

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Inhibitory angiogeneze v terapii nádorových onemocnění

Eva Papáčková

Bakalářská práce

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Angiogenesis inhibitors in cancer treatment

Eva Papáčková

Bachelor work

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Papáčková**
Osobní číslo: **C13368**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Inhibitory angiogeneze v terapii nádorových onemocnění**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Angiogeneze a její úloha v růstu nádoru. Mechanismy angiogeneze u nádorů - angiogenní kaskáda, angiogenní a antiangiogenní faktory.
2. Inhibitory angiogeneze - rozdělení, charakteristika, mechanismus působení. Léčebné možnosti ovlivnění průběhu nádorových onemocnění pomocí inhibitorů angiogeneze.
3. Zhodnocení terapeutického potenciálu inhibitorů angiogeneze u nádorových onemocnění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.


Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Karel Královec, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

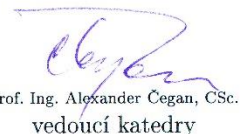
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14. 6. 2017

Eva Papáčková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu RNDr. Karlovi Královcovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc a rady, které mi pomohly při zpracování bakalářské práce, dále za jeho trpělivost, ochotu a poskytnutý materiál.

Anotace:

Tématem bakalářské práce jsou inhibitory angiogeneze v terapii nádorových onemocnění. První část práce se zaměřuje na pojem angiogeneze a nádorová angiogeneze. Podává přehled o angiogenních a antiangiogenních faktorech a o mechanismech nádorové angiogeneze. Druhá část práce se zabývá rozdělením, charakteristikou, mechanismem působení a využitím inhibitorů angiogeneze v protinádorové terapii. Jsou zde také detailně popsány tři nádorová onemocnění (renální karcinom, kolorektální karcinom, glioblastom), u kterých jsou léčebnou možností právě inhibitory angiogeneze. V poslední části je pak zhodnocen terapeutický potenciál těchto inhibitorů u nádorových onemocnění.

Klíčová slova:

angiogeneze, inhibitory, nádor, léčba

Annotation:

The topic of the bachelor thesis is angiogenesis inhibitors in cancer treatment. The first part of the thesis focuses on the concept of angiogenesis and tumor angiogenesis. It provides an overview of angiogenic and antiangiogenic factors and mechanisms of tumor angiogenesis. The second part of the thesis deals with the classification, characterization, mechanism of action and utilization of inhibitors of angiogenesis in antitumor therapy. Three tumor diseases (renal carcinoma, colorectal carcinoma, glioblastoma) are described in detail in which the angiogenesis inhibitors are the treatment option. The last part evaluates the therapeutic potential of these inhibitors in tumor diseases.

Key words:

angiogenesis, inhibitors, tumor, treatment

Obsah

1	ÚVOD	13
2	ANGIOGENEZE	14
2.1	Mechanismus fyziologické angiogeneze.....	14
2.2	Angiogenní faktory	16
2.2.1	VEGF „rodina“	17
2.2.2	FGF.....	19
2.2.3	HGF	19
2.2.4	Angiopoetiny	19
2.2.5	TNF- α	20
2.2.6	MMP.....	20
2.2.7	PD-ECGF a PDGF	20
2.2.8	TGF- α a EGF.....	20
2.3	Antiangiogenní faktory	21
2.3.1	Angiostatin	21
2.3.2	Endostatin	21
2.3.3	Trombospondin.....	22
2.3.4	Inhibitory proteolýzy	22
2.3.5	TGF- β	22
2.3.6	PF-4	22
2.3.7	Interleukiny.....	22
3	ANGIOGENEZE U NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ.....	23
3.1	Mechanismus nádorové angiogeneze.....	23
3.2	Stimulace nádorové angiogeneze.....	24
3.2.1	Mutace Von Hippel Lindauova genu	25
3.2.2	Aktivace kaskády ang-TIE2	26
3.2.3	Cyklooxygenázy	27
3.2.4	NO a NO-syntáza	27
4	INHIBICE ANGIOGENEZE V PROTINÁDOROVÉ LÉČBĚ.....	28
4.1	Přirození antagonisté angiogeneze.....	28
4.1.1	ABT-510 (thrombospondin mimetic peptid – TSP-1).....	28
4.1.2	PF-4	29
4.2	Blokáda angiogenních faktorů	29
4.2.1	Inhibice signální dráhy VEGF-VEGFR	29

4.2.2	Stabilizace bazální membrány	30
4.2.3	Inhibice endotelové proliferace	31
4.3	Monoklonální protilátky.....	32
4.3.1	Bevacizumab (avastin®)	32
4.3.2	Cetuximab (Erbix®).....	34
4.4	Nízkomolekulární protilátky	35
4.4.1	Inhibitory receptorových tyrozinkináz	35
4.4.2	Inhibitory COX-2	38
4.5	Inhibitory mTOR.....	39
5	LÉČEBNÉ MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ PRŮBĚHU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ POMOCÍ INHIBITORŮ ANGIOGENEZE	39
5.1	Renální karcinom	41
5.2	Kolorektální karcinom	45
5.3	Glioblastom	48
6	TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL INHIBITORŮ ANGIOGENEZE U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	50
7	ZÁVĚR	51
8	POUŽITÁ LITERATURA	52

Seznam zkratek

ANG	angiopoetin
CAI	karboxyamidotriazol
CK	kreatin kináza
COX	cyklooxygenáza
CRC	kolorektální karcinom
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
fVIII	antihemofilický faktor
FGF	růstový faktor fibroblastů
FLT	fetální jaterní receptor tyrozinkinázy 3
GBM	Glioblastom multiforme
HCC	hepatocelulární karcinom
HGF	růstový faktor hepatocytů
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula
IFN	interferon
IL	interleukin
KIT	receptor faktoru kmenových buněk
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
mCRC	metastazující kolorektální karcinom
MMP	matrix metaloproteázy
mRCC	metastazující renální karcinom
MVD	mikrovaskulární denzita
NO	oxid dusnatý
NO-syntáza	syntáza oxidu dusnatého
OS	celkové přežití
PAI	inhibitor aktivace plazminogenu
PD-ECGF	destičkový růstový faktor endotelových buněk
PDGF	destičkový růstový faktor
PDGFR	receptor destičkového růstového faktoru
PF-4	destičkový faktor 4

PFS	přežití bez progresu
PGE2	prostaglandin E2
PIGF	placentární růstový faktor
PLC- γ	fosfolipáza C
RCC	renální karcinom
SCF	faktor kmenových buněk
TAF	nádorové faktory angiogeneze
TGF	transformující růstový faktor
TIMP	tkáňový inhibitor matrixmetaloproteinazy
TNF- α	faktor nekrotizující nádory
TSP-1	trombospondin 1
TTP	doba do začátku progresu onemocnění
VEGF	cévní endotelový růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

1 ÚVOD

Bakalářská práce se zabývá inhibitory angiogeneze v terapii nádorových onemocnění. Nádorovým onemocněním různého typu trpí celosvětově 22,4 miliónu osob. V roce 2000 zemřelo přes 6,2 miliónu osob následkem nádorových onemocnění. V posledních letech se znalosti o prevenci a léčbě onkologických onemocnění značně rozšířily.

Významným avšak negativním prognostickým faktorem podílejícím se na růstu nádoru a metastazování je angiogeneze neboli novotvorba cév. Růst nádoru a jeho vývoj závisí na přísunu živin a kyslíku prostou difuzí. Pokud nádor překročí velikost 2 mm, dostává se nádor do hypoxie a dochází tak k tvorbě vlastního cévního zásobení. Tím se umožní jeho další růst a metastazování.

Nádorová angiogeneze je několikastupňový komplexní proces ovlivněný proangiogenními a antiangiogenními faktory. Inhibice angiogeneze má v dnešní době velký terapeutický potenciál v protinádorové léčbě, jehož cílem je potlačení abnormálních signálních dráh, které vedou k narušení rovnováhy mezi faktory. Principem antiangiogenních látek v terapii nádorů je inhibice angiogenních faktorů, endotelová proliferace a stabilizace bazální membrány.

Cílem bakalářské práce je podat přehled o nádorové angiogenezi, inhibitech angiogeneze a o možnostech využití inhibitorů angiogeneze v terapii nádorových onemocnění.

2 ANGIOGENEZE

Termín angiogeneze popisuje novotvorbu cév, jde o fyziologickou vlastnost všech vyšších organismů, při které se nově vytvořené kapiláry formují již z existujících cév. Vyžaduje vzájemné působení různých buněčných populací, extracelulární matrix, růstových faktorů a cytokinů [1,2].

Tato tzv. neovaskularizace následuje vaskulogenezi, což je proces vývoje cév z endoteliálních prekurzorů. Uplatňuje se při tvorbě primitivních embryonálních cév a také u novotvorby cév nádoru. To způsobují cirkulující endoteliální prekurzory, jejichž rychlou pohotovost působí faktory, které mají také důležitou roli v angiogenezi [3,4].

Proces novotvorby cév může být fyziologický, kam se řadí vývoj embrya, hojení ran a zlomenin, změny v endometriu a ovariích v průběhu menstruačního cyklu. Dále se setkáváme i s různými odchylkami, kdy dochází k patologiím, především u chronického zánětu, revmatoidní artritidy a při vzniku retinopatie. V posledních letech je pak angiogeneze středem zájmu hlavně v onkologii, kdy její působení ovlivňuje celkově patogenezi nádorových procesů, tedy i jejich metastazování [1,2,5,6]. Tento vliv byl popsán už na konci minulého století a byla vyslovena hypotéza, že by anti-angiogenní léčba mohla působit proti nádorově [7].

2.1 Mechanismus fyziologické angiogeneze

Mechanismus angiogeneze probíhá kaskádovitě, jde tedy o složitý víceetapový proces (Obr. 1), který je regulován působením jak hormonálních látek (cytokiny, integriny), tak adhezních molekul, proteolytických enzymů a nízkomolekulárních látek [8].

Podle Klenera se angiogenní kaskáda dělí na 3. etapy, ve kterých dochází k morfologickým změnám: disoluce bazální membrány, proliferace a migrace endotelií a morfogeneze nové cévy [5,9]. Vše probíhá pod vlivem angiogenních a antiangiogenních faktorů, které jsou za fyziologických podmínek v rovnováze (Tab. 1), [5,9,11]. Ztráta rovnováhy mezi stimulatory a inhibitory se projeví poruchou, jejíž charakter závisí na tom, která ze skupin regulátorů nabyla vrchu [5].

etapa kaskády	proces	stimulátory	inhibitory
1	zvýšení permeability	VEGF	trombospondin
	disoluce bazální membrány	matrixmetaloproteázy	TIMP, PAI
	porušení mezibuněčných spojů	TGF, angiogenin	angiostatin, endostatin
2	proliferace endotelií	VEGF	INF- α , INF- β
	migrace endotelií	integriny, IL-6, IL-8	PF-4, IL-12, TGF- β
3	morfogeneze nové cévy	angioepoetiny	vazostatin
	adheze a formace lumina	E-cadherin	tumstatin
	proliferace fibroblastů	FGF, PD-ECGF	TIMP
	syntéza kolagenu, maturace	EGF	

Tab. 1: Schéma angiogenní kaskády s podílejícími se faktory, upraveno dle [9].

- **disoluce bazální membrány (iniciální fáze)**

Kdy nejdříve dojde k rozšíření cév, protahováním tvaru endotelových buněk je narušena bazální membrána, jak mechanicky, tak i působením proteolytických enzymů, matrixmetaloproteáz [5,9]. Účinkem angiogenních faktorů, především cévního endotelového růstového faktoru (VEGF) se zvyšuje permeabilita membrány. Díky její zvýšené propustnosti uniká fibrinogen s plazminogenem z cévy. Fibrinogen se mění vlivem tkáňových faktorů na fibrin, jehož fibrinová vlákna tvoří matrici pro růst nových cév, a plazminogen na plazmin, který se také podílí na rozkladu membrány a částečné degradaci extracelulární matrix [5,10,11]. Od bazální membrány se oddělují podpůrné buňky zvané pericyty. Potlačením faktorů antiangiogenních (trombospondin, angiostatin, endostatin) je umožněna aktivita angiogenních faktorů [9].

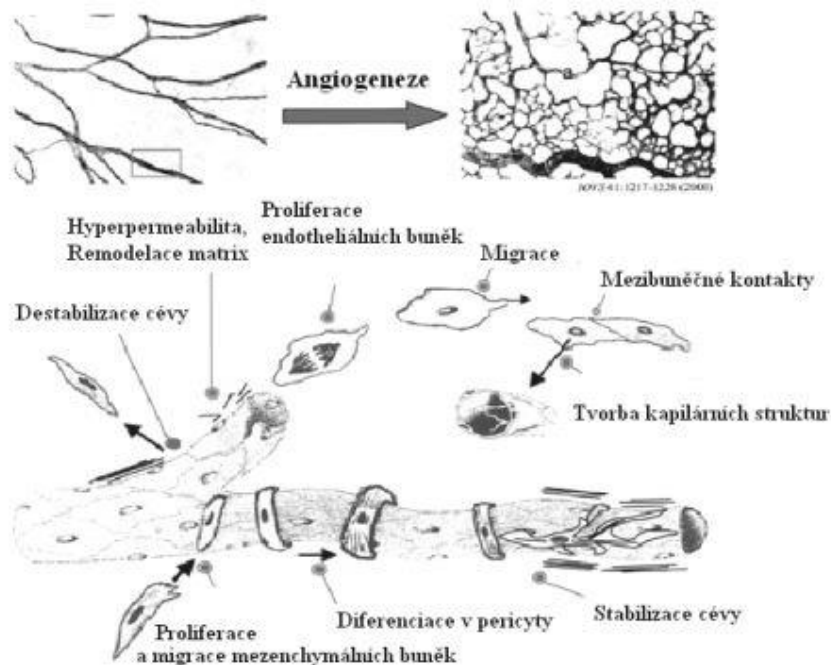
- **proliferace a migrace endotelií**

Výše uvedené kroky jsou stimulovány angiogenními faktory. Endotelové buňky ve velkém množství proliferují, vytvářejí se na povrchu cév útvary připomínající pupeny. Po uchycení endotelů díky schopnosti pohybu na síti fibrinových vláken vzniká novotvořená céva [9,11,12].

- **vlastní morfogeneze nové cévy**

Takto nový základ cévy se stabilizuje, vytváří se další mezibuněčné spojení. Nejdříve se musí aktivovat pericyty, pak se vytváří se nová bazální membrána a lumen cévy [5,9]. Dochází k velké proliferaci fibroblastů a syntéze kolagenu za účinku transformujícího

růstového faktoru (TGF- α) a destičkového růstového faktoru endotelových buněk (PD-ECGF). V takto nové cévě vznikají transluminální můstky, které můžou za rozdělení proudu krve do kanálků, ty se dále dělí a formují další dceřiné kapiláry [9,13].



Obr. 1: Mechanismus fyziologické angiogeneze, upraveno dle [13].

2.2 Angienní faktory

Fyziologické angiogeneze se účastní celá řada faktorů, souhrn nejdůležitějších faktorů je pro lepší přehled uveden v tabulce č. 2. Někdy bývají označeny pod souhrnným názvem jako nádorové faktory angiogeneze (TAF) [14]. Dochází k jejich stimulaci různými mechanismy v angienní kaskádě [9,14].

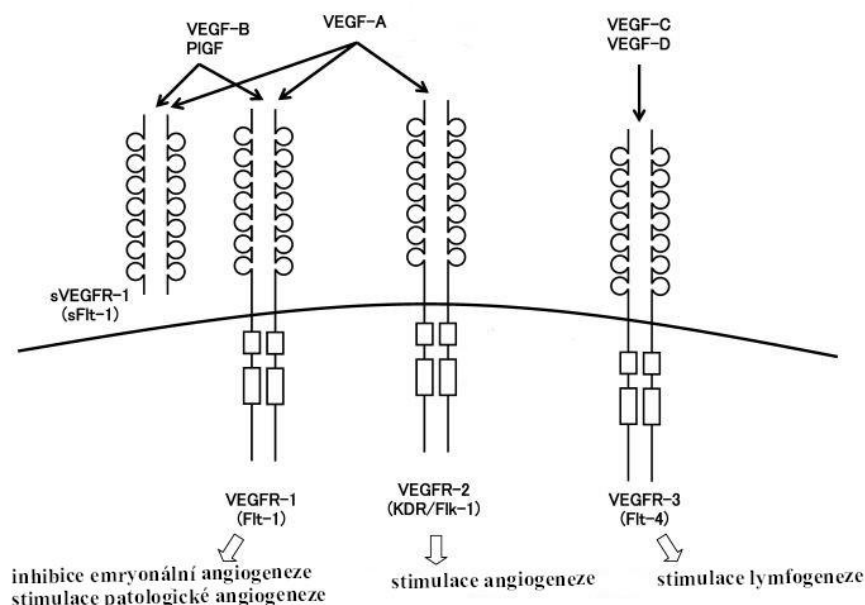
angiogenní faktor	mechanismus účinku
rodina VEGF (VEGF A-E, PGF)	indukce proliferace endotelií zvýšení permeability bazální membrány
FGF (acidický/bazický)	mitogenní účinek na endotelie
HGF	morfogeneze nové cévy
MMP	proteolýza bazální membrány a extracelulární matrix
angiopoetiny	komplexní antiangiogenní účinky, omezení expresse adhezních molekul, aktivace pericytů
PDGF	stimulace a proliferace fibroblastů a produkce kolagenu
PD-ECGF	usnadnění migrace endotelií
TNF- α	aktivace MMP
EGF	nepřímé účinky, stimulace výdeje VEGF
TGF- α	nepřímé účinky, stimulace výdeje VEGF
interleukiny (IL-1,IL-6,IL-8)	stimulace mitogeneze a migrace endotelií
integriny	usnadnění migrace buněk

Tab. 2: Významné angiogenní faktory a jejich funkce, upraveno dle [5].

2.2.1 VEGF, „rodina“

Rodina VEGF spolu s jejich receptory jsou důležitými regulátory angiogeneze a vaskulární permeability. Do této tzv. rodiny se řadí 6 typů: VEGF-A, B, C, D, E (Obr. 2) a placentární růstový faktor (PlGF), který je s VEGF homologní [15]. Každý z těchto proteinů obsahuje signální sekvenci, která je štěpena během biosyntézy. Alternativní sestřih odpovídajícího pre-mRNA vytváří pak ještě další isoformy od VEGF [16,17].

VEGF je dimerický glykoprotein s 8 cysteinovými zbytky (Obr. 2), uvolňuje se hlavně z fibroblastů, z nádorových buněk pak při patologiích [9]. Tento signální glykoprotein podporuje růst nových krevních cév. Pokud dojde k ohrožení krevního oběhu, buňky a tkáně jsou zbaveny oksyložené krve a díky mechanismu, jehož je VEGF součástí, se obnoví tak přívod krve [16]. VEGF vytváří vazbu se specifickými receptory, které jsou umístěny na membráně endotelových buněk. Po zprostředkování vazby mezi faktorem a jejím příslušným receptorem se aktivuje receptorová tyrosinkináza v intracelulární doméně receptoru. Takto aktivovaná tyrosinkináza spouští transdukční kaskádu a dochází ke zvýšené proliferaci, migrace se usnadňuje a permeabilita se fosfolipázovou cestou také zvyšuje [9,18,19].



Obr. 2: Druhy VEGF s příslušnými receptory a jejich funkce, upraveno dle [20].

VEGF-A vytváří nové cévy během embryonálního vývoje, působí vazodilataci a napomáhá mobilizaci buněk makrofágů a granulocytů. VEGF-B přispívá k tvorbě svalové tkáně v srdci, v důsledku tvorby nové cévy u embryonálního vývoje [21]. Dále má klíčovou roli v ochraně nových krevních cév, neuronů v mozkové kůře a sítnice. VEGF-C způsobuje lymfogenezi, uplatňuje se v cévním endoteliálním buněčném růstu. VEGF-D vytváří nové lymfatické cévy, nejvíce v plicích. VEGF-E reguluje funkci keratinocytů a tím přispívá k regeneraci epidermální (kůže). PIGF má úlohu v zánětlivých procesech, podporuje patologické angiogeneze v dospělosti a poskytuje terapeutickou úlevu od ischemické choroby srdeční [5,9].

Existují 3 receptory protein-tyrosinkináz pro rodinu VEGF ligandů (Obr. 2): VEGFR-1 (Flt-1), který je exprimován na hematopoetických kmenových buňkách, VEGFR-2 (Flk-1/KDR), jenž je vylučován na buňkách cévního endotelu a lymfatických endoteliálních buňkách, a VEGFR-3 (Flt-4), který se nachází pouze na lymfatických endoteliálních buňkách a váže se na VEGF-C a VEGF-D [16, 22, 23]. Dále existují i dva neenzymatické receptory: neuropilin-1, neuropilin-2. Navíc některé ligandy VEGF se vážou na heparan sulfát-proteoglykany (HSPGs), které jsou na plasmatické membráně a v extracelulární matrix [16]. Vazbou VEGF na VEGFR-1 (Flt-1) dochází ke stimulaci proliferace a migraci endotelií. Vazba na VEGFR-2 (Flk-1/KDR) způsobí zvýšení cévní permeability a blokuje apoptózu endotelií [9, 23].

2.2.2 FGF

Růstový faktor pro fibroblasty patří mezi další stimulatory angiogeneze, důležitou roli hraje v růstu krevních cév, podporuje hojení ran, růst a obnovu tkání. Dělí se na 2 formy a to acidickou (aFGF) a bazickou (bFGF). Oba mají výrazný mitogenní účinek na endotelové buňky, dále blokují apoptózu, podobně jako VEGF navázaný na VEGFR-2, ale u FGF je podstatou zvýšení exprese proteinu bcl-2 [5, 7, 24]. Jejich vazba na heparansulfát proteoglykanu v bazální membráně cévy způsobuje silnou afinitu k heparinu. Dochází k jejich uvolňování z makrofágů, aktivovaných T-lymfocytů a nádorových buněk, byla prokázána jak autokrinní, tak parakrinní sekrece endotelovými buňkami [24]. Podnět pro toto uvolnění nebyl do dnes zcela obeznámen [5].

2.2.3 HGF

Buňky mezodermálního původu (fibroblasty, makrofágy, endotelie) produkují růstový faktor hepatocytů (HGF), zvaný též scattered factor [9]. Ten působí jako multifunkční cytokin na epiteliálních buňkách. Je vylučován jako jeden inaktivní polypeptid, ten je štěpen serinovým proteázami do α -řetězce a β -řetězce. Disulfidová vazba mezi řetězci vytváří aktivní heterodimerní molekulu (Obr. 3). Uplatňuje se v angiogenezi, tumorogenezi a regeneraci tkání [25]. Jeho funkcí je stimulace proliferace jaterních buněk, keratinocytů a endotelií [5].



Obr. 3: Struktura HGF proteinu [26].

2.2.4 Angiopoetiny

Do této skupiny se řadí angiopoetin-1 (ANG-1), angiopoetin-2 (ANG-2), angiogenin a angiotropin. Jejich funkcí je usnadňování vzájemných kontaktů endotelií a usnadnění vazby k buněčné membráně. V neposlední řadě způsobují aktivitu pericytů, které mají schopnost

stabilizace u nově vytvořené cévy a působí maturaci cév. ANG-1 a ANG-2 na sebe vážou receptor TIE-2, jehož exprese je ve větší míře v lymfatických cévách [9, 27]. Vlivem angiogeninu, který stimuluje endotelové buňky, dochází k tvorbě prostacyklinu. Brání také tvoření adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1) [5].

2.2.5 TNF- α

Faktor nekrotizující nádory, někdy nazýván kachektin, se v procesu novotvorby cév uvolňuje z makrofágů a aktivovaných monocytů. Jde o homotrimerický protein o 157 aminokyselinách. Váže se na TNF receptor (cytokin). Po navázání TNF ligandu způsobí apoptózu. Proto se označuje jako jeden z receptorů smrti [28]. Má vliv na degradaci bazální membrány jako aktivátor matrix metaloproteázy (MMP). Stimuluje výdej interleukinu-1 (IL-1) a adhezních molekul (ICAM-1). Může působit i v opačném smyslu. Ve vysokých koncentracích vyvolává koagulaci uvnitř cév. Cévy se uzavřou a nastává nekróza nádoru [5].

2.2.6 MMP

Matrix metaloproteázy se řadí do skupiny enzymů, působí proteolyticky na bazální membránu endotelií, extracelulární matrix. Zvyšují propustnost cévy a vytváří místo pro novou cévu. Přispívá k mobilitě endotelií a invazi nádorových buněk do cév [5, 27].

2.2.7 PD-ECGF a PDGF

Destičkový růstový faktor endotelových buněk (PD-ECGF) se vyznačuje vysokou afinitou k endotelu. Nachází se v lymfatických uzlinách, periferních lymfocytech, ve slezině, plicích, játrech a v děložním endometriu. Účinkuje chemotakticky a usnadňuje migraci endotelií [29]. Destičkový růstový faktor (PDGF) patří mezi látky navozující mitózu. Jeho vlivem dochází k proliferaci fibroblastů, produkci kolagenu, zároveň zvyšuje jeho syntézu. Podílí se na formování nového lumen cévy [30].

2.2.8 TGF- α a EGF

Transformující růstový faktor (TGF) spolu s epidermálním růstovým faktorem (EGF) mají nepřímý účinek. Jejich úloha je především ve stimulaci proliferace a výdeje VEGF [5].

2.3 Antiangiogenní faktory

Jak již bylo řečeno, angiogenní faktory jsou v rovnováze s antiangiogenními [5,9]. Obě skupiny se tedy podílejí na udržení angiogeneze. Pro lepší přehled jsou důležité antiangiogenní faktory uvedeny v tabulce č. 3. Antiangiogenní faktory se řadí mezi inhibitory angiogeneze.

antiangiogenní faktor	mechanismus účinku
angiostatin	inhibice endoteliální proliferace
endostatin	indukce apoptózy endotelií
trombospondin	inhibiční protein komplexní antiangiogenní účinky
TGF- β	omezení proliferace zvýšení produkce trombospondinu
interferon- α a β	inhibice endotelové proliferace
PF-4	chemokin inhibice proliferace endotelií
interleukiny (IL-12, IL-18)	inhibice migrace endotelií
<i>inhibitory proteolýzy</i> TIMPs PAI	inhibice proteolytických enzymů (MMP) inhibice tvorby plazminu

Tab. 3: Přehled antiangiogenních faktorů s mechanismem účinku, upraveno dle [5].

2.3.1 Angiostatin

Jde o polypeptid o 200 aminokyselinách. K jeho produkci dochází štěpením plazminogenu. Obsahuje několik fragmentů, které inhibují migraci endoteliálních buněk a proliferaci in vitro [31]. Zvýšená koncentrace E-selektinu v endoteliích podporuje jejich adhezi [5].

2.3.2 Endostatin

Endostatin je produkt odštěpený od kboxyl-koncové domény kolagenu XVIII. Původně byl objeven v upraveném médiu z myší endotelové buněčné linie. Inhibuje endoteliální buněčnou migraci in vivo, in vitro, indukuje apoptózu endotelií spolu s angiostatinem [32, 33].

2.3.3 Trombospondin

Protein interagující s extracelulární matrix. Produkují ho fibroblasty, pod dohledem supresorového genu p53. Pokud dojde k mutaci tohoto genu, koncentrace proteinu se snižuje a angiogenní faktory se tak stávají aktivní [5].

2.3.4 Inhibitory proteolýzy

Produkovány klidovými endotelovými buňkami. Řadí se mezi ně inhibitory metaloproteáz (TIMPs), které způsobují inhibici MMP, a inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI), který brání tvorbě plazminu. Obecně inhibitory proteolýzy brání fragmentaci bazální membrány [5].

2.3.5 TGF- β

Malé proteiny se 112 aminokyselinami se stejnou funkcí jako cytokiny. Jsou vylučovány fibroblasty, trombocyty, monocyty, chondrocyty a osteoblasty. Existují ve 3 typech (TGF- β 1,2,3) s příslušnými receptory ze skupiny serin/threonin kináz [34]. Zabraňuje odpovědi imunitního systému a snižuje tvorbu superoxidových radikálů. Zvyšují produkci trombospondinu, působí inhibici proliferace a migrace endotelových buněk a vyvolává apoptózu. Zároveň je antagonistou EGF, stabilizuje bazální membránu [5, 35, 36].

2.3.6 PF-4

Destičkový faktor 4 je malý cytokin patřící do CXC chemokinů. Nachází se v α -granulích trombocytů. Má vysokou afinitu k heparinu a tím podporuje krevní srážlivost. Brání vazbě FGF na receptory a tím i proliferaci endotelů indukovanou VEGF [5, 37].

2.3.7 Interleukiny

Angiogenezi ovlivňují také cytokiny. IL-1 stimuluje mitogenezi a expresi endotelových aktivačních markerů, IL-6 působí na migraci nádorových buněk, IL-8 usnadňuje migraci endotelů, naopak IL-12 s IL-18 potlačují tuto migraci. IL-1 společně s IL-8 stimulací makrofágů podporují výdej angiogenních faktorů a tak i nepřímo celý proces angiogeneze [12].

3 ANGIOGENEZE U NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

Angiogeneze má klíčový význam v růstu nádoru a jeho metastazování. Rakovina má schopnost se šířit do sousedních a vzdálených orgánů. Nádorové buňky mohou proniknout do krve nebo lymfatických cév, cirkulovat skrz intravaskulární proud a množit se tak na jiném místě. Růst cévní sítě je tedy velmi důležitý pro šíření metastáz. Jak angiogeneze tak i lymfogeneze mají tedy zásadní roli při tvorbě nové cévní sítě. Tento fakt je znám už od roku 1971 [7]. Pokud tedy nejsou angiogenní faktory v rovnováze s antiangiogenními, angiogeneze je ještě více stimulována a dochází ke vzniku nádorové angiogeneze.

Důkaz, že angiogeneze souvisí také s tvorbou nádorů, objasnil Weidner. Při histologickém studiu použil imunohistochemickou techniku pro znázornění cév u karcinomu prsu. Pomocí fVIII spočítal cévy v místě nejhustějšího zásobení nádoru. Poukázal tak na významnou souvislost angiogeneze s metastickým postiženým lymfatických uzlin [38].

Další studie prokázala, že lidé trpící Downovým syndromem naopak nejsou tak ohroženi vznikem nádoru. Gen DSCR1, lokalizovaný na 21 chromozomu kóduje protein, který způsobuje negativní regulaci signální kaskády VEGF-calcineurin-NFAT. V místě zvýšené koncentrace VEGF dochází ke snížení hustoty kapilár [39].

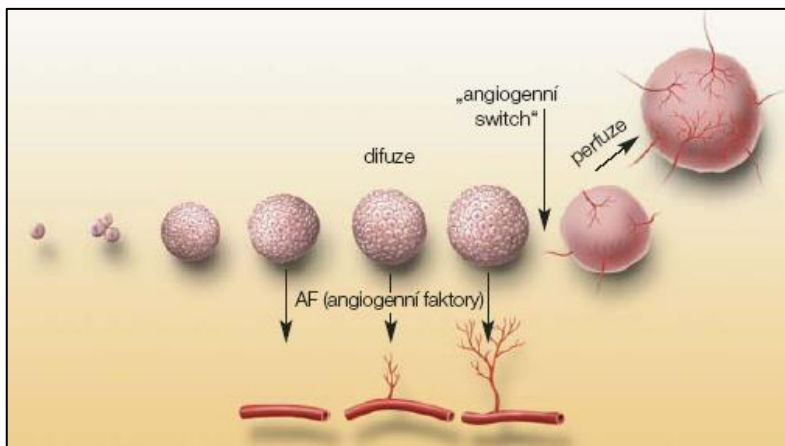
Nedávné údaje naznačují, že některé nádorové buněčné linie se mohou vyjadřovat angiogenními růstovými faktory a receptory. Byla potvrzena exprese VEGF, Flk-1 a Flt-1 v různých lidských nádorových buňkách neendotelového původu. Jednalo se o melanom, karcinom vaječníků, slinivky a prostaty. Znečitlivující činidla nebo protilátky proti těmto faktorům vedla k inhibici růstu nádoru in vitro [40].

3.1 Mechanismus nádorové angiogeneze

V dospělosti je angiogeneze vysoce potlačena, pouze u 0,01% endotelových buněk probíhá dělení. Většina nádorů perzistuje in situ bez známek novotvorby cév měsíce až roky. Fyziologické procesy jsou pozměněny, pokud se nádor pokouší o růst nových kapilár. Rostoucí nádor potřebuje ke svému růstu přísun kyslíku a živin, má schopnost tvořit nové cévy, díky tomu se nádorové buňky pak mohou dostat přes oběh do orgánu a zde metastázovat [9].

Vlivem prosté difuze je nádorové ložisko schopno dosáhnout maximálního rozměru 1-2mm³, to odpovídá přibližně 106 buňkám [12]. Tato nutrice zajišťovaná difuzí je nedostatečná. Hypoxický nádor vede ke genové nestabilitě a vznikají mutace, které potlačují antiangiogenní faktor trombospondin. Zvyšují se růstové proangiogenní faktory, v důsledku kumulace HIF- α

(hypoxii vyvolávající faktor). Tato změna se označuje jako tzv. „angiogenní switch“ (Obr. 4), kdy se nádorový růst přesouvá z avaskulární fáze do vaskulární a je tak zahájen proces patologické angiogeneze [12, 41, 42]. Buňky díky tomuto přepnutí mohou zvětšit svůj objem nádoru nad 2mm^3 , zrychluje se růst, invazivita a metastazování. Endotelie migrují k nádorovému ložisku v důsledku poškození bazální membrány proteolytickými enzymy nádorových buněk. Únikem fibrinogenu a plazminogenu z cévy vzniká nová matrice pro růst novotvořené cévy [27, 43].



Obr. 4: Mechanismus angiogeneze nádoru [9].

Nádorem postihnuté cévy jsou nevyzrálé, neuspořádané, směřují do všech stran, jsou pokroucené, mají neúplnou bazální membránu, pericyty se vyskytují v malém množství nebo úplně chybí. Endoteliální buňky se náhodně sdružují, rychleji prolifерují, více odolávají apoptickým stimulům. Nacházíme u nich i cytogenetické abnormality (aneuploidita, abnormální centrozomy) [27]. Zvyšuje se tlak v nádoru v důsledku zvýšené permeability a nekontrolované proliferace nádorových buněk, může to být hlavně problém při léčbě léky, kdy je omezen jejich průnik k nádoru [1, 27]. Zvýšený tlak také způsobuje vznik abnormálního mikroprostředí nádoru. Nádor není dostatečně zásobován krví, je omezen průtok, dochází k hypoxickým nekrotickým, angiogeneze je dále stimulována [43]. Je tedy zřejmé, že pokud se zasáhne do těchto mechanismů spínačů angiogeneze, může se pozitivním způsobem ovlivnit léčba nádorového onemocnění.

3.2 Stimulace nádorové angiogeneze

Mezi nejúčinnější aktivátory a stimulanty angiogeneze se řadí hypoxie. Nedostatek kyslíku je běžným znakem nádorových tkání. Objevuje se u časného růstu nádoru. Hlavní

funkcí hypoxie je regulace exprese skupiny genů, především genu pro VEGF. Zvyšuje tedy jeho hladinu a tím přispívá k další stimulaci angiogeneze [44].

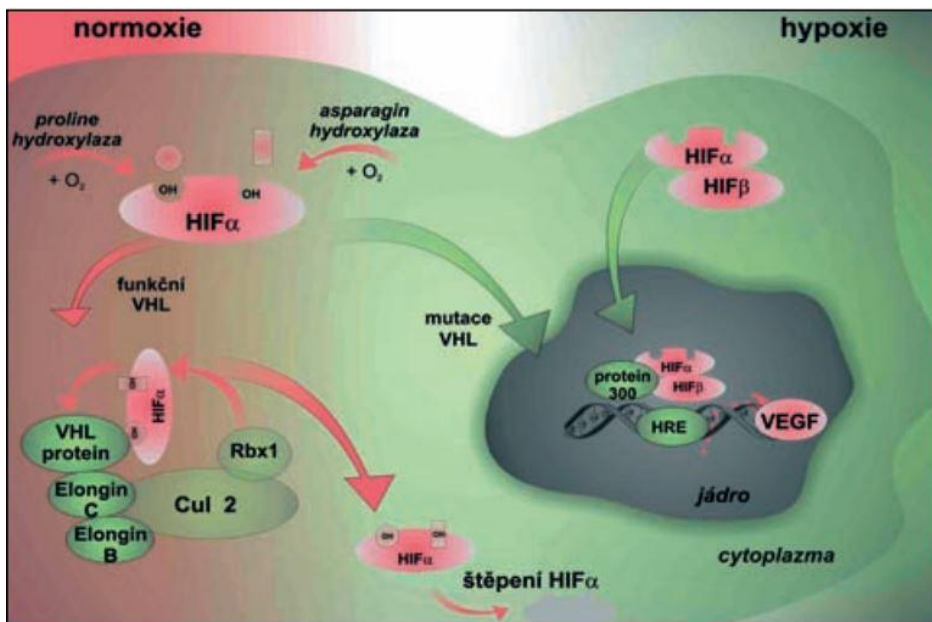
Klíčovou roli v reakci na hypoxii hraje mediátor HIF-1 (hypoxií indukovaný faktor). Tento transkripční faktor je tvořen 2 podjednotkami: HIF- α a HIF- β . Oba jsou závislé na koncentraci kyslíku, a jsou velmi nestabilní za normoxických podmínek. HIF1- α vzrůstá s klesající koncentrací kyslíku, zatímco HIF1- β naopak [45]. Aby došlo ke stimulaci angiogeneze, musí se nejdříve stabilizovat hypoxický transkripční komplex. HIF-1 se naváže na geny a vznikne genová sekvence zvaná hypoxia response element (HRE). Tento element je obsažen například v VEGF nebo COX-2 [45, 46].

3.2.1 Mutace Von Hippel Lindauova genu

Důležitou roli v angiogenezi hraje Von Hippel Lindaurův gen (VHL gen). Tento gen způsobuje autosomálně dominantní onemocnění zvané Von Hippel-Lindau choroba. Při narušení regulace angiogeneze dochází k jeho mutaci a stoupá proces nádorové angiogeneze. VHL tumor – suprimující gen byl lokalizován na 3p25-26 chromozomu a je tvořen 3 axony [47]. Při mutaci tohoto genu stoupá citlivost buněk na hypoxii. Delece alely VHL genu byla dokázána u 84-98% sporadických renálních karcinomů. Mutace zbývající alely byla prokázána u 34-57% světlobuněčných renálních karcinomů [48]. Inaktivace genu VHL může být způsobena i metylací cytosinu a guaninu v DNA (5-19% světlobuněčných renálních karcinomů) [49]. 5-30% hemangioblastomů mozečku vzniká v souvislosti s VHL [50].

Aby se HIF- α mohl navázat na VHL protein, musí dojít k hydroxylaci prolinového konce HIF- α . Dále hydroxylace asparaginových zbytků blokuje vazbu HIF- α s transkripčním koaktivátorem p300. Početná hydroxylace inhibuje HIF- α aktivitu (Obr. 5) [51]. Za normoxických podmínek je HIF- α na prolinových koncích hydroxylován prolinovou hydroxylázou a na asparaginovém konci asparaginovou hydroxylázou. První uvedený způsob hydroxylace zajistí vazbu HIF- α s VHL proteinem. Tato vazba pak potencuje odbourávání HIF- α proteasomovou cestou. Zatímco druhý způsob blokuje vazbu HIF- α transkripčním koaktivátorem p300. VHL protein se vážně přes Elongin B a C na Cul 2 protein (protein cullinových ligáz). RING-box protein zde působí jako ubiquitin transferáza pro VHL skp-cullin-F-box protein (SCF komplex). Pokud VHL protein chybí, dochází k hromadění HIF- α , protein vytváří heterodimery s HIF- α , aktivuje transkripci HERs (element zodpovědný za hypoxii), který je součástí genů kódujících VEGF. Při hypoxii se HIF- α nehydroxyluje, tedy VHL protein se nenaváže. Jak chybění proteinu, tak hypoxie vedou ke stimulaci nádorové

angiogeneze prostřednictvím zvýšení VEGF [52]. Ubikvitinový řetězec ztrácí schopnost označit protein HIF- α , nedochází tak k jeho degradaci v proteazomu. Přebytek HIF- α způsobí přepis genů anaerobní glykolýzy, erythropoetinu, VEGF spolu s jejich receptory. Zvýšená aktivita HIF- α byla zjištěna u aktivace kaskád MAPK kináz, fosfatidylinositol-3-kinázy nebo proteinkinázy C [1, 47, 53].



Obr. 5: Proces hydroxylace a inhibice HIF- α aktivity [47].

3.2.2 Aktivace kaskády ang-TIE2

Mezi další stimuly nádorové angiogeneze patří aktivace kaskády angiopoetin-TIE2. Angiopoetin2 (ANGPT1) se uvolňuje z endotelových buněk při stimulaci nádorovými buňkami. Za jeho nadměrnou tvorbu je zodpovědná zvýšená aktivace inzulinové signalizace, kaskády VEGFR a PDGFR v nádorových buňkách. Ang-TIE2 kaskáda má dva protichůdné účinky. Zvyšuje hypervaskularizaci nádoru a naopak za jiných podmínek může růst nádorových buněk potlačovat a zvyšovat jejich apoptózu. Tyto podmínky však dosud nebyly zcela definovány. Proto také nelze říci, zda vyšší koncentrace jak ANGPT1, tak ANGPT2 má vliv na pozitivní prognózu u nádorů plic, ledvin nebo prsu. Studie prokázaly, že ANGPT1 zlepšil prognózu u pacientů s nádory hlavy a krku. Avšak vyšší koncentrace ANGPT2 u akutní myeloidní leukémie, hepatocelulárního karcinomu, nádorů plic, ovaríí s neuroendokrinními nádory se stupňovala a ukazovala na zhoršení stavu pacientů [1].

3.2.3 Cyklooxygenázy

Cyklooxygenáza (COX) je enzym zajišťující přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny a tromboxany. Existují 2 izoformy: COX-1 a COX2. COX-1 (konstitutivní forma) zodpovídá za produkci prostaglandinů. Při nedostatku této formy dochází k negativním účinkům u zažívacího traktu a ledvin. COX-2 (indukovatelná forma) je přítomna v místě zánětu a tak i spojována se zvýšenou angiogenezí v místě nádoru (kolorektální karcinom). Zvýšená exprese této formy byla nalezena i v mozku, působí tak na CNS. Nedostatek se projevuje hlavně v poruchách funkce ledvin [54]. V buňkách kolorektálního karcinomu zvyšuje proangiogenní faktory VEGF, PGE2. PGE2 pomáhá přežít nádorovým buňkám, stimuluje proliferaci a migraci buněk. Hypoxie spolu s HIF1- α reguluje COX-2 [46].

3.2.4 NO a NO-syntáza

K produkci oxidu dusnatého dochází za účasti NADPH pomocí NO-syntázy z L-argininu. Jde o signální molekulu, která zvyšuje expresi NO-syntázy. NO-syntáza má 3 izoformy, které ovlivňují spolu s angiogenezí nádorový růst. Jejich míra ovlivnění závisí na aktivitě, distribuci a koncentraci NO. Produkci izoform ovlivňuje opět hypoxie, zánětlivé cytokiny a oxidativní stres. Jejich expresi s produkcí NO stimuluje VEGF. Při dlouhodobém působení VEGF na lidské endoteliální buňky se stupňuje hladina endoteliální NO-syntázy. Naopak při krátkém působení vzrůstá produkce NO [46]. NO inhibuje apoptózu, zvyšuje proliferaci a migraci endoteliálních buněk a rozpouštění extracelulární matrix [55].

4 INHIBICE ANGIOGENEZE V PROTINÁDOROVÉ LÉČBĚ

Poznání vzájemné spojitosti mezi angiogenezí a metastazováním nádoru vedlo k hledání způsobu, jak angiogenezi potlačit a tím i zamezit růstu nádoru [9]. Nejčastějším prostředkem pro léčbu nádorových onemocnění je inhibice angiogenních faktorů. Ve srovnání s chemoterapií je tento přístup výhodnější, inhibitory jsou méně toxické a také klesá riziko vzniku rezistence [27].

Mezi angiogenní prostředky se řadí velká skupina molekul, jejich mechanismus účinku se různě liší. Dělí se do dvou skupin: přímé inhibitory, které blokují cestu angiogeneze, a nepřímé inhibitory, jenž působí protichůdně na angiogenní faktory a jejich biologickou aktivitu [27]. Vzhledem k tomu, že angiogeneze je složitý děj, existuje několik cílů zásahu.

4.1 Přirození antagonisté angiogeneze

I přesto, že se aplikace antiangiogenních faktorů zatím příliš v klinické praxi nevyužívá, některé pilotní studie s některými faktory přinášejí vcelku dobré výsledky. Tyto látky se připravují rekombinantní technikou. Mezi nejvíce prostudované přípravky se řadí ABT-510, angiostatin, endostatin, PF-4 [9].

4.1.1 ABT-510 (thrombospondin mimetic peptid – TSP-1)

ABT-510 je syntetický peptid, který napodobuje antiangiogenní aktivitu endogenního proteinu trombospondinu-1 (TSP-1). Jeho úlohou je inhibice aktivity endotelií a podpora jejich apoptózy. TSP-1 je velký adhezní glykoprotein, který je aktivován nádorovým supresorovým genem p53, inhibuje akce některých proangiogenních faktorů, včetně VEGF, bFGF, HGF a IL-8. Antiangiogenní aktivita TSP-1 je závislá na aktivaci p59^{fyn} a p38MAPK prostřednictvím interakce s CD36 receptorem nebo s příbuznými proteiny. Endoteliální buněčná apoptóza indukovaná TSP-1 je zprostředkována interakcí Fas/Fas ligandem, doprovázena aktivací kaspázy-3 a fragmentací FAK. ABT-510 soutěží s TSP-1 o vazbu na endoteliálních buňkách, indukuje expresi Fas ligandu v endotelových buňkách, a inhibuje VEGF a bFGF-stimulovanou migraci lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk [5, 56].

V experimentu, kdy se podávalo ABT-510 při dávkách 0,1-200mg/kg/den, se dokázala jeho účinnost potlačit růst různých transplantovaných nádorů [5]. Studie prokázala schopnost ABT-510 inhibovat růst nádoru a tvorbu metastáz v preklinických myších nádorech, avšak nebyla indukována regrese nádorů. V první fázi výzkumu se dále provádělo vyhodnocování

účinku tohoto proteinu na sérové markery angiogeneze: VEGF, bFGF, IL-8. U bFGF se prokázalo, že jeho sérové hladiny výrazně poklesly po měsíci a půl, ve srovnání s 1. dnem. Avšak hladiny VEGF a IL-8 nevykazovaly významnou změnu. Pokles bFGF může buď souviset s přímým účinkem ABT-510 nebo se změnami nádoru, proto je klinický význam bFGF ve vztahu ke stavu nádoru doposud sporný. Studie ve fázi I. ukázala, že ABT-510 má lineární, časově nezávislou farmakokinetiku a příznivý profil toxicity. V současné době se ABT-510 testuje ve fázi II, a to buď jako monoterapie nebo v kombinaci s cytotoxickou chemoterapií, především u pacientů se sarkomy měkkých tkání, pokročilým karcinomem ledvin, lymfomem a nemalobuněčným karcinomem plic. Několik preklinických modelů demonstrovalo, že jak zvýšená exprese VEGF, tak snížená exprese TSP-1 jsou u nádorové angiogeneze nezbytné [56].

4.1.2 PF-4

Destičkový faktor 4 se také řadí mezi rekombinantně připravený lék. V současnosti se testuje u nemocných s Kaposiho sarkomem, maligním melanomem a adenokarcinomem ledviny. Dosud ale nebyla zjištěna vhodná optimální dávka [57].

4.2 Blokáda angiogenních faktorů

Potlačení účinku angiogenních faktorů se dnes využívá častěji než přirozených antagonistů angiogeneze. Do tohoto terapeutického přístupu se řadí inhibice angiogenní kaskády (především signální dráhy VEG-VEGFR), inhibice proliferace endotelových buněk, stabilizace bazální membrány endotelových buněk [5].

4.2.1 Inhibice signální dráhy VEGF-VEGFR

Mezi nejdůležitější signální kaskády, kde se uplatňuje proces angiogeneze, patří signální dráha VEGF-VEGR. Proto je její inhibice nejvíce prostudovaná a požívá se tak nejčastěji v terapeutických metodách. Účinek VEGF lze pozorovat na několika úrovních.

První je neutralizace ligandu VEGF. Neutralizační protilátky se navážou na konkrétní sekvenci aminokyselin VEGF a zamezí jeho interakci s receptory. Hojně se zde využívá monoklonálních protilátek. Nejčastější takovou protilátkou, která blokuje novotvorbu cév při navázání na volný VEGF-A, VEGF-B i VEGF-C je bevacizumbab [58]. Další strategií je eliminace VEGF za použití solubilního VEGFR, s názvem VEGF- trap (aflibercept). Tento receptor působí jako kompetitivní inhibitor [59]. Největší účinek vykazuje blokáda tyrozinkinázové domény intracelulární části receptorů pro angiogenní faktory VEGF, PDGF,

FGF a další. Používají se nízkomolekulární látky označované jako tyrozinkinázové inhibitory (TKI) [27]. Patří sem zejména semaxanib, cediranib, sunitinib, sorafenib, vatalanib a další. O některých látkách více v kapitole 4.4.1.

4.2.2 Stabilizace bazální membrány

Intaktní bazální membrána znesnadňuje pučení endotelií mimo cévu. Využívá se proto inhibice enzymů, které způsobí rozrušení bazální membrány a okolní matrix. Tyto enzymy se nazývají matrixmetaloproteázy (MMP), řadí se mezi ně intersticiální kolagenázy, gelatináza, matrilysin a stromelysiny. TIMP's pak způsobují inhibici těchto enzymů. Experimentálně se prokázaly účinné syntetické inhibitory: prinomastat, který blokuje aktivitu gelatinázy, marimastat a batimastat vážou zinek, který pak aktivuje metaloproteázy. Byly testovány u nemalobuněčného karcinomu plic a u karcinomu prostaty. V klinických studiích bohužel neobstály, neboť jejich protinádorový účinek nebyl výrazně prokázán. Přirozené inhibitory vykázaly větší účinnost, avšak jejich stinnou stránkou je krátký poločas [5].

4.2.2.1 Neovastat

Tekutý extrakt ze žraločí chrupavky je přirozeným inhibitorem angiogeneze. Obsahuje vysokou koncentraci biologicky relevantních molekul. Jedná se o multifunkční přípravek. Inhibuje proteolytické enzymy (MMP-2, MMP-3, MMP-12), dále blokuje receptory pro VEGF na povrchu endotelií a indukuje jejich apoptózu. Před pár lety bylo zahájeno klinické testování účinnosti Neovastatu u pacientů s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic, metastatickým karcinomem ledvinových buněk a refrakterním mnohočetným myelomem. Preklinické i klinické studie poukazují na netoxické působení tohoto přípravku. Nedávno byl charakterizován jeho inhibiční účinek [60]. Nejprve byl demonstrován případ, kdy Neovastat inhibuje embryo kuřete vaskularizací in vivo. Dále také inhibuje u myši růst nádoru na modelu adenokarcinomu prsu a HGD lidského glioblastomu. Kromě toho inhibuje i kostní a plicní metastázy pomocí MDA-231 u karcinomu prsu člověka [60, 61].

VEGFR-2 je zodpovědný za většinu biologických účinků zprostředkovaných skrz VEGF. Včetně proliferace, migrace, přežívání buněk a vaskulární permeability. Ve studiích bylo prokázáno, že Neovastat přednostně inhibuje vazbu VEGF na endoteliální buněčný povrch. Dále tento přípravek skrz VEGF inhiboval mikrocévní pučení ex vivo pomocí kroužků z krysí aorty. Tento test byl již dříve použit pro studium účinků různých inhibitorů angiogeneze

(endostatin, CAI). Studie ve fázi II potvrdila, že se zvyšující dávkou Neovastatu se zvyšuje přežití u pacientů s refrakterním karcinomem ledvin [61].

4.2.3 Inhibice endotelové proliferace

Schopnost inhibice proliferace endoteliálních buněk se testovala u řady látek, bohužel většina z nich vykazovala značnou toxicitu. Takovou látkou je například fumagilin (extrakt z houby *Aspergillus fumigatus*) [62].

AGM-1470 je více využívaná, jde o syntetický derivát fumagilinu, který je mnohem méně toxický. Inhibuje translokaci membránových bioproteinů a transkripční faktor Ets-1. Úspěšné experimenty vedly k testování jeho účinnosti u Kaposiho sarkomu, avšak při vyšších dávkách se projevovala známka neurotoxicity. Byla zaznamenána i regrese metastáz u pokročilého karcinomu čípku, navzdory tomu musí být ale léčba dlouhodobá [5, 27, 62].

TNP-410 je též netoxická látka. Její efekt byl spatřen u jaterních metastáz, dále se testuje v léčbě mozkových nádorů, protože prochází hematoencefalickou bariérou [5].

Interferony- α , β také tlumí proliferaci endotelií. Interferon- α se používá k omezení angiogeneze u progredujících hemangiomů [27].

Thalidomid prokázal také antiangiogenní účinky, způsobené maloformací plodu při podávání těhotným ženám. Mechanismus účinku není dodnes zcela prozkoumán, avšak na celkovém efektu se podílí několik různých zásahů a úrovní nádorové buňky a jejího okolí. Thalidomid přímo snižuje růst a zkracuje přežití myelomových nádorových buněk, ovlivňuje produkci cytokinů a chemokinů, dále snižuje růst a novotvorbu cév a stimuluje buňky imunitního systému. Klinické studie potvrdily jeho účinek u karcinomu prostaty, gliomů a karcinomu prsu [63].

Squalamin je další látkou, která inhibuje proliferaci buněk. Jde o aminosterol izolovaný z jater žraloka *Squalus acanthias*. Inhibuje angiogenezi a nádorový růst v různých zvířecích modelech a to bez pozorovatelného účinku na nestimulované endotelové buňky. Ve studiích fáze I nebyla pozorována žádná toxicita s užíváním squalaminu. Některé pozitivní výsledky byly získány ve studiích fáze II u karcinomu plic v kombinaci se standardní chemoterapií. Silné klinické výsledky byly zaznamenány pro léčbu makulární degenerace související s věkem [62].

Rapamycin (sirolimus) je známé imunopresivum inhibující růst nádorů a angiogenezi v modelech *in vivo*. Antiangiogenní aktivita je spojena s inhibicí proliferace endotelových buněk po stimulaci VEGF a se snížením produkce tohoto angiogenního faktoru. Rapamycin je následný efektor fosfatidylinositol 3-kinázy signální cesty, která zprostředkovává

buněčné přežití a proliferaci. Analogií Rapamycinu je Everolimus. Je podáván orálně a vykazuje příznivější farmakokinetické vlastnosti. Prezentuje omezenou toxicitu u pacientů. Je vyvíjen jako antiproliferativní agens a byl schválen v Evropě jako imunosupresivní látka v transplantaci solidních orgánů. Studie ve fázích II/III dokázaly protinádorovou aktivitu u metastazujícího RRC [62, 64].

4.3 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky pro lidské užití se řadí mezi bioléčiva. Jsou imunoglobulinového charakteru nebo fragmentu imunoglobulinu s definovanou specifitou, produkované jedním klonem buněk. Vážou se specificky na proteiny, působící jako tzv. epitopy antigenů. Tyto protilátky, jak chimérní, tak humanizované obsahují střídající se sekvence lidí a zvířat [65]. K neutralizaci antigenu dochází, pokud je cílem tohoto antigenu solubilní molekula (např. toxin, receptorový ligand). Tímto krokem dochází k blokaci signální cesty, která je s molekulou spojena. K likvidaci buňky pak dochází změnami v buněčné adhezi, cytokinové aktivaci nebo indukci apopózy. Dalším způsobem, který je častější při léčbě, je likvidace určité skupiny buněk efektorovým mechanismem. Za to zodpovídá Fc fragment monoklonální protilátky. Zničení buňky probíhá buď fagocytózou, ADCC (cytotoxická reakce závislá na protilátkách) nebo aktivací komplementu s následnou tvorbou MAC (membránu atakující komplex). Třetím mechanismem, který navozuje monoklonální protilátka, je tvorba antiidotypových protilátek. První monoklonální protilátkou, užitou v praxi byl muromonab, myší protilátka proti antigenu CD3 [65, 66].

4.3.1 Bevacizumab (avastin®)

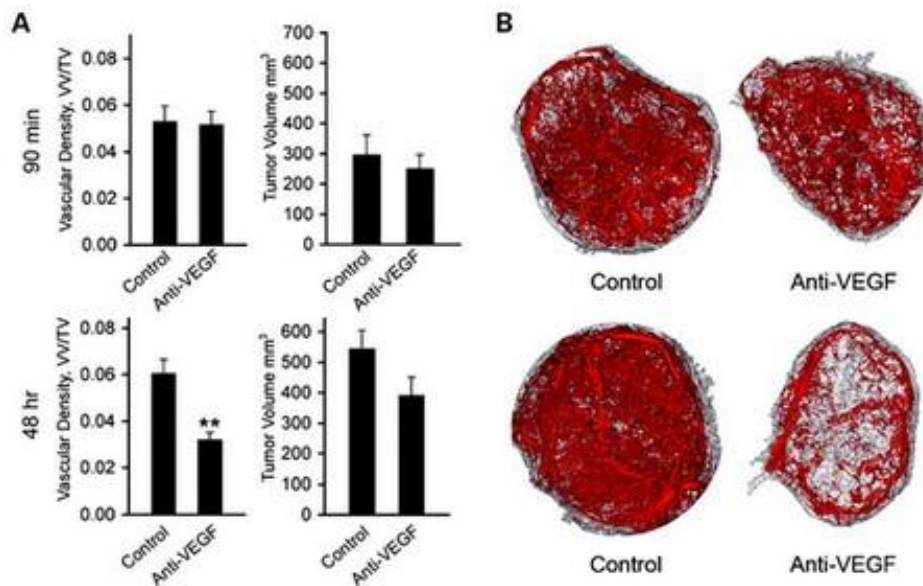
Bevacizumab se řadí mezi humanizované myší monoklonální protilátky. Působí jako inhibitor angiogeneze nebo neovaskularizace. Je to imunoglobulinová protilátka typu G₁ cílená přímo proti VEGF. Avastin® se selektivně váže na VEGF, inhibuje tak angiogenezi a kontroluje růst nádoru. Díky této selektivní inhibici je možno lék kombinovat s chemoterapií a zároveň tak lze zabránit projevům necílové toxicity. VEGF se váže na dva podtypy receptorů VEGFR-1 a VEGFR-2, touto vazbou aktivuje receptorovou tyrosinkinasu a indukuje angiogenezi. Zvýšená exprimace vede k tvorbě nádorů. Proto byla angiogeneze navržena už v 70. letech minulého století jako cíl zásahu v protinádorové terapii a dodnes představuje účinnou terapii, jelikož je receptor VEGFR-2 v přímém kontaktu s krví a exprimován v tumorových buňkách, léčivo se k nádorovým buňkám dostane celkem snadno [65]. Vazba

bevacizumabu na VEGF má několik účinků, mezi něž patří především regrese nádorové cévní sítě, inhibice růstu nových cév a snížení propustnosti zbývajících cév [67].

Bylo prokázáno, že avastin® v monoterapii nebo v kombinaci s cytostatiky má pozitivní účinek v léčbě solidních nádorů [68]. V roce 2004 byl v USA schválen jako léčivo metastazujícího kolorektálního karcinomu v kombinaci s fluorouracilem, o dva roky později i pro nemalobuněčný plicní karcinom. V EU se užívá v kombinaci s paklitaxelem u metastazujícího karcinomu prsu. Jeho účinky byly zpozorovány u řady dalších nádorů, včetně neuroendokrinních [65].

V první preklinické fázi studie dokázala, že podání protilátky proti VEGF je spojeno s výraznými efekty již po zahájení léčby. Byla zjištěna významná redukce objemu cév při zobrazení ex vivo nádorové cévní sítě mikro-angiografií u modelu s xenoinplantátem lidského kolorektálního nádoru za použití protilátky G6-31 proti VEGF a to už po 48h (Obr. 6), [67].

V preklinickém výzkumu se také studoval účinek bevacizumabu na hustotu mikrocév u imunodeficientní myši s lidským adenokarcinomem tlustého střeva. Po porovnání výsledků s kontrolami vedla léčba anti-VEGF k výraznému poklesu propustnosti nádorových cév a cévního objemu v tomto nádoru [69].



Obr. 6: A: změny vaskulární hustoty u kontrolních zvířat a v buňkách ošetřených s protilátkou anti-VEGF G6-31, B: reprezentativní mikro-CT pro každou skupinu ošetření při 90 minutách a po 48 hodinách, upraveno dle [67].

V dalším testu se sledoval pokles váhy nádoru, opět testován na myších, kterým byly implantovány xenoimplantáty lidského plicního karcinomu. Výsledky opět prokázaly v porovnání s kontrolami pokles hmotnosti nádoru [70]. Ve fázi I se také prokázalo, že bevacizumab snížil průtok krve až o 44% a objem krve nádoru až o 39% u pacientů s primárním lokálně pokročilým adenokarcinomem konečnicku. V první linii tento lék výrazně přináší šance na přežití u metastického kolorektálního karcinomu, nemalobuněčného plicního karcinomu, metastického karcinomu prsu a metastického karcinomu ledviny. Studie fáze III ukazují, že pokračování léčby bevacizumabem přináší klinický prospěch a doporučuje se, aby léčba trvala až do progresu základního onemocnění [71].

4.3.2 Cetuximab (Erbix®)

Monoklonální, chimérická humánní-myší protilátka třídy IgG1 je cílená proti extracelulární části receptoru pro EGFR. Zvýšené exprese tyrozinkinázového receptoru (HER-1) byla zjištěna především u pacientů trpících metastickým kolorektálním karcinomem (CRC) a to až u 25-80% případů [72]. Používá se buď v kombinaci s chemoterapií nebo v monoterapii od roku 2004 v USA, v České republice pak o rok později. Jeho účinnost se prokázala i u karcinomu hlavy a krku a v roce 2009 byly na konferenci Americké společnosti pro klinickou onkologii prezentovány studie, které potvrdily jeho účinky v léčbě karcinomu žaludku a žlučových cest [73].

EGFR obsahuje extracelulární doménu vázající ligand, transmembránový segment a intracelulární doménu, se kterou se pojí aktivita tyrozinkinázy, která přenáší signál. Vazbou receptoru s ligandem se tvoří heterodimerické receptorové komplexy a následně se autofosforylují domény tyrozinkinázy prostřednictvím RAS-RAF-MAPKinázové dráhy a PI3K-AKT-mTOR-S6K dráhy, která má vliv na transkripci v jádře. Klíčovou rolí v signalizační kaskádě hraje GTP-vázající onkoprotein (RAS) na vnitřní straně buněčné membrány. Vysktuje se ve 2 konfiguracích, které mezi sebou vzájemně přecházejí. Inaktivní forma GDP-RAS se přemění na aktivní GTP-RAS při navázání ligandu na EGF receptor, poté se přenesení signál do jádra buňky. Aktivuje se transkripce genů, které regulují pozitivně proliferaci, angiogenezi, buněčnou migraci a negativně apoptózu. Afinity Cetuximabu k EGFR je 10x vyšší než u přirozených ligandů. Blokáce endogenních ligandů tímto přípravkům způsobí inhibici funkce receptoru a na úrovni nádorových buněk dochází tak inhibici proliferace, tkáňové invazi a metastazování. Inhibuje přežívání a navozuje apoptózu. Kromě toho dokáže Cetuximab aktivovat imunitní systém proti nádoru [73].

První studie, která se historicky výrazně podílela na zařazení Cetuximabu mezi přípravky pro léčbu pacientů s metastatickým onemocněním exprimujícím EGFR po selhání předchozí léčby jiným lékem (irinotecanem), porovnávala léčbu samotným cetuximabem s kombinací toho léku s irinotecanem. Prokázalo se, že v kombinaci má mnohem lepší účinky a to až u více jak poloviny pacientů. Zmenšení nádorových ložisek o polovinu se zaznamenalo u 23% nemocných. Medián přežití u pacientů s kožní toxicitou byl v kombinaci s druhým lékem 9,1 měsíce, tedy o měsíc více než v monoterapii a bez kožní toxicity 2,5-3 měsíce [72]. Další studie (EVEREST) prokázala, že pokud se dávkování upraví dle kožní reakce, u pacientů s metastatickým CRC se zlepší terapeutická odezva. Cetuximab způsobuje i řadu nežádoucích účinků, mezi něž se řadí především akneformní exantém (80% pacientů), pruritus, suchá kůže, hypertrichóza, poruchy nehtů, hypomagnesémie a mukositida [73].

4.4 Nízkomolekulární protilátky

4.4.1 Inhibitory receptorových tyrozinkináz

Slibné vyhlídky do budoucna přináší blokáda tyrozinkinázové domény. Pomocí tyrozinkináz dochází k vazbě fosfátových skupin na aminokyselinu tyrozin. Fosforylace umožňuje „vypnout molekuly“, vazbu růstových faktorů, čímž se spustí kaskáda přenosů signálů z vnějšího prostředí buňky do jádra. Pokud se místo ATP (adenozintrifosfát) na enzymy naváže daný inhibitor, fosforylace proteinů je inhibována a přenos signálu se přeruší [74].

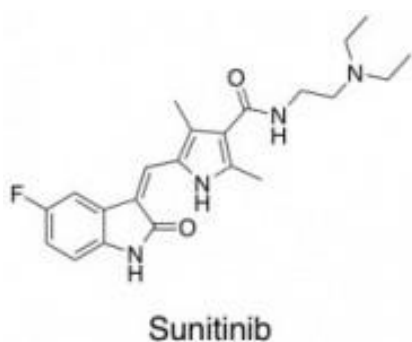
Mezi výhody TKI se řadí především cílené působení na specifické receptory nádorové buňky a hlavně jejich mnohočetné účinky, kdy dokážou zasáhnout několik cílů najednou [74]. Z toho lze vyvodit, že multikinázové TKI mají výhodu oproti bevacizumabu, jehož účinky jsou pouze selektivní. Zabraňují aktivaci transdukční kaskády po její aktivaci VEGF [27]. Brzdí neoangiogenezi, tím dochází ke snížení krevního zásobení nádorových buněk, omezují schopnost jejich růstu a proliferace a zvyšují apoptózu [74].

4.4.1.1 Sunitinib

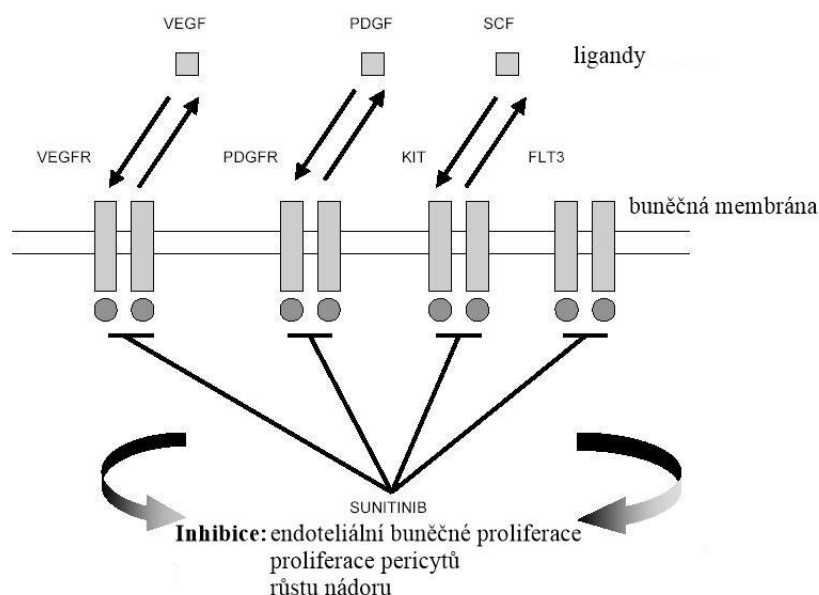
Sunitinib, někdy uváděn pod názvem Sutent nebo SU11248 (Obr. 7), je nový orální cílený inhibitor tyrozinkinázy s protinádorovou a antiangiogenní aktivitou (Obr. 8). Byl identifikován jako silný inhibitor VEGFR-1, VEGFR-2, fetálního jaterního receptoru tyrozinkinázy 3 (FLT-3), receptoru faktoru kmenových buněk (KIT), PDGFR jak v biochemických tak buněčných testech. In vitro sunitinib inhibuje růst buněčných linií

poháněných VEGF, SCF a PDGF a indukuje apoptózu u lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly [75, 76].

Studie metabolismu in vitro ukazují, že sunitinib byl primárně metabolizován cytochromem CYP3A4. Následkem se vytvořil hlavní, farmakologicky aktivní N-desethyl metabolit SU012662. Ten vykazoval v biochemických a buněčných testech podobnou účinnost jako sunitinib. Farmakokinetické údaje ze studií na zvířatech ukázaly, že plazmatická koncentrace sunitinibu, schopná inhibovat fosforylaci u PDGFR- β , VEGFR-2, KIT, byla stanovena v rozmezí 50-100 ng/ml. Sunitinib byl před pár lety schválen v první linii léčby u pacientů s pokročilým karcinomem ledvin (RCC), a pro léčbu pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem (GIST) [77].



Obr. 7: Struktura sunitinibu [78].



Obr. 8: Mechanismus účinku sunitinibu, upraveno dle [77].

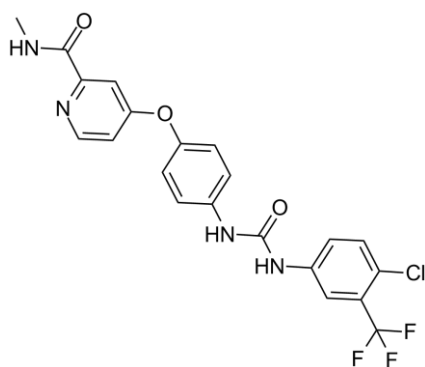
Podobné účinky sunitinibu má i imatinib. Avšak sunitinib se váže na více různých proteinkináz. Výhodou sunitinibu je vyšší afinita k c-KIT. Tato proteinkináza je u nemocných s GIST deregulována. Sunitinib po navázání kinázové domény zastavuje buněčnou proliferaci a to i u pacientů, kteří jsou rezistentní u léčby imatinibem. Studie ve fázi III zkoumala účinky sunitinibu a placebo u pacientů kteří netolerovali léčbu imatinibem nebo u nich byla zaznamenána progresse nemoci. Ve větvi se sunitibem byla doba do začátku progresse onemocnění (TTP) 6,3 měsíce, s placebem pak pouze 1,5 měsíce. Také riziko úmrtí stoupl až dvakrát u skupiny léčené placebem [77, 79].

4.4.1.2 Sorafenib

Sorafenib neboli Nexavar (Obr. 9) je další mutlikinázový inhibitor procesů zodpovědných za růst nádorové buňky a angiogenezi. Proliferace nádorových buněk je z větší části dána mitogenní signální cestou proteinkináz aktivovaných mitogeny (MAPK). Serin/threonin kináza (Raf) je klíčový prvek, který vede k nádorovému bujení. U angiogeneze je to pak mediátor VEGF. Bylo zjištěno, že sorafenib inhibuje fosforylaci a tím i aktivaci kináz v MAPK signální dráze. Dále inhibuje tyrozinkinázy receptoru pro VEGFR-2, VEGFR-3, PDGR, FGFR-1, C-KIT, Flt-3 a signální cesty Raf/MEK/ERK [80].

Sorafenib prokázal svoji účinnost v léčbě metastazujícího renálního karcinomu a hepatocelulárního karcinomu. Dále probíhá jeho testování u dalších nádorových onemocnění jako je například nemalobuněčný karcinom plic, melanom a kolorektální karcinom [80].

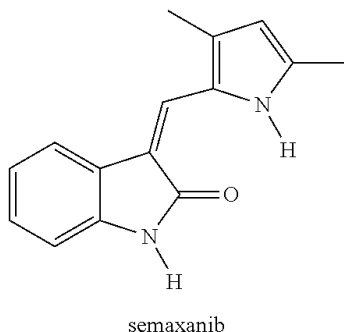
V preklinických studiích byl popsán jeho vliv na inhibici buněčného růstu, indukci apoptózy, zmenšení nádoru i na inhibici neovaskularizace na zvířecích modelech nádorů ledvin, prsu, střev, ovarií a plic [81].



Obr. 9: Struktura sorafenibu [82].

4.4.1.3 Semaxanib

Semaxanib, SU5416 (Obr. 10) je indolinový inhibitor blokuje receptorů VEGFR-1 a C-KIT. Výsledky z I a II etapy klinického zkoušení potvrdily jeho účinnost u nemalobuněčného karcinomu plic, Kaposiho sarkomu a kolorektálního karcinomu. In vitro inhibuje VEGF-dependentní fosforylaci receptoru Flk-1 v Flk-1 nadměrně exprimujících buňkách NIH 3T3 s IC 50. Semaxanib může potencovat chemoterapeutický a anti leukemický účinek [5].



Obr. 10: Struktura semaxanibu [83].

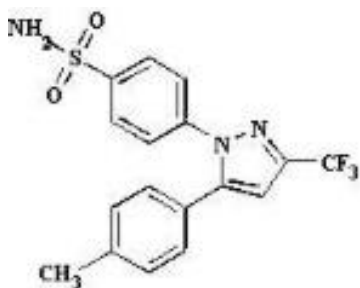
4.4.2 Inhibitory COX-2

Nesteroidní protizánětlivé léky jsou heterogenní skupinou léků spojených s inhibicí zánětlivého procesu, se zaměřením na enzymy jako jsou COX a ty ovlivňují syntézu prostaglandinů z kyseliny arachidonové. COX-2 není spojena pouze se zánětem, ale také s angiogenezí, proliferací a růstem nádoru. Existují důkazy s nadměrnou expresí COX-2 u různých druhů rakovin. Pacienti s nadměrnou expresí COX-2 v nádorových buňkách pankreatu mají horší prognózu, než ti, kde je exprese COX-2 normální [84]. V důsledku gastrointestinálních obtíží byly hledány látky, které by inhibovaly pouze formu COX-2. Tyto látky se označují jako nesteroidní protizánětlivé léky druhé generace [85].

4.4.2.1 Celecoxib

Neboli celebrex (Obr. 11) je selektivní inhibitor COX-2, který byl schválen k léčbě revmatoidní artritidy, osteoartrózy, akutní bolesti včetně primární dysmenroey. Nedávno se zjistila jeho indikace v redukci počtu polypů u familiární adenomatózní polypózy. V posledních letech byl navrhován jako činitel, který může zasáhnout do signálních drah spojených s expresí COX-2 a zvýšit hladiny endogenních inhibitorů angiogeneze, zvaných endostatiny. Mimo to, nesteroidní protizánětlivé léky snižují progresi onemocnění u některých zhoubných nádorů (rakovina tlustého střeva). Z tohoto důvodu byl celecoxib navrhnout pro léčbu tlustého střeva,

slinivky a rakoviny prsu k potlačení angiogeneze a podpoře apoptózy. Inhibuje růst meningiomu in vivo, snižuje COX-2 aktivitu a koncentraci prostaglandinu [84].



Obr. 11: Struktura celecoxibu [86].

4.5 Inhibitory mTOR

Savčí receptor pro rapamycin (mTOR), se řadí mezi serin/threoninové kinázy, které hrají klíčovou úlohu v regulaci buněčných procesů (regulace růstu, proliferace, motility) a angiogenezi. Signální kaskády většiny účastníků se receptorů vedou k aktivaci PI3K-AKT-mTOR dráhy. Inhibitory mTOR prokazují antiangiogenní účinky a představují tak vhodné látky pro kombinovanou antiangiogenní léčbu. Brání přechodu buněk z fáze G1 buněčného cyklu do fáze S. Dochází k vyvolání zástavy buněčného cyklu, která je způsobena především poklesem syntézy regulátorů buněčného cyklu (cyklin D). Aby mohl být buněčný cyklus ukončen, regulátory cyklu musí být přítomny. Léčba mTOR inhibitory může indukovat i apoptózu [87]. Do této skupiny patří již zmíněný sirolimus a everolimus.

5 LÉČEBNÉ MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ PRŮBĚHU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ POMOCÍ INHIBITORŮ ANGIOGENEZE

V poslední době se při léčbě nádorů užívají léčebné strategie, které jsou cílené na nádorové prostředí. Nejen soubor nádorových buněk, ale i jednotlivé elementy mikroprostředí, jako jsou extracelulární matrix, makrofágy, fibroblasty a cévy, se svým působením podílejí na invazi a dalším šíření nádoru [88]. Proto má význam angiogeneze a tedy i související inhibitory angiogeneze v léčbě nádorů nezastupitelnou roli. Několikrát bylo prokázáno, že jejich užitím se prodloužily pacientům životy o několik měsíců popřípadě roků [89].

Výzkumy prokázaly, že zvýšená angiogeneze zhoršuje prognózu u pacientů s mnohočetným myelomem (MM). Hlavním aktivátorem angiogeneze u MM je HGF. mRNA HGF spolu s jeho receptorem jsou exprimovány v myelomových buněčných liniích a v nádorových buňkách. Dále byly nalezeny zvýšené hladiny VEGF v myelomových buněčných liniích i v nádorových plazmatických buňkách kostní dřeně. Pacienti s MM mají také výrazně vyšší hladiny bFGF, jeho receptor syndecan-1 se nachází v cytoplasmě a je považován za marker detekce maligních buněk v krvi či kostní dřeni [90, 91].

Jedna studie potvrdila, že v kostní dřeni a lymfatických uzlinách u chronické lymfatické leukémie (CLL) jsou známky patologické angiogeneze zřejmé, dále se prokázaly zvýšené hladiny VEGF a FGF a zvýšená mikrovaskulární denzita (MVD) v kostní dřeni [92]. U pacientů byla také zjištěna přímá úměra mezi expesí bcl-2 a hladinami bFGF v séru. VEGF je produkován přímo buňkami B-CLL. Hladinu mRNA proteinu VEGF v B-CLL buňkách také zvyšuje hypoxie. Podle další studie bylo zjištěno, že hladiny VEGF vzájemně souvisejí přímo s absolutním počtem lymfocytů a inverzně s počtem leukocytů. Také exprese VEGF klesá při příznivé léčbě CLL [93]. Podle Menzela a spol. byly intracelulární hladiny bFGF výrazně zvýšeny u pacientů s velmi rizikovým onemocněním ve srovnání s pacienty s průměrným rizikem a se zdravými kontrolami. Imunofluorescenční vyšetření prokázalo, že bFGF přímo produkují nádorové buňky [94].

Například sérová hladina ofbFGF proteinu je zvýšena u více než jedné poloviny pacientů s renálním karcinomem (RCC). Studie prokázala, že bFGF je jedním z faktorů, který se podílí na rozvoji nádorové angiogeneze. Ve 4 z 6 případů je produkce bFGF mRNA až čtyřikrát vyšší v nádorových renálních tkáních, než v okolí normální tkáně. Další výzkum potvrdil, že hladiny VEGF mRNA byly výrazně vyšší v nádorových tkáních, než v sousedních zdravých tkáních, z toho 96% se řadilo mezi hypervaskulární renální karcinom. Další příčinou vysoké angiogenní aktivity u RCC je overexprese růstových faktorů VEGF a IGF, k čemuž dochází při genetické inaktivaci VHL genu [95].

Výzkum potvrdil, že hladina VEGF byla výrazně stimulována ve skupině gliomů s vysokým maligním stavem, ve srovnání s gliomy s nízkou malignitou [96]. Nádor pro svůj růst využívá cévní síť buněk gliomu, přes které probíhá jeho zásobení kyslíkem a živinami. Bylo prokázáno, že buňky gliomu migrují skrz cévní síť do různých částí mozku [96, 97].

U karcinomu prsu se také potvrdila exprese VEGF. Ve studii je uváděna míra exprese mRNA dvanácti různých genů, které kódují proangiogenní růstové faktory včetně VEGF, avšak hladiny nejsou tak výrazné jako u RCC [98].

U nemalobuněčného plicního karcinomu byly zjištěny proliferační účinky na buňky epidermis způsobené nadměrnou aktivací EGF. Gen pro EGF bývá amplifikován a tím dochází ke zvýšení exprese jeho produktu peptidu EGF. K tomuto dochází až u 60 % pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem. U plicního adenokarcinomu se projevila zvýšená exprese v 50 % případů [99].

5.1 Renální karcinom

Renální karcinom (RCC) je nejčastější vyskytující se nádor ledvin u dospělých, představuje až 90% zhoubných novotvarů ledvin, z toho u 25-30% pacientů dochází k metastickému šíření. Česká republika se řadí mezi země s nejvyšší incidencí. Významným rysem karcinomu ledvin je hypervaskularita. Z tohoto důvodu mohou renální tumorové buňky produkovat angiogenní faktory [100].

Několik případů RCC způsobuje mutace v genech s vysokou penetrací – VHL syndrom se ztrátou exprese nebo poškozením funkce VHL proteinu. Pacienti, u kterých se objevuje mutace VHL genu, mají až 40% pravděpodobnost výskytu RCC. V normálních buňkách tzv. wild-type VHL protein zabraňuje nekontrolované angiogenezi tak, že podporuje degradaci HIF-1 α , což je transkripční faktor aktivovaný v odpovědi na tkáňovou hypoxii. U karcinomů ledvin s mutovaným VHL se HIF-1 hromadí v buňkách, vyvolá se tak tvorba silných proangiogenních růstových faktorů VEGF, PDGF. Tyto faktory na sebe váží příslušné povrchové receptory a ty způsobují endoteliální buněčnou proliferaci, migraci a tvorbu kapilární sítě a dochází k aktivaci signální dráhy [101].

Data ukazují, že právě angiogenní faktory jsou slibné terapeutické cíle u RCC. Pokud je nemoc diagnostikována v raném stádiu, postačí k léčbě chirurgická operace. Naopak neoperovatelná a metastazující onemocnění jsou nevléčitelná. Poznání základních patologických mechanismů směřujících k maligní transformaci, identifikaci esenciálních signálních transdukčních cest vedlo k vývoji účinných přípravků [87].

Do nedávné doby byly jedinými schválenými léky pro léčbu pokročilého onemocnění cytokiny, interferon a interleukin. Nicméně, pouze přibližně 15% pacientů mělo prospěch z této léčby a toxicita zde byla značná. V posledních letech byly vyvinuty nové biologické činitele se značnou aktivitou a některé z nich testovány v klinických studiích. Nejúčinnější jsou tyrozinkinázové inhibitory zastavující přenos signálu směrem od intracytoplazmatické části VEGF receptoru: sorafenib, sunitib, pazopanib, axitinib, a monoklonální látka neutralizující cirkulující VEGF: bevacizumab. Inhibitory mTOR dráhy: temsirolimus a everolimus

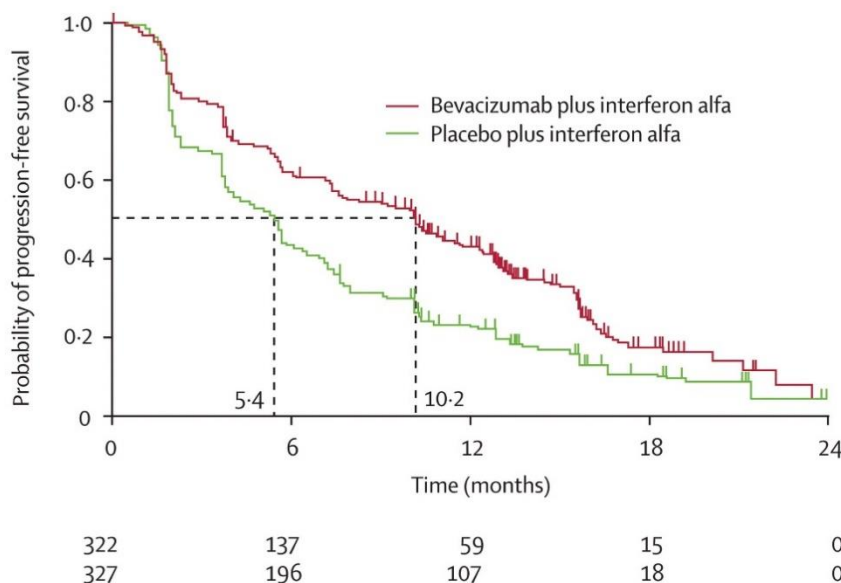
způsobují inhibici angiogeneze a nádorové proliferace. U všech těchto látek bylo prokázáno, že jsou účinnější než interferon při léčbě první a druhé linie [102].

Je zapotřebí zmínit i sekvenční terapii cílenými léčivými (Tab. 4), která se zaměřuje na rozdílné způsoby aktivace nádorových buněk. Řada pacientů je schopna se léčit několika léky sekvenčně a vykazují i tak dobrou prognózu. Podle údajů z národního registru pacientů s RCC léčených cílenou léčbou pro mRCC se přežití u pacientů, léčených sekvenčně, prodlužuje na 5 let [103].

		světlobuněčný karcinom		nesvětlobuněčný karcinom
		dobrá/střední prognóza	špatná prognóza	
1. linie	standardní léčba	sunitinib	temsirolimus	není definována
		bevacizumab + IFN- α		
		pazopanib		
	další možnosti	sorafenib	sunitinib	temsirolimus
vysokodávkovaný IL-2		sunitinib		
				sorafenib
2. linie	standardní léčba	předchozí léčba inhibitory VEGF		předchozí léčba cytokiny
		everolimus		sorafenib
		axitinib		pazopanib
				axitinib
	další možnosti	dosud nepoužitý TKI (sunitinib, sorafenib)		sunitinib

Tab. 4: Léčba mRCC podle European Society for Medical Oncology, upraveno dle [103].

Randomizovaná, dvojitě slepá, fáze III AVOREN hodnotila účinky bevacizumabu s IFN- α v porovnání s INF- α a placebem a byl prokázán významný přínos v celkovém přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS). Celkem 649 pacientů s dosud neléčeným metastatickým karcinomem ledvin (mRCC) bylo náhodně rozděleno v poměru 1:1. Podávalo se 10mg/kg bevacizumabu každé 2 týdny s 9 MIU IFN- α injekčně třikrát týdně nebo IFN- α s placebem. U první kombinace byl PFS 10,2 měsíce oproti INF- α s placebem, kdy PFS činil 5,4 měsíce (Obr. 12). Tato studie poukazuje na to, že kombinace dostupných přípravků vede k mnohem delšímu přežití. Také byla potvrzena účinnost bevacizumabu při snížení dávek INF- α . Snížení dávky přispělo k lepší snášenlivosti režimu, při čemž účinnost této kombinace byla zachována [104].



Obr.12: Pravděpodobnost přežití bez progresu v závislosti na čase při užívání bevacizumab + INF- α nebo placebo + INF- α [104].

Sorafenib a sunitinib jsou prvními léčivými přípravky cílené terapie, které byly schváleny pro druhou linii léčby u mRCC. Ve zkušebním testování fáze II bylo testováno 63 pacientů s renálním karcinomem, u kterých selhala léčba na bázi cytokinů. Pacientům bylo podáváno na začátku 50mg sunitinibu perorálně v režimu 4/2. 25 z 63 pacientů (40%) dosáhlo částečné odezvy a 17 pacientů (28%) mělo stabilní onemocnění trvající déle než 3 měsíce. Medián TTP byl 8,7 měsíce a OS 16,4 měsíce [77]. Výsledky z předchozí studie vedly ke zkušební fázi III, kdy se hodnotila účinnost a bezpečnost tohoto přípravku ve srovnání s interferonem- α . Bylo vybráno 750 pacientů. Jedna polovina byla léčena 50 mg sunitinibu v režimu 4/2, druhá polovina interferonem- α podávaným injekčně v dávce 3 miliony jednotek (MIU) první týden, 6 MIU další týden a 9 MIU třetí týden a pak 3x týdně v nepravidelně jdoucích dnech. Hodnotilo se přežití bez známek progresu (PFS). U léčených sunitinibem medián PFS byl cca 47 týdnů, u léčby interferonem- α se léčba prodloužila více jak o polovinu (22 týdnů) [105]. Účinky sunitinibu byly také studovány u 61 pacientů s mRCC, předléčených bevacizumabem. Objektivní odpověď byla u 23% s mediánem PFS 30,4 týdně při podání sunitinibu [106].

Je obtížné stanovit relativní příspěvek sorafenibu cíleného na protinádorovou aktivitu. Nicméně výrazně ovlivňuje nádorovou vaskulaturu a angiogenezi. In vitro inhibuje proliferaci buněčné linie u RCC. I když se nepodařilo přesně rozeznat, které z cílů sorafenibu zprostředkovává účinek, přímá nádorová cytotoxicita může být složkou klinické účinnosti pozorované u RCC [107]. Sorafenib se také využívá u pacientů, kde selhalo působení cytokinů.

Studie ve fázi I hodnotila bezpečnost, optimální schéma léčby a farmakokinetiku. Vhodná dávka v podávání sorafenibu je 400 mg 2x denně, i přes průkaz nežádoucích účinků při navýšení dávky na 800 mg 2x denně se zvýšila účinnost a u 2 pacientů se toto onemocnění na další 2 roky stabilizovalo. V RTD multicentrické klinické studii fáze II se doložila účinnost u mRCC, kdy 202 nemocným bylo v jednom rameni podáváno placebo a v druhém rameni sorafenib. Po 24 týdnech léčby se neprokázala progresse u 50% pacientů léčených sorafenibem a u 18 % pacientů v rameni s placebem, kde bylo přežití bez progresse (PFS) i 6x nižší. Ve studii TARGET, která se zabývala účinností sorafenibu u renálního karcinomu, se prokázalo, že medián přežití bez progresse se zdvojnásobil (o 2,5 měsíce) oproti užívání placeba. Dále se také prodloužila doba i celkového přežívání [80, 108].

Účinky sorafenibu by mohly být spojovány i s léčbou hypertenze. Bylo zpozorováno konzistentní zvýšení krevního tlaku po celou dobu kohorty. Nebyl zjištěn žádný vztah mezi mediátory krevního tlaku a velikostí zvýšení. Nejspíše sorafenib inhiboval produkci oxidu dusnatého v endotelových buňkách, zprostředkovaného pomocí VEGF. To je podporováno rychlou normalizací krevního tlaku po přerušení sorafenibu. Avšak je potřeba důkladnějšího vyhodnocení krevního tlaku jako potenciálního markeru inhibice VEGF u mRCC. Pro svou nízkou toxicitu může být kombinován i s jinými přípravky [107].

Další lék, který schválila Evropská léková agentura v roce 2010 pro 1. a 2. linii léčby mRCC, je pazopanib. Jde o multikinázový inhibitor, který blokuje VEGFR-1,2,3, PDGFR- α , β a KIT. Pazopanib výrazně zlepšil PFS ve srovnání s placebem u dosud neléčených a cytokiny léčených pacientů s mRCC. Výsledky z randomizované studie fáze III prokazují, že pazopanib má podobnou účinnost jako sunitinib, avšak vzhledem k jinému profilu toxicity je lépe snášen. Objevuje se nižší výskyt zánětu sliznice, syndromu ruka-noha, únavy a hematologické toxicity, což představuje přednostní volbu u většiny pacientů. Přípravek se také testuje v neoadjuvantní a adjuvantní terapii u RCC avšak jeho role v tomto ohledu zůstává zatím neznámá [109].

Temsirolimus, inhibitor kinázy mTOR, je jediným lékem, který je vyzkoušený u pacientů se špatnou prognózou, definovanou jako přítomnost více jak 3 faktorů krátkého přežití. Mezi něž se řadí 1,5x vyšší LDH, nižší hladina hemoglobinu, hladina korigovaného sérového vápníku nad 10mg/dl, vícečetné orgánové metastatické postižení a méně než jeden rok od stanovení diagnózy. Bylo dosaženo rozdílu mezi terapií INF- α a monoterapií temsirolimem, buď v době do progresse onemocnění (5,6 měsíců vs. 3,2 měsíce) nebo v celkovém přežití (10,9 měsíce vs. 7,3 měsíce). Jedná se o jediný přípravek, jehož podávání vedlo v klinických studiích fáze III k prodloužení celkové doby přežití [110].

Everolimus potvrdil své účinky u nemocných předléčených inhibitory angiogeneze. Dvojitě slepá klinická studie fáze III prokázala lepší výsledky u pacientů léčených everolimem oproti placebo. Bylo podáváno 10 mg everolimu 410 nemocným do ramene s everolimem. Rozdíl činil téměř 3 měsíce v době do progresu onemocnění. Podle statistik se nejvíce rozdílů prokázalo ve všech skupinách nemocných s příznivou, střední i špatnou prognózou [105].

5.2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) se ve světě řadí na čtvrté místo vyskytujících se nádorových onemocnění u mužů a na třetí místo u žen a každoročně přibývá více než 800 nových případů [111]. Karcinom kolon a rektu vzniká maligní transformací cylindrického epitelu tlustého střeva a konečníku. Jde o víceméně heterogenní onemocnění s různými molekulárně-genetickými charakteristikami, které mají vliv jak na biologické chování nádoru, tak i na odpověď na systémovou léčbu a celkový průběh onemocnění. Základem úspěšné léčby je včasné stanovení diagnózy, chirurgické odstranění nádoru a odpovídající adjuvantní terapie [112]. Metastatické procesy se projeví u 50% nemocných a nejčastěji se CRC objevuje mezi 60-75 lety z toho 80% tvoří sporadické formy choroby. Až 95% zhoubných nádorů kolorekta představují adenokarcinomy. Výsledkem kombinace chemoterapie s biologickou léčbou a s chirurgickými zákroky je prodloužení mediánu přežívání do 2 let a současně se snížil index mortalita/incidence pod hodnotu 0,5 [113]. V České republice jsou pro léčbu CRC schváleny doposud 3 přípravky, mezi něž se řadí bevacizumab, cetuximab a panitumumab. Jiné antiangiogenní látky jsou v pozdním stadiu klinického vývoje.

U léčby CRC se řadí mezi nejslibnější inhibice extracelulární části receptoru pro EGFR pomocí cetuximabu [72]. Zvýšená exprese tohoto tyrozinkinázového receptoru se prokázala u 25-80% pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem [114]. Účastníkem řízení přežívání buněk, angiogeneze, pohybu buněk a buněčné invaze či metastazování jsou EGFR signální mechanismy a cílená blokáda tohoto receptoru cetuximabem se řadí mezi další léčebnou možnost, která vede k zlepšení výsledků u nemocných s CRC [72].

Onkogen K-ras kóduje protein, který má důležitou roli v signální cestě spouštěné EGFR. Tento onkogen se vyskytuje v tumorech ve dvou typech: nemutovaný K-ras protein (wild type) nebo jako mutovaný K-ras. Protein s mutovanou verzí je v nádorech nepřetržitě zapnut bez aktivace cestou EGFR, zatímco u nádorů s divokým typem K-ras je pouze přechodně aktivován. Stav receptoru K-ras proto indikuje prognózu a je prediktorem odpovědi na léčbu CRC cetuximabem a panitumabem [115].

Cetuximab se účinně využívá k léčbě pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (mCRC) exprimujícím EGFR a vykazujícím gen K-ras wild type v první linii a to buď v kombinaci s chemoterapií FOLFIRI nebo FOLFOX. Dále v druhé linii metastatického onemocnění u pacientů, jejichž zdravotní stav se zhoršil po chemoterapii s irinotecanem, po selhání cytotoxické léčby s irinotecanem nebo oxaliplatinou a nebo při nesnášenlivosti irinotekanu v monoterapii [116]. Nejznámější randomizovaná světová studie BOND-1 hodnotila účinek cetuximabu v kombinaci s irinotecanem. 218 pacientům s průměrným věkem 58 lety se podával irinotecan v dávce 125 mg/m² týdně v režimu 4/2 a cetuximab v iniciální dávce 400 mg/m², následně 250 mg/m² týdně. U více než poloviny pacientů se prokázal benefit z této kombinované léčby. U 45% nemocných proběhla již dříve cytotoxická léčba více než 3 liniemi. Parciální remise onemocnění, kdy se nádorová ložiska zmenšila o polovinu, se zaregistrovala u 23% nemocných. Byla zpozorována stabilizace onemocnění u 33% léčených, která odpovídala ústupu nádorových změn o méně než 50% nebo jejich progresi o méně než 25%. TTP byla 4,1 měsíce oproti samostatnému podávání cetuximabu kde TTP činila 1,5 měsíce a parciální remise onemocnění dosahovala pouze u 11% [117]. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patřil průjem, astenie, akneiformní vyrážka a neutropenie [72].

Další randomizovaná studie OPUS hodnotila účinek a bezpečnost přidání cetuximabu k režimu FOLFOX v léčbě 1. linie mCRC. Přípravek v kombinaci s tímto režimem zvýšil četnost léčebných odpovědí o 65%, ale pouze u K-ras nemutované formy. OS u kombinované léčby bylo 22,8 měsíce, u samostatné chemoterapie 18,5 měsíců [118]. Dále probíhala i klinická studie CRYSTAL, která porovnávala kombinaci režimu FOLFIRI s cetuximabem a bez něj opět v 1. linii léčby. TTP byla u biologické léčby kombinované s chemoterapií 8,9 měsíce a OS 23,5 měsíce. U samostatné chemoterapie TTP činila 8 měsíců s OS 20 měsíců. Tato studie také potvrdila, že lze předpovědět léčebnou odpověď na cetuximab podle stupně kožní reakce [119].

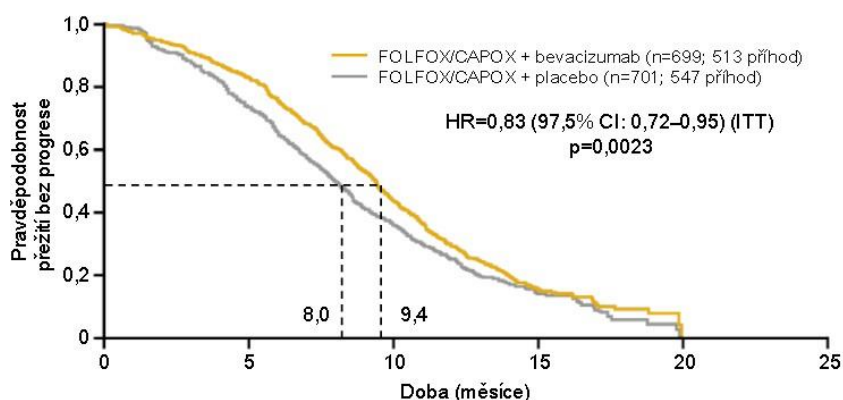
Několik klinických studií hodnotilo možnost ovlivnění resekability jaterních metastáz. Počet operací s kurativním záměrem a R0 resekci byla vyšší v případě kombinované terapie s cetuximabem než u samostatné chemoterapie. To samé platí pro bevacizumab [120].

U mCRC je první volbou bevacizumab a to v 1. linii léčby, který v monoterapii má minimální účinky, ale hojně se kombinuje se standardní chemoterapií na bázi 5-fluorouracilu (IFL) a oxaliplatinou (režimy FOLFOX, XELOX) nebo irinotekanu (režimy FOLFIRI, XELIRI). Přidání bevacizumabu zvyšuje efektivitu systémové léčby a prodlužuje celkové přežití o 25%, což odpovídá přibližně 2 let [121]. Díky mechanismu, kterým bevacizumab působí proti nádorům, se nasazuje co nejdříve po zjištění metastáz, avšak pro maximální účinnost je potřeba, aby pacienti byli léčeni biologickou léčbou až do progresu onemocnění [116].

Na základě studie fáze III se porovnávala iniciálně 3 ramena: režimy IFL/bevacizumab, IFL/placebo a FUFA/bevacizumab, který byl předčasně ukončen. Při přímém porovnání režimů přineslo lepší výsledky kombinování s bevacizumabem, kdy léčebná odpověď pro IFL byla 35% a u IFL/bevacizumab 45%. Dále se hodnotilo prodloužené přežití pacientů. Při použití pouze IFL bylo přežití 15,6 měsíce, při kombinaci s monoklonální protilátkou stoupl téměř o 4 měsíce [122].

I další studie potvrdily nárůst léčebných odpovědí o 10-15% při kombinaci chemoterapie s bevacizumabem, zlepšil se medián přežití o 5 měsíců a TTP byl vyšší o 4-6 měsíců než u samostatné chemoterapie [120].

Další klinická studie fáze III hodnotila kombinování bevacizumabu s chemoterapií na bázi oxaliplatiny. Chemoterapeutické režimy FOLFOX nebo CAPOX se kombinovaly s placebem nebo bevacizumabem. Opět se potvrdilo, že bevacizumab vedl k prodloužení doby dogrese onemocnění a to na 9,4 měsíce v porovnání se samostatnou chemoterapií, kde to bylo jen 8 měsíců [123].



Obr. 13: Pravděpodobnost přežití bezgrese v závislosti na čase (měsíce) při užití režimů FOLFOX/CAPOX s bevacizumabem nebo s placebem [124].

Také se porovnával bevacizumab v kombinaci s režimem zahrnujícím irinotecan a bolusové podání 5-FU s leukovorinem oproti chemoterapii IFL samotné. U kombinace s biologickou léčbou byla odpověď na léčbu 45% vs. 35% pro samotnou chemoterapii. TTP poukázala opět na zlepšení při kombinaci s bevacizumabem, kdy činila 10,6 měsíce vs. 6,2 měsíce u chemoterapie. Režim IFL byl pro užití příliš toxický. Dnes se více využívá podání 5-FU s irinotekanem v režimu FOLFIRI, u kterého je nižší toxicita a vyšší účinnost, nebo kombinace irinotekan/kapecitabin – XELIRI [125]. Při porovnání režimu IFL+bevacizumab a FOLFIRI+bevacizumab ve studii fáze III byl medián přežití vyšší u kontinuálního podávání (28 měsíců vs. 19 měsíců) [126].

Panitumumab je další monoklonální látka proti EGFR, která se u mCRC používá pouze v monoterapii a to po selhání léčby chemoterapeutickými režimy s 5-FU, irinotecanem a oxaliplatinou. Znakem, který předpovídá účinnost léčby panitumumabu, je opět přítomnost K-ras nemutované formy. Tato bílkovina je odhalena u více jak poloviny pacientů s mCRC. Pro odhalení mutované či nemutované formy v nádorových buňkách se využívá analýza DNA a tento test je doporučován pacientům, kteří se chystají na léčbu jak cetumabem tak i panitumumabem. Nejběžnějším nežádoucím účinkem je kožní toxicita (kožní vyrážky a suchost kůže), kterou způsobuje vysoká exprese EGFR epidermálními buňkami kůže [121].

Studie fáze III PRIME testovala účinnost kombinace panitumumabu s chemoterapií FOLFOX4 v první linii léčby MCRC. U pacientů s divokou formou K-ras byl medián PFS v rameni, které kombinovalo panitumumab s chemoterapií, delší oproti samostatné chemoterapii FOLFOX4 (10 vs. 8,6 měsíce) [127].

5.3 Glioblastom

Maligní gliomy se vyznačují zvýšenou tvorbou krevních cév, která je zásadní pro růst nádoru a jeho kolonizaci v mozku. Cévy gliomu ukazují endoteliální buněčnou proliferaci, která je klíčovým prvkem klasifikace gliomu v systému třídění WHO. Glioblastom je nejčastější maligní primární nádor mozku u dospělých. I přes jeho léčbu studie uvádějí maximální délku života do 2 let. Aberantní cévy nádoru zvyšují hypoxii a narušují tak dodávku cytostatik. Je prokázáno, že exprese VEGF je přímo úměrná stupni malignity. To vysvětluje, proč největší edém bývá u glioblastomu a metastáz, zatímco u gliomů WHO stupně II je malý nebo zcela chybí [96].

Glioblastom multiforme (GBM) je jeden z nejagresivnějších mozkových nádorů, přičemž jeho léčba je značně komplikovaná. Nejběžněji se využívá kombinace radio- a chemoterapie po radikální operaci zlepšující medián celkového přežití. Dále je nutné se zaměřit i na výzkum biomarkerů v dnešní době rozvoje cílené biologické léčby. Mezi nejslibnější anti-angiogenní látku se řadí bevacizumab. Také se zkoumají i další mechanismy EGF, dráhy m-TOR, integrínů, proteinkinázy C β 2, které ovlivňují angiogenezi. Cilengitid, aflibercept nebo cediranib se také testují, avšak zatím ani jeden z nich nebyl schválen ke klinickému použití. Standardní léčebný režim s radiací a temozolomidem mají stále přednost před inhibitory angiogeneze. Neúspěchu může předcházet například snížená prostupnost léčiv do nádorové tkáně kvůli přítomnosti hematoencefalické bariéry [128].

Nedávné klinické studie bevacizumabu u nově diagnostikovaných GBM sice neprokázaly žádné příznivé účinky na celkovou dobu přežití, ale základní kvalita života a výkonnost související se zdravím byla u pacientů léčených bevacizumabem delší. Potvrzuje se výjimka od Folkmana: GBM roste v nepřítomnosti angiogeneze cyklem proliferace a invazí mozku rozšiřující nekrózu. Kromě toho nekróza pozitivně koreluje s invazí mozku v 26 nově diagnostikovaných GBM. Dále Byly studovány xenografty GBM v mozku zvířat a ukázalo se, že léčba bevacizumabem snížila zásobení krví, ale byla spojena se zvýšením infiltračních nádorových buněk [129]. Také nejspíše zvyšuje motilitu buněčné linie prostřednictvím svých účinků na VEGF, protože ten negativně reguluje invazi a motilitu GBM buněk prostřednictvím suprese HGF-dependentní MET fosforylace [130]. Nedávné výsledky naznačují, že při absenci angiogeneze dochází k migraci buněk GBM k existujícím normálním mikrocévám a k růstu v perivaskulárních prostorech [131].

Pozitivně se prokázala kombinace bevacizumabu s irinotecanem zkoumána u 35 pacientů s recidivujícími high-grade gliomy předléčenými radioterapií a temozolomidem. Léčebné odpovědi dosáhlo 20 pacientů (57%). 46% pacientů zaznamenalo období do progresu 6 měsíců. Po 6 měsících od začátku léčby přežívalo ještě 77% pacientů s přijatelnými nežádoucími účinky [132]. Také bevacizumab v monoterapii vs. Bevacizumab s irinotecanem prokázal kladné výsledky. Medián celkového přežití v monoterapii činil 9,2 měsíce s četností odpovědi na léčbu 28,2%, v kombinaci pak 8,7 měsíce a 37,8% . V současné době probíhají klinické studie fáze III (AVAglio a RTOG-0825), které hodnotí účinnost a bezpečnost bevacizumabu u nemocných s nově diagnostikovaným GBM [128].

Další látkou, která napomáhá léčbě GBM je cediranib. Podle studie fáze II se zapojilo 31 pacientů s recidivujícím glioblastomem. Cediranib ovlivnil kladně četnost přežití bez progresu v 6 měsících (25,8%), PFS 16,7 týdne a s OS 31,7 týdne. Odpověď na radiologickou léčbu zaznamenalo 56% pacientů [133].

Po klinické studii fáze I, která potvrdila bezpečnost podání i maximální tolerovanou dávku cilengitidu, se prováděla fáze II, která měla zhodnotit jeho účinek v různých dávkách. Lepší výsledky se pojily s podáváním vyšší dávky. Po 6 měsících bylo bez progresu 15% pacientů s mediánem celkového přežití 9,9 měsíce. V současnosti probíhá studie fáze III a to i v České republice [134].

Inhibitor m-TOR receptoru temsirolimus byl podáván 65 pacientům s progredujícími GBM po prodělané nejvíce jedné řadě chemoterapie. Radiologické zlepšení nálezu, spojené s výrazným prodloužením PFS zpozorovalo 36% pacientů [135].

6 TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL INHIBITORŮ ANGIOGENEZE U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Inhibice angiogeneze má v léčbě karcinomů významný přínos. Samotně inhibitory při léčbě většiny nádorových onemocnění nemají velký účinek, avšak spojením biologické léčby s chemoterapií, radioterapií a chirurgickým zákrokem se u nemocných výrazně zvyšuje šance na přežití a prodloužení doby života. Lze předpokládat, že do budoucna inhibitory angiogeneze příznivě ovlivní prognózu u pacientů trpících některým zhoubným nádorovým onemocněním [136].

Pohled na to, jak se protínají angiogenní signalizační cesty může pomoci při navrhování přípravků se zlepšeným profilem účinnosti a bezpečnosti a sníženým rizikem rezistence [137]. Avšak doposud je většina přípravků ještě testována pouze ve výzkumných pracovištích a ještě několik let potrvá než se všechny studie ukončí a přinesou pozitivní výsledky. Jde o zpravidla dlouhodobou léčbu a její hodnocení se zdá být značně obtížné ve srovnání s účinky chemoterapie [5]. Je tedy potřeba dalšího výzkumu, jak postupovat a kombinovat schválené a experimentální antiangiogenní látky pro léčbu nádorových onemocnění [137].

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo vytvořit ucelený přehled o nádorové angiogenezi, inhibitech angiogeneze a o možnostech využití inhibitorů angiogeneze v terapii nádorových onemocnění.

Již na konci 20. století se prokázalo, že angiogeneze má významnou úlohu v novotvorbě cév, tedy že existuje propojení mezi angiogenezí a růstem nádoru a šířením metastáz. Mezi nejrozšířenější a nejdůležitější regulátory angiogeneze se řadí angiogenní faktory, především VEGF. Inhibicí těchto VEGF faktorů dochází k zablokování signálních cest, tím se omezí novotvorba cév v nádoru a dochází tak k jeho regresí. Proto jsou v posledních letech vyvíjeny přípravky, které by mohly zajistit lepší prognózu u pacientů trpících nádorovým onemocněním.

U inhibice angiogeneze se využívá přirozených antagonistů angiogeneze, kam se řadí např. ABT-510 nebo angiostatin. V blokádě angiogenních faktorů je nejlépe prozkoumána signální kaskáda VEGF-VGFR. Na blokaci této kaskády jsou postaveny přípravky jako sunitinib, cediranib, monoklonální protilátky bevacizumab a cetuximab a jiné. Neovastat inhibuje proteolytické enzymy a tak rozrušuje bazální membránu. Méně účinná je inhibice endotelové proliferace, kam se řadí lék sirolimus.

Mezi hojně využívaný přípravek v terapii nádorových onemocnění se řadí bevacizumab a to buď v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií. Jeho účinek potvrdilo několik studií i klinických zkoušek. Navíc jeho toxický profil je velmi nízký a vedlejší účinky jsou dobře snášenlivé.

U zmíněných nádorových onemocnění (RCC, CRC, glioblastom) léčiva prokázala lepší výsledky v porovnání s placebem. Upřednostněná je však buď jejich kombinace s chemoterapií, nebo chirurgickým zákrokem, protože léčiva působí jen omezenou dobu a po několika měsících dochází ke vzniku rezistence a nádor opětovně roste. Většina nových léčivých přípravků je doposud ve fázi testování a součástí klinických výzkumů, ale není pochyb o tom, že inhibitory angiogeneze mají do budoucna velký léčebný potenciál u nádorových onemocnění.

8 Použitá literatura

1. Novotný, J. Zikán, M. Nádorová angiogeneze. *Klin Farmakol Farm* 2010; **24**(3): 124–12.
2. Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin in Oncol* 2001; **28**: 536–42.
3. Kerbel R.S. Tumor angiogenesis. *New Engl J Med* 2008; **358**: 2039– 2049.
4. Goldie L.C., Nix M.K., Hirschi K.K. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis* 2008; **4**: 257– 263.
5. Klener P. Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia* 2002; **12**: 2–8.
6. Chung S.A., Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Rev Cancer* 2010; **10**: 505–514.
7. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987; **235**: 442–47.
8. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; **6**: 389–95.
9. Klener, P. Význam inhibice angiogeneze v protinádorové léčbě. *Remedia* 2005; **15**: 384-389.
10. Hessig B, Hattori K, Friedrich M, et al. Angiogenesis: vascular remodeling of extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol* 2003; **10**: 136–141.
11. Ryška A. Angiogeneze v nádorech. Část I.: Úloha v určování biologických vlastností nádoru; faktory ovlivňující vznik a vývoj angiogeneze. *Čes Slov Patol* 2000; **36**: 26–31.

12. Lukešová, S. Kopecký, O. Dvořák, J. Hlávková, D. Vroblová, V. Nádorová angiogeneze. *Vnitř Lék* 2006; **52**(9): 797-800.
13. M. Papetti, I. M. Herman: Mechanisms of normal and tumor derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: 947–970.
14. Borset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood* 1996; **88**: 3998–4004.
15. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; **25**: 581–611.
16. Roskoski, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2007; **62**: 179–213.
17. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; **5**: 519–24.
18. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; **373**(6515): 573–580.
19. Spyridopoulos, I. et al. Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals. *J Mol Cell Card* 1997; **29**: 1321-1330.
20. Takahashi, S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF Receptors and Their Inhibitors for Antiangiogenic Tumor Therapy. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2011; **34**(12): 1785-1788.
21. Almodovar, R.. Lambrechts D, et al. Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiological Reviews* 2009; **89**(2): 607-648.

22. Shinkaruk B, Bayle M, Lain G, et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; **2**: 95– 117.
23. Holmes K, Roberts O.L., Thomas A.M., Cross M.J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007; **19**(10): 2003-2012.
24. Ramp U, Reinecke P, Gabbert H.E., Gerharz C.D. 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.
25. Kučera R: Inzulinu podobné a jiné růstové faktory a nádory, dizertační, Univerzita Karlova, lékařská fakulta, Praha, 2011.
26. http://www.rcsb.org/pdb/images/1SHY_bio_r_500.jpg?bioNum=1 [cit. 29. 5. 2017].
27. Klener P. Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění. *Klin Onkol* 2010; **23**(1): 14–20.
28. Murphy K, Travers P. Walport, M.. Janeway's Immunobiology. 7. vyd. New York: Garland Science, 2008. ISBN 9780815341239.
29. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA in uterine cervical cancers. *British Journal of Cancer* 1999; **79**: 1249–1254.
30. Hannink M, Donoghue D.J. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; **989**: 1–10.
31. Gately S., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10868-10872.

32. O'Reilly M.S., 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.
33. O'Reilly M.S., Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; **88**: 277–285.
34. Alberts B, et al. The Molecular Biology of the Cell. 4. vyd. New York: Garland Science, 2002.
35. Ferrari G, Cook D, Terushkin V, et al. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 2009; **219**: 449-458.
36. Lukešová Š, Kopecký O, Dvořák J, et al. Angiogeneze u renálního karcinomu. *Interní Med.* 2007; **1**: 21–27.
37. Eisman R, Surrey S, Ramachandran B, Schwartz E, Poncz M. Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood* 1990; **76**: 336–344.
38. Fox S, Harris A. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS* 2004; **12**: 413-430.
39. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to antiangiogenic therapy. *Nature Rev Cancer* 2008; **8**: 593–603.
40. Scappaticci F. Mechanisms and Future Directions for Angiogenesis-Based Cancer Therapies. *Journal of Clinical Oncology* 2002; **20**: 3906-3927
41. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**: 249–257.

42. Marme D, Fusening N. Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy. Berlín: Springer, 2008.
43. Kašparová P: Angiogeneze v kostní dřeni, Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, LFHK, Hradec Králové, 2006.
44. Talks K, Harris A: Current status of antiangiogenic factors. *Brit J Haematol* 2000; **109**: 447-489.
45. Hirota K.G., Semenza L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; **59**: 15-26.
46. Pohlová L: Studium potenciálních inhibitorů angiogeneze pomocí „Capillary-like tube formation“ testu, bakalářská práce, Univerzita Karlova, PŘF UK, Praha, 2012.
47. Lukešová Š, Kopecký O, Dvořák J, et al. Význam genetických mutací a podstata poruchy angiogeneze u světlo buněčného karcinomu ledviny. *Klin Onkol* 2006; **19** (6): 290-292.
48. Rini B.I., Small E.J. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol* 2005; **23**: 1028-1043.
49. Brauch H, Weirich G, Brieger J., et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000; **60**: 1942-1948.
50. Catapano D, Muscarella L.A., Guarnieri V. Hemangioblastomas of central nervous system: molecular genetic analysis and clinical management. *Neurosurgery* 2005; **56**: 1215– 1221.
51. Cohen H.T., McGovern F.J.: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2477-2490.

52. 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.
53. Hoffman M, Ohh M, Yang H, et al. Von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1019-1027.
54. ADAM Z. Kostní nádorová choroba. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1357-8.
55. Cooke J, Losordo D. Nitric Oxide and Angiogenesis. *Circulation* 2002; **105**: 2133-2135.
56. Hoekstra R, de Vos F, Eskens F, et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005; **23**: 5188-5197.
57. Klener P. Principy systémové protinádorové léčby. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2013. 199 s. ISBN: 978-80-247-4171-0.
58. Klener P: Nové možnosti využití bevacizumabu v protinádorové léčbě. *Remedia* 2008; **18**: 70-75.
59. Chu Q. S. Aflibercept (AVE 0005): an alternative strategy for inhibiting tumour angiogenesis by vascular endothelial growth factors. *Expert Opin Biol Ther* 2009; **9**: 263– 271.
60. Be´liveau R, Gingras D, Kruger E.A., et al. The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) inhibits vascular endothelial growth factor-mediated biological effects. *Clinical Cancer Research* 2002; **8**: 1242-1250.
61. Batist G, Patenaude F, Champagne P, et al. Neovastat (Æ-941) in refractory renal cell carcinoma patients: report of a phase II trial with two dose levels. *Ann Oncol* 2002; **13**: 1259-1263.

62. Chatterjee M, Rana A, Rana B. *Angiogenesis & therapeutic targets in cancer*. S.I.: Bentham Science Publishers Ltd, 2010. 225s. ISBN 9781608050079.
63. D'Amato R.J., Loughan M.S., Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**(9):4082-4085.
64. Študentová H, Melichar B. Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura. *Onkologie* 2010; **4**(3): 185–188.
65. Farsa O. Terapeutické monoklonální protilátky v léčbě a ve vývoji. *Chem. Listy* 2013; **107**: 464-470.
66. Sobotková M, Bartůňková J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. *Remedia* 2008; **18**: 356-364.
67. O'Connor J, Carano R, Clamp A, et al. Quantifying Antivascular Effects of Monoclonal Antibodies to Vascular Endothelial Growth Factor: Insights from Imaging. *Clinical Cancer Research* 2009; **15**: 6674-6682
68. Suenaga M, Matsusaka S, Ueno M, et al. Predictors of the efficacy of FOLFIRI plus bevacizumab as second-line treatment in metastatic colorectal cancer patients. *Surgery today* 2011; **41**(8): 1067-1074.
69. Yuan F, Chen Y, Dellian M, et al. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **93**:14765–14770.
70. Yeung Y, Wu X, Reyes A, et al.:A therapeutic anti-VEGF antibody with increased potency independent of pharmacokinetic half-life. *Cancer Research* 2010; **15**: 3269-3277.

71. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2335-2342.
72. Kocáková I. Cetuximab – biologická léčba metastazujícího kolorektálního karcinomu. *Remedia* 2005; **15**: 463–468.
73. Kocáková I, Němeček R. Cetuximab a irinotecan v léčbě chemorezistentního metastazujícího kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 2009; **3**(5): 303–307.
74. Brančíková D, Adámková Krákorová D. Sunitinib. *Remedia* 2008; **18**: 187–193.
75. Chinchar E, Makey L.K., Gibson J, et al. Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative. *Vascular Cell* 2014; **6**: 1-12.
76. Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; **356**: 115–124.
77. Le Tourneau Ch, Raymond E, Faivre S. Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Ther Clin Risk Manag* 2007; **3**: 341–348.
78. <http://icanhasscience.com/wp-content/uploads/2011/02/Antiangiogenic-Drug-Sunitinib-e1298375458195.jpg> [cit. 29. 5. 2017].
79. Demetri G.D., van Oosterom A.T., Garrett C.R., et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; **368**: 1329–1338.
80. Bartoš J. Sorafenib. *Remedia* 2008; **18**: 273–282
81. Levy J, Pauloski N, Baun D, et al. Analysis of transcription and protein expression changes in the 786-O human renal cell carcinoma tumor xenograft model in response to

- treatment with the multi-kinase inhibitor sorafenib (BAY 43-9006). *Proc Am Assoc Cancer Res* 2006; **47**: 906.
82. <http://www.apexbt.com//media/diy/images/struct/A3009.png> [cit. 23. 3. 2017].
83. <http://patentimages.storage.googleapis.com/US20140011855A1/US20140011855A1-20140109-C00001.png> [cit. 23. 3. 2017].
84. Rosas C, Sinning M, Ferreira A, et al. Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistant to chemotherapy. *Biological Research* 2014; **47**: 1-27.
85. Stichtenoth D.O., Frölich J.C. The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? *Drugs* 2003; **63**: 33-45.
86. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/image.cfm?archiveid=6868&type=img&name=celebrex-01.jpg> [cit. 29. 5. 2017].
87. Noh W.C., Mondesire W.H., Peng J, et al. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* 2004; **10**(3): 249–258.
88. Klener P. Chemoterapie v komplexní léčbě zhoubných nádorů a hemoblastóz. Praha: Avicenum, 1987, 490 s.
89. Ebos J, Lee Ch, Cruz-Munoz W, et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009; **15**: 232-239.
90. Di Raimondo F, Pia Azzaro M, Palumbo G.A., et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 2000; **85**: 800-805.
91. Rajkumar S, Mesa R, Fonseca R, et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clinical Cancer Research* 2002; **8**: 2210-2216.

92. Chen, H., Treweeke, A.T., West, D.C., et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*,2000; **96**: 3181–3187.
93. Aguayo A, O'Brien S, Keating M, et al. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; **96**: 768-770.
94. Menzel T, Rahman Z, Calleja E, et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996; **3**: 1056-1063.
95. Takahashi A, Sasaki H, Kim S.J., et al. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer research* 1994; **54**: 4233-4237.
96. Wang L, Zhang L, Shen W, et al. High expression of VEGF and PI3K in glioma stem cells provides new criteria for the grading of gliomas. *Exp Ther Med* 2016; **11**: 571–576.
97. Würdinger T, Tannous B.A. Glioma angiogenesis. *Cell Adhesion & Migration* 2009; **3**:230-235.
98. Boneberg E.M., Legler D.F., Hofer M.M., et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis are downregulated in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2009; **101**: 605-614.
99. Levitzki A. EGF receptor as a therapeutic target. *Lung Cancer* 2003; **41**: 9-14.
100. Kubáčková K. Renální karcinom. Jak dále po selhání léčby inhibitory angiogeneze? *Remedia* 2010; **20**: 319–326.

101. Rodríguez-Antona C., García-Donas J. Constitutional genetic variants as predictors of antiangiogenic therapy outcome in renal cell carcinoma. *Pharmacogenomics* 2012; **13**: 1621–1633.
102. Lainakis G, Baimas A. Targeting Angiogenesis in Renal Cell Carcinoma. *Current Cancer Drug Targets* 2008; **8**(5): 349-358.
103. Escudier B, Eisen T, Porta C, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012; **23**: 65–71.
104. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007; **370**: 2103-2111.
105. Motzer R.J., Escudier B, Oudard S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* 2010; **116**: 4256–4265.
106. Rini B.I., Michaelson M.D., Rosenberg J.E., et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; **26**(22): 3743-3748.
107. Flaherty K, T. Sorafenib in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2007; **13**(2): 747-752.
108. Vachkani P, George S. VEGF inhibitors in renal cell carcinoma. *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 2016; **14**(12): 1016-1028.
109. Gupta S, Spiess P.E. The prospects of pazopanib in advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol* 2013; **5**(5): 223-232.
110. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; **356**: 2271–2281.

111. Fearon E.R., Kohn D.B., Winkelstein J.A., Vogelstein B, Blaese R.M. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* 1988; **72**(5): 1735-1739.
112. DeVita V.T., Lawrence T.S., Rosenberg S.A., DePinho R.A., Weinberg R.A. DeVita Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 2800s. ISBN 978-1451105452.
113. Vítek P. Léčba pokročilých nádorů kolorekta. *Farmakoterapie* 2013; **9**(5): 501–509.
114. Ciardiello F, Tortora G. Anti-epidermal growth factor receptor drugs in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; **11**: 755–768.
115. Karapetis S.CH., Khambata-Ford S, Jonker J.D., et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; **359**: 1757-1765.
116. Fínek J. Biologická léčba kolorektálního karcinomu. *Interní Med* 2008; **10**: 54-57.
117. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximabmonotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 337–345
118. Tabernero J, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E., et al. Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 5225–5232.
119. Van Cutsem E, Nowacki M., Lang I., et al. Randomized phase III study of irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): The CRYSTAL trial. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 4000.
120. Kiss I, Tomášek J, Halámková J. Biologická léčba kolorektálního karcinomu. *Remedia* 2008; **18**: 28–34.

121. Büchler T. Systémová léčba kolorektálního karcinomu. *Onkologické péče* 2008; **12**: 13-16.
122. Hurwitz H.I., Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2335–2342.
123. Petrelli F, Coinu A, Ghilardi M, Cabiddu M, Zaniboni A, Barni S. Efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy + bevacizumab as first-line treatment for advanced colorectal cancer: a systematic review and pooled analysis of published trials. *Am J Clin Oncol* 2015; **38**(2): 227-233.
124. Punt C. Léčebné strategie u kolorektálního karcinomu. Department of Medical Oncology Radboud University Nijmegen Medical Centre, The Netherlands. Dostupné online: <http://slideplayer.cz/slide/2938526/> [ppt, cit. 10. 5. 2017].
125. Folprecht G., Seymour M.T., Saltz L, et al. Irinotecan/fluorouracil combination in first-line therapy of older and younger patients with metastatic colorectal cancer: combined analysis of 2,691 patients in randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 1443–1451.
126. Fuchs C.S., Marshall J, Barrueco J, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 689–690.
127. Douillard JY, Siena S, Tabernero J, et al. Overall Survival (OS) Analysis From PRIME: Randomized Phase 3 Study of Panitumumab (pmab) With FOLFOX4 for 1st-line Metastatic Colorectal Cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2013; **31**: 3620.
128. Lakomý R, Burkoň P, Burkoňová D, Jančálek R. Nové možnosti léčby glioblastoma multiforme. *Klin Onkol* 2010; **23**(6): 381–387.

129. Scribner E, Saut O, Province P, Bag A, Colin T, et al. Effects of Anti-Angiogenesis on Glioblastoma Growth and Migration: Model to Clinical Predictions. *PLOS ONE* 2014; **9**(12): e115018.
130. Lu K.V., Chang J.P., Parachoniak C.A., Pandika M.M., Aghi M.K., et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 2012; **22**: 21–35.
131. Baker G.J., Yadav V.N., Motsch S, Koschmann C, Calinescu A.A., et al. Mechanisms of glioma formation: iterative perivascular glioma growth and invasion leads to tumor progression, VEGF-independent vascularization, and resistance to antiangiogenic therapy. *Neoplasia* 2014; **16**: 543–561.
132. Vredenburgh J.J., Desjardins A, Herndon J.E., et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007; **25**(30): 4722–4729.
133. Batchelor T.T., Duda D.G., di Tomaso E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010; **28**(17): 2817–2823.
134. Rear don D.A., Fink K.L., Mikkelsen T., et al. Randomized phase II study of cilengitide: An integrin argin-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *Clin Oncol* 2008; **26**: 5610–5617.
135. Galanis E, Buckner J.C., Maurer M.J., et al. North Central Cancer Treatment Group. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5294–5304.
136. Klener P. Dnešní pokroky a možné perspektivy v léčbě nádorových onemocnění. *Sanquis* 2004; **36**: 14-14.
137. Sun, W. Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2012; **5**(63): 1-9.