

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Brno 2017

MUDr. Danica Zapletalová

MASARYKOVA UNIVERZITA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Fakultní nemocnice Brno

Klinika dětské onkologie

**Cirkulující endoteliální a progenitorové buňky jako biomarkery
angiogeneze u dětských onkologických pacientů**

Disertační práce v oboru onkologie

Školitel:

Prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D.

Autor:

MUDr. Danica Zapletalová

Brno, 2017

Abstrakt

Úvod: Novotvorba cév angiogenezí či vaskulogenezí je nedílnou součástí nádorového růstu. Má zásadní význam pro jeho invazivitu a metastazování. S rozvojem antiangiogenní léčby se objevila potřeba spolehlivého markeru angiogeneze, jenž by měl jak prognostický, tak prediktivní význam. Cirkulující endoteliální buňky (CEC) a cirkulující endoteliální progenitorové buňky (EPC) byly několika studii navrženy jako potenciální neinvazivní biomarkery nádorové angiogeneze.

Cíle: Cílem naší práce byla podrobná analýza množství CEC a EPC u dětských onkologických pacientů jak iniciálně ve vztahu k typu nádoru, rozsahu onemocnění, typu dosažené odpovědi na léčbu, tak i monitorace dynamiky těchto buněk v průběhu léčby, srovnání konvenční chemoterapie a metronomické/antiangiogenní léčby, zhodnocení vlivu febrilní neutropenie, operačního zákroku či podávání rekombinantního G-CSF.

Pacienti a metody: Analýza cílů v první etapě výzkumu byla provedena u 171 dětí. Do druhé části studie bylo zařazeno 30 pacientů. Pro zhodnocení vlivu febrilní neutropenie, operačního zákroku a podávání Neupogenu bylo analyzováno celkem 478 vzorků periferní krve. Množství buněk bylo stanoveno pomocí flowcytometrie. V první etapě byly hodnocené aktivované CEC (aCEC) s imunofenotypickou definicí $CD45^+CD146^+CD105^+$, zralé CEC (mCEC) $CD45^+CD146^+CD31^+$ a EPC $CD45^{+/+}CD146^+CD34^+$. Ve druhé etapě byly hodnoceny CEC jako $CD45^+CD146^+CD31^+$, EPC jako $CD45^+CD146^+CD133^+$ a jejich mrtvé/apoptotické varianty 7-AAD⁺.

Výsledky: Nenalezli jsme signifikantní rozdíl v iniciálním množství sledovaných buněk v korelaci s typem nádoru. Při srovnání hodnot před léčbou a v jejím průběhu bez ohledu na diagnózu došlo k poklesu v množství aCEC a mCEC. Při korelaci s odpovědí na léčbu byl patrný statisticky signifikantní pokles aCEC u pacientů, kteří dosáhli pouze stabilizace onemocnění nebo u nichž došlo k progresi ve srovnání s pacienty, jež dosáhli objemové regrese tumoru. Rozsah onemocnění a léčby neměl významný vliv. Po podání konvenční chemoterapie došlo k signifikantnímu nárůstu CEC i EPC v průběhu prvních 7 dnů bloku a následně k poklesu hodnot, zatímco dynamika sledovaných buněk v průběhu antiangiogenní léčby nevykazovala žádný výraznější trend. Iniciálně v průběhu febrilní neutropenie a po podání Neupogenu došlo k signifikantnímu poklesu CEC i EPC, zatímco operační zákrok neměl významný vliv na sledované hodnoty.

Závěr: V naší studii jsme nepotvrdili význam EPC a CEC jako spolehlivých biomarkerů u dětských onkologických pacientů. V praxi by bylo možné využít monitoraci aCEC k vytipování pacientů, kteří by mohli hůře odpovídat na léčbu. Při podávání konvenční chemoterapie může docházet k dočasné stimulaci neoangiogeneze, zatímco při antiangiogenní léčbě k výraznějším výkyvům v hodnotách EPC a CEC nedochází. Pro další využitelnost EPC a CEC je nutný standardizovaný a robustně validovaný protokol pro analýzu pomocí flowcytometru.

Klíčové slova

Angiogeneze - vaskulogeneze - cirkulující endoteliální buňky - cirkulující endoteliální progenitorové buňky - dětské nádory – flowcytometrie

Summary

Introduction: Neovascularization by angiogenesis or vasculogenesis is an integral part of the tumor growth, it is essential for tumor invasiveness and for the process of metastasis. With the development of antiangiogenic therapies there is urgent need for reliable biomarkers of angiogenesis, that would have both - prognostic and predictive meaning. Circulating endothelial cells (CEC) and circulating endothelial progenitor cells (EPC) have been proposed as a potential noninvasive biomarker of tumor angiogenesis in several studies.

Objective: The aim of our work was a detailed analysis of the amount of CEC and EPC in pediatric cancer patients, both initially in relation to tumor type, extent of the disease, type of the treatment response as well as monitoring the dynamics of these cells during treatment, comparison of conventional chemotherapy and metronomic/antiangiogenic treatment, an evaluation of the effect of febrile neutropenia, surgery, or administration of recombinant G-CSF.

Patients and methods: The analysis of objectives in the first part of the research was performed in 171 children. The second part of the study included 30 patients. A total of 478 peripheral blood samples were analyzed to assess the effect of febrile neutropenia, surgery, and Neupogen administration. Cells were determined by flowcytometry. In the first part we evaluated activated CEC (aCEC) with immunophenotypic definition $CD45^-CD146^+CD105^+$, mature CEC (mCEC) $CD45^-CD146^+CD31^+$ and EPC $CD45^{-/+}CD146^+CD34^+$. In the second part, CECs were evaluated as $CD45^-CD146^+CD31^+$, EPC as $CD45^-CD146^+CD133^+$ and their dead/apoptotic variants as 7-AAD⁺.

Results: We did not find a significant difference in the initial amount of the monitored cells in correlation with the tumor type. Comparing the values before and during treatment, regardless of the diagnosis, there was a decrease in the amount of aCEC and mCEC. In correlation with the treatment response, there was a statistically significant decrease in aCEC in patients who achieved only disease stabilization or progressed on treatment compared to patients who achieved regression in the tumor volume. The extent of the disease and treatment did not have a significant effect. Following conventional chemotherapy, there was a significant increase in both CEC and EPC over the first 7 days of the chemotherapy cycle, followed by a decrease in values, while the dynamics of the monitored cells during the antiangiogenic treatment showed no significant trend. Initially, during febrile neutropenia and

after Neupogen administration, there was a significant decrease in both CEC and EPC, whereas the surgery did not have a significant impact on the monitored values.

Conclusions: In our study, we did not confirm the significance of EPC and CEC as reliable markers in pediatric cancer patients. In practice, aCEC monitoring could be used to identify patients who may be less responsive to treatment. Conventional chemotherapy may temporarily stimulate neoangiogenesis, whereas anti-angiogenic therapy does not result in significant fluctuations in EPC and CEC values. For the further use of EPC and CEC as biomarkers of angiogenesis, a standardized protocol for flowcytometry analysis is required.

Keywords

Angiogenesis – vasculogenesis - circulating endothelial cells - circulating endothelial progenitor cells - pediatric malignancy - flowcytometry

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr.
Jaroslava Štěrbý, Ph.D., s využitím zdrojů uvedených v soupisu literatury.

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Jaroslavu Štěřbovi, Ph.D. za pečlivé vedení, cenné rady, odbornou pomoc a čas, který mi věnoval v průběhu celého studia. Současně děkuji Ing. Olze Stehlíkové, Ph.D. a Andree Wágnerové za pomoc a rady ohledně flowcytometrie. V neposledné řadě děkuji svému manželovi Štěpánovi a synu Jonášovi za lásku, nesmírnou podporu a trpělivost a stejně tak celé rodině.

Obsah

1 Úvod	13
1.1 Vaskulogeneze	13
1.2 Fyziologická angiogeneze	13
1.3 Stavba fyziologické cévy	15
1.4 Nádorová angiogeneze	18
1.4.1 Historie	18
1.4.2 Proces nádorové angiogeneze	20
1.4.3 Stavba novovytvořené cévy v tumoru	28
2 Markery angiogeneze	30
2.1 Preklinické angiogenní studie	30
2.2 Mikrovaskulární hustota (MVD)	30
2.3 Proteiny plazmy	31
2.4 Zobrazovací metody	31
2.5 Cirkulující endoteliální buňky (circulating endothelial cells - CEC).....	31
2.5.1 Historie	31
2.5.2 Původ a patofyziologie CEC.....	32
2.5.3 Hodnoty CEC v průběhu života.....	33
2.5.4 Metody detekce CEC	34
2.5.5 CEC u různých onemocnění.....	39
2.5.6 CEC u dospělých pacientů s nádorovým onemocněním.....	39
2.6 Cirkulující endoteliální progenitorové buňky (circulating endothelial progenitor cells - EPC)	41
2.6.1 Historie	41
2.6.2 Původ a patofyziologie EPC	42
2.6.3 Hodnoty EPC v průběhu života	45
2.6.4 Metody detekce EPC	45

2.6.5 EPC u různých onemocnění	46
2.6.6 EPC u dospělých onkologických pacientů	46
2.7 CEC a EPC v dětské onkologii	48
3 Cíle práce.....	51
3.1 Stanovení množství aktivovaných CEC (aCEC), zralých CEC (mCEC) a EPC u pacientů Kliniky dětské onkologie FN Brno v korelaci s diagnózou.....	51
3.2 Srovnání hodnot aCEC, mCEC a EPC při diagnóze a v rámci přešetření v korelaci s rozsahem onemocnění, léčbou a odpovědí na léčbu	51
3.3 Sledování dynamiky vývoje hodnot CEC a EPC v čase v korelaci s podáním blokové konvenční chemoterapie nebo metronomické/cílené antiangiogenní léčby	51
3.4 Korelace množství CEC a EPC s febrilní neutropenií, operačním zákrokem a podáváním rekombinantního G-CSF.....	52
4 Metodické postupy a soubory pacientů	53
4.1 Soubory pacientů	53
4.2 Analýza CEC a EPC metodou flowcytometrie.....	54
4.2.1 Protokol pro stanovení CEC a EPC pomocí průtokové cytometrie v první etapě výzkumu	54
4.2.2 Protokol pro stanovení CEC a EPC pomocí průtokové cytometrie ve druhé etapě výzkumu	56
4.3 Analýza vlivu rozsahu onemocnění, typu a průběhu léčby na hodnoty aCEC, mCEC a EPC.....	57
4.3.1 Analýza vlivu rozsahu onemocnění na hodnoty aCEC, mCEC a EPC	57
4.3.2 Analýza vlivu léčby a odpovědi na léčbu na hodnoty aCEC, mCEC a EPC	57
4.4 Sledování dynamiky vývoje hodnot CEC a EPC v čase v korelaci s podáním blokové konvenční chemoterapie nebo metronomické či jiné antiangiogenní léčby	58
4.5 Analýza vlivu febrilní neutropenie, operačního zákroku a podávání rekombinantního G-CSF na množství CEC a EPC.....	59
4.5.1 Analýza vlivu febrilní neutropenie na množství CEC a EPC	59
4.5.2 Analýza vlivu operačního zákroku na množství CEC a EPC	59

4.5.3 Analýza vlivu podávání rekombinantního G-CSF (Neupogenu) na množství CEC a EPC	59
4.6 Statistické metody	60
5 Výsledky	61
5.1 Stanovení množství CEC a EPC u pacientů Kliniky dětské onkologie FN Brno a korelace s diagnózou	61
5.2 Srovnání hodnot aCEC, mCEC a EPC při diagnóze a v rámci přešetření v korelaci s rozsahem onemocnění, léčbou a odpovědí na léčbu	65
5.2.1 Množství aCEC, mCEC a EPC v rámci přešetření v korelaci s diagnózou.....	66
5.2.2 Srovnání množství aCEC, mCEC a EPC při diagnóze a při přešetření bez ohledu na diagnózu	69
5.2.3 Dynamika v množství aCEC, mCEC a EPC v korelaci s rozsahem onemocnění, léčbou a odpovědí na léčbu	70
5.3 Sledování dynamiky vývoje hodnot CEC a EPC v čase v korelaci s podáním blokové konvenční chemoterapie nebo metronomické či jiné antiangiogenní léčby	73
5.4 Korelace množství CEC a EPC s febrilní neutropenií, operačním zákrokem a podáváním rekombinantního G-CSF.....	77
5.4.1 Korelace množství CEC a EPC s febrilní neutropenií.....	78
5.4.2 Korelace množství CEC a EPC s operačním zákrokem	79
5.4.3 Korelace množství CEC a EPC s podáváním rekombinantního G-CSF (Neupogen)	80
6 Diskuze.....	83
7 Závěr	92
8 Soupis literatury a pramenů	95
9 Seznam zkratk.....	114
10 Seznam obrázků.....	120
11 Seznam tabulek.....	121
12 Seznam odborných publikací autora	122
13 Souhrn poznatků	125

1 Úvod

Difusní limit kyslíku činí přibližně 100 až 200 μm . U primitivních tvorů, jako je například *Drosophila melanogaster*, tak kyslík prostupuje prostou difuzí každou buňku jejich těla. U složitějších organizmů větších rozměrů se ale jednotlivé buňky musí nacházet od nejbližší cévy v rámci tohoto difusního limitu. Aby byl tento požadavek splněn, musí si organizmus zajistit adekvátní cévní síť novotvorbou cév a to buď vaskulogenezí nebo angiogenezí.¹

1.1 Vaskulogeneze

Fyziologicky se krevní cévy vyvíjí z angioblastů přibližně 3. týden embryonálního vývoje procesem vaskulogeneze. Klíčovou roli zde hrají angioblasty, buňky mesenchymálního původu, určené pro diferenciaci v endotelové buňky. Ty spolu s hematopoetickými kmenovými buňkami splývají do primitivní sítě cév označované jako primitivní kapilární plexus. Vaskulogeneze je tedy proces nezávislý na preexistujících cévách, jelikož vzniká z prekursorových endoteliálních buněk.¹

První cévy mají vzhled kanálků a jejich stěna je tvořena mezenchymálními buňkami. Výstelku těchto cév tvoří postupně se oplošťující angioblasty, které splývají v souvislou vrstvu. Jejich povrch se zvětšuje, vytváří mikrovilózní reliéf a cytoplasmatické výchlípky na straně lumenální i ablumenální. Adhezivita buněk mezi sebou navzájem je zpočátku slabá, realizovaná pouze bodovými kontakty, ty se pak zdokonalují v nexy, až z nich v kapilárách postupně vznikají zonulae occludentes. Na ablumenální straně endotelových buněk se vytváří bazální membrána, čímž se sníží permeabilita cévní stěny. Kolem bazální membrány se pak z mesenchymálních buněk diferencují hladké svalové buňky tvořící vrstvu tunica media. Primitivní kapilární plexus je následně remodelován pučením, větvením či intususcepcí nových cév z již existujících cévních kmenů procesem angiogeneze.²

1.2 Fyziologická angiogeneze

S fyziologickou angiogenezí se setkáváme zejména v průběhu embryonálního vývoje, kde je jejím úkolem vytvořit dostatečné cévní zásobení všem vyvíjejícím se orgánům. V dospělosti jsou endoteliální buňky (EC) v klidovém stádiu a angiogeneze se vyskytuje pouze u žen v průběhu ovariálního cyklu nebo v placentě při těhotenství. EC si ale uchovávají svojí schopnost dělení v případě stimulů jako je například hypoxie. Angiogeneze se také reaktivuje v rámci reparačních procesů a při hojení ran.³

Angiogeneze je přísně regulovaný proces, jenž závisí na koordinaci několika nezávislých dějů. Ty probíhají jako cyklus ve čtyřech etapách a souhrnně se označují jako angiogenní kaskáda.

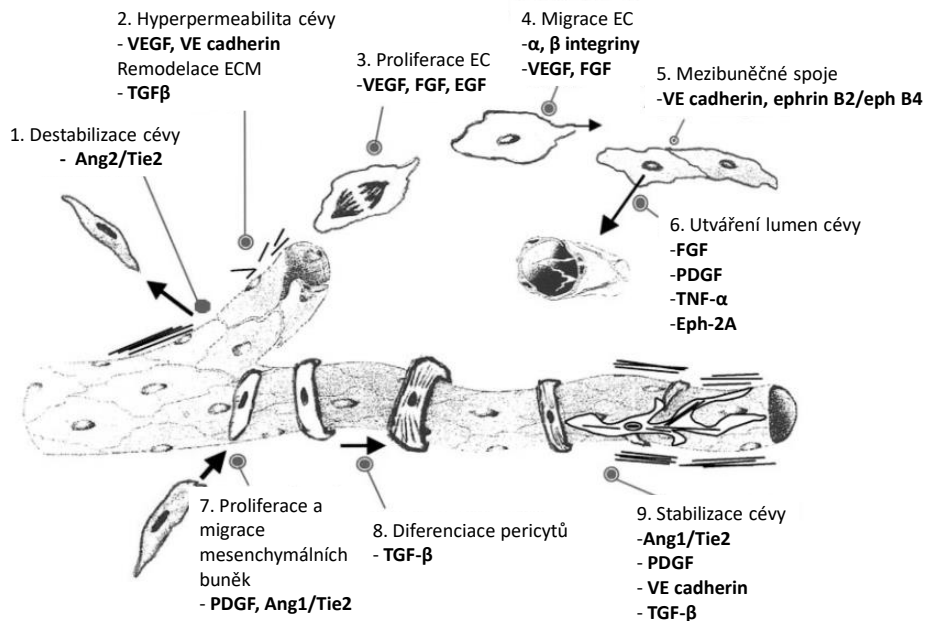
V bazální klidové fázi exprimují perivaskulární buňky angiopoetin 1 (ANG1), který vazbou na receptor TIE2, nacházející se na endoteliálních buňkách, udržuje integritu cévní stěny.⁴

Působením proangiogenních faktorů (např. angiopoetinu-2, ANG2, kdy se zvyšuje poměr ANG2/ANG1) dojde k oslabení integrity cévní stěny a postupně k odstranění nástěnných buněk (pericytů u středně velkých cév, u velkých cév pak buněk hladké svaloviny) a tím k destabilizaci cévy. Endoteliální buňky se aktivují z klidového stádia do stádia proliferace a jsou zvýšeně citlivé na další proangiogenní podněty. Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) způsobuje hyperpermeabilitu cévy a umožní tak extravazaci proteáz a komponent matrixu v místě nově se tvořící cévy. Tyto proteázy pak rozruší extracelulární matrix a bazální membránu a umožní endoteliálním buňkám migrovat. Navíc dochází k úniku fibrinogenu a plazminogenu do extravaskulárního prostoru a jejich následné přeměně na fibrin a plazmin. Fibrinová vlákna vytvářejí síť, která slouží jako matrice pro růst novovytvořených cév. Plazmin s proteázami přispívá k disoluci bazální membrány. Tato fáze se nazývá plastická.^{2, 4}

V další aktivní angiogenní fázi se na povrchu cévy objevují útvary ve tvaru pupenů, tvořené endotelovými buňkami, tzv. vessels sprouts. Stromální buňky produkují novou matrix, která spolu s dalšími růstovými faktory (VEGF, integriny, interleukin 6 a 8) dále podporuje migraci a proliferaci endoteliálních buněk do tvaru kanálků.^{2, 4}

V poslední maturační fázi angiogenního cyklu proliferují mesenchymální buňky podél těchto nově vytvořených cév a diferencují se v pericyty. Vytváří se taktéž nová bazální membrána. Nově vytvořená céva morfologicky a funkčně dozrává. Při intususcepci se uvnitř této novovytvořené cévy vytvářejí transluminální můstky, které rozdělí krevní proud do jednotlivých kanálků. Ty se následně separují a vytvoří tak dceřiné kapiláry.⁴

Následně se endoteliální buňky vrátí do klidového stadia, upevní se mezibuněčné spoje a krev začíná proudit novovytvořenou cévou, viz obrázek č.1.



Obr. 1 – Proces fyziologické angiogeneze. Upraveno dle Papetti a spol.² (Ang2 – angiopoetin 2; VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor; VE cadherin – vaskulární endoteliální cadherin; ECM – extracelulární matrix; TGFβ – transformující růstový faktor β; EC – endoteliální buňky; FGF – fibroblastový růstový faktor; EGF – epidermální růstový faktor; eph B4 – efrin typ B receptor; PDGF – růstový faktor z trombocytů; TNF-α – faktor nádorové nekrózy α; Eph-2A – efrin typ A receptor)

1.3 Stavba fyziologické cévy

Fyziologická céva má 3 vrstvy různé šíře dle své funkce:

- 1) Tunica intima (vnitřní vrstva) – obklopuje lumen cévy, je tvořena tenkou vrstvou endoteliálních buněk, které naléhají na bazální membránu a zajišťují hladký a nesmáčivý povrch vnitřní cévy
- 2) Tunica media (prostřední vrstva) – je tvořena hladkou svalovinou, která je spirálně a kruhovitě orientovaná, což umožňuje změnu průsvitu cévy, regulaci průtoku a činí cévu pružnou
- 3) Tunica externa (vnější vrstva) – je tvořena vazivem s četnými elastickými vlákny, probíhají v ní vegetativní nervy pro hladkou svalovinu v tunice media

Zatímco největší artérie a vény jsou tvořeny všemi třemi vrstvami, přičemž u artérií je dominantní zejména svalová vrstva tvořící prostřední vrstvu (tunica media), nejmenší kapiláry jsou tvořeny pouze vrstvou endoteliálních buněk, obklopených bazální membránou, na kterou rozptýleně nasedají pericyty. Vrstva endoteliálních buněk obklopená bazální membránou je tak součástí všech cévních struktur od srdce až po kapiláry.⁵

Endotel je největším endokrinním orgánem lidského organismu. Tvoří cca 0,5% váhy těla (1,5 - 3 kg) a plochu přibližně 5000 m².⁶⁷ Tyto buňky vykazují velmi nízkou mitotickou aktivitu, v klidovém stádiu se replikuje 1 z 1000 buněk každý den. V případě nutnosti jsou však schopny svůj replikační obrat výrazně zvýšit až na 1 buňku z 10 či 100 buněk denně.⁸ Odhadovaný obrat endoteliálních buněk se tak pohybuje mezi 47 až 23 000 dnů.⁹

Endoteliální buňky jsou ploché, polygonální a mají průměr pouhých 300 nm. Imunohistochemicky jsou definovány pozitivitou CD34 a CD106. Organelová výbava je vcelku chudá. V centrální části buňky se nachází ploché jádro, které v tomto místě buňku vyklenuje směrem do lumina cévy. V laterálních částech se nacházejí velmi tenké výběžky. V blízkosti jádra je umístěn malý Golgiho komplex. Z ostatních buněčných struktur je zde několik mitochondrií, ribozomů a drobné cisterny endoplasmatického retikula. Jsou zde i elementy cytoskeletu - intermediální filamenta a četná aktinová mikrofilamenta, která poukazují na možnou, limitovanou schopnost kontraktility. Ve větších cévách se v endoteliálních buňkách také nacházejí tzv. Weibelova-Paladeho granula, které obsahují von Willebrandův faktor, glykoprotein, vyvolávající shlukování trombocytů při poranění cévní stěny.¹⁰

Propojení endotelových buněk navzájem se uskutečňuje pomocí mezibuněčných spojení. Rozlišují se na utěšňující – zonulae occludentes, adhezivní – desmozomy a komunikační spojení – nexy.

Soudržnost endotelových buněk je zajištěna pomocí četných zonulae occludentes. Tento typ těsného spojení ("tight junction") slouží k utěsnění mezibuněčného prostoru a tak brání paracelulární difuzi látek. Zevní vrstvy buněčných membrán sousedních buněk splývají díky opakovaným kontaktům mezi transmembránovými proteiny kladinem a occludinem a vytváří pás kolem celé buňky.⁵

Mechanická odolnost endotelu je zajištěna hlavně pomocí desmozomů, jež zajišťuje bodové, obzvláště pevné mechanické spojení buněk. Skládají se z desmozomálních úponových

plotének, v nichž jsou ukotvena intracelulární cytokeratinové vlákna, které se rozprostírají v souvislou síť v rozsahu celého endotelu. Tímto desmozomy rozkládají působící sílu na celou endotelovou vrstvu. Hemidesmosomy slouží k ukotvení buňky k extracelulární matrix.^{1,5,10}

Komunikace mezi jednotlivými endotelovými buňkami je zajištěna pomocí nexů, štěrbinových spojů, které umožňují selektivní difuzi iontů a malých molekul a tak urychlují přímou komunikaci mezi sousedními endotelovými buňkami. Nexus je tvořen dvěma connexony, jejichž propojením vzniká intercelulární kanálek.^{1,10}

Endotel svým nesmáčivým povrchem a inaktivací trombinu zabraňuje styku trombocytů se subendotelovou tkání, následně jejich shlukování a tvorbě trombů. Přes poměrně chudou organelovou výbavu jsou tyto buňky metabolicky značně aktivní - produkují mnoho vazokonstrikčních a vazodilatačních substancí, většina z nich působí lokálně a krátkodobě (např. oxid dusnatý, endoteliny). Jsou také místem sekrece cytokinů stimulujících proliferaci (zejména PDGF – růstový faktor z trombocytů) či tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA) i jeho inhibitoru. Působením těchto substancí pak kontrolují napětí cévní stěny, čímž také regulují průtok krve. Pomocí tPA a jeho inhibitoru ovlivňují procesy koagulace a fibrinolýzy a tím i reparační pochody. Současně také inaktivují řadu působků, například bradykinin, serotonin, noradrenalin, nebo zajišťují lipolýzu. Pomocí P- a E-selektinů exprimovaných na lumenálním povrchu endotelových buněk pak navigují leukocyty k místu výstupu z krevního řečiště při potřebě jejich zásahu. Kromě toho produkují i mezibuněčnou hmotu, jako je biglykan a versikan.^{7,10}

V arteriolách, kapilárách a postkapilárních venulách se místo hladké svaloviny nacházejí pericyty (Rougetovy buňky). Jsou mezenchymálního původu a mají dlouhé cytoplasmatické výběžky, jimiž obklopují endotelové buňky. Vytvářejí vlastní bazální laminu, která může splývat s bazální laminou endotelií. V relativně slabě diferencované cytoplasmě obsahují aktin, myozin a tropomyosin, což dokazuje jejich schopnost alespoň částečné kontrakce.¹¹

Tunica media je převážně tvořena buňkami hladké svaloviny, jež také produkují mezibuněčnou hmotu a to zejména glykosaminoglykan chondroitinsulfát a proteoglykany, které tento glykosaminoglykan obsahují. Dále se zde nacházejí tzv. membranae fenestratae, což jsou sítě nebo blanky tvořené elastickými vlákny, obsahující otvory (fenestrae), které umožňují, aby živiny pronikaly do hlubších partií stěny cév. Všechny tyto struktury jsou uspořádané cirkulárně.¹⁰

V tunice adventicii jsou především longitudinálně uspořádaná kolagenní a elastická vlákna, z buněk se zde vyskytují fibroblasty, adipocyty, mohou se vyskytovat i buňky hladké svaloviny. Nacházíme zde převážně kolagen typu I, dále glykosaminoglykany dermatansulfát, v malé míře i heparansulfát.¹⁰

1.4 Nádorová angiogeneze

1.4.1 Historie

Termín angiogeneze poprvé použil chirurg John Hunter již v roce 1787. Ve své praxi pozoroval, že cévy po poranění mají větší schopnost regenerace, než jakýkoliv jiný orgán v těle. V polovině 19. století demonstroval Thiersch přítomnost nových cév ve stromatu karcinomů, které pocházejí z již existujících kapilár. Morfologii cév se věnoval také Virchow. O půl století později Billoth pozoroval bohatší cévní síť v nejmladších částech nádoru na rozdíl od spíše trombotizovaných a atrofovaných kapilár, které se nacházejí ve vývojově starších oblastech tumoru. Podrobnější morfologii nádorových cév popsal až Goldman ve třicátých letech 20. století, když aplikoval indickou modř do cév lidských a zvířecích tumorů, aby mohl studovat průběh, formu a šířku cév. Na základě svých pozorování konstatoval, že pravidelná distribuce krevního řečiště je narušena invazivním růstem tumoru a na jeho okraji dochází k intenzivní novotvorbě cév. Stejnou metodu použil v roce 1927 i Lewis, který však výsledky mylně interpretoval, že nádor určuje růst a uspořádání cév a ne naopak. Tento mylný dojem přetrval téměř 150 let. Až v 40. letech Ide provedl sérii experimentů s inzercí epiteliumu do ucha králíka, kde byl růst tumoru provázen infiltrací nově vytvářených cév. S použitím komůrky poprvé demonstroval fakt, že tumor aktivně přitahuje nově vytvořené kapiláry.¹² Harry S. N. Greene v roce 1941 publikoval výsledky série experimentů s transplantací zvířecích a následně i lidských nádorů do přední komory oka morčat. Transplantované nádory získaly krevní zásobení od hostitele a napadly periorbitální tkáň, ale nemetastazovaly.¹³ V dalších pokusech prokázal schopnost růstu nádorových fragmentů, pokud se transplantují do prostředí bohatého na krevní cévy a proběhne jejich vaskularizace. V těchto letech proběhlo mnoho dalších experimentů zaměřených na neovaskularizaci tumoru, jako příčinu nádorové angiogeneze však předpokládali zánětlivou reakci, vasodilataci, či nahromadění látek metabolismu nádorových buněk.¹²

V roce 1960 prováděli Judah Folkman a Frederick Becker experimenty s roztoky hemoglobinu pro námořnictvo USA za účelem najít náhradu za čerstvou krev pro nemocnice na palubě letadlové lodě. Psí štítné žlázy byly perfundovány roztoky hemoglobinu v uzavřené

skleněné komoře po dobu přibližně jednoho týdne. Po týdnu, s cílem zjistit, zda jsou tyto orgány schopny nejenom přežít v těchto podmínkách, ale i podporovat růst buněk, vstříkli do štítných žláz buňky myšího melanomu. Ty ze začátku rostly rychle, ale přibližně při velikosti cca 1-2 mm³ se jejich růst zastavil. Při pátrání po důvodu zastavení růstu vždy v té samé velikosti, transplantovali tyto tumory následně do myši, kde růst nádoru pokračoval i přes 1 mm³ a nakonec usmrtil svého hostitele. Zásadní rozdíl mezi nádorem v izolované perfundované štítné žláze a nádorem v živém hostiteli (myši) byl ve vaskularizaci – nádor v izolované štítné žláze vaskularizovaný nebyl, tumor implantovaný v myši ano. Po návratu k chirurgické práci v nemocnici v Bostonu si Folkman i v praxi začal všimnout, že nádory u pacientů, které operoval, jsou již velké a dobře vaskularizované a některé malé, 2-3 mm³ velké metastázy jsou naopak bílé, avaskulární.¹⁴ Na základě svých pozorování, ale i experimentů kolegů (Algire, Green, Tannock a jiní) publikoval v roce 1972 hypotézu o závislosti všech nádorů na angiogenezi. Již v té době předpokládal, že pro růst tumoru nad 2 mm³ již prostá difuze nestačí a je nutné rekrutovat nové cévy.¹⁵

Rozděлил tak růst nádoru na dvě na sebe navazující fáze:

- 1) prevaskulární, kdy nádor dosahuje pouze mikroskopických rozměrů bez přítomnosti angiogeneze, přičemž proliferují pouze buňky na periferii, zatímco v centru tumoru dochází k nekróze, nádor ale zůstává životaschopný a schopnost rekrutovat nové cévy si ponechává
- 2) vaskulární, kdy již nové rekrutované kapiláry penetrovaly avaskulární tumor a dochází k rapidnímu růstu nádoru, centrální nekróza mizí, přičemž při velikosti cca 1 cm³ jsou již přítomny kapiláry napříč celým tumorem^{16,4}

V tomto článku z roku 1972 uvedl i další hypotézy – virtuálně každý nádor by se mohl omezit na pouhé mikroskopické rozměry, pokud by nedošlo k angiogenezi; nádory produkují difusibilní proangiogenní molekuly ("tumor angiogenesis factor, TAF") a blokováním angiogeneze by mohlo dojít k zastavení růstu tumoru. Poprvé tak použil slovo "anti-angiogeneze" ve smyslu prevence vytvoření nových cév mikroskopickým tumorem i jako terapeutickou možnost.^{12, 13}

Jeho tvrzení v té době vyvolalo vlnu nesouhlasu a skepticismu, jelikož vaskularizace tumoru byla vnímána jako důsledek zánětlivé reakce organismu a také z důvodu, že svoje hypotézy nemohl dokázat. Angiogenezi totiž nebylo možné studovat in vitro, neexistovaly na to žádné metody. Folkman ale postupně překonal všechny zejména technické obtíže a své hypotézy

potvrdil řadou experimentů, čímž dal podnět na rozvoj zcela nové oblasti výzkumu – angiogenezi a to nejen v onkologii, ale i řadě dalších oborů.¹⁴

1.4.2 Proces nádorové angiogeneze

Za fyziologických okolností je v lidském organismu nastolena rovnováha mezi proangiogenními faktory a inhibitory angiogeneze. Jak již bylo zmíněno výše – nádor pro svůj růst potřebuje přísun živin a kyslíku. Dosáhne-li kritické velikosti (cca 1-2 mm³), pouhá difuze na zajištění výživových nároků tumoru již nestačí a tak dochází k hypoxii a deprivaci nutrientů, které vedou k převaze angiogenních faktorů, jež vyústí v tzv. angiogenní přepnutí ("angiogenic switch") a následně tvorbě nových cév.¹⁷

Nádor může podněcovat angiogenezi ovlivněním rovnováhy mezi aktivujícími (proangiogenními) a inhibujícími faktory v rámci mikroprostředí a to:

- 1) up-regulací a zvýšenou expresí či sekrecí aktivátorů angiogeneze
- 2) up-regulací proangiogenních receptorů na okolních cévách
- 3) down-regulací a sníženou expresí či sekrecí endogenních inhibitorů angiogeneze¹⁸

1.4.2.1 Up-regulace a zvýšená exprese či sekrece aktivátorů angiogeneze a proangiogenních receptorů

Aktivátory angiogeneze jsou secernovány nádorovými buňkami, mohou být mobilizovány z extracelulární matrix, nebo jsou uvolňovány buňkami z mikroprostředí tumoru jako např. makrofágy.¹⁹

Impulzy pro tvorbu proangiogenních faktorů jsou jednak epigenetické (metabolický stres – hypoxie, nízké pH, hypoglykémie; mechanický stres – tlak proliferujících buněk; zánětlivá reakce; sekrece cytokinů), jednak genetické (aktivované onkogeny; delece tumor supresorových genů).^{15,16}

Nejsilnějším epigenetickým stimulem je hypoxie. Vede ke stabilizaci transkripčního faktoru HIF1 α (hypoxia inducible factor alpha) a k jeho transportu do jádra, kde se váže na specifickou sekvenci HRE (hypoxia response element). Následně dochází ke stimulaci transkripce a expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor - VEGF).^{17, 21} Zvýšená exprese HIF1 α podporuje transkripci i dalších důležitých substancí – glukózového transportéru 1 (GLUT1), jež aktivuje transport glukózy uvnitř buňky; laktát dehydrogenázy A (LDH-A), která je součástí glykolytické dráhy; erythropoetinu

(EPO), který podporuje erythropoézu a syntázy oxidu dusnatého (NOS), jež stimuluje angiogenezi a vazodilataci. HIF1 α také indukuje expresi pyruvátdehydrogenázy kinázy 1 (PDK1) a tak brání vstupu pyruvátu do Krebsova cyklu. Tento proces vede ke snížené konzumpci kyslíku a odklonu od oxidativní fosforylace.²¹

Většina lidských nádorových buněk exprimuje VEGF a většina endotelií podílejících se na angiogenezi má na svém povrchu četné receptory pro VEGF. Existuje 6 variant VEGF (VEGF-A až E a PlGF – placenta induced growth factor, který je homologní s VEGF-A), přičemž VEGF-A, VEGF-B a VEGF-E stimulují především proliferaci a migraci endoteliálních buněk a zvyšují permeabilitu cévní stěny, zatímco VEGF-C a VEGF-D se podílejí zejména na lymfangiogenezi.^{17, 22} Receptory VEGF patří mezi tyrosin-kinázové receptory a v současnosti jsou známe celkem 3 – VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1 - kinase-insert domain-containing receptor – KDR u lidí a fetal liver kinase 1 – flk1 u myši) a VEGFR-3 (Flt-4). Po aktivaci VEGFR-1 a VEGFR-2 dochází ke stimulaci proliferace a migrace endotelií, snižuje se jejich citlivost k apoptóze a zvyšuje se cévní permeabilita. VEGFR-3 je exprimován zejména na lymfatických cévách.^{2, 17} Aktivace onkogenu ras nebo ztráta tumor supresorového genu Von Hippel Lindau (VHL) vede k upregulaci exprese VEGF.²³

V rámci nádorové angiogeneze působí VEGF především parakrinně, tedy je exprimován nádorovými buňkami, které na svém povrchu povětšinou nemají pro něj receptory na rozdíl od endoteliálních buněk podílejících se na angiogenezi, jež mají na svém povrchu četné VEGFR. Tyto endotelie ale zase neexprimují téměř žádný VEGF. Také další buňky z tzv. mikroprostředí tumoru, jako například trombocyty či buňky hladké svaloviny, mohou exprimovat dostatečné množství VEGF k vyvolání nádorové angiogeneze. V některých případech může VEGF působit jako růstový faktor také autokrinně, kdy buňky několika typů nádorů exprimují na svém povrchu jak VEGF, tak i VEGFR. Receptor pro VEGF může být také přítomen intracelulárně, kde po aktivaci podporuje přežití nádorových buněk intrakrinním mechanismem.^{22, 24}

VEGF vede ke zvýšené expresi transmembránového ligandu delta-like 4 (Dll4), nacházející se pouze na endoteliálních buňkách. Ten se váže na povrchový receptor notch na přilehlých buňkách. Aktivace notch-Dll4 funguje jako negativní zpětná vazba k prevenci nadměrné angiogeneze. Inhibicí této dráhy dochází ke zvýšené angiogenezi, přičemž jsou ale

novotvořené cévy morfologicky i funkčně abnormální, čímž je krevní proud výrazně redukován a hypoxie v rámci tumoru dále roste.^{21,22}

Další signální dráha, která se uplatňuje v angiogenezi, je aktivována vazbou angiopoetinů 1 a 2 (Ang-1, Ang-2) a jejich tyrosin-kinázového receptoru Tie2, exprimovaného zejména na endoteliálních buňkách. Exprese Tie2 následuje po expresi VEGFR a slouží k podpoře zrání endotelia a ke stabilizaci cévní sítě. Ang-1 působí jako agonista, zatímco Ang-2 působí jako, přinejmenším částečný, antagonist. V nádorové angiogenezi hraje Ang-2 významnější roli než je tomu v průběhu fyziologické novotvorby cév. V časném stádiu tumoru nádorové buňky rostou primárně kolem již existující cévy a ještě nevyžadují vlastní cévní zásobení, tedy ani neprodukují VEGF. Zato indukují expresi Ang-2, jenž je zodpovědný za destabilizaci cévy. Jak tumor roste, rostou i jeho metabolické nároky a produkci VEGF stimuluje neovaskularizaci. Ang-2 pak napomáhá tomuto procesu destabilizací endotelia, jež se stává plastičtější a také podporuje intenzivnější větvení nových cév.^{2,25}

Fibroblastový růstový faktor (FGF) byl prvním objeveným a izolovaným růstovým faktorem stimulující angiogenezi, původně označován jako tumor angiogenesis factor (TAF). Rodina FGF se skládá z 23 členů, z nichž dva – acidický a bázičský FGF jsou velmi silnými induktory proliferace a migrace endoteliálních buněk, utváření cév *in vitro* a také *in vivo*.² Aktivací receptoru FGFR na endoteliálních buňkách bázičským FGF vede ke zvýšené expresi receptorů pro růstový faktor z trombocytů (platelet-derived growth factor - PDGF) – PDGFR- α a PDGFR- β na stejných buňkách. Recipročně aktivací PDGF-BB/PDGFR na povrchu buněk hladké svaloviny asociovaných s nádorovými cévami dochází ke zvýšené expresi a sensitivitě receptorů FGFR k působení bFGF. Důsledkem těchto interakcí je akcelerovaný růst nových cév a jejich výrazná abnormální struktura.²²

Novotvořené cévy jsou tedy chaotické, s četnými strukturálními defekty, často zde chybí bazální membrána i pericyty. To vede k vysokému úniku plazmy do intersticia ("leakage"), čímž se zvyšuje i tlak uvnitř nádoru. Důsledkem těchto pochodů se nadále zhoršuje zásobení nádoru kyslíkem a živinami, vznikají hypoxické nekrózy, jež dále stimulují angiogenezi.¹⁷ Obnažená bazální membrána v místě průniku plazmy do intersticia přitahuje a aktivuje trombocyty, které uvolňují další faktory zvyšující propustnost cév a působící proangiogenně jako např. platelet-derived growth factor (PDGF).²⁷ Rodina tohoto růstového faktoru se skládá z pěti strukturálně podobných polypeptidů – PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC a PDGF-DD, jež jsou ligandem pro tři tyrosin kinázové receptory - PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ a

PDGFR- β . Ze všech ligandů pouze PDGF-BB je schopen vázat se na všechny tři receptory a je tak nejvíce pluripotentním z rodiny PDGF.²⁶ PDGF-BB je secernován také dalšími buňkami v nádorovém mikroprostředí – endoteliálními buňkami, makrofágy. Receptory PDGFR (zejména PDGFR- β) jsou přítomny na pericytech obklopující cévy v blízkosti nádoru, dále na fibroblastech a myofibroblastech ve stromatu tumoru. Stimulace fibroblastů a myofibroblastů aktivací signální dráhy PDGFR přispívá ke zvýšení intersticiálního tlaku, jež dále zhoršuje prokrvení tumoru a podporuje tak další angiogenezi.²⁸

Integriny jsou molekuly, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami a extracelulární matrix. Každý integrin je heterodimer, složený ze dvou podjednotek – α a β . Více než 16 podjednotek α a 8 podjednotek β spolu vytváří četnými kombinacemi přes 20 různých integrinů. Substrátem jsou proteiny extracelulární matrix (polysacharidové glykosaminoglykany a fibrózní proteiny jako např. fibronectin, vitronectin, kolagen, laminin a elastin) a polypeptidy vázané na membráně ostatních buněk. Některé integriny se vážou na krátkou peptidovou sekvenci Arg-Gly-Asp (RGD), která se nachází ve fibronectinu nebo vitronectinu, jiné rozeznávají trojrozměrnou strukturu. Navázání ligandu na integrin funguje jako tzv. crosstalk mezi aktivovaným specifickým cytokinem nebo růstovými faktory a integriny. Tyto vazby mohou determinovat, zda se buňka nachází v odpovídajícím mikroprostředí a mohou tak ovlivnit přežití buňky, migraci a invazi. U buňky, jež se nenachází v odpovídajícím prostředí a k této vazbě ligandu na integrin nedochází, pak může aktivně podpořit apoptózu buňky nebo integrinem zprostředkovanou smrt buňky. Také fragmenty, vzniklé proteolytickou degradací určitých proteinů extracelulární matrix (ECM), mohou působit jako endogenní inhibitory angiogeneze narušením funkce integrinů. Optimální stimulace angiogeneze růstovým faktorem často spoléhá na vazbu integrinu a patřičného proteinu ECM. Např. $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_5\beta_1$ interagují s četnými receptory růstových faktorů jako např. VEGFR2, FGFR1, PDGFR a jinými. Integrin $\alpha_v\beta_3$ je vysoce exprimovaný na povrchu endoteliálních buněk, které byly exponované faktoru bFGF. $\alpha_v\beta_3$ váže také matrix metaloproteinázu-2 (MMP-2) a lokalizuje aktivní formu tohoto enzymu na vrchol pupenu nově vytvářené cévy, čímž stimuluje degradaci ECM a zprostředkovává migraci EC přilnutím k této modifikované ECM. Aktivací signální dráhy MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy) potlačuje apoptózu v EC.^{2,27,29}

1.4.2.2 Down-regulace a snížená exprese či sekrece endogenních inhibitorů angiogeneze

Ačkoli je zvýšená exprese proangiogenních faktorů pro zahájení neovaskularizace nutná, sama o sobě nestačí ke změně tumoru v angiogenní fenotyp. Nezbytná je také snížená produkce inhibitorů.

Endogenní inhibitory lze rozdělit do dvou skupin:

- 1) složky a proteolytické fragmenty ECM a bazální membrány
- 2) rozpustné faktory²⁹

Do první skupiny patří například trombospondin-1 (TSP-1), glykoprotein ECM. TSP-1 byl prvním proteinem, který byl identifikován jako přirozeně se vyskytující inhibitor angiogeneze, jehož množství je snižené na 4-6% v průběhu tumorigeneze. Sekrece TSP-1 v lidských fibroblastech je za fyziologických okolností pod kontrolou tumor supresorového genu p53.³⁰ Ten je transkripčním aktivátorem TSP genu a v několika studiích bylo prokázáno, že zvýšená exprese proteinu wild-type p53 vede ke zvýšené expresi TSP-1. Mutace nebo žádná exprese p53 vede k výrazně nižším hladinám TSP-1, což vede k dysbalanci směrem k proangiogennímu působení a tím možnému přepnutí na angiogenní fenotyp.³¹ TSP-1 se váže na integriny v membráně endotelových buněk, zvyšuje expresi FAS receptoru a tím inhibuje proliferaci EC a indukuje jejich apoptózu.⁴

Prvním inhibitorem derivovaným ze složky bazální membrány je endostatin, fragment kolagenu XVIII, jenž vzniká působením elastázy nebo katepsinu L. Zvýšené hladiny 1,6-2x nad normu lze nalézt u jedinců s Downovým syndromem (DS), díky zvýšené hladině kolagenu XVIII danou třetí kopií genu pro kolagen na trisomickém chromozomu 21. Jedinci s tímto syndromem mají velmi nízké riziko (<0.1) incidence maligního solidního nádoru, ale až 500x vyšší riziko rozvoje AML M7, kde však mají podstatně lepší prognózu ve srovnání s pacienty s AML M7, kteří DS nemají. Endostatin se váže na heparan sulfát nebo na integrin $\alpha_5\beta_1$, jenž je exprimovaný na proliferujících endotelových buňkách v některých tumorech. Jeho účinkem dochází v endotelu k down-regulaci mnoha signálních drah, které působí proangiogenně. Například neutralizuje geny, které byly aktivovány pomocí VEGF a bFGF, snižuje aktivitu HIF-1 α či expresi neuropilinu – receptoru pro VEGF. Současně dochází k up-regulaci antiangiogenních genů jako je gen pro sfingomyelinázu, jež reguluje apoptózu endoteliálních buněk, TSP-1 nebo inhibitor HIF-1 α .³² Dalšími inhibitory derivovanými ze složky bazální membrány jsou arresten, canstatin a tumstatin, jež jsou štěpnými produkty kolagenu typu 4. Nejvíce studií bylo zaměřeno na tumstatin, který byl purifikován z bazální membrány degradované pomocí MMP. Váže se na EC pomocí integrinu $\alpha_v\beta_3$, pro který má dvě vazebná místa – jedno na N-terminálním konci molekuly asociované s antiangiogenním

působením inhibitoru, druhé na C-terminálním konci asociované s protinádorovou aktivitou. Tumorstatin je specifickým inhibitorem proteosyntézy endoteliálních buněk, což vede k jejich apoptóze.³³

Do druhé skupiny se řadí angiostatin, štěpný produkt plazminu po jeho degradaci elastázou, MMP, proteázami či endopeptidázami. Angiostatin selektivně blokuje migraci endotelií, indukovanou plazminem vazbou na integrin $\alpha_v\beta_3$. Váže se přímo na ATP syntázu na povrchu endoteliálních buněk, což může vést k poklesu pH intracelulárně a tím ke spuštění procesu apoptózy.^{4,33}

Interferony α a β byli vůbec první popsané endogenní antiangiogenní regulátory. Tyto pleiotropní cytokiny regulují antivirové, protinádorové, apoptotické a imunitní reakce v lidském organismu. Interferon α (IFN- α) redukuje množství aktivátoru plazminogenu urokinázového typu, také inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 a významně snižuje enzymatickou aktivitu MMP-9.³³

Nádorové buňky v reakci na hypoxii produkují mnoho cytokinů a růstových faktorů, jež působí chemoatraktivně pro monocyty a makrofágy (např. CSF-1, GM-CSF, TGF β). Infiltrující makrofágy pak dále produkují růstové faktory, jako např. VEGF-A a C, FGF-2, TNF, HGF a PDGF, které ovlivňují nádorové buňky i nádorové endotelium. Tyto cytokiny a chemokiny jsou také důležité pro chemoatrakci sekundárních zánětlivých buněk jako jsou mastocyty a neutrofilů, jež sekrecí prozánětlivých, proangiogenních a protumorózních cytokinů a proteáz dále podporují nádorovou progresi.³⁴

1.4.2.3 Mechanizmy nádorové angiogeneze

V současnosti je již známo, že cévní zásobení nádoru může vznikat pomocí několika mechanismů³⁵:

- 1) angiogeneze pučením
- 2) angiogeneze intususcepcí
- 3) vaskulogenní mimikry
- 4) mozaikové cévy
- 5) kooptace již existujících cév
- 6) vyplavením endoteliálních progenitorových buněk z kostní dřeně a pomocí nich vytvoření nových cév (postnatální vaskulogeneze)

1) Angiogeneze pučením ("sprouting angiogenesis")

Nejvýznamnější způsob nádorové angiogeneze, která probíhá ve třech etapách obdobných fyziologické angiogenní kaskádě následujících po první bazální klidové fázi. V druhé fázi dochází působením angiopoetinu 2 ke zvýšení permeability cévy, k disoluci bazální membrány působením plazminu a matrix-metaloproteinázy (MMP) a k porušení mezibuněčných spojů po stimulaci VEGF. Ve třetí fázi dochází k proliferaci a migraci endotelií zejména působením VEGF, ale i díky cytokinům a interleukinům. V poslední fázi se pak vytváří nová céva, formuje se lumen, proliferují fibroblasty a syntetizuje se kolagen. Stimulátory této fáze jsou zejména angiopoetiny, PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) a jiné.

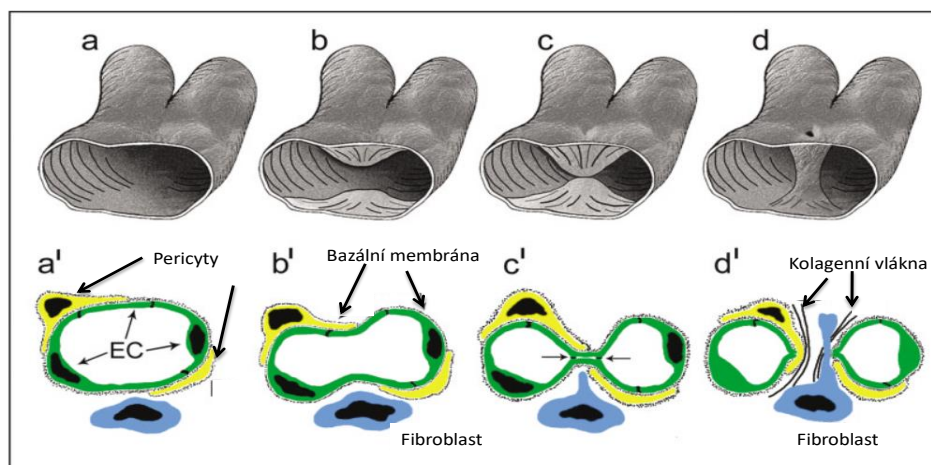
Hlavním mediátorem v nádorové angiogenezi je vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), zejména jeho cirkulující izoformy VEGF₁₂₁ a VEGF₁₆₅. Ty se vážou na receptor VEGFR-2, čímž spouští celou řadu signálních drah, vedoucích k up-regulaci genů podílejících se na zprostředkování proliferace, migrace a prodloužené životnosti endoteliálních buněk jako i zvýšené cévní permeability. Jednou z těchto drah je aktivace signální dráhy MAPK (mitogen activated protein kinases), kdy vazbou VEGF-A na receptor VEGFR-2 dochází k aktivaci fosfolipázy C – gamma (PLC-gamma) pomocí vazby SH domény k receptoru a amplifikaci dráhy proteinkináza C (PKC) – Raf kináza – MEK - MAPK, která vede posléze k syntéze DNA a růstu buňky. Další dráhou aktivovanou ligandem VEGF-A/VEGFR-2 je PI3K (fosfatidyl inositol-3-kinázy)/AKT/mTOR, která vede ke zvýšenému přežívání endoteliálních buněk. Aktivace src kinázy vede ke změnám v cytoskeletu a tím k indukci migrace endoteliálních buněk.^{21,22}

2) Angiogeneze intususcepceí

Tento způsob angiogeneze je rychlejší než předchozí větvení, odehrává se v průběhu hodin, nevyžaduje proliferaci endotelií a mohou tak být rozšířené všechny kapilární sítě. Existují dva způsoby intususcepce.³⁶

Podle prvního modelu se díky působení tlaku, který vyvíjí pojivová tkáň nebo pericyty, přiblíží k sobě endoteliální buňky nacházející se proti sobě v cévní stěně. Po navázání kontaktu se začne vytvářet interendoteliální transluminální most o průměru přibližně 1 μm. Následně dochází k reorganizaci intercelulárních spojení, jež vede k perforaci endoteliální dvouvrstvy. Mezi tyto dvě vrstvy endoteliálních buněk migrují buňky produkující kolagen a

spolu s ním vytvářejí v lumen cévy pilíř pojivové tkáně, který je pro angiogenezi intususcepcí charakteristický. Růstem pilíře pak dochází ke kompletnímu rozdělení cévy.^{36,37}



Obr. 2 – Proces angiogeneze intususcepcí. Upraveno dle Burri a spol.³⁷

Podle druhého modelu nejdříve dochází k rozrušení bazální membrány a následně se endoteliální buňky připojené ke svazku kolagenu přesouvají přes lumen cévy. Rodící se intraluminální pilíř je tak složen ze dvou endoteliálních buněk a jednoho kolagenového svazku. V posledním kroku migrují do tohoto pilíře fibroblasty, které produkují další pojivovou tkáň a přispívají k dozrávání pilíře. Tento způsob angiogeneze se taky nazývá inverzní větvení, neboť se pojivová tkáň nachází uvnitř lumen cévy.^{36,38}

3) Vaskulogenní mimikry

Vaskulogenní mimikry představují alternativní způsob angiogeneze, kdy se agresivní nádorové buňky transdiferencují a získají charakter endotelových buněk. Ty vytvářejí avaskulární kanály, kterými protéká krev a které jsou napojené na vlastní cévy. Byly popsány u četných tumorů jako například u melanomu, u karcinomu plic, prostaty, močového měchýře, ledvin, vaječnicků, prsu, dále pak u sarkomů a gliomů. VE-cadherin, Notch a HIF1 α patří mezi nejdůležitější signální molekuly zapojené do tří hlavních cest, které kontrolují vaskulogenní mimikry: vaskulární signální cesta, hypoxická a signální cesta pro regulaci kmenových buněk. VE-cadherin, Eph 2A a VEGF aktivují tzv. vaskulární signalizaci, jež vede k odštěpení lamininu 5 a fragmentů $\gamma 2x$ a $\gamma 2'$, které podporují migraci různých nádorových buněk do extracelulární matrix. Signalizace pro kmenové buňky zahrnuje dráhy aktivované pomocí Notch a Nodal, které up-regulují geny pro pluripotenci a dediferenciaci. Hypoxie pak

vede ke zvýšené expresi některých zásadních signálních molekul, jako jsou právě VE-cadherin či Eph 2A.^{39,40}

4) Mozaikové cévy

V mozaikových cévách jsou cévní stěny částečně tvořeny nádorovými buňkami. Tento způsob také patří k alternativním mechanismům novotvorby cév.⁴

5) Koopce již existujících cév

Tumor může také invazivně růst podél již vytvořených fyziologických cév nacházejících se v jeho okolí. Tento jev, jenž se označuje jako koopce cév, je známý zejména u agresivnějších typů nádoru a děje se nezávisle na angiogenezi větvením. Takto koptované cévy jsou obklopeny pericyty, většinou mají mnohem větší průměr než je tomu u běžných kapilár a dokážou lépe přežít po tom, co se vlivem léčby nádorová vaskulatura normalizuje. Persistentní koopce cév tak vede u některých nádorů, jako je např. neuroblastom, k rezistenci na antiangiogenní léčbu. Tento proces běžně doprovází i remodelace cévy, a to jak před, tak i po koopci cévy.^{4,41}

V prvním kroku dochází k tumorem indukované angiogeneze mimo samotný tumor, přesněji ke generaci arterioli s několika vrstvami pericytů, jež mají za cíl snížit permeabilitu cévy a snížit výměnu kyslíku a živin mezi cirkulací a zdravou tkání. Lumen těchto arterioli se následně rozšíří. Po koopci cévy a její integraci do nádorové vaskulatury se začnou vrstvy pericytů postupně ztrácet až nakonec vymizí, čímž se zvýší výměna kyslíku a nutrientů mezi cirkulací a nádorovou tkání.⁴¹

6) Postnatální vaskulogeneze

Jak již bylo popsáno výše - vaskulogeneze se uplatňuje zejména při vzniku embryonálních cév, ale částečně se zřejmě podílí i na neovaskularizaci tumoru. Jedná se o vytvoření cévy de novo z cirkulujících buněk rekrutovaných z kostní dřeně. Stimulem pro tuto mobilizaci jsou proangiogenní faktory, zejména VEGF, MMP9 a TGF- β . Předpokládá se, že cirkulující endoteliální progenitorové buňky pocházejí ze společného progenitoru jako hematopoetické kmenové buňky – z hemangioblastu.⁴

1.4.3 Stavba novovytvořené cévy v tumoru

Cévy v tumoru postrádají přesnou hierarchickou strukturu jak je tomu při fyziologických cévách. Cévní struktury nádoru jsou tvořeny diferencovanými nezralými a nediferencovanými

cévami se zvýšenou permeabilitou. Nediferencované cévy mají často kolabované lumen nebo nemají lumen vůbec.⁴¹ Novovytvořené cévy jsou chaotické a strukturálně defektní, často jim chybí souvislá bazální lamina, lumen je jen volně obklopeno stabilizačními pericyty, chybí buňky hladké svaloviny. Vzhledem ke zvýšené permeabilitě dochází ke zvýšenému úniku plazmy do intersticia ("leakage"), což zvyšuje intratumorální tlak, vede ke kompresi ostatních cév a tak dále zhoršuje prokrvení nádoru, vznikají nádorové nekrózy a roste hypoxie, jež dále stimuluje angiogenezi.¹⁷

Endotelové buňky v nádoru prolifерují 50-200 krát rychleji než normální endotelové buňky. Míra proliferaci není stejná napříč tumorem. V některých částech konstantně zvýšená proliferace EC vede k růstu nádoru, zatímco v jiné části dochází k apoptóze EC paralelně s nádorovou nekrózou a regresí cév.⁴²

Endotelová vrstva v tumoru není souvislá. Mezibuněčné spoje jsou většinou chabě diferencované, komplexní kontaktní struktury zde zcela chybí, což oslabuje soudržnost buněk a vytváří se defekty či mezery mezi jednotlivými buňkami. Jsou zde přítomné také četné endoteliální fenestrace a vezikulo-vakuolární organely. To vše vede ke zvýšenému krvácení mimo cévu.^{35,42}

Nádorové EC se od těch fyziologických liší také expresí genů a profilem adhezních molekul, jež exprimují. Markantní je zejména zvýšená exprese povrchových molekul, které stimulují adhezi a migraci, jako jsou integriny $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_v\beta_5$, E-selektin, endoglin, endosialin a VEGF receptory. Naopak VE-cadherin je zde jen slabě exprimován.^{42,43}

Bazální membrána v tumorózních cévách může mít několik vrstev navíc, jež nemusí s EC vůbec souviset nebo bývá nesouvislá. Obsahuje osobité formy fibronektinu a kolagenu typu 4 a je zdrojem jak proangiogenních tak i antiangiogenních molekul. Také se zde vážou růstové faktory.⁴³

Pericyty jsou s nádorovými EC spojené jen velmi volně. Mívají abnormální tvar, výběžky cytoplazmy směřující spíše na opačnou stranu - směrem od cévní stěny a extra vrstvy vlastní bazální membrány. Tyto abnormality odpovídají alterované signální dráze PDGFB.^{11,42}

2 Markery angiogeneze

S rostoucím množstvím informací ohledně procesu nádorové neovaskularizace vyvstala poptávka po spolehlivém markeru angiogeneze u onkologicky nemocných ve snaze lépe predikovat prognózu pacienta, odpověď na léčbu či riziko relapsu onemocnění. Tato potřeba se ještě zvýraznila po objevení četných antiangiogenních látek a po jejich zavedení do klinického testování. Efekt těchto léků je totiž často cytostatický, zmenšení nádorové masy tak nemusí být ideálním ukazatelem efektivity antiangiogenní léčby ani indikátorem biologické aktivity. K optimalizaci klinického testování těchto látek je tedy potřeba validovaného spolehlivého biomarkeru nejenom k posouzení jejich biologické aktivity, ale také k určení optimální dávky nebo k identifikaci pacientů, kteří by z dané léčby mohli nejvíce profitovat. V preklinických i klinických studiích bylo zkoumáno mnoho biomarkerů angiogeneze, nicméně žádný z nich se rutinně v současnosti v klinické praxi nepoužívá. Tyto markery lze rozdělit na preklinické modely, mikrovaskulární denzitu, proteiny plazmy, zobrazovací metody a buněčné markery angiogeneze – cirkulující endoteliální buňky a cirkulující endoteliální progenitorové buňky.⁴⁴

2.1 Preklinické angiogenní studie

První studie k posouzení angiogeneze byla provedena v laboratoři Judah Folkmana koncem 70tych let. Jednalo se o studii in vitro a posuzovala schopnost přidaného angiogenního faktoru nebo naopak inhibitoru ovlivnit funkci endoteliálních buněk (proliferace, migrace, invaze a formování cévy). Tato metoda je užitečná při skríningu jednotlivých angiogenních faktorů a inhibitorů, ale biologická aktivita těchto molekul prokázána in vitro nemusí reflektovat stav in vivo. V současnosti existuje několik semikvantitativních a kvantitativních studií a to jak systémy in vitro, tak i ex vivo či in vivo modely, využívající myši, potkany, nebo lidské tkáně. Mezi in vivo modely patří například studie na kuřecí chorioalantoické membráně nebo na rohovce. Problémem je množství substrátu pro tyto studie, vysoká cena, poměrně značná technická náročnost provedení a velmi malá reprodukovatelnost. Navíc tyto metody není možné využít u pacientů v klinické praxi.^{44,45}

2.2 Mikrovaskulární hustota (MVD)

Nejdetailnější popis angiogeneze in vivo poskytuje histologické vyšetření. Při sledování efektu antiangiogenní léčby lze tedy srovnat změny v cévní struktuře nádoru v biopsii před zahájením léčby a po léčbě. Tato metoda spočívá v nabarvení krevních cév specifickými protilátkami proti endoteliálním buňkám (např. CD31, CD34, vWf) a následném spočítání

pomocí mikroskopu. MVD má prognosticky význam u mnoha typů nádorů, ačkoliv nikdy nebyla jako metoda standardizována. Další nevýhodou je invazivita, jelikož je potřeba dvou vzorků tkáně a také fakt, že hodnocené místo nemusí reflektovat poměry v celém tumoru vzhledem k heterogenitě nádorové masy.^{44,45}

2.3 Proteiny plazmy

Další možností je měření hladin angiogenních faktorů jako jsou VEGF, b-FGF, HGF či PIGF a to buď z krve, nebo moče u některých typů nádorů. Hladiny těchto faktorů před zahájením léčby by mohli předpovídat nebo upřesňovat prognózu pacienta. Nicméně většina studií zabývajících se hodnotami cirkulujících angiogenních faktorů neprokázala jejich korelaci s odpovědí na léčbu.^{44,45}

2.4 Zobrazovací metody

Funkční zobrazení, jako je dynamická magnetická rezonance s využitím kontrastní látky (DCE-MRI) je dalším možným biomarkerem angiogeneze. Pomocí této metody lze měřit změny v krevních tocích v nádoru a také vaskulární permeabilitu. Měřením krevního toku tak lze prokázat změny v nádorové vaskularitě v průběhu léčby, jež se objevují mnohem dříve, než dojde ke zmenšení nádorové masy. Tato metoda však není validována a také vyžaduje nákladné vybavení, které není dostupné ve většině klinických center.⁴⁴

2.5 Cirkulující endoteliální buňky (circulating endothelial cells - CEC)

2.5.1 Historie

CEC byly poprvé pozorovány v krevním nátěru pomocí světelného mikroskopu po barvení dle May-Grünwald-Giemsa v roce 1934, byly však mylně považovány za cirkulující nádorové buňky.⁴⁶ Až v roce 1964 Herbeval a Bouvier přišli s myšlenkou, že by se nemuselo jednat o tumorosní buňky, nýbrž o buňky endoteliálního původu a mohli by pocházet z vaskulatury. Ve své práci poukázali na podobnou morfologii endotelií a nádorových buněk – obě populace se často prezentují jako shluky velkých buněk vřetenovitého (fusiformního) tvaru či tvaru mnohostěnu, v barvení dle Giemsy mají nejčastěji jedno malé červené jádro a bledě modrou cytoplazmu.⁴⁷ V další studii již autoři prezentovali heterogenitu CEC v krevních nátěrech – jako binukleární i polynukleární buňky, vyskytující se buď jednotlivě nebo ve shlucích či jako malé fragmenty endotelia.⁴⁸

Krátce poté, v roce 1968, byla publikovaná studie zkoumající povahu generalizované Schwartzmanové reakce, kde na zvířecích modelech bylo prokázáno zvýšené množství CEC

po aplikaci endotoxinu *Escheria coli*.⁴⁹ V roce 1970 publikoval Hladovec a kolektiv obdobnou studii, ve které opět na zvířecích modelech prokázali zvýšené množství CEC po aplikaci citronanu sodného.⁵⁰ CEC byli v těchto studiích identifikováni pomocí světelného mikroskopu na základě morfologie a barvení podle Giemsy a pomocí separace centrifugací dle hustotního gradientu.

Následně několik prací věnujících se přítomnosti CEC u lidí prokázalo změny v jejich množství u různých diagnóz, např. při infarktu myokardu, v imunosupresi, při hypertenzi, či homocysteinemii.⁵¹ Některé z těchto studií použili k identifikaci CEC nepřímou imunofluorescencí s protilátkou proti von Willebrandovmu faktoru, jenž je všeobecně uznávaným markerem CEC, nicméně jedná se o intracelulární molekulu a tak je jeho určení možné pouze po předchozí permeabilizaci buněk. Vzhledem k neznalosti povrchových markerů specifických pouze pro endotelium ani jedna z těchto metod nedokázala jednoznačně tyto buňky identifikovat.

Průlom nastal v roce 1991, kdy dvě skupiny nezávisle na sobě publikovaly studie zabývající se počty CEC, identifikovaných pomocí dvou nových monoklonálních protilátek proti antigenům specifickým pro endoteliální buňky – HEC19 a S-Endo 1.^{36,37} George a kolektiv následně charakterizovali S-Endo 1 jako protilátku proti antigenu CD146, který je přítomný na všech typech endoteliálních buněk, ale ne na cirkulujících krvinkách. Ve svém experimentu k získání CEC z plné krve použili imunomagnetické kuličky potažené S-Endo 1. Endoteliální původ těchto buněk byl následně potvrzen koexpresí von Willebrandova faktoru, trombomodulinu a přítomností Weibel-Paladeho granul v elektronovém mikroskopu.⁵³ Pomocí S-Endo 1 pak demonstrovali přítomnost CEC u různých onemocnění jako např. rickettsií, srpkovité anémie, trombotické trombocytopenie a akutního koronárního syndromu.⁵¹ Představení S-Endo 1 vedlo také k využití flowcytometrie pro separaci CEC, jež dosud nebylo možné vzhledem k chybějící specifické protilátce.

2.5.2 Původ a patofyziologie CEC

Cirkulující endoteliální buňky se považují za zralé endotelie odloučené z cév po vaskulárním infultu, jsou tak spíše důsledkem než iniciátorem patologického stavu.

Vztah mezi CEC a cirkulujícími endoteliálními progenitorovými buňkami (EPC) objasnil Lin a kol. v roce 2000 studiem těchto buněk u pacientů po transplantaci kostní dřeně opačného pohlaví. Pomocí chromozomu Y pak byli schopni rozeznat EPC z kostní dřeně, které pocházely od dárce a CEC odloučené z cévní stěny, pocházející od recipienta. Více jak 90%

endoteliálních buněk přítomných v krevním oběhu pocházelo od příjemce. Ve studiích in vitro expandovaly pouze asi 20krát, zatímco endoteliální buňky dárcovského původu expandovaly cca 1000krát. Tyto výsledky vedly autora k hypotéze, že většina CEC pochází z cévní stěny a má jen omezenou růstovou schopnost. Jen velmi malá část této populace buněk, jež pravděpodobně pochází z kostní dřeni a je definovaná jako EPC, je zodpovědná za převážnou většinu proliferativního potenciálu CEC.^{45,54}

Odloučení endoteliálních buněk zahrnuje několik faktorů. Nejvíce studií poukazuje na působení vaskulárního mechanického inzultu, např. Boos a kol. prokázal o 32% vyšší množství CEC v prvních 4 ml krve po venepunkci ve srovnání s dalšími 4 ml, odebraných stejnou jehlou.^{55,56}

Alterace endoteliálních adhezních molekul (např. integrinu $\alpha_v\beta_3$), či defektní vazba k ukotvujícím proteinům matrix (např. k fibronektinu, lamininu či kolagenu typu 4) vede k odloučení endoteliálních buněk. K alteraci této vazby k proteinům matrix může vést také prolongovaná stimulace růstovými faktory. Působení cytokinů nebo zvýšené množství proteáz např. po uvolnění z neutrofilů, jež jako první migrují k místu zánětu, vede také k narušení této vazby.⁵⁷ Výsledným efektem je snížená interakce mezi endoteliálními buňkami a bazální membránou a následné odloučení buňky.⁵⁸ Integriny a adhezní molekuly jsou odpovědné i za zprostředkování přežití endoteliálních buněk, tudíž jejich alterací dochází také k odumření těchto buněk procesem zvaným anoikis.⁵⁹

CEC tak mohou sloužit jako marker vaskulárních (nebo spíše endoteliálních) dysfunkcí a zánětlivých onemocnění. Jejich funkce v periferní krvi je zatím neznáma. Některé studie poukazují na prozánětlivé působení CEC, jelikož exprimují chemokiny jako např. interleukin 8 a zvyšují migraci neutrofilů.⁶⁰ V neposlední řadě po odloučení CEC dochází k obnažení bazální membrány, což spouští zánětlivou reakci.⁶¹

2.5.3 Hodnoty CEC v průběhu života

Počet CEC v periferní krvi je u zdravých jedinců extrémně nízký. Vzhledem k rozmanitosti metod k detekci těchto buněk je referovaný počet CEC velmi variabilní, pohybuje se mezi 0 až 7900 bb/ml. Zatímco při použití imunomagnetické separace se množství CEC pohybuje kolem 10 bb/ml, při použití flowcytometru jsou referované hodnoty až 1000 násobně vyšší.⁵¹ Spolu s cirkulujícími endoteliálními progenitorovými buňkami (EPC) se pohybuje mezi 0.01% až 0.0001% všech mononukleárních buněk.⁶²

U většiny studií nebyl prokázán vliv věku na počet CEC, tudíž hodnoty CEC u zdravých jedinců se jeví být stabilní v průběhu života, kromě 1,5 až 2 násobného zvýšení u žen v průběhu menstruace, jež patrně souvisí s vaskulární remodelací v děloze.⁶³ Počet těchto studií je nízký a srovnávány jsou soubory mladých dospělých (průměr ± směrodatná odchylka: 33 ± 8 let) a soubory starších dospělých (průměr ± směrodatná odchylka: 66 ± 8 let).⁶⁴⁻⁶⁶ Pouze jedna studie prokázala zvyšující se počet CEC v korelaci s věkem, a to srovnáním souboru 26 zdravých dětí ve věku 10-18 let a 82 dospělých ve věku 18-67 let. CEC byly detekovány imunomagnetickou separací. Hodnoty u dětí byly statisticky významně nižší než u dospělé kohorty (medián[interkvantilní rozsah] – 16[14-32] vs. 44[17-80]). Tento významný rozdíl zůstal zachován i po zohlednění kardiovaskulárních rizik (pohlaví, obvod pásu, krevní tlak, hodnota glykemie nalačno, hodnota krevních tuků).⁶⁷

Jediná podrobná studie ohledně množství CEC u zdravých dětí neprokázala rozdílné hodnoty v závislosti na věku ani pohlaví. V této studii bylo vyšetřeno celkem 75 dětí, 37 ve skupině 8-10 let a 38 ve skupině 14-16 let. CEC byly detekovány pomocí flowcytometru. Medián množství CEC v první skupině byl 2.64 bb/ml, zatímco v druhé 4.68 bb/ml, rozdíl nebyl statisticky významný. Hodnoty CEC byly pozitivně asociovány s aerobním cvičením u dětí, zatímco korelace s procentem tělesného tuku neprokázala statisticky významný rozdíl.⁶⁸

2.5.4 Metody detekce CEC

Morfologicky populace CEC často přesahuje 10 μm , mohou se vyskytovat samostatně nebo ve shlucích a často se mezi nimi nacházejí apoptotické či nekrotické buňky, což může být důsledkem uvolnění od ukotvujících proteinů matrix.^{51,69}

V současnosti neexistuje jednoznačná shoda na přesné fenotypické identifikaci CEC. Žádný marker není dostatečně specifický pro fenotyp endoteliálních buněk, ani žádný není konstantně exprimován. CEC jsou obecně definovány jako buňky s expresí endoteliálních antigenů (např. von Willenbrandův faktor, CD146, VE-cadherin) při absenci hematopoetických (CD45 a CD14) a progenitorových (CD133) markerů.⁵⁸ Na zralých CEC je ale také přítomen progenitorový marker CD34. Zato CD146, jenž byl původně považován za hlavní marker CEC, je exprimován také na buňkách trofoblastu, mesenchymálních kmenových buňkách, na některých nádorových tkáních i na aktivovaných T lymfocytech.^{51,58,62} Jelikož se velká část adhezní molekuly CD146 nachází intracelulárně a její ektodoména může být z povrchu buňky odloučena, mohou tyto CD146⁻ CEC uniknout při imunomagnetické separaci či flowcytometrii.⁶⁹ Exprese VE-cadherinu (CD144) byla popsána

kromě endoteliálních buněk také na fetálních jaterních kmenových buňkách a exprese CD31 také na trombocytech, endoteliálních mikročásticích, lymfocytech, zralých myeloidních buňkách a hematopoetických progenitorových buňkách.⁶³ Stejně tak vWf byl popsán na trombocytech. Exprese CD34 se vyskytuje jak na EPC tak i na CEC. Vzhledem k této antigenní promiskuitě je náročné odlišit od sebe CEC, EPC, trombocyty, hematopoetické progenitorové buňky a endoteliální mikročástice.⁷⁰

V minulosti používané barvení dle Giemsy a světelného či elektronového mikroskopu není tím pádem dostatečně specifické ani sensitivní k izolaci CEC. Díky technologickému a vědeckému pokroku byly vyvinuty sofistikovanější metody k jejich identifikaci.

Imunomagnetická separace CEC byla poprvé popsána v roce 1992. Principem je inkubace paramagnetických kuliček potažených protilátkou proti molekule CD146 (primárně S-Endo-1 a P1H12) s plnou krví a následně použitím magnetu separace buněk označených protilátkou anti-CD146. Po obarvení se pak tyto buňky počítají pomocí fluorescenčního mikroskopu.⁵³ Separace pouze na základě exprese CD146 ale zahrnuje také aktivované T-lymfocyty a další buňky, jak již bylo zmíněno výše. Vzhledem k tomuto faktu byl v roce 2006 navržen Woywodtem a kol. standardizovaný protokol, jenž zahrnuje přídatní barvení s Ulex Europaeus Lectin-1 (UEA-1), markerem specifickým pro endoteliální buňky.⁵⁶

Dalším problémem je fakt, že exprese CD146 na cirkulujících endoteliálních buňkách je daleko slabší ve srovnání s endoteliálními buňkami z umbilikální žíly (HUVEC), což může vést k neschopnosti navázat se na imunomagnetické kuličky a následně k podhodnocení počtu CEC.⁷¹ Nespornou výhodou této metody je vizuální identifikace CEC, jež umožňuje jejich odlišení od endoteliálních mikročástic, anukleárních buněk a buněčných konglomerátů. Nevýhodou je značná pracovní i časová náročnost metody a velká míra subjektivity při určování CEC pomocí morfologie, což z ní nedělá vysoce výkonnou metodu, kterou počítání CEC u velkého souboru pacientů vyžaduje.^{7,29}

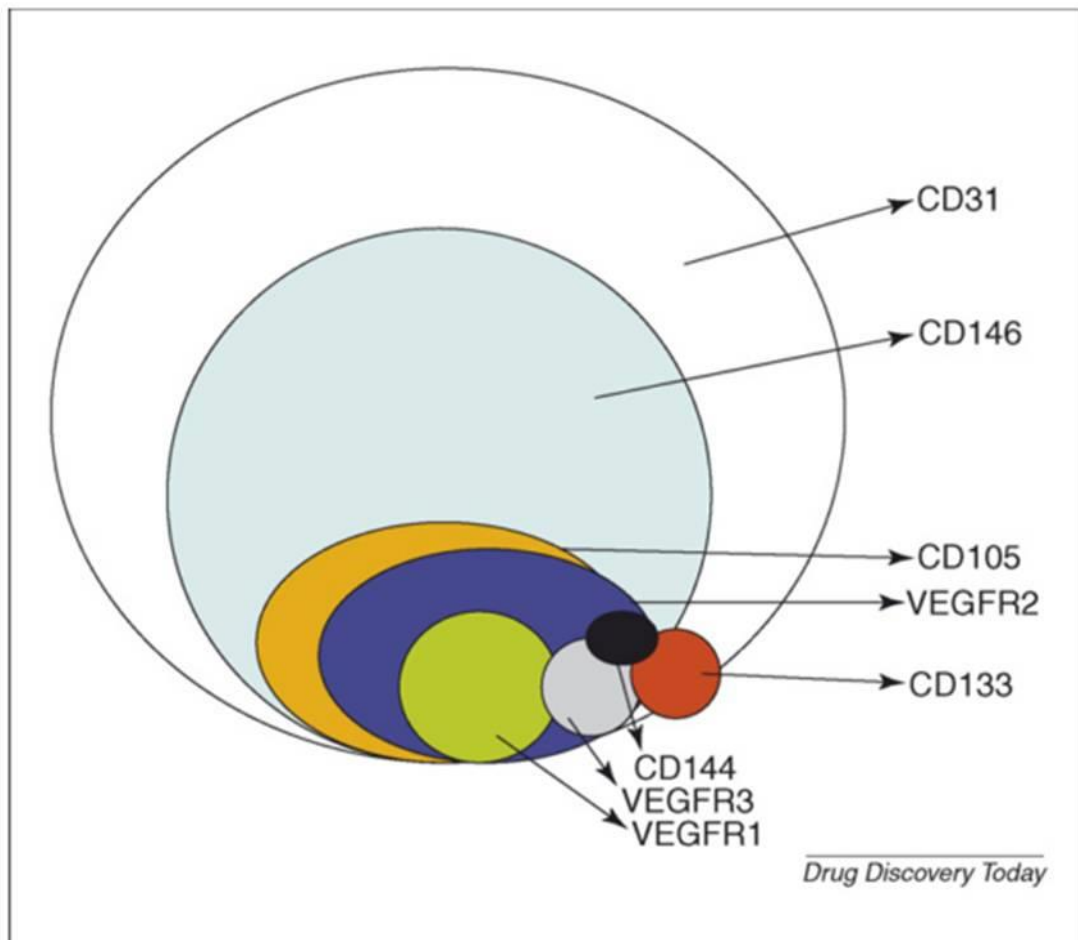
Alternativou k imunomagnetické enumeraci CEC je flowcytometrie (FCM), která umožňuje simultánní multiparametrickou analýzu v poměrně krátkém čase. Vzhledem k enormně nízkému počtu CEC v periferní krvi u zdravých jedinců vyžaduje jejich přesná kvantifikace technicky pečlivý analytický přístup, jelikož několik preanalytických i analytických kroků může výrazně ovlivnit počet těchto buněk. Přesnost se zvyšuje s počtem počítaných buněk, tudíž identifikace CEC je přesnější v adekvátním vzorku periferní krve, především analýza většího objemu krve, např. 1 ml místo dříve užívaných 50-200 μ l.⁷³

V současnosti existuje mnoho protokolů pro evaluaci CEC pomocí flowcytometrie, jež se liší v kombinaci použitých protilátek, ve způsobu zpracování vzorku, v použití aditivních barvení, v gatovací strategii a v systému analýzy získaných dat.⁷⁴ Většina se shoduje na iniciálním použití pan-hematopoetického markeru CD45 k vyloučení hematopoetických buněk a následném potvrzení endoteliálního charakteru použitím 2 a více endoteliálních markerů, jako např. CD146, VEGFR-2, CD31, CD34. Publikované studie využívají různých kombinací těchto endoteliálních markerů, což vede k obtížím při srovnávání výsledků jednotlivých skupin. Nejčastěji užívaným imunofenotypem pro CEC je CD45⁻, CD31⁺, CD146⁺, nicméně většina publikovaných studií neprokázala jednoznačný endoteliální původ takto definovaných buněk.⁷¹ V některých studiích byly sice použity podobné markery pro imunofenotypickou definici CEC, ale s rozdílnou mírou exprese, což opět znemožňuje jejich srovnání, viz obr.3 a 4. Také použitím velkého množství reagentů ve snaze o co nejpřesnější stanovení CEC může docházet k interferencím mezi různými činidly.⁷⁴

Znaky	EPC	mCEC	Endoteliální mikročástice	Trombocyt	Erytroblast	Lymfocyt	Zralá myeloidní buňka	Hematopoetická progenitorová buňka
DNA	Bright	Bright	Negativní	Negativní	Dim	Bright	Bright	Bright
RNA	Bright	Bright	Bright	Bright	Bright	Bright	Bright	Bright
CD45	Dim	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Bright	Bright	Bright
CD133	Bright	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Bright
CD34	Bright	Dim	Dim	Dim	Negativní	Negativní	Negativní	Bright
CD105	Subpopulace	Subpopulace	Negativní	Negativní	Subpopulace	Negativní	Negativní	Subpopulace
CD146	Bright	Bright	Bright	Negativní	Negativní	Subpopulace	Negativní	Negativní
CD144	Bright	Bright	Bright	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Subpopulace
CD31	Bright	Bright	Bright	Bright	Negativní	Bright	Bright	Bright
CD13	Bright	Bright	Bright	Negativní	Negativní	Negativní	Subpopulace	Bright
CD117	Subpopulace	Subpopulace	Subpopulace	Negativní	Negativní	Negativní	Subpopulace	Subpopulace
VEGFR1	Negativní	Bright	Bright	Negativní	Negativní	Negativní	Subpopulace	Negativní
VEGFR2	Bright	Bright	Bright	Negativní	Negativní	Negativní	Subpopulace	Subpopulace
VEGFR3	Subpopulace	Subpopulace	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní

Bright
 Dim
 Negativní
 Subpopulace

Obr. 3 - Expresse antigenů na jednotlivých buňkách. Upraveno dle Bertollini a kol.⁶³ (EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky; VEGFR – receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor).



Obr. 4 - Distribuce vybraných antigenů exprimovaných na CEC. Upraveno dle Bertollini a spol.⁴⁵

Důležitá je i preanalytická fáze jak před imunomagnetickou separací tak před FCM. V publikovaných studiích údaje ohledně preanalytické fáze (způsob odběru vzorku krve, způsob skladování, protokol pro depleci erytrocytů) buď nejsou uvedené vůbec, nebo se významně liší.⁷⁰

Prvním krokem preanalytické fáze je odběr vzorku periferní krve. Vzorek krve lze odebrat v kteroukoliv denní dobu, jelikož experimentální data neprokázala vliv diurnálního rytmu na množství CEC.⁷⁵ Srovnáním hladin CEC v arteriální a venózní krve nebyl prokázán signifikantní rozdíl v jejich množství.^{53,75} Odběr krve z centrálního žilního katetru (CVK) se nedoporučuje pro možné ovlivnění množství CEC při iritaci cévní stěny katétre, ale data o množství CEC v krvi odebrané z CVK versus z venepunkce periferní žíly v literatuře neexistují. Několik studií prokázalo zvýšené množství CEC při použití prvních 4 ml odebrané krve ve srovnání s dalším vzorkem krve, pravděpodobně na základě traumatické venepunkce.

Pro analýzu CEC se proto doporučuje první zkumavku krve znehodnotit a analýzu provádět až s následujícím vzorkem.^{53,75}

Pro další zpracování se doporučuje použití plné krve místo pouhé suspenze buněk, např. na Ficoll gradientu. Doba a teplota skladování vzorku krve před samotnou analýzou může mít výrazný vliv na finální počet CEC, dle studií je tedy vhodné skladování při 4°C a ne delší dobu než 4 hodiny.⁷³

Velkým úskalím FCM je fluorescence pozadí. Při analýze běžných populací tyto rušící faktory nijak výrazně neovlivňují analyzovaná data, nicméně při extrémně nízké události jako jsou CEC, je tento podíl významný. Představuje větší počet buněk než je očekávaná frekvence CEC. Fluorescence pozadí vzniká z několika různých důvodů, z nichž nejčastější je nespecifická vazba protilátek k buňkám, jež neexprimují požadovaný antigen, a autofluorescence.

Nespecifická vazba může v důsledku vést k nadhodnocení počtu CEC. I při použití čerstvě odebrané periferní krve se nespecifická vazba vyskytuje ve 0.1 až 0.5% analyzovaných buněk.⁶² Tyto nespecifické vazby mohou vznikat mezi protilátkou a mrtvou nebo umírající buňkou, buňkami exprimujícími Fc receptor, nesprávným použitím reagensů nebo v důsledku dalších faktorů. K eliminaci těchto vazeb je možné použít blokátor Fc receptoru, či real-time barvení na životaschopnost buněk pomocí 7-aminoaktinomycinu D (7-AAD) nebo propidium iodidu k vyloučení mrtvých/apoptotických buněk.⁶² Důležitý je i výběr vhodného slepého kanálu, který obsahuje značenou protilátku proti antigenu přítomnému na většině buněk zkoumaného souboru, nikoli však na hledaných buňkách. Dříve používaný CD45 pro tento kanál se ukázal jako ne úplně specifický, jelikož některé populace endotelových buněk mohou CD45 slabě exprimovat.⁶⁴

Falešná pozitivita může také vést k nadhodnocení počtu CEC a to specifickou vazbou protilátky na rozpustnou formu antigenu. Mnoho endoteliálních povrchových antigenů (jako např. sCD144 či sCD146) je secernováno a následně absorbováno shlukem trombocytů, jež se pak vážou specifickou vazbou na protilátku. Strijbos a kol. tak v roce 2007 prokázali, že na základě FCM analýzy dle Manusca a kol. v důsledku nesprávné titrace protilátky proti CD146 jsou domnělé CEC ve skutečnosti velké trombocyty.⁷⁶ Eliminaci shluků trombocytů či endoteliálních mikročástic lze dosáhnout použitím specifického barvení na DNA, jako DAPI nebo DRAQ5, jež dokonce prostupuje membránou a tak nevyžaduje žádnou permeabilizaci buněk.⁷³

Autofluorescence je ve větší či menší míře vlastní všem buňkám v závislosti na typu buňky. Větší buňky a shluky buněk a částic vykazují větší autofluorescenci ve srovnání s jednotlivými buňkami a pro přítomnost flavoproteinů v granulích je také vyšší u granulocytů než u lymfocytů. Důležité je na tento jev myslet při iniciálním stanovení gatovací strategie jako i kompenzací jednotlivých fluorescenčních kanálů.^{77,78}

2.5.5 CEC u různých onemocnění

U nemocných se množství CEC pohybuje mezi 1 až 39000 bb/ml.^{51,58} Zvýšené hladiny CEC byly prokázány u různých nemocí, zahrnující kardiovaskulární poruchy^{7,79}, infekční onemocnění^{49,80}, poruchy imunity⁸¹, plicní hypertenzi⁸², srpkovitou anémií⁸³, stav po transplantaci orgánů^{84,85} a nádorové onemocnění.^{86–89}

Původ CEC je u různých onemocnění různý. Pomocí specifických protilátek byly prokázány CEC pocházející z mikrovaskularizace (CD36⁺) u onemocnění jako jsou nádory, thalasemie, srpkovitá anémie. Naopak CEC při akutních koronárních syndromech či při systémovém lupuse erythematodes pocházejí z větších cév.⁵⁸

Navíc hladiny CEC korelují s dalšími markery cévního postižení – vWf, tPA, plasminogen-aktivator inhibitor (PAI-1), rozpustný trombomodulin, rozpustné adhezivní molekuly pro leukocyty (ICAM-1, VCAM-1, E- a P-selektin).

2.5.6 CEC u dospělých pacientů s nádorovým onemocněním

Poprvé byly popsány zvýšené hodnoty CEC u onkologických pacientů v roce 2001 ve studii publikované Patrziou Mancuso a spol. V této studii prokázali elevaci množství CEC až 5x u 76 pacientů s lymfomem nebo karcinomem prsu ve srovnání s 20 zdravými dobrovolníky.⁸⁶ Mnoho dalších studií se následně věnovalo hodnotám CEC u onkologických pacientů ve srovnání se zdravými dobrovolníky, jejich přehled je spolu s imunofenotypickou definicí a hodnotami CEC uveden v tabulce č.1.

Tab. 1 - Přehled vybraných studií, jež se zabývají množstvím CEC u onkologických pacientů. Upraveno dle Danova et al⁷⁴ (CEC – cirkulující endoteliální buňky; NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic; mCRC – metastatický kolorektální karcinom; RCC – renální karcinom; WBC – bílé krvinky)

Typ nádoru	Imunofenotyp CEC	Jednotka	Pacienti	Kontrola	P-hodnota	Reference
Karcinom prsu	CD45 ⁻ , CD146 ⁺	/600 událostí	61	54	<0.05	Goodale ⁹⁰

Karcinom prsu	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD3 ⁺	/ml	9 (5-12.7)	7.7 (6-10)	0.05	Goon ⁹¹
NSCLC	CD45 ⁻ , CD3 ^{bright} , VEGFR2 ⁺	/ml	41	n.a.		Vroling ⁹²
NSCLC	CD45 ⁻ , CD31 ⁺ , CD146 ⁺	/10 ⁵ buněk	299±221	117±33	<0.001	Yuan ⁹³
mCRC	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD34 ⁺	/WBC	30	20	0.09	Ronzoni ⁹⁴
mCRC	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD34 ⁺	/WBC	35	18	0.01	Manzoni ⁹⁵
mCRC	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD34 ⁺	/ml	20	8	<0.05	Ramcharan ⁹⁶
Rektální karcinom	CD45 ⁻ , CD31 ^{bright} , CD133 ⁻ , VEGFR2 ⁺	/10 ⁵ událostí	1000	473	<0.01	Lin ⁹⁷
Nádor pankreatu	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD31 ⁺	/5x10 ⁵ událostí	4.5	2	0.46	Starlinger ⁹⁸
Gynekologické nádory	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD31 ⁺ , CD105 ⁺	% WBC	1.36	0.18	>0.0001	Yu ⁹⁹
RCC	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD31 ⁺ , 7AAD ⁻	/ml	13	n.a.		Farace ¹⁰⁰
RCC	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD31 ⁺	/ul	0.93	0.33	0.05	Bhatt ¹⁰¹
Karcinom prostaty	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD34 ⁺ , CD309 ⁻	/ml	25	28	0.004	Blann ¹⁰²
Karcinom prostaty	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD31 ⁺ , Syto 19 ⁺	% WBC	0.22092	n.a.		Fuereder ¹⁰³
Osteosarkom	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD31 ⁺	/ml	645	1670	0.12	DuBois ¹⁰⁴
Maligní gliom	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD31 ⁺	/ml	101	26	0.01	Cuppini ¹⁰⁵
Nádory hlava a krku	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD31 ⁺	/5x10 ⁵ událostí	20	17	<0.01	Brunner ¹⁰⁶
Různé	CD45 ⁻ , CD146 ⁺ , CD133 ⁻ , CD31 ⁺ , Syto16 ⁺	/ml	951	140	<0.0001	Mancuso ¹⁰⁷

Kromě zhodnocení rozdílu v hodnotách CEC mezi onkologickými pacienty a zdravou populací se řada studií zabývala také vztahem těchto hodnot ke klinickým charakteristikám nádoru, jako jsou rozsah onemocnění, prognóza pacientů, predikce odpovědi na léčbu, či k určení optimální dávky léků v časných fázích klinických studií. Výsledky těchto prací jsou již ale značně rozporuplné, odrážející absenci jednoznačného protokolu pro stanovení CEC, různou imunofenotypickou definicí v jednotlivých studiích a také rozdílné složení zkoumaného souboru. Stručné závěry jednotlivých studií jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tab. 2 - Přehled klinických korelací z vybraných studií zabývajících se množstvím CEC u onkologických pacientů. Upraveno dle Danova et al⁷⁴ (CEC – cirkulující endoteliální buňky; NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic; mCRC – metastatický kolorektální karcinom; RCC – renální karcinom)

Publikace	Typ nádoru	Klinická korelace
Goodale ⁹⁰	Karcinom prsu	CEC korelují se stádiem onemocnění
Goon ⁹¹	Karcinom prsu	CEC pozitivně korelují s velikostí tumoru a invazivitou
Kuo ¹⁰⁸	Karcinom prsu	CEC nejsou biomarkerem angiogeneze u pacientů léčených chemoterapií a antiangiogenní léčbou
Vroling ⁹²	NSCLC	CEC korelují s odpovědí na tyrozin kinázové inhibitory
Yuan ⁹³	NSCLC	CEC mohou být potenciálním biomarkerem pro diagnózu
Ronzoni ⁹⁴	mCRC	CEC korelují s přežitím do progresu
Manzoni ⁹⁵	mCRC	CEC jsou prediktivním biomarkerem k odpovědi na léčbu a korelují s přežitím do progresu
Lin ⁹⁷	Rektální karcinom	CEC mohou být biomarkerem pro prognózu a morbiditu
Starlinger ⁹⁸	Nádory pankreatu	CEC mohou být potenciálním prognostickým a/nebo prediktivním biomarkerem
Yu ⁹⁹	Gynekologické nádory	Klinická korelace nenalezena
Farace ¹⁰⁰	RCC	CEC nekorelují ani s přežitím do progresu ani s celkovým přežitím
Bhatt ¹⁰¹	RCC	Klinická korelace nenalezena
Blann ¹⁰²	Karcinom prostaty	Klinická korelace nenalezena
Fuereder ¹⁰³	Karcinom prostaty	Klinická korelace nenalezena
DuBois ¹⁰⁴	Osteosarkom	Klinická korelace nenalezena
Cuppini ¹⁰⁵	Malígní gliom	Klinická korelace nenalezena
Brunner ¹⁰⁶	Nádory hlavy a krku	Nehodnoceno
Mancuso ¹⁰⁷	Různé	CEC nekorelují s rozsahem onemocnění

Je tedy zřejmé, že analytická fáze měření a také typ nádoru výrazně ovlivňují hodnoty CEC a tedy i jejich využití jako biomarkeru u onkologicky nemocných.

2.6 Cirkulující endoteliální progenitorové buňky (circulating endothelial progenitor cells - EPC)

2.6.1 Historie

Cirkulující endoteliální progenitorové buňky byly poprvé izolovány z krve dospělého člověka pomocí imunomagnetické separace s použitím protilátky proti antigenům CD34 a VEGFR2 v roce 1997. Pomocí buněčných kolonií Asahara a kol. demonstrovali jejich schopnost diferenciaci v zralé endoteliální buňky a to jak in vivo, tak in vitro.¹⁰⁹ Následně několik dalších studií demonstrovalo přínos EPC při ischemii myokardu a infarktu, ischemii končetin, hojení ran, ateroskleróze a to jak u myši, tak i u lidí.¹¹⁰ V roce 2001 pak Lyden a kol. poprvé

poukázali na spojitost mezi EPC a časnou neovaskularizací tumoru, když na zvířecích modelech po transplantaci kostní dřeně demonstrovali přítomnost dárcovských buněk v cévách tumoru.¹¹¹

2.6.2 Původ a patofyziologie EPC

Cirkulující endoteliální progenitorové buňky je skupina extrémně vzácných buněk, derivovaných z kostní dřeně, o nichž se předpokládá, že hrají roli v udržování integrity cévního systému. Jsou schopné migrace, kolonizace, proliferace a následně pravděpodobně i diferenciaci v zralé EC. EPC byly izolovány z pupečnickové krve, z kostní dřeně dospělého člověka, z fetálních jaterních buněk a z periferní krve mobilizované cytokiny.⁵⁸

Většina EPC se nachází v klidovém stádiu v mikroprostředí kostní dřeně, jež se označuje pojmem "niche" (v překladu hnízdo/nika) kmenových buněk. Tento specifický prostor reguluje proliferaci kmenových buněk, chrání před jejich vyčerpáním a zároveň brání před jejich nadměrnou proliferací. Cirkulující hematopoetické buňky (HSC) migrují směrem ke kostní dřeni, aby mohlo dojít k jejich proliferaci v niche kmenových buněk. Na základě stimulace cytokinů HSC prostupují přes sinusoidy z krve do kostní dřeně. Následně jsou pomocí integrinů navázány na stromální buňky. Stromální buňky indukují proliferaci a konverzi HSC na funkční buňky s regeneračním potenciálem, jež jsou schopné migrace a přilhojení ve tkáni. Přesný postup této proliferace a následného uvolnění do cirkulace v současnosti není plně objasněn, nicméně předpokládá se souhra cytokinů/chemokinů, proteináz a adhezivních molekul.¹¹²

Chemokiny jsou cytokiny, jež mají chemoatraktivní vlastnosti. Existují 4 rodiny těchto látek, jsou propojeny s receptory spřažené s G-proteinem. Na rozdíl od cytokinů vyvolávají odezvu v organismu během minut až hodin. Jako nejdůležitější chemokin, který je zapojen do mobilizace EPC, bývá označován faktor derivovaný ze stromálních buněk (stromal-derived factor 1 – SDF-1).¹¹²

SDF1 je exprimován dřevými stromálními buňkami, buňkami plic, jater a kůže a interaguje s HSC při jejich navázání na tyto orgány. Mezi koncentrací SDF-1 v plazmě a stupněm mobilizace EPC je přímá korelace, která naznačuje, že odezvu určuje koncentrační gradient. Dominantním receptorem pro SDF-1 je CXC receptor 4 (CXCR4), jenž je exprimován četnými tkáněmi včetně hematopoetických buněk a EC. Interakce mezi SDF-1 produkovaným stromálními buňkami v kostní dřeni a CXCR4 na EPC může být odpovědná za retenci EPC v niche.¹¹³

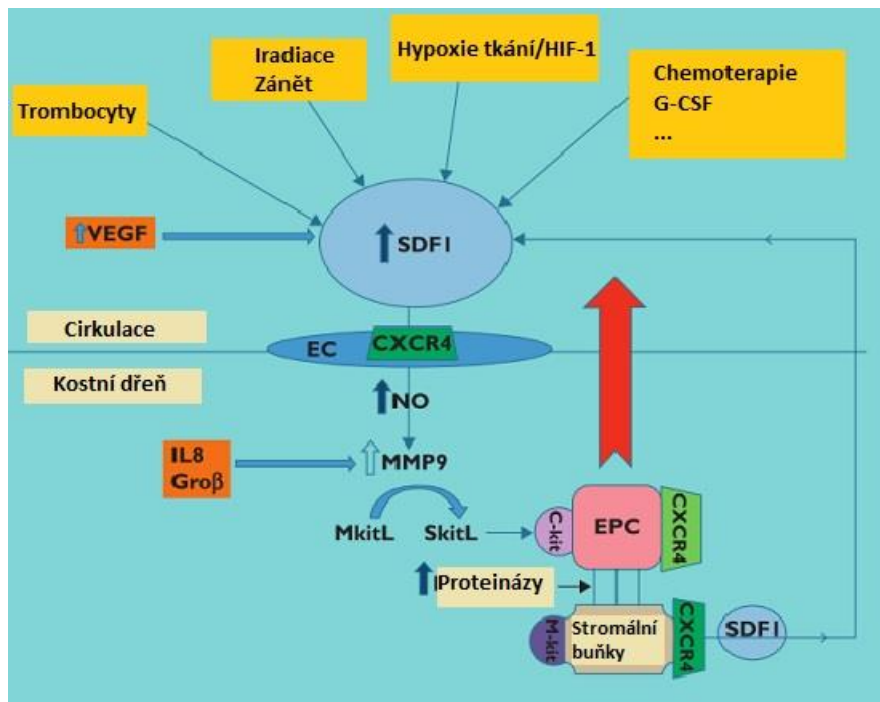
Stresové faktory jako je ozáření, zánět, hypoxie a také některé léky (jako např. G-CSF) zvyšují hladinu HIF-1 a VEGF, jež dále zvyšují hladinu SDF-1 v cirkulaci stimulací zralých EC a pericytů z takto poškozených tkání, nebo z nádorových tkání, nebo z destiček. I samotné EPC mohou parakrinně produkovat SDF-1.^{112,113}

Při vstupu do kostní dřeně SDF-1 aktivuje dráhu PIK3/Akt/eNOS, což vede ke zvýšené hladině oxidu dusnatého (NO) v prostředí kostní dřeně. NO aktivuje matrix metalloproteinázu 9 (MMP9), extracelulární proteinázu exprimovanou stromálními buňkami v kostní dřeni. MMP9 následně vede ke konverzi na membránu vázaného kit ligandu (MkitL) na jeho solubilní formu (SkitL). Ten se váže na tyrosin kinázový receptor c-kit na povrchu EPC, čímž pravděpodobně brání vazbě EPC ke stromálním buňkám.¹¹² (viz obrázek č.5)

MMP9 je velmi závislá na dostupnosti NO v kostní dřeni, jehož hlavním zdrojem je eNOS (endoteliální NO syntáza). To potvrdily experimenty s eNOS knokautovanými myšemi, u kterých byla prokázána snížená aktivita MMP9 a následně i snížená hladina EPC. Ta byla komparabilní s hladinami u MMP9 knokautovaných myší. Po infuzi sKitL došlo ke zvýšení hladiny EPC.¹¹⁴

Spolu s narušením vazby MkitL-c-kit pomocí MMP9 dochází také k lokálnímu zvýšení hladiny proteináz (např. katepsinu G) a elastáz, jež rozštěpením integrinů dále oslabují vazbu SDF-1-CXCR4 a tím i interakci mezi stromálními buňkami a EPC. To spolu se zvýšeným množstvím SDF-1 v cirkulaci vytváří koncentrační gradient, který nutí CXCR4⁺ EPC opustit kostní dřeň via sinusoidy.¹¹⁵

Kromě SDF-1 i další růstové faktory a cytokiny stimulují mobilizaci EPC, jako například VEGF, GM-CSF, G-CSF, erythropoetin, interleukin-8, HGF. Také různé exogenní látky jako antihypertenzíva, protizánětlivé léky či antidiabetika vedou ke zvýšené hladině EPC. Jednoduchý způsob ke zvýšení mobilizace EPC u lidí je cvičení a to jak u zdravých jedinců, tak i u nemocných se stabilní koronární nemocí.⁹²



Obr. 5 - Mechanismus mobilizace EPC z kostní dřeně. Upraveno dle Tilling a spol.¹¹² (HIF-1 – hypoxií indukovaný faktor; G-CSF – faktor stimulující granulocytární kolonie; VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor; SDF1 – faktor derivovaný ze stromálních buněk; EC – endoteliální buňky; CXCR4 – CXC receptor 4; NO – oxid dusnatý; IL8 – interleukin 8; MMP9 – matrix metaloproteináza 9; MkitL – na membránu vázaný kit ligand; SkitL – solubilní kit ligand; EPC – endoteliální progenitorové buňky)

Po vstupu EPC do krevního oběhu proteinázy jako například katepsin L a MMP2 zprostředkují migraci EPC do poškozené cévy.¹¹⁶ V tomto místě pak specifické cytokinové prostředí rozhodne o tom, zda se EPC budou dále diferencovat ve zralé EC¹⁰⁹, nebo zda budou produkovat cytokiny a růstové faktory, jež iniciují opravu buněčné stěny z okolních endoteliálních buněk.¹¹⁷ Ovšem toto specifické prostředí, které reguluje diferenciaci a funkci EPC, zatím nebylo jasně definováno. Urbich a spol. ve své práci prokázali diferenciaci CD34⁺ buněk do endoteliálních po expozici VEGF, zatímco po expozici GM-CSF a zánětlivými cytokiny se tyto buňky diferencovaly v makrofágy.¹¹⁸ Také je nutno objasnit vztahy a kontribuce různých podskupin či vývojových stádií EPC, existují-li, k procesu vaskulogeneze.¹¹⁹ Tyto nejasnosti mohou být důvodem, proč některé studie prokázaly až 90% inkorporaci geneticky značených transplantovaných EPC do místa vaskulogeneze^{120–123}, zatímco jiné neprokázaly žádný přímý přínos EPC pro endoteliální regeneraci.^{117,124–127} I přes tyto limitace většina publikovaných prací nezpochybňuje kritickou roli EPC v udržení

vaskulární homeostázy, přičemž poukazují na jasnou souvislost mezi hodnotami EPC a endoteliální funkcí či obnovou poškozeného endotelu.¹²⁸

2.6.3 Hodnoty EPC v průběhu života

Studie na zvířecích i lidských modelech ukazují, že v průběhu života dochází postupně ke snižování proliferace EPC^{129–131}, nedostatečné mobilizaci EPC z kostní dřeně^{130–132} a sníženému přežití EPC¹³⁰. Většina studií se však zaměřovala na srovnávání mladých dospělých a seniorů, jen velmi málo studií se zabývalo hodnotami EPC v průběhu dětství.

Jie a spol. pozorovali negativní asociaci mezi věkem a množstvím EPC měřenými pomocí flowcytometru, kdy u dětí ve věku 1 až 17 byly nalezeny hodnoty až třikrát vyšší než u dospělých ve věku 20 let a výše. Také variabilita v pediatrické skupině byla třikrát vyšší než u dospělých poukazující na možné změny v hodnotách EPC jako důsledek růstu a dospívání.¹³³

Zaldivar a spol. prokázali signifikantně vyšší hodnoty EPC u chlapců prepubertálních či v časně pubertě ve srovnání s chlapci v pozdní pubertě. U starších chlapců byly také pozorovány nižší hladiny G-CSF, který se podílí na mobilizaci EPC z kostní dřeně. Nicméně soubor pacientů činil pouze 27 subjektů a jednalo se pouze o chlapce, tedy tyto výsledky nelze vztahovat na celou pediatrickou populaci.¹³⁴

2.6.4 Metody detekce EPC

V klinické praxi je za nejvhodnější metodu detekce EPC považována flowcytometrie.¹³⁵ Obdobně jako u CEC je však problémem optimální protokol a jednoznačná imunofenotypická definice těchto buněk, jelikož jasný konsenzus mezi jednotlivými skupinami investigátorů neexistuje. Asahara a spol. definovali EPC jako CD34⁺CD309⁺¹⁰⁹, ačkoliv exprese CD34 byla popsána na četných dalších buňkách jako i na hematopoetických kmenových/progenitorových, na kterých bývá též exprimován i CD309.^{136–138} CD309 (nebo-li VEGFR-2) bývá také přítomen na zralých endoteliálních buňkách, tedy odlišení zralých CEC od EPC je pak značně obtížné.¹³⁹ Některé studie také poukazují na možnou změnu exprese povrchových antigenů ve vztahu k vývojovému stádiu EPC^{140–142}, nebo by se mohlo jednat o více podtypů které přispívají k neoangiogenezi různou měrou.¹⁴³ Také neexistuje unikátní antigen, který by byl specifický pouze pro tyto buňky bez ohledu na vývojové stádium.

Dle Fadini a spol. by imunofenotypická definice EPC měla obsahovat alespoň jeden marker nezralosti a jeden marker endoteliálního původu.¹³⁵ Z markerů kmenových buněk je nejčastěji

k detekci EPC používán CD34 a CD133, z endoteliálních pak CD31, VEGFR-2 či VEGFR-1.⁷⁴

Dalším zdrojem rozdílných výsledků v publikovaných studiích je forma, jakou jsou hodnoty EPC prezentovány – buď jako počet EPC v periferní krvi, nebo jako procento v definovaném počtu mononukleárních buněk. Také jsou rozdílné jednotky měření a algoritmy použité k určení absolutního počtu EPC.⁷⁴

2.6.5 EPC u různých onemocnění

Publikované hodnoty EPC u zdravých jedinců jsou velmi variabilní, pohybují se mezi 70-210 bb/ml až k 3000-5000 bb/ml.^{122,144}

Snížené hodnoty EPC i narušená funkce těchto buněk bývá spojována s různými chronickými onemocněními a to jak u dospělých, tak u dětí.^{67,145-147} Mezi nejvíce prozkoumané patologické stavy spojené s alterací EPC patří obezita^{148,149}, diabetes mellitus prvního typu¹⁵⁰, familiární hypercholesterolemie⁶⁷ a juvenilní idiopatická artritida¹⁵¹.

Důvodem snížených hodnot EPC u těchto patologických stavů může být jednak vyčerpání zásob těchto buněk v kostní dřeni, nejspíše díky prolongované stimulaci z přetrvávajícího vaskulárního inzultu či při alterovaných hormonálních hladinách, jednak narušená mobilizace a migrace EPC z kostní dřene do místa poranění, nebo snížené přežití a diferenciaci EPC v krevním oběhu jako důsledek alterace cytokinů v rámci systémového zánětu.^{119,150}

2.6.6 EPC u dospělých onkologických pacientů

První popis tumorem indukované vaskulogeneze byl publikován Lydenem a spol. v roce 2001 s použitím Id-mutantních myších modelů. Tyto myši nebyly schopny podpořit nádorovou angiogenezi a tak i růst tumoru samotného, ale po transplantaci wild type kostní dřene došlo k rozvoji nádorové neovaskularizace pomocí dárcovských EPC a tak následně i k růstu tumoru.¹¹¹

První klinická data ohledně množství EPC u onkologických pacientů publikoval v roce 2005 Peters a spol., který analyzoval nádory od šesti pacientů, jež v minulosti absolvovali alogenní transplantaci kostní dřene od dárce opačného pohlaví. Použitím FISH proti pohlavnímu chromozomu prokázal kontribuci EPC v nádorové vaskulatuře od 1% u nádorů hlavy a krku po 12% u lymfomů.¹⁵² Následně několik dalších studií prokázalo zvýšené hodnoty EPC u různých nádorových onemocnění, přehled kterých je zaznamenán spolu s imunofenotypickou definicí EPC a hodnotami u nemocných vs. zdravých kontrol v tabulce č.3.

Tab. 3 - Přehled vybraných studií zabývajících se množstvím EPC u onkologických nemocných. Upraveno dle Danova et al.⁷⁴ (EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; SCLC – malobuněčný karcinom plic; NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic; mCRC – metastatický kolorektální karcinom; RCC – renální karcinom; HCC – hepatocelulární karcinom; WBC – bílé krvinky; n.a. – není k dispozici)

Typ nádoru	Imunofenotyp EPC	Jednotka	Pacienti	Kontrola	p-hodnota	Reference
Karcinom prsu	CD14 ⁺ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	/5x10 ⁵ událostí	165	n.a.	n.a.	Naik ¹⁵³
Karcinom prsu	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻	/ml	121	169	<0.05	Goon ⁹¹
Karcinom prsu	CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD133 ⁺	/10 ⁵ událostí x WBC	0.295	n.a.	n.a.	Kuo ¹⁰⁸
Karcinom prsu	CD45 ^{dim} CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	/ml	21.3	n.a.	n.a.	Jain ¹⁵⁴
SCLC	CD34 ⁺ VEGFR-3 ⁺	/ml	1625	455	<0.01	Bogos ¹⁵⁵
NSCLC	CD34 ⁺ CD133 ⁺ VEGR-2 ⁺	%	11	0.025	<0.001	Nowak ¹⁵⁶
NSCLC	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD31 ⁺	/μl	37	11	<0.05	Morita ¹⁵⁷
NSCLC	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD31 ⁺	/μl	40	4	<0.001	Sakamori ¹⁵⁸
mCRC	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD146 ⁺	x WBC/100	0.2	0.1	>0.05	Ronzoni ⁹⁴
Rektální karcinom	CD31 ⁺ CD45 ^{dim} VEGFR-2 ⁺ CD133 ⁺	/10 ⁵ událostí	30	34	<0.01	Lin ⁹⁷
Ovariální nádory	CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺	%	0.98	0.15	<0.01	Qiu ¹⁵⁹
Gynekologické nádory	CD31 ⁺ CD45 ⁻ VEGFR-2 ⁺ CD133 ⁺	%	0.032	0.002	<0.01	Kim ¹⁶⁰
RCC	CD34 ⁺ CD45 ⁻ VEGFR-2 ⁺	%	0.28	0.08	<0.01	Yang ¹⁶¹
RCC	CD34 ⁺ CD45 ^{dim} VEGFR-2 ⁺ 7AAD ⁻	% CD34 bb	0.5	n.a.	n.a.	Farace ¹⁰⁰
RCC	CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD146 ⁺	/μl	0.97	0.19	<0.01	Bhatt ¹⁰¹
Karcinom prostaty	CD34 ⁺ CD309 ⁺ CD45 ⁻ CD146 ⁻	/ml	38	32	>0.01	Blann ¹⁰²
Karcinom prostaty	CD31 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD146 ⁺ 7AAD ⁺ Syto16 ⁺ bright	% WBC	0.29233	n.a.	n.a.	Fuereder ¹⁰³
Osteosarkom	CD31 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD146 ⁺	/ml	126	260	0.69	DuBois ¹⁰⁴
Gliom	CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD133 ⁺	/μl	3.8	3.6	>0.05	Corsini ¹⁶²
Nádory hlavy a krku	CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	/10 ⁵ událostí	4.5	2	<0.001	Brunner ¹⁰⁶
HCC	CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺ CD133 ⁺	%	0.14	0.06	<0.01	Sieghart ¹⁶³
Různé	CD31 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁻ CD146 ⁺ 7AAD ⁻ Syto16 ⁺ bright	/ml	429	181	<0.01	Mancuso ¹⁰⁷

Obdobně jako u CEC i ve studiích zabývajících se EPC je snaha o klinickou korelaci těchto hodnot a klinických charakteristik tumoru, opět s rozporuplnými výsledky, přehled vybraných studií je uveden v tabulce č. 4.

Tab. 4 - Přehled klinických korelací z vybraných studií zabývajících se množstvím EPC u onkologických pacientů. Upraveno dle Danova et al⁷⁴ (EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; SCLC – malobuněčný karcinom plic; NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic; RCC – renální karcinom)

Publikace	Typ nádoru	Klinická korelace
Naik ¹⁵³	Karcinom prsu	EPC korelují se stádiem onemocnění a s odpovědí na léčbu
Goon ⁹¹	Karcinom prsu	EPC nekorelují s velikostí tumoru ani invazivitou
Kuo ¹⁰⁸	Karcinom prsu	EPC se dynamicky mění v průběhu antiangiogenní léčby
Jain ¹⁵⁴	Karcinom prsu	EPC korelují s rizikem relapsu a progresí onemocnění
Bogos ¹⁵⁵	SCLC	EPC korelují s postižením lymfatických cest a prognózou
Nowak ¹⁵⁶	NSCLC	EPC korelují se stádiem onemocnění a rizikem progresse
Morita ¹⁵⁷	NSCLC	EPC korelují s klinickou odpovědí, ale ne s přežitím do progresse
Sakamori ¹⁵⁸	NSCLC	EPC korelují s odpovědí na léčbu a s rizikem progresse
Qiu ¹⁵⁹	Ovariální nádory	EPC korelují s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách
Kim ¹⁶⁰	Gynekologické nádory	EPC mohou být užitečným biomarkerem k monitoraci odpovědi na léčbu
Farace ¹⁰⁰	RCC	EPC korelují s přežitím do progresse a celkovým přežitím
Bhatt ¹⁰¹	RCC	Klinická korelace nenalezena
Blann ¹⁰²	Karcinom prostaty	Klinická korelace nenalezena
Fuereder ¹⁰³	Karcinom prostaty	Klinická korelace nenalezena
DuBois ¹⁰⁴	Osteosarkom	Klinická korelace nenalezena
Corsini ¹⁶²	Gliom	Klinická korelace nenalezena
Brunner ¹⁰⁶	Nádory hlavy a krku	EPC korelují s odpovědí na léčbu

2.7 CEC a EPC v dětské onkologii

Jen několik málo studií se věnovalo množství CEC a EPC u dětských onkologických pacientů. Taylor a spol. prokázali zvýšené množství EPC u metastatických nádorů u dětí, zatímco hodnoty CEC byly obdobné u všech sledovaných skupin včetně zdravé kontroly.¹⁶⁴

Pradhan a spol. ve své práci z roku 2011 prokázal zvýšené hodnoty apoptotických CEC u zdravých dětí ve srovnání se skupinou dětí s různými maligními solidními tumory, zatímco množství CEC se v průběhu léčby u onkologických pacientů signifikantně nelišilo. Ve své studii prokázali také signifikantně vyšší hodnoty EPC s potenciálem tvořit kolonie (ECFC) a cirkulujících hematopoetických kmenových a progenitorových buněk (CPC) u pacientů s nádorovým onemocněním 21. den léčby ve srovnání se zdravou kontrolou, zatímco před zahájením léčby rozdíl mezi těmito dvěma skupinami nebyl významný.¹⁶⁵ Ve své další

publikované studii z roku 2015 zaměřené na sarkomy u pediatrických pacientů byly výsledky obdobné – signifikantně nižší množství CEC u onkologických pacientů ve srovnání se zdravou kontrolou před zahájením a v průběhu celé léčby jako i po ukončení terapie. Před a po lokální kontrole tumoru nebyl v hodnotách CEC signifikantní rozdíl. U pacientů, kteří na konci léčby dosáhli kompletní remise, byly hodnoty CEC signifikantně nižší než u těch dětí, které kompletní remisi nedosáhli. Množství EPC s potenciálem tvořit kolonie bylo signifikantně zvýšené u onkologických pacientů ve srovnání se zdravou kontrolou. Hodnoty ECFC se po prvním bloku chemoterapie významně zvýšily a byly signifikantně zvýšené i na konci terapie ve srovnání s hodnotami před zahájením léčby i ve srovnání se zdravou kontrolou. Lokální kontrola tumoru množství ECFC významně neovlivnila. Žádná ze sledovaných typů buněk nekorelovala s histologií nádoru, rozsahem onemocnění (metastatická vs. lokalizovaná choroba) nebo velikostí tumoru.¹⁶⁶

DuBois a kol. zkoumali množství CEC a EPC u 18 dětí s osteosarkomem. Množství CEC a EPC se významně nelišilo u onkologických pacientů ve srovnání se zdravou kontrolou a hodnoty nekorelovaly s rozsahem onemocnění, velikostí tumoru ani histologickou odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii.¹⁰⁴

Všechny výše uvedené studie u dětských onkologických pacientů použily k analýze množství CEC a EPC flowcytometr, i když definice těchto buněk se mezi jednotlivými studiemi lišila. Taylor a spol. ve své studii definovali CEC jako $CD31^+CD146^+CD45^-7AAD^-$ buněk v mililitru, k analýze použili 1 ml plné krve a množství bylo stanoveno pomocí 4-barevného flowcytometru. EPC byly analyzovány z 10 ml plné krve obohacené o progenitory a definovány jako $CD45^{dim/-}CD34^+VEGFR2^+7AAD^-$ buněk v mililitru.¹⁶⁴ Pradhan a kol. použili k analýze suspenzi mononukleárních buněk izolovaných pomocí Ficoll gradientu z plné krve. CEC v této studii představují zralé apoptotické cirkulující endoteliální buňky, definované jako $CD31^{bright}CD45^-CD34^{dim}AC133^-$. Dle Pradhana a spol. EPC lze rozdělit na tři skupiny: EPC s potenciálem tvořit kolonie (ECFC), které nazývá "pravými" endoteliálními progenitorovými buňkami právě pro jejich schopnost vytvářet nové cévy in vitro, dále pak dvě podskupiny hematopoetických kmenových a progenitorových buněk (CHSPC) – proangiogenní (pCHSPC) a nonangiogenní (nCHSPC). ECFC byli definovány jako $CD31^+CD34^{bright}CD45^-AC133^-CD14^-LIVE/DEAD^-$, CHSPC jako $CD31^+CD34^{bright}CD45^{dim}CD14^-LIVE/DEAD^-$, přičemž rozdíl mezi proangiogenní a nonangiogenní podskupinou byl v expresi AC133 – proangiogenní buňky tento antigen exprimují, nonangiogenní ne.^{165,166} DuBois a kol. analyzovali CEC a EPC z 5 ml periferní krve pomocí 4-barevného flowcytometru. CEC byly

definovány jako $CD146^+CD31^+CD45^-CD133^-$, EPC jako $CD146^+CD31^+CD45^-CD133^+$, přičemž použili také barvení na jádro a 7AAD k vyloučení mrtvých/apoptotických buněk. Pro srovnání výsledků s jinými výzkumnými skupinami testovali také přítomnost dalších povrchových antigenů u buněk $CD146^+$ jako VEGFR2, VEGFR3, CD105, CD143 a CD144.¹⁰⁴

3 Cíle práce

3.1 Stanovení množství aktivovaných CEC (aCEC), zralých CEC (mCEC) a EPC u pacientů Kliniky dětské onkologie FN Brno v korelaci s diagnózou

Stanovení hladin CEC a EPC jsme zvolili vzhledem k poměrně chudým datům v literatuře o jejich množství u dětí obecně. Motivací bylo především hledat biomarker, jenž by byl schopen odlišit děti s benigním onemocněním od těch s maligním onemocněním, případně vytipovat pacienty s vysoce rizikovou chorobou a rozvinutou angiogenezí. U těchto pacientů by bylo možné sledování nemoci také pomocí dynamiky v množství CEC a EPC, na základě těchto hodnot zvažovat modifikace léčby, nebo sledování zobrazovacími metodami po léčbě.

3.2 Srovnání hodnot aCEC, mCEC a EPC při diagnóze a v rámci přešetření v korelaci s rozsahem onemocnění, léčbou a odpovědí na léčbu

Dalším cílem bylo zjistit, zda dochází k dynamice v množství CEC a EPC v průběhu léčby u dětských onkologických pacientů. Manusco a kol. jako první prezentovali výsledky své studie, kdy došlo k poklesu CEC k hodnotám obdobným jako u zdravých kontrol a to u těch dospělých pacientů s lymfomem, kteří dosáhli po léčbě kompletní remisi a také u pacientek s karcinomem prsu po kvadrantektomii. Pokud by stejná dynamika byla potvrzena i u dětských onkologických pacientů, přispělo by to k monitoraci úspěšnosti léčby. Stanovením množství CEC a EPC v průběhu terapie by bylo možné vytipovat pacienty, jejichž odpověď na dosavadní léčbu není dostatečná a včas na tento fakt reagovat modifikací léčebného plánu.

3.3 Sledování dynamiky vývoje hodnot CEC a EPC v čase v korelaci s podáním blokové konvenční chemoterapie nebo metronomické/cílené antiangiogenní léčby

Jedním z předpokládaných mechanismů účinků metronomické léčby je její antiangiogenní působení inhibicí mobilizace EPC z kostní dřeně a jejím cytotoxickým efektem na tyto buňky jako i na CEC. Bertolini a kol. prokázal výrazné zvýšení množství EPC u myších modelů s lymfomem pár dnů po podání cyklofosfamidu v maximálně tolerované dávce (MTD). V průběhu podávání cyklofosfamidu v malých dávkách bez prolongovaných pauz došlo naopak ke snížení počtu i viability EPC.

Farmakologickou blokádou signálních drah, jež jsou spouštěny zvýšeně exprimovanými proangiogenními faktory v tumoru, dochází k blokáde neovaskularizace a tím i omezení růstu tumoru samotného. Angiogenní kaskády lze blokovat na různých úrovních – na úrovni ligandu, vazebné domény receptoru, na úrovni kinázové domény receptoru nebo v dalším

průběhu jednotlivých signálních drah. Zda tato cílená antiangiogenní léčba ovlivňuje hodnoty CEC a EPC, nebylo jednoznačně prokázáno.

Cílem práce bylo porovnat dynamiku množství EPC a CEC u dětí, jež dostávali konvenční chemoterapii a u pacientů, kteří byli léčeni metronomickou nebo jinou antiangiogenní léčbou.

3.4 Korelace množství CEC a EPC s febrilní neutropenií, operačním zákrokem a podáváním rekombinantního G-CSF

Z literatury je zřejmé, že mnoho patologických stavů ovlivňuje hodnoty CEC a EPC. U dětí léčených konvenční chemoterapií založené na maximálně tolerovaných dávkách dochází po bloku k myelosupresi. S tím je spojeno i vysoké riziko febrilní neutropenie. V průběhu zánětu jsou aktivované endotelie, což se může projevit i dynamikou v množství CEC a EPC. Cílem bylo zjistit vliv zánětu/febrilní neutropenie na hodnoty CEC a EPC.

V pooperačním období dochází k hojení rány, jež je spojeno s angiogenezí. Cílem bylo zjistit vliv pooperačního hojení na množství CEC a EPC a tím definovat jejich podíl na dynamice hodnot těchto buněk v průběhu léčby.

V roce 2006 Shaked a kol. prokázali možný podíl G-CSF na rapidní mobilizaci EPC po podání léku zaměřených na disrupci již existujících nádorových cév ("vascular disrupting agents" – VDA). Uvedl tak i hypotézu o možném snížení účinku konvenční chemoterapie u onkologických pacientů po podání rekombinantního G-CSF v důsledku zvýšené mobilizace EPC a tedy i zvýšené vaskulogeneze v tumoru.¹⁶⁷ Cílem bylo zjistit, zda v průběhu podávání rekombinantního G-CSF (Neupogenu) dochází ke změně v množství CEC a EPC u dětských onkologických pacientů a dle výsledků eventuálně pozměnit strategii podpůrné péče v průběhu neutropenie.

4 Metodické postupy a soubory pacientů

4.1 Soubory pacientů

Do studie pro analýzu prvních dvou cílů byli zařazeni pacienti hospitalizovaní na Klinice dětské onkologie FN Brno - Dětská nemocnice k diagnostice primárního onemocnění nebo relapsu základního onemocnění v době od 1.12.2007 do 1.12.2009 bez ohledu na diagnózu. Rodiče pacientů nebo jejich zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas s odběrem biologického materiálu a jeho využitím v rámci biologických studií. Tyto podmínky splnilo 171 pacientů - 164 pacientů s iniciální diagnózou a 7 pacientů s nově diagnostikovaným relapsem základního onemocnění. Odběr periferní krve byl proveden před zahájením léčby maligního onemocnění.

Pro analýzu druhého cíle byli z tohoto souboru vyloučeni pacienti s nenádorovým onemocněním, s relapsem nádorového onemocnění a ti, o nichž nebyly k dispozici data o rozsahu onemocnění, léčbě a odpovědi na léčbu. Kompletní data byla dohledána u 136 pacientů. U 52 dětí z tohoto souboru byl proveden také druhý odběr periferní krve ke stanovení aCEC, mCEC a EPC v rámci přešetření základního onemocnění.

V druhé etapě k analýze dalších dvou cílů byli zařazeni pacienti s histologicky prokázanou malignitou, jež se léčili na Klinice dětské onkologie FN Brno v období od 1.10.2011 do 1.10.2013. Pacienti mohli být zařazeni kdykoliv v průběhu léčby. Podmínkou vstupu do studie byla léčba konvenční chemoterapií, metronomickou léčbou nebo antiangiogenní léčbou, absolvování všech ambulantních kontrol v průběhu léčby na Klinice dětské onkologie FN Brno a podepsaný informovaný souhlas rodiči či zákonnými zástupci. Tyto podmínky splnilo 12 pacientů s konvenční chemoterapií, 18 pacientů s metronomickou léčbou nebo cílenou antiangiogenní léčbou. Za účelem podrobného zmapování dynamiky hodnot CEC a EPC v průběhu léčby byla u pacientů zařazených do této části studie provedena s každým odběrem periferní krve z klinické indikace také analýza množství CEC a EPC. Celkově tak bylo analyzováno 478 hodnot CEC a EPC ve skupině konvenční chemoterapie a 126 ve skupině s metronomií a antiangiogenní léčbou. Důvodem pro výrazně větší počet hodnot při menším počtu pacientů ve skupině s konvenční chemoterapií byly četnější kontroly spojené s intenzivní léčbou.

4.2 Analýza CEC a EPC metodou flowcytometrie

Analýza CEC a EPC pomocí flowcytometru procházela postupným vývojem, jenž reflektoval publikovanou odbornou literaturu v čase. Vzhledem k širokému časovému rozpětí naší studie jsme pro stanovení CEC a EPC v první etapě zvolili jiný přístup než ve druhé části, kdy jsme jednak měli k dispozici jiný typ flowcytometru, jednak se znalostí nových poznatků jsme pozměnili i samotný protokol.

Vzorky periferní krve ke stanovení CEC a EPC byly odebrány do EDTA zkumavek. Analyzovány byly do 24 hodin po odběru, do té doby byly uchovávány v temnu a při teplotě 4°C.

4.2.1 Protokol pro stanovení CEC a EPC pomocí průtokové cytometrie v první etapě výzkumu

Monoklonální protilátky označené fluorochromem byly použity od firmy Beckman Coulter, IN, USA v následujících kombinacích: CD45-FITC, CD146-PC5, CD105-PE, CD34-PC7, CD31-PE. Ke stanovení absolutního počtu buněk byly použity fluorosféry (Flow-Count Fluorospheres), k lýze erytrocytů výrobcem definovaný lyzační roztok VersaLyse Lysing Solution, kterého hlavní účinnou složkou je cyklický amin a pro zajištění hydronamické fokusace byl použit nosný roztok IsoFlow Sheat Fluid od stejnojmenné firmy, to umožní snímání signálu z jednotlivých částic zvlášť. Do dvou zkumavek byly přidány protilátky dle následující tabulky č. 5.

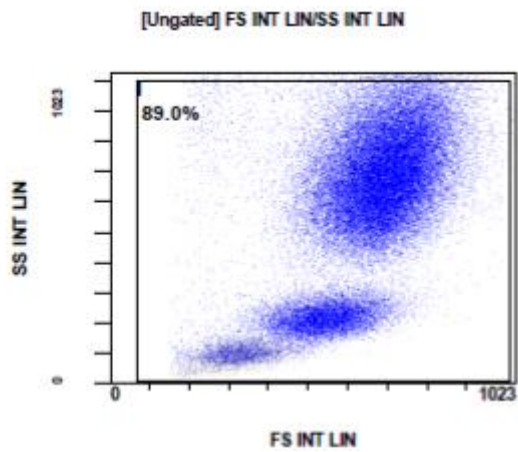
Tab. 5 - Směs protilátek v jednotlivých zkumavkách pro analýzu flowcytometrem.

Zkum.č.1	CD146-PC5	CD34-PC7	CD31-PE	CD45-FITC
Zkum.č.2	CD146-PC5	CD34-PC7	CD105-PE	CD45-FITC

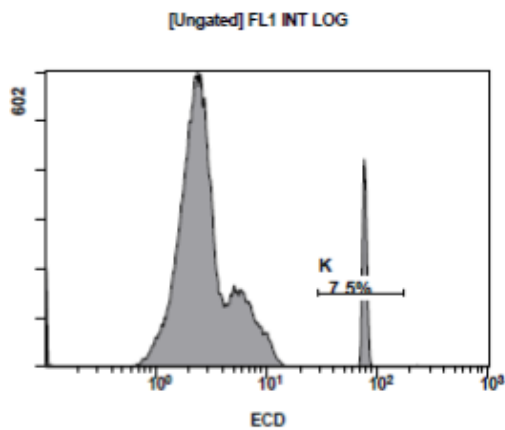
Do každé zkumavky bylo přidáno 50 µl periferní krve, obsah byl promíchán a následně inkubován ve tmě při 20 – 25°C. Následně byl přidán lyzační roztok a opět proběhla inkubace za stejných podmínek. Těsně před měřením byly přidány Flow-Count Fluorospheres. Takto připravený vzorek byl analyzován na průtokovém cytometru Navios (Beckman Coulter, IN, USA).

Gatovací strategie byla následovní:

První gate (gate I) vymezuje populace buněk pomocí FS (forward scatter - podává informaci o velikosti buněk) a SS (side scatter - informace o granularitě buněk), viz obr. č. 6.

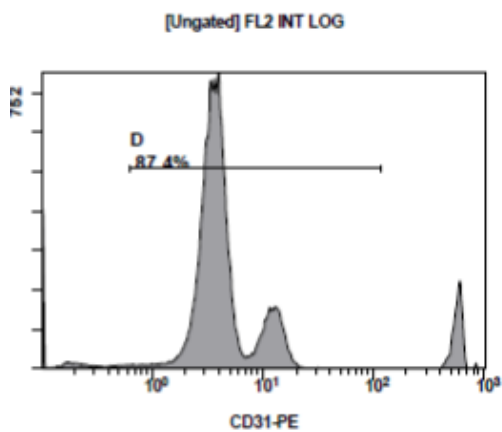


Obr. 6 - Stanovení prvního gatu.



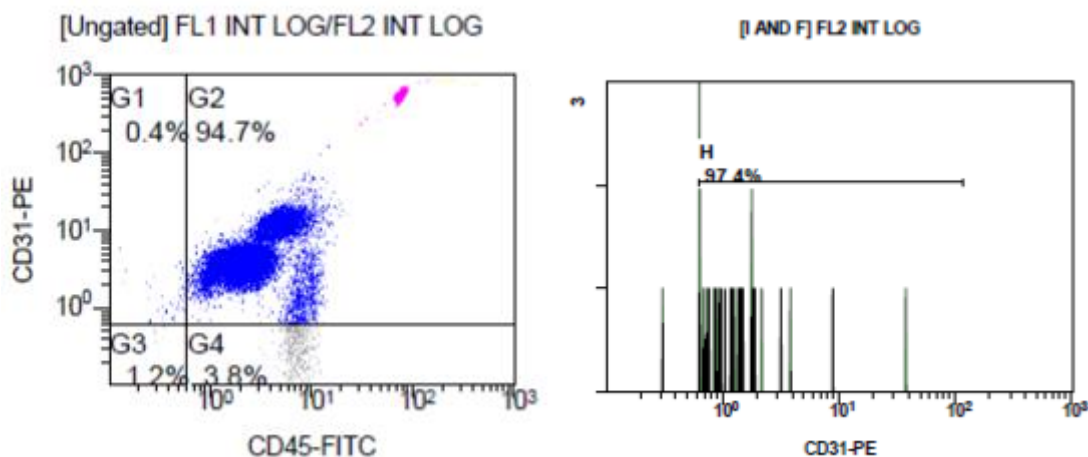
Obr. 7 - Gate K (počet kuliček – flow count)

Podle izotopové kontroly (oddělení negativní populace od pozitivní) byl nastaven gate D na buňky CD31+, viz obr. č. 8.



Obr. 8 - Nastavení gatu D na buňky CD31+.

Podle gate D byly upraveny všechny následující scattegramy, kde na jedné z os je znak CD31.



Obr. 9 - Scattegramy se znakem CD31.

aCEC byly identifikovány jako $CD146^+CD105^+CD45^-$, mCEC jako $CD146^+CD31^+CD45^-$ a EPC jako $CD146^+CD45^{+/-}CD34^+$. Hodnoty byly uvedeny jako počet bb/ml.

4.2.2 Protokol pro stanovení CEC a EPC pomocí průtokové cytometrie ve druhé etapě výzkumu

Monoklonální protilátky označené fluorochromem byly použity v následujících kombinacích: CD31-FITC (klon: WM59, Becton Dickinson, NJ, USA), CD45-V500 (klon: HI30, Becton Dickinson, NJ, USA), CD133-APC (klon: AC133, Miltenyi Biotec, Německo), CD146-PE (klon: P1H12, Chemicon, MA, USA) a barvení na viabilitu buněk 7-aminoactinomycin D (7AAD, Calbiochem, CA, USA). Do dvou zkumavek byly přidány protilátky dle následující tabulky 6.

Tab. 6 - Směs protilátek v jednotlivých zkumavkách pro analýzu flowcytometrem.

Zkum.č.1 negativní kontrola	-	-	-	-	CD45-V500
Zkum.č.2 CEC/EPC	-	CD31-FITC	CD146-PE	7AAD	CD133-APC CD45-V500

Do zkumavek byl dále doplněn FACS buffer (složen z BSA = bovine serum albumin, EDTA a fosfátového pufru) tak, aby celkový objem byl v obou zkumavkách shodný. Následně bylo do zkumavek přidáno 100 ul periferní krve a obsah byl krátce promíchán. Vzorky byly

inkubovány po dobu 30 minut při 4°C. Eliminace erytrocytů byla provedena následným doplněním 4 ml lyzačního roztoku, na bázi chloridu amonného a inkubací po dobu 10 minut při 4°C. Následovala centrifugace 5 minut při 300 až 500 g. Supernatant byl odsát a zbylé buňky byly resuspendovány v 350 ul FACS bufferu. Takto připravený vzorek byl analyzován na průtokovém cytometru BD FACSCanto II (Becton Dickinson, NJ, USA). Vždy bylo analyzováno nejméně 100 000 událostí/buněk (events) v každé zkumavce.

Pro stanovení hodnot CEC a EPC byla použita následující gatovací strategie: v prvním kroku byly eliminovány CD45 pozitivní leukocyty a reziduální erytrocyty, trombocyty a debris (CD45 negativní, SSlow a FSlow). V dalším kroku byly identifikovány CEC s fenotypem CD146⁺CD31⁺CD45⁻ a EPC s fenotypem CD146⁺CD31⁺CD133⁺CD45⁻. Apoptotické a mrtvé buňky byly detekovány barvením na základě hodnocení viability jako 7AAD pozitivní buňky. Absolutní hodnoty buněk byly vypočteny pomocí následujících vzorců, jak bylo popsáno Yuvaem Shakedem v roce 2006⁹⁶:

Počet CEC v 1 ul PK: % CD146⁺CD31⁺CD45⁻ (ze všech buněk) x počet WBC/ μ l

Počet EPC v 1 ul PK: % CD146⁺CD31⁺CD133⁺CD45⁻ (ze všech buněk) x počet WBC/ μ l

Počet mrtvých/apoptotických CEC/EPC: % mrtvých/apoptotických CECs /EPCs x počet CECs/EPCs/ μ l

4.3 Analýza vlivu rozsahu onemocnění, typu a průběhu léčby na hodnoty aCEC, mCEC a EPC

4.3.1 Analýza vlivu rozsahu onemocnění na hodnoty aCEC, mCEC a EPC

Pacienti s maligním tumorem byli na základě rozsahu svého onemocnění v době diagnózy rozděleni do dvou základních skupin - s lokalizovaným onemocněním a s metastatickou chorobou. Lokalizované onemocnění bylo definováno absencí vzdálených ložisek tumoru, potvrzené zobrazovacími metodami v rámci vstupního vyšetření. Metastatická choroba byla definována přítomností jednoho nebo více vzdálených ložisek základního onemocnění kromě origa tumoru.

4.3.2 Analýza vlivu léčby a odpovědi na léčbu na hodnoty aCEC, mCEC a EPC

Pro analýzu vlivu léčby na hodnocené parametry byli pacienti rozděleni do dvou skupin podle toho, zda absolvovali po iniciální biopsii či resekci tumoru další léčbu. V první skupině byli

zařazení pacienti s benigními tumory a pacienti s low grade nádory, kteří po iniciální resekci tumoru a potvrzení histopatologické diagnózy byli dále pouze sledováni bez adjuvantní léčby. Druhou skupinu pak tvořili pacienti s maligním nádorovým onemocněním, jež po iniciální biopsii či resekci tumoru pokračovali v léčbě chemoterapií a/nebo radioterapií dle příslušného protokolu léčby.

Časový bod přešetření byl určen následovně: u dětí, jež neabsolvovaly adjuvantní léčbu, proběhlo v odstupu minimálně jednoho měsíce od operačního zákroku. U pacientů s maligním onemocněním, kteří absolvovali po iniciální biopsii či resekci tumoru další systémovou terapii, byl stanoven dle konkrétního protokolu léčby. V závislosti na protokolu tak pacienti před přešetřením absolvovali 2 až 6 bloků chemoterapie a/nebo radioterapii.

Odpověď na léčbu byla stanovena v rámci přešetření a definována jednotlivými protokoly léčby. Pro účely analýzy byli pacienti rozděleni na základě toho, zda dosáhli nějaké odpovědi na léčbu (kompletní remise, velmi dobrá parciální remise, parciální remise) nebo došlo u nich pouze ke stabilizaci onemocnění či naopak k progresi tumoru.

4.4 Sledování dynamiky vývoje hodnot CEC a EPC v čase v korelaci s podáním blokové konvenční chemoterapie nebo metronomické či jiné antiangiogenní léčby

Za konvenční blokovou chemoterapii se pokládá necílená léčba konvenčními cytostatiky v maximálně tolerovaných dávkách (MTD), podávána během několika dní s následující 2 až 3 týdenní pauzou, během které dochází k významné myelosupresi. Kombinace cytostatik, jednotlivé dávky či způsob podání byly definovány konkrétním protokolem léčby. Přehled bloků chemoterapie použitých k analýze je uveden v tabulce 7.

Tab. 7 - Přehled bloků konvenční chemoterapie použitých k analýze

Název bloku	Konkrétní cytostatika
VIDE	Vinkristin, ifosfamid, doxorubicin, etoposid
VAI	Vinkristin, aktinomycin D, ifosfamid
VAC	Vinkristin, aktinomycin D, cyklofosfamid
VDC	Vinkristin, doxorubicin, cyklofosfamid
IVADo	Ifosfamid, vinkristin, aktinomycin D, doxorubicin
Carbo/Topo	Carboplatina, topotecan
Topo/Cyclo	Topotecan, cyklofosfamid
IE	Ifosfamid, etoposide
AA24	Vinkristin, cytarabin, etoposid, metotrexát, ifosfamid
BB24	Vinkristin, doxorubicin, metotrexát, cyklofosfamid
CC	Vindesin, cytarabin, etoposid

AP	Cisplatina, doxorubicin
MTX	Metotrexát

Metronomická léčba byla definována jako terapie běžnými cytostatiky v dávkách nižších než MTD, podávanými bez prolongovaných pauz, jež nevedla k výraznější myelosupresi. V rámci konkrétního protokolu léčby byly kromě cytostatik použity také léky se známým antiangiogenním působením (např. fenofibrát, celecoxib). Používané cytostatika v metronomickém dávkování zahrnovali vinblastin, temodal, cyklofosfamid, etoposid, metotrexát, thioguanin, nimotuzumab, vinorelbin.

Do studie byli zahrnuti také pacienti s cílenou antiangiogenní léčbou. Z preparátů se konkrétně jednalo o monoklonální protilátku proti VEGF - bevacuzimab, inhibitor tyrosinkinázy (TKI) – pazopanib, mTOR inhibitory – sirolimus, everolimus a inhibitor angiogeneze - interferon-2 α .

4.5 Analýza vlivu febrilní neutropenie, operačního zákroku a podávání rekombinantního G-CSF na množství CEC a EPC

4.5.1 Analýza vlivu febrilní neutropenie na množství CEC a EPC

Febrilní neutropenie byla definována přítomností teploty měřené axilárně nad 38,5°C nebo dvakrát nad 38°C během 12 hodin a současně neutropenií s absolutním počtem neutrofilů pod 500/ μ l periferní krve. Antimikrobiální léčba byla ukončena, pokud byl pacient alespoň 48 hodin bez teploty a současně byl patrný vzestupný trend v počtu neutrofilů v krevním obraze. V případě pozitivní hemokultury byla léčba minimálně 10 dnů. Délka febrilní neutropenie byla stanovena počtem dnů s antimikrobiální terapií.

4.5.2 Analýza vlivu operačního zákroku na množství CEC a EPC

Za operační zákrok byly považovány biopsie a resekce. První zavedení centrálního žilního katetru ve sledovaném období bylo také zahrnuto do analýzy. Jako událost byl uveden datum operačního zákroku.

4.5.3 Analýza vlivu podávání rekombinantního G-CSF (Neupogenu) na množství CEC a EPC

Neupogen byl podáván pacientům buď v průběhu febrilní neutropenie, před plánovanou separací periferních kmenových buněk nebo profylakticky dle doporučení jednotlivého protokolu léčby. K analýze byl použit počet dnů s aplikací Neupogenu.

4.6 Statistické metody

Deskriptivní statistika byla u kategoriálních proměnných dána absolutní a relativní četností, u spojitých proměnných pak průměrem a směrodatnou odchylkou, mediánem a rozpětím mezi minimální a maximální hodnotou.

Pro srovnání klinických dat při více kategoriích byla použita neparametrická obdoba analýzy rozptylu – Kruskal Wallisův test. Pro srovnání párových hodnot jednotlivých parametrů v čase byl použit Wilcoxonův test.

Pro zkoumání dynamiky hodnocených parametrů byl využit lineární model. Opakovaná měření v čase byla zohledněna použitím lineárního smíšeného modelu. Nejprve byla data logaritmicky transformována, aby bylo dosaženo přibližně normálního rozložení dat. Na transformovaných datech byl vytvořen časový lineární lomený model s uzly po jednom týdnu s náhodným efektem pro každého pacienta.

Smíšený lineární model byl specifikován následovně:

$$y_{ij} = \beta_{00} + \beta_{10}T0_{ij} + \beta_{20}T7_{ij} + \beta_{30}T14_{ij} + b_{0j} + \varepsilon_{ij},$$

kde γ_{ij} jsou logaritmované hodnoty hodnocených parametrů (CEC, EPC);

β_{00} , $\beta_{10}T0_{ij}$, $\beta_{20}T7_{ij}$, $\beta_{30}T14_{ij}$ jsou fixní efekty (absolutní člen respektive časové změny v jednotlivých uzlech);

b_{0j} je náhodný efekt (absolutní člen) pro každého pacienta;

ε_{ij} je náhodná chyba.¹⁶⁸

Výsledky jsou prezentovány formou tabulky s odhady efektů a odpovídající chybou statistickou významností. Pro jednoduchou interpretaci byl model zobrazen jako průměrný trend na pozadí zdrojových dat formou case-profile plotu.

Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

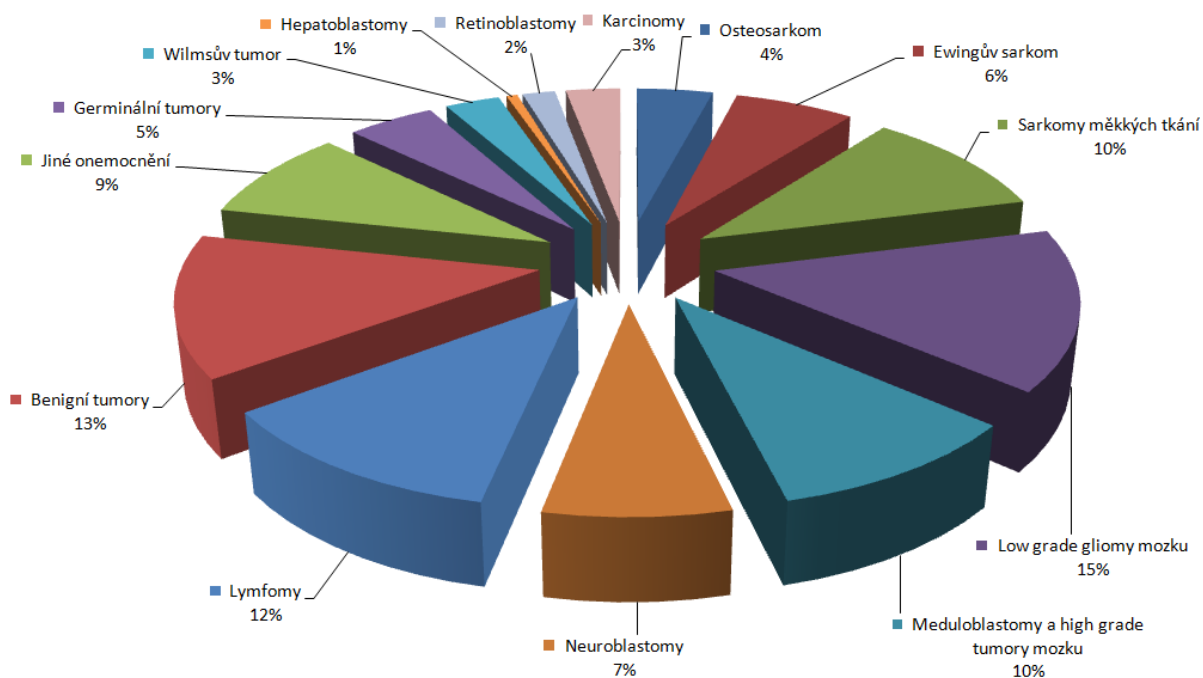
5 Výsledky

5.1 Stanovení množství CEC a EPC u pacientů Kliniky dětské onkologie FN Brno a korelace s diagnózou

Celkem byly analyzovány data od 171 pacientů. V souboru bylo lehce více chlapců než děvčat (55,6% vs. 44,4%), průměrný věk byl téměř 10 let (medián \pm SD: 8,90 \pm 6,46). Základní data o pacientech jsou shrnuty v tabulce 8, rozložení diagnóz je graficky znázorněno na obr. č. 10.

Tab. 8 - Popisná statistika souboru dle diagnóz.

Diagnóza	Celkový počet	Počet v %	Muži (počet)	Ženy (počet)	Věk při dg Průměr \pm SD
Osteosarkom	7	4.1	2	5	18,06 \pm 3,98
Ewingův sarkom	11	6.4	9	2	10,76 \pm 5,37
Sarkomy měkkých tkání	18	10.5	8	10	7,74 \pm 6,02
Low grade gliomy mozku	26	15.2	13	13	9,42 \pm 5,32
Meduloblastomy a high grade tumory mozku	17	9.9	12	5	8,06 \pm 6,78
Neuroblastomy	12	7.0	6	6	5,74 \pm 5,40
Lymfomy	20	11.7	14	6	12,7 \pm 4,76
Benigní tumory	23	13.5	10	13	10,71 \pm 8,00
Jiné onemocnění	15	8.8	8	7	7,38 \pm 4,83
Germinální tumory	8	4.7	5	3	13,44 \pm 5,13
Wilmsův tumor	5	2.9	1	4	3,33 \pm 1,17
Hepatoblastom	1	0.6	1	0	0,58 \pm 0,00
Retinoblastom	3	1.8	3	0	5,49 \pm 4,00
Karcinomy	5	2.9	3	2	10,06 \pm 4,38
Součet	171		95 (55.6%)	76 (44.4%)	9,59\pm6,46



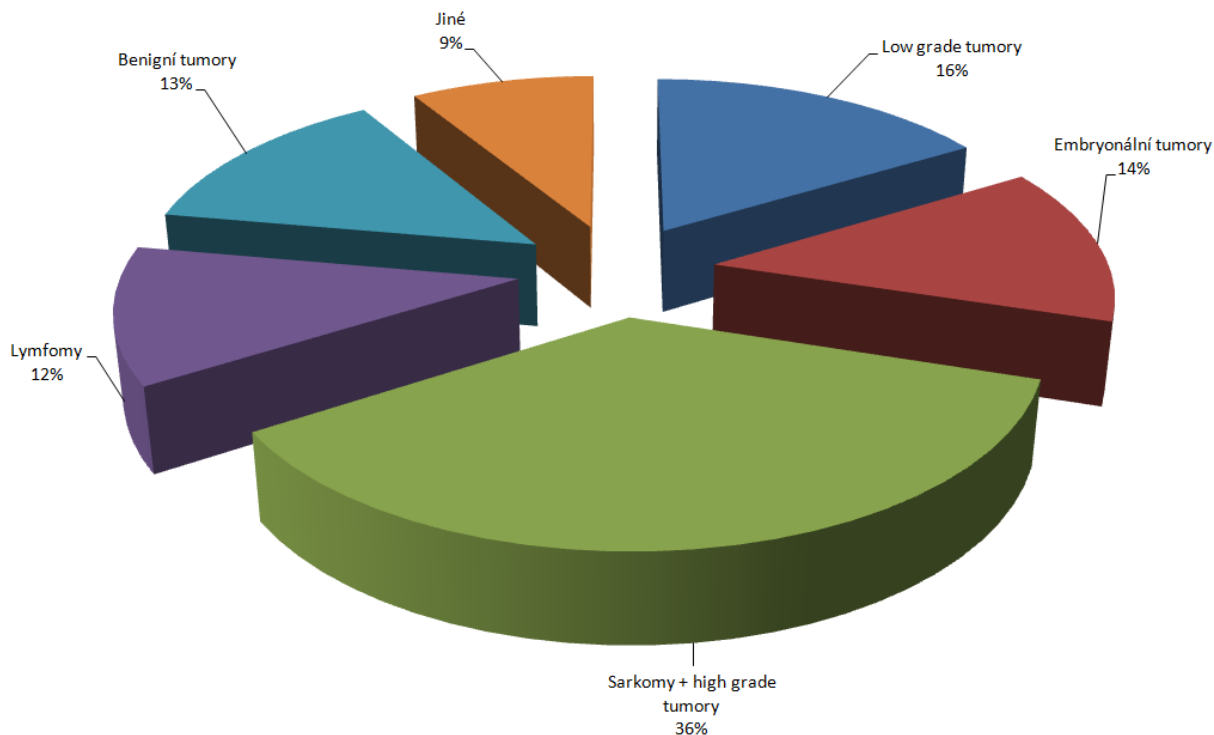
Obr. 10 - Rozložení diagnóz v analyzovaném souboru.

Vzhledem k významné heterogenitě jednotlivých typů solidních nádoru dětského věku byly jednotlivé diagnózy na základě obvyklých společných biologických charakteristik sloučeny do menšího počtu větších diagnostických skupin: embryonální sarkomy mimo CNS, sarkomy a jiné high grade tumory, lymfomy, low grade tumory, benigní nádory a jiné onemocnění. Podrobnější data jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab. 9 - Diagnostické skupiny. (CNS – centrální nervový systém)

Diagnostická skupina (celkový počet pacientů)	Typy jednotlivých malignit (počet pacientů)
Low grade tumory (28)	low grade tumor mozku (26), infantilní fibrosarkom (2)
Embryonální nádory mimo CNS (21)	neuroblastom (12), Wilmsův tumor (5), retinoblastom (3), hepatoblastom (1)
Sarkomy a high grade tumory (64)	sarkom měkkých tkání (16), Ewingův sarkom (11), osteosarkom (7), germinální nádor (8), karcinom (5), high grade tumor mozku (17)
Lymfomy	Hodgkinův lymfom (10), Non-Hodgkinův lymfom (10)
Benigní nádory (23)	ganglioneurom (3), hemangiom (3), neuroendokrinní tumor (2), hamartom (2), schwannom (2), adenom (2), neurofibrom (1), fibromatosa (1), lymfangiom (1), nefrom (1), osteoid osteom (1), benigní dysembryom (1), myxom (1), sinusová histiocytoza (1),

	obrovskobuněčný nádor (1)
Jiné (15)	Zánětlivé onemocnění (5), cysta (3), torze adnex (3), cévní malformace (3), dysplazie (1)



Obr. 11 - Rozložení diagnostických skupin v analyzovaném souboru.

Rozpětí hodnot pro jednotlivé buňky bylo poměrně rozsáhlé a hodnoty vykazovali výraznou individuální intervariabilitu. U EPC se hodnoty bez ohledu na diagnózu pohybovali od 0 do 44442 bb/ml, hodnoty aktivovaných CEC byly v rozmezí 501 až 78375 bb/ml a zralých CEC 1040 až 470871 bb/ml. Přehled výsledků CEC (zralých i aktivovaných) a EPC pro jednotlivé diagnostické skupiny jsou uvedeny v tabulce 10. Celkový souhrn počtu CEC a EPC u všech pacientů je uveden v tabulce 11.

Tab. 10 - Přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPC v jednotlivých diagnostických skupinách. (EPC – cirkulující endoteliální buňky; aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky; mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky; SD – směrodatná odchylka; bb – buňky; CNS – centrální nervový systém)

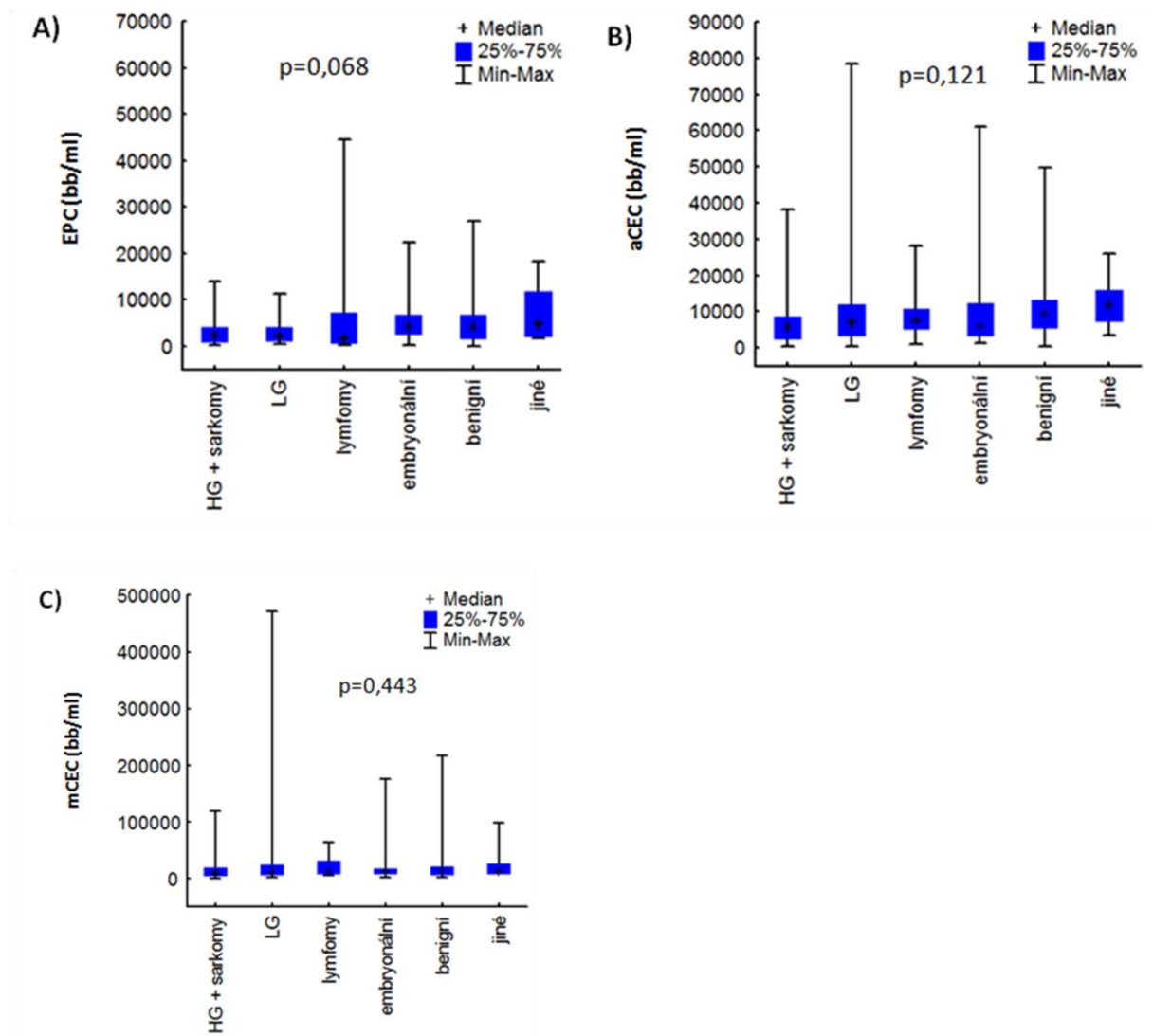
Diagnóza (celkový počet pacientů)	bb/ml	Průměr	SD	Medián	Min	Max
Low grade tumory (28)	EPC	3001	2656	2124	471	11374
	aCEC	13694	19096	7053	561	78375
	mCEC	40658	88915	11113	2059	470871

Embryonální nonCNS nádory (23)	EPC	5115	3824	4295	198	22383
	aCEC	11298	13168	6155	1427	60909
	mCEC	20938	34480	12561	2520	175765
Sarkomy + high grade tumory (62)	EPC	3513	3315	2477	166	13990
	aCEC	7903	7495	5846	528	40163
	mCEC	19668	31356	10568	1040	213042
Lymfomy (20)	EPC	5674	9872	1997	168	44442
	aCEC	10782	8182	8087	934	31889
	mCEC	19696	15070	14069	5029	63210
Benigní tumory (23)	EPC	5234	5617	4206	0	26976
	aCEC	11736	11133	9412	501	49789
	mCEC	23926	43298	13551	1750	217173
Jiné onemocnění (15)	EPC	5987	5055	3410	1261	18185
	aCEC	11278	6371	11300	3328	26007
	mCEC	19979	22208	12478	113	98102

Tab. 11 - Souhrnný přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPCu všech pacientů. (EPC – cirkulující endoteliální buňky; aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky; mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky; SD – směrodatná odchylka)

	Průměr	SD	Median	Minimum	Maximum
EPC	4425	5408	2811	0	44442
aCEC	10309	1194	7148	501	78375
mCEC	22845	4651	12014	1040	470871

V našem souboru jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v množství CEC (aktivovaných a zralých) a EPC mezi jednotlivými diagnostickými skupinami. Srovnání aCEC, mCEC a EPC mezi jednotlivými diagnostickými skupinami je znázorněno na obr. č. 12 A, B, C.



Obr. 12 A, B, C - Hodnoty EPC, aCEC a mCEC u jednotlivých diagnostických skupin. (HG – high grade; LG – low grade; EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky; mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky)

5.2 Srovnání hodnot aCEC, mCEC a EPC při diagnóze a v rámci přešetření v korelaci s rozsahem onemocnění, léčbou a odpovědí na léčbu

Ze souboru 171 pacientů byla u 52 provedena analýza aCEC, mCEC a EPC také v průběhu léčby v rámci přešetření základního onemocnění. Poměr chlapců a dívek byl 59.6% vs. 40.4%, průměrný věk byl necelých 9 let. Základní data o pacientech jsou shrnuty v tabulce 12.

Tab. 12 - Popisná statistika souboru dle diagnóz při druhém odběru.

Diagnóza	Celkový počet	Počet v %	Muži (počet)	Ženy (počet)	Věk při dg Průměr ± SD
Osteosarkom	2	3.8	1	1	17,17±0,27
Ewingův sarkom	5	9.6	4	1	8,52±4,32
Sarkomy měkkých tkání	7	13.5	2	5	9,60±7,11
Low grade gliomy mozku	6	11.5	3	3	10,40±7,19
Meduloblastomy a high grade tumory mozku	5	9.6	5	0	8,54±6,75
Neuroblastomy	4	7.7	2	2	8,50±7,19
Lymfomy	11	21.2	7	4	13,13±4,75
Benigní tumory	6	11.5	3	3	5,32±4,83
Germinální tumory	4	7.7	2	2	11,46±5,6
Wilmsův tumor	1	1.9	1	0	3,22±0,00
Karcinomy	1	1.9	1	0	2,90±0,00
Součet	52		31	21	8,76±4,58
			(59.6%)	(40.4%)	

Obdobně jako při odběru v rámci diagnózy i zde vykazovaly hodnoty jednotlivých buněk výraznou individuální intervariabilitu. Hodnoty EPC bez ohledu na diagnózu byly v rozmezí 118 až 62359 bb/ml, aCEC 441 až 29695 bb/ml a mCEC 1605 až 136321 bb/ml.

5.2.1 Množství aCEC, mCEC a EPC v rámci přšetření v korelaci s diagnózou

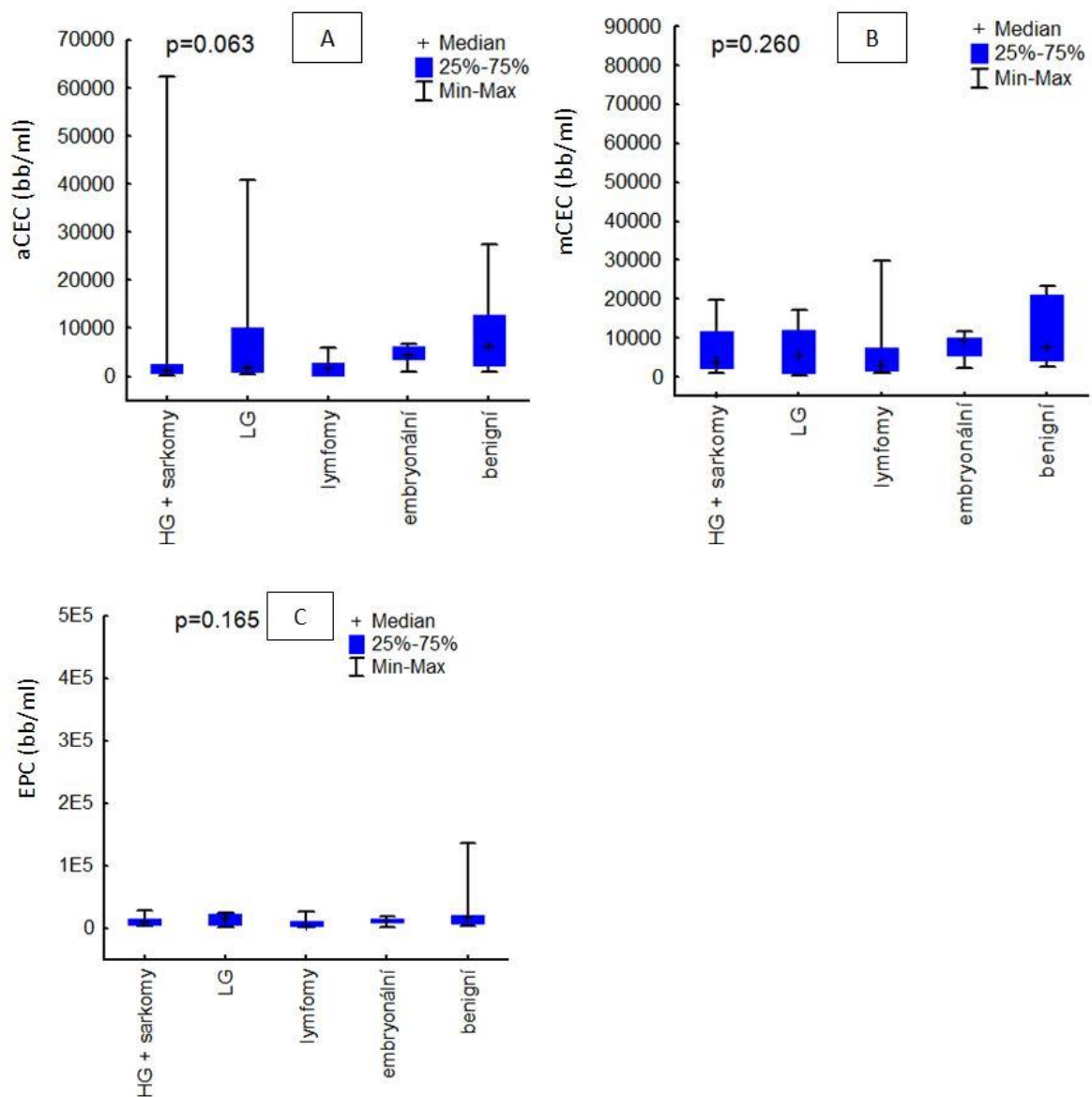
Přehled výsledků CEC (zralých i aktivovaných) a EPC pro jednotlivé diagnostické skupiny jsou uvedeny v tabulce 13. Celkový souhrn počtu CEC a EPC v průběhu léčby u všech pacientů je uveden v tabulce 14. Srovnání aCEC, mCEC a EPC mezi jednotlivými diagnostickými skupinami je znázorněno na obr. č. 13 A až C.

Tab. 13 - Přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPC v jednotlivých diagnostických skupinách při druhém odběru. (EPC – cirkulující endoteliální buňky; aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky; mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky; SD – směrodatná odchylka; bb – buňky; CNS – centrální nervový systém)

Diagnóza (celkový počet pacientů)	bb/ml	Průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
Low grade tumory (7)						
	B EPC	8851	13453	1823	392	40791
	B aCEC	6588	5793	5393	441	17066
	B mCEC	14361	7733	15600	1773	23706
Embryonální nonCNS nádory (6)						
	B EPC	4343	1950	4370	832	6634
	B aCEC	7945	3179	9228	2200	11528
	B mCEC	11236	4926	11848	2079	17940
Sarkomy + high grade tumory (22)						
	B EPC	4540	B EPC	1206	156	62359
	B aCEC	6608	B aCEC	3790	849	19842
	B mCEC	12004	B mCEC	9121	3070	28149
Lymfomy (11)						
	B EPC	1886	B EPC	1567	118	5953
	B aCEC	5835	B aCEC	2861	1051	29695
	B mCEC	7555	B mCEC	4255	1605	26330
Benigní tumory (6)						
	B EPC	9271	B EPC	6263	899	27399
	B aCEC	11153	B aCEC	7711	2570	23479
	B mCEC	33753	B mCEC	17313	3213	136321

Tab. 14 - Souhrnný přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPCu všech pacientů v průběhu léčby. (EPC – cirkulující endoteliální buňky; aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky; mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky; SD – směrodatná odchylka)

	Průměr	SD	Median	Minimum	Maximum
EPC	4935	10385	1801	118	62359
aCEC	6996	6491	4432	441	29695
mCEC	13547	18615	10004	1605	136321

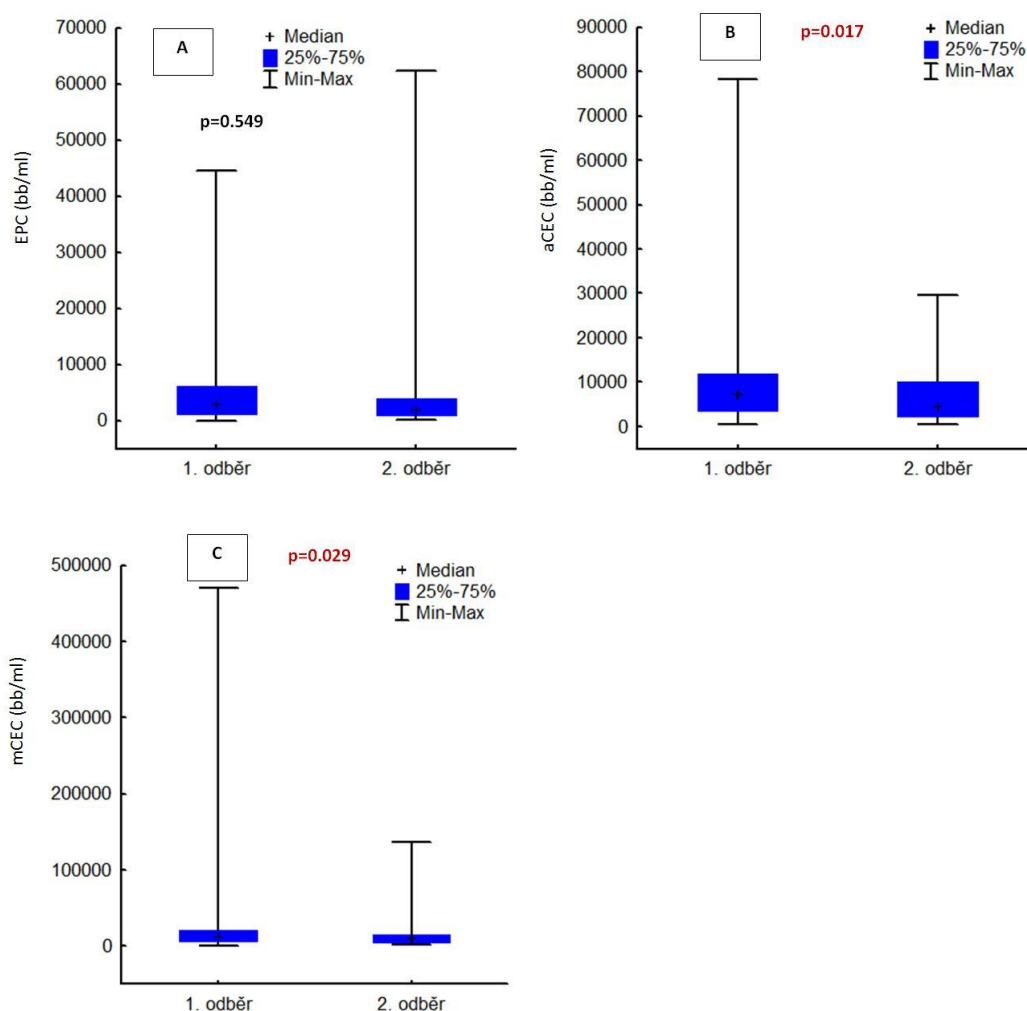


Obr. 13 A, B, C - Hodnoty EPC, aCEC a mCEC u jednotlivých diagnostických skupin při druhém odběru (HG – high grade; LG – low grade; EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky, aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky, mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky)

Hodnoty aCEC, mCEC a EPC při přešetření byly obdobné u jednotlivých diagnostických skupin. Nenalezli jsme statisticky signifikantní rozdíl mezi množstvím a jednotlivými diagnostickými skupinami.

5.2.2 Srovnání množství aCEC, mCEC a EPC při diagnóze a při přešetření bez ohledu na diagnózu

U pacientů, u nichž byli dostupné data z obou dvou odběrů, jak iniciálně při diagnóze, tak v průběhu přešetření, byla provedena analýza ke srovnání dynamiky v počtu aCEC, mCEC a EPC bez ohledu na diagnózu. Výsledky jsou znázorněné na obr. č. 14 A až C.



Obr. 14 A, B, C - Hodnoty EPC, aCEC a mCEC při prvním a druhém odběru bez ohledu na diagnózu. (EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky, aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky, mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky)

V rámci analyzovaného souboru nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi množstvím EPC při diagnóze a v rámci přešetření. U aCEC a mCEC došlo k poklesu hodnot obou parametrů v čase. Tento pokles byl statisticky významný.

5.2.3 Dynamika v množství aCEC, mCEC a EPC v korelaci s rozsahem onemocnění, léčbou a odpovědí na léčbu

Do této části studie bylo zahrnuto 136 pacientů s primární diagnózou, u nichž byli k dispozici data o rozsahu onemocnění, léčbě a odpovědi na léčbu. Základní data o pacientech jsou shrnuty v tabulce č. 15.

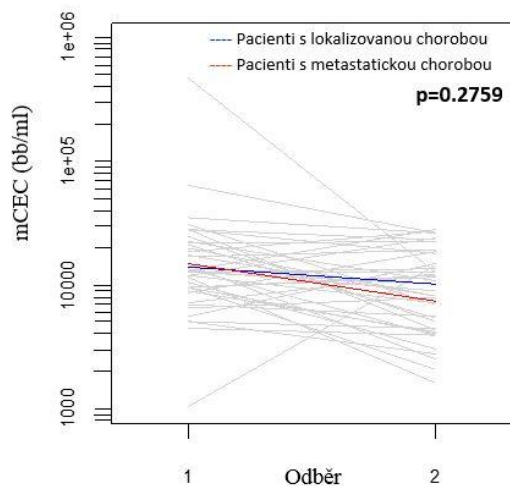
Tab. 15 - Popisná statistika souboru dle diagnóz k analýze rozsahu onemocnění, léčby a odpovědi na léčbu.

Diagnóza	Celkový počet	Počet v %	Muži (počet)	Ženy (počet)	Věk při dg Průměr ± SD
Osteosarkom	7	5.1	2	5	18,06±3,98
Ewingův sarkom	11	8.1	9	2	10,76±5,37
Sarkomy měkkých tkání	18	13.2	8	10	7,74±6,02
Low grade gliomy mozku	26	19.1	13	13	9,42±5,32
Meduloblastomy a high grade tumory mozku	17	12.5	12	5	8,06±6,78
Neuroblastomy	12	8.8	6	6	5,74±5,40
Lymfomy	20	14.7	14	6	12,7±4,76
Benigní tumory	6	4.4	3	3	9,02±6,09
Germinální tumory	7	5.1	4	3	12,15±6,05
Wilmsův tumor	4	2.9	1	3	3,70±1,02
Hepatoblastom	1	0.7	1	0	0,58±0,00
Retinoblastom	3	2.2	3	0	5,49±4,00
Karcinomy	4	2.9	2	2	10,57±4,76
Součet	136		78	58	8,97±4,36
			(57.4%)	(42.6%)	

5.2.3.1 Dynamika v množství aCEC, mCEC a EPC v korelaci s rozsahem onemocnění

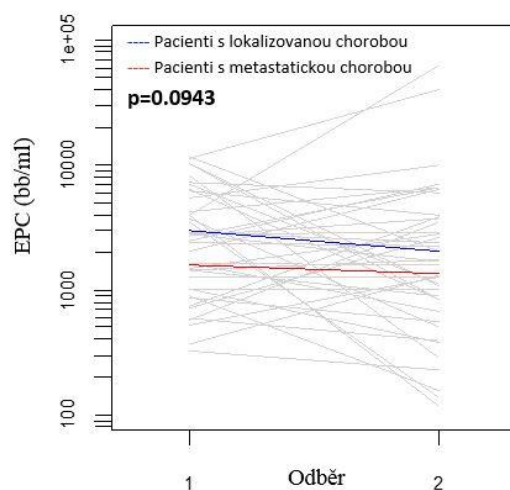
Při korelaci dynamiky hodnot aCEC s rozsahem onemocnění v době diagnózy nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientů s lokalizovanou versus metastatickou chorobou.

Při sledování dynamiky mCEC byl patrný výraznější klesající trend ve skupině s metastatickou chorobou ve srovnání s lokalizovaným onemocněním. Tento rozdíl nebyl statisticky významný, viz obr. č. 15.



Obr. 15 - Dynamika mCEC v korelaci s rozsahem onemocnění. (mCEC – zralé cirkulující endoteliální buňky; bb – buňky)

Srovnání dynamiky hodnot EPC s rozsahem onemocnění v době diagnózy (lokalizovaná vs. metastatická choroba) je znázorněno na obr. č. 16. Na hranici statistické významnosti ($p=0.09$) byl rozdíl v absolutní hodnotě EPC v závislosti na rozsahu onemocnění, pacienti s metastatickou chorobou měli nižší hodnoty EPC a to jak při diagnóze, tak i při přešetření ve srovnání s pacienty s lokalizovanou chorobou. Dynamika v hodnotách EPC v době diagnózy a při přešetření byla u obou skupin obdobná.

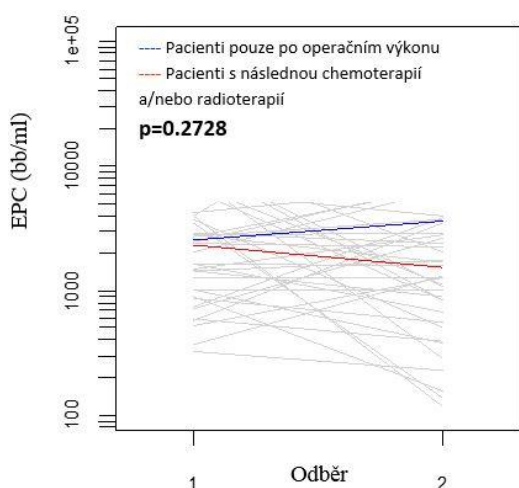


Obr. 16 - Dynamika EPC v korelaci s rozsahem onemocnění. (EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

5.2.3.2 Dynamika v množství aCEC, mCEC a EPC v korelaci s léčbou

V dynamice hodnot aCEC a mCEC nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů, jež absolvovali pouze operační zákrok a skupinou pacientů, jež absolvovali chemoterapii a/nebo radioterapii.

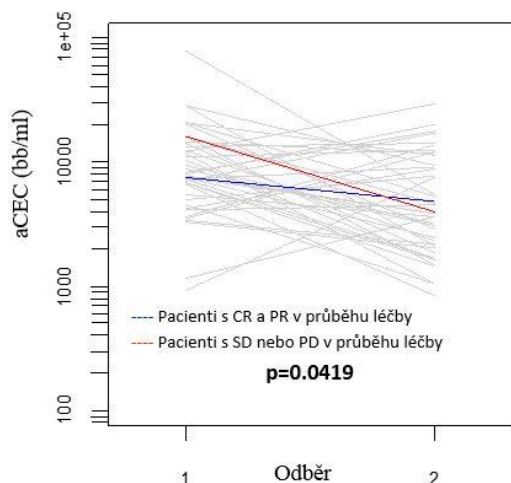
Při srovnání hodnot EPC v době diagnózy a v rámci přešetření byl patrný výraznější klesající trend ve skupině s následnou léčbou ve srovnání s pacienty, jež absolvovali pouze operaci. Tento trend nebyl statisticky signifikantní, viz obr. č. 17.



Obr. 17 - Dynamika EPC v korelaci s léčbou. (EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

5.2.3.3 Dynamika v množství aCEC, mCEC a EPC v korelaci s odpovědí na léčbu

Srovnáním dynamiky hodnot aCEC v čase byl pozorován výrazný klesající trend ve skupině, jež neodpověděla na léčbu nebo dosáhla pouze stabilizace onemocnění ve srovnání se skupinou s objemovou regresí tumoru. Rozdíl v této dynamice mezi oběma skupinami byl statisticky významný, viz obr.č.18.



Obr. 18 - Dynamika a CEC v korelaci s odpovědí na léčbu. (aCEC – aktivované cirkulující endoteliální buňky; bb – buňky; CR – kompletní remise; PR – parciální remise; SD – stabilní onemocnění; PD – progresse onemocnění)

Dynamika hodnot mCEC a EPC byla srovnatelná mezi oběma skupinami.

5.3 Sledování dynamiky vývoje hodnot CEC a EPC v čase v korelaci s podáním blokové konvenční chemoterapie nebo metronomické či jiné antiangiogenní léčby

Celkem byly analyzovány data od 12 pacientů s konvenční chemoterapií a 18 pacientů s metronomickou a jinou antiangiogenní léčbou. Mezi pacienty s konvenční chemoterapií bylo lehce více dívek než chlapců (poměr 7:5). Nejčastější diagnózou byl sarkom (celkem 9 pacientů), dále pak lymfomy (celkem 2 pacienti) a 1 pacient s neuroblastomem. U všech dětí se jednalo o léčbu iniciální diagnózy. Dvě třetiny pacientů mělo již iniciálně metastatické onemocnění. Základní data o pacientech s konvenční chemoterapií jsou shrnuty v tabulce 16.

Tab. 16 - Popisná statistika souboru pacientů s konvenční chemoterapií. (M – muž; F – žena; NHL – Non-Hodgkinův lymfom; mts – metastatická choroba; lokaliz – lokalizované onemocnění; dg – diagnóza)

Pacient	Pohlaví	Věk (měsíců)	Diagnóza	Rozsah onemocnění	Iniciální dg vs. Relaps
1	M	4	T-lymfoblastický lymfom	Mts	iniciální dg
2	F	7	Histiocytární sarkom	Mts	iniciální dg
3	M	16	Ewingův sarkom	Mts	iniciální dg
4	F	17	Ewingův sarkom	Lokaliz	iniciální dg
5	F	15	Alveolární rhabdomyosarkom	Mts	iniciální dg

6	F	0 (3)	Neuroblastom	Mts	iniciální dg
7	M	2	Alveolární rhabdomyosarkom	Mts	iniciální dg
8	M	0 (5)	Ewingův sarkom	Lokaliz	iniciální dg
9	M	18	Zralý B-NHL	Mts	iniciální dg
10	F	6	Osteosarkom	Mts	iniciální dg
11	F	12	Ewingův sarkom	Lokaliz	iniciální dg
12	F	14	Osteosarkom	Lokaliz	iniciální dg

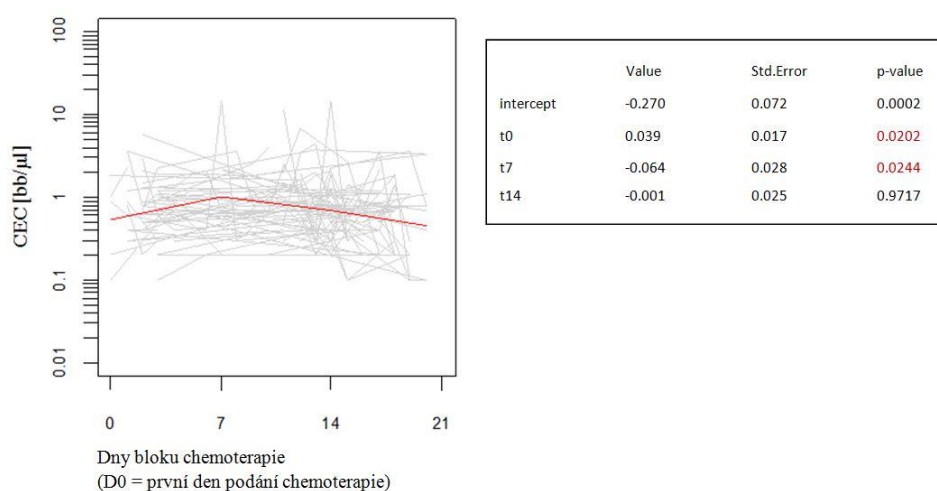
Mezi pacienty s metronomickou a jinou antiangiogenní léčbou bylo naopak více chlapců než dívek (poměr 11:7). V přehledu diagnóz se jednalo spíše o malignity nízkého stupně většinou na podkladě vrozených syndromů (neurofibromatóza typu 1, tuberózní skleróza). V této skupině byl počet pacientů s lokalizovaným onemocněním v době metronomické léčby stejný jako počet dětí s metastatickým onemocněním. U 4 pacientů se jednalo o relaps základního onemocnění, u jednoho byla diagnostikována sekundární malignita a jeden pacient zahajoval metronomickou léčbu v době progresu onemocnění.

Tab. 17 - Popisná statistika souboru pacientů s metronomickou a jinou antiangiogenní léčbou. (M – muž; F – žena; SEGA – subependymální obrovskobuněčný astrocytom; DIPG – difusní intrinsický pontinní gliom; OBN – kostní obrovskobuněčný nádor; mts – metastatická choroba; lokaliz – lokalizované onemocnění; dg – diagnóza).

Pacient	Pohlaví	Věk (měsíců)	Diagnóza	Rozsah onemocnění	Iniciální dg, relaps, progrese, sekundární malignita
1	F	16	Oligoastrocytom	Lokaliz	iniciální dg
2	M	14	Lymfangiomatosa	Lokaliz	iniciální dg
3	M	17	Meduloblastom	Mts	Relaps
4	M	16	SEGA	Mts	iniciální dg
5	F	1	SEGA	Lokaliz	iniciální dg
6	M	21	glioblastoma multiforme	Mts	sekundární malignita
7	M	3	SEGA	Lokaliz	iniciální dg
8	F	15	multicentrická kutánní reticulohistiocytoza	Lokaliz	Progrese
9	M	3	Chordom	Lokaliz	iniciální dg
10	M	19	Ewingův sarkom	Mts	Relaps
11	M	11	DIPG	Lokaliz	iniciální dg
12	F	20	astrocytom, meningeom,	Mts	iniciální dg

neurinom					
13	M	5	Histiocytoza	Lokaliz	iniciální dg
14	M	10	vřetenobuněčný hemangioendotheliom	Mts	iniciální dg
15	F	29	OBN	Mts	Relaps
16	M	36	OBN	Mts	iniciální dg
17	F	24	smíšený alveolární-embryonální rhabdomyosarkom	Mts	Relaps
18	F	11	SEGA	Lokaliz	iniciální dg

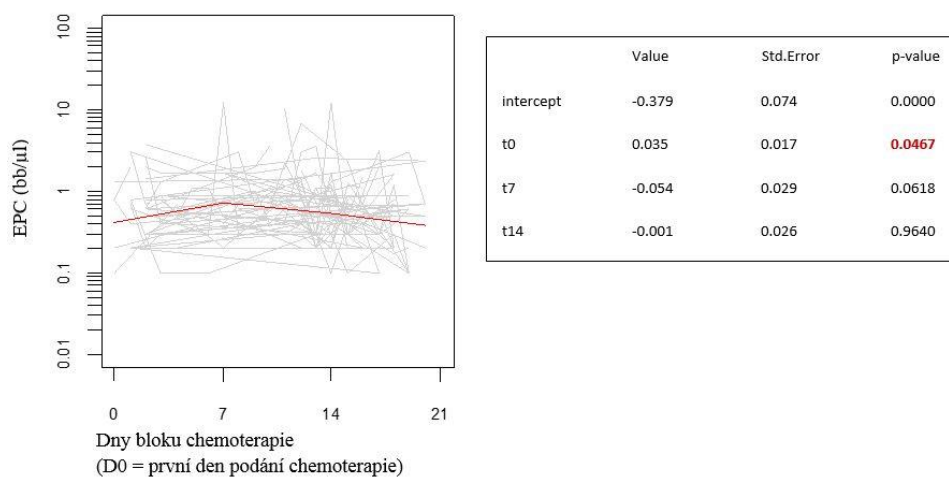
Při sledování dynamiky hodnot CEC v průběhu konvenční chemoterapie docházelo již od prvního dne bloku k nárůstu jejich množství až do dne 7, potom hodnoty CEC postupně klesaly až ke dni 21, jenž je obvykle zároveň i prvním dnem dalšího bloku. Tento nárůst a následný pokles po dni 7 byl statisticky významný.



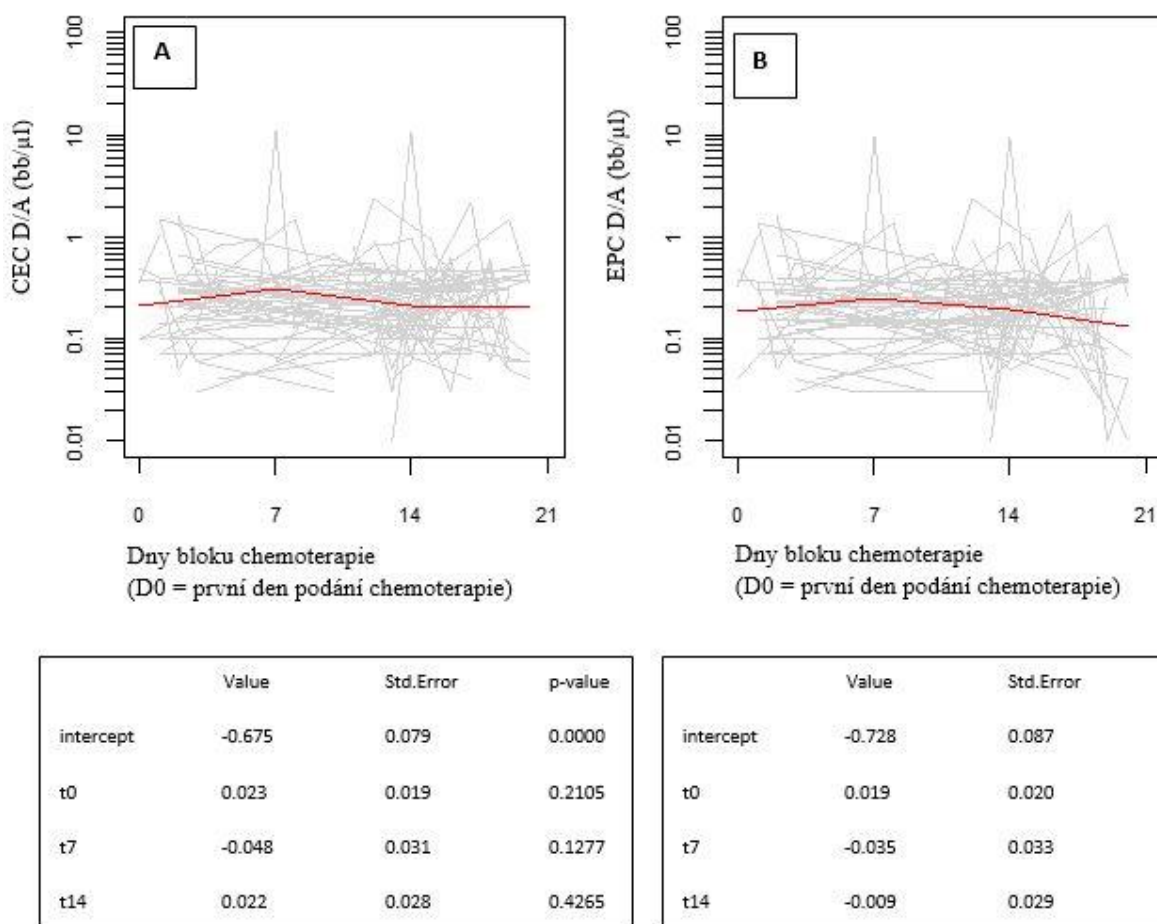
Obr. 19 - Dynamika CEC v průběhu konvenční chemoterapie. (CEC – cirkulující endoteliální buňky; bb – buňky).

Obdobný trend byl patrný i u hodnot EPC, kdy statisticky významný byl pouze vzestup hodnot ode dne nula ke dni 7, následný pokles hodnot již nebyl statisticky signifikantní, viz obr.č.20.

Dynamika hodnot mrtvých/apoptotických jak CEC, tak EPC byla obdobná, nárůst i pokles po dni 7 však nebyl statisticky signifikantní, viz obr. č. 21 A, B.



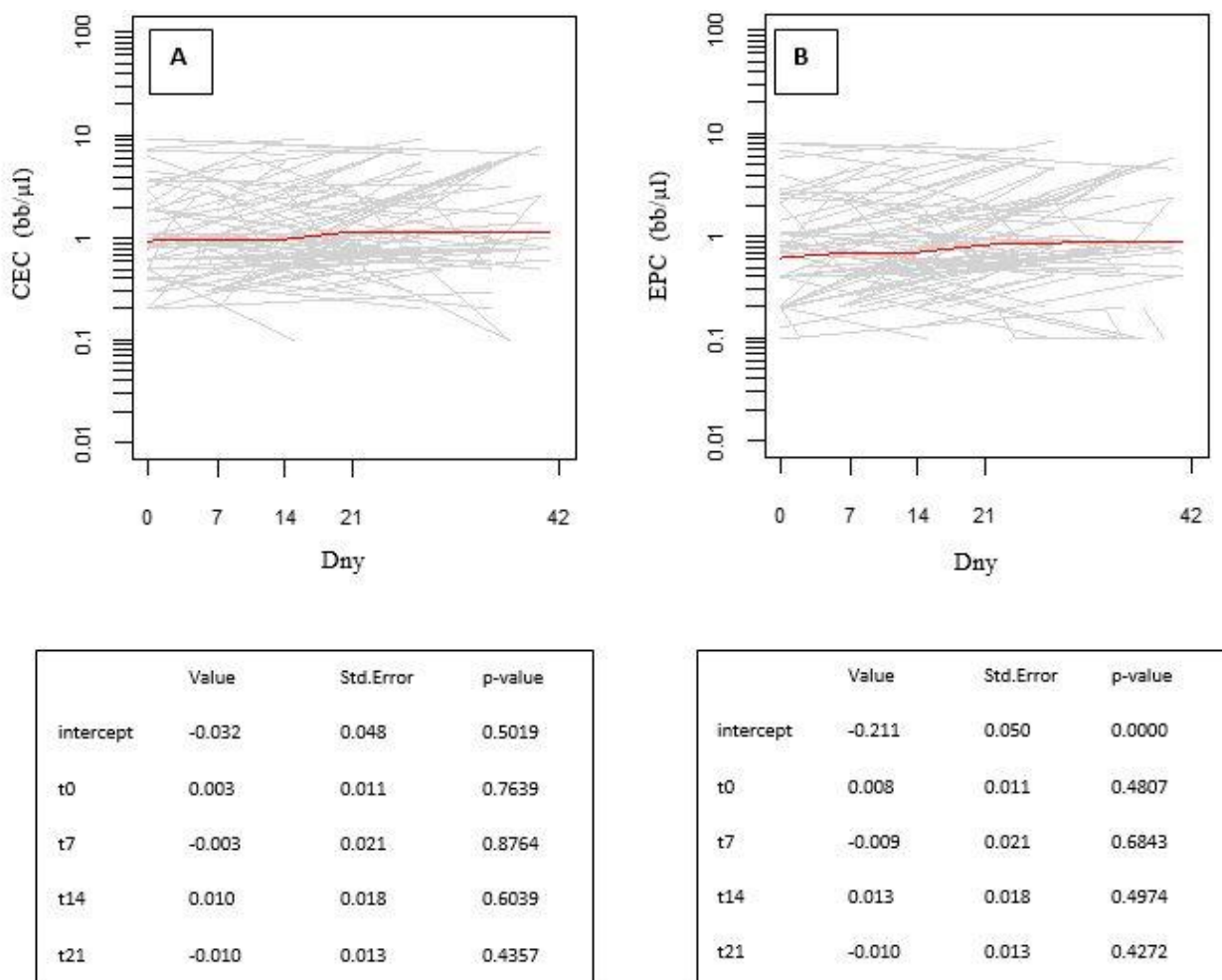
Obr. 20 - Dynamika EPC v průběhu konvenční chemoterapie. (EPC – cirkulující progenitorové endoteliální buňky; bb – buňky).



Obr. 21 A, B - Dynamika CEC D/A a EPCD/A v průběhu konvenční chemoterapie. (CEC D/A – mrtvé/apoptotické cirkulující endoteliální buňky; EPC D/A – cirkulující endoteliální progenitorové endoteliální buňky; bb – buňky)

Hodnoty CEC a EPC v průběhu podávání metronomické či antiangiogenní léčby v sledovaném období 42 dnů nevykazovaly výraznější rozdíly (obr. 22 A, B).

Dynamika hodnot mrtvých/apoptotických jak CEC, tak EPC byla obdobná.



Obr. 22 A, B - Dynamika CEC a EPC v průběhu metronomické a jiné antiangiogenní léčby. (CEC – cirkulující endoteliální buňky; EPC – cirkulující progenitorové endoteliální buňky; bb – buňky)

5.4 Korelace množství CEC a EPC s febrilní neutropenií, operačním zákrokem a podáváním rekombinantního G-CSF

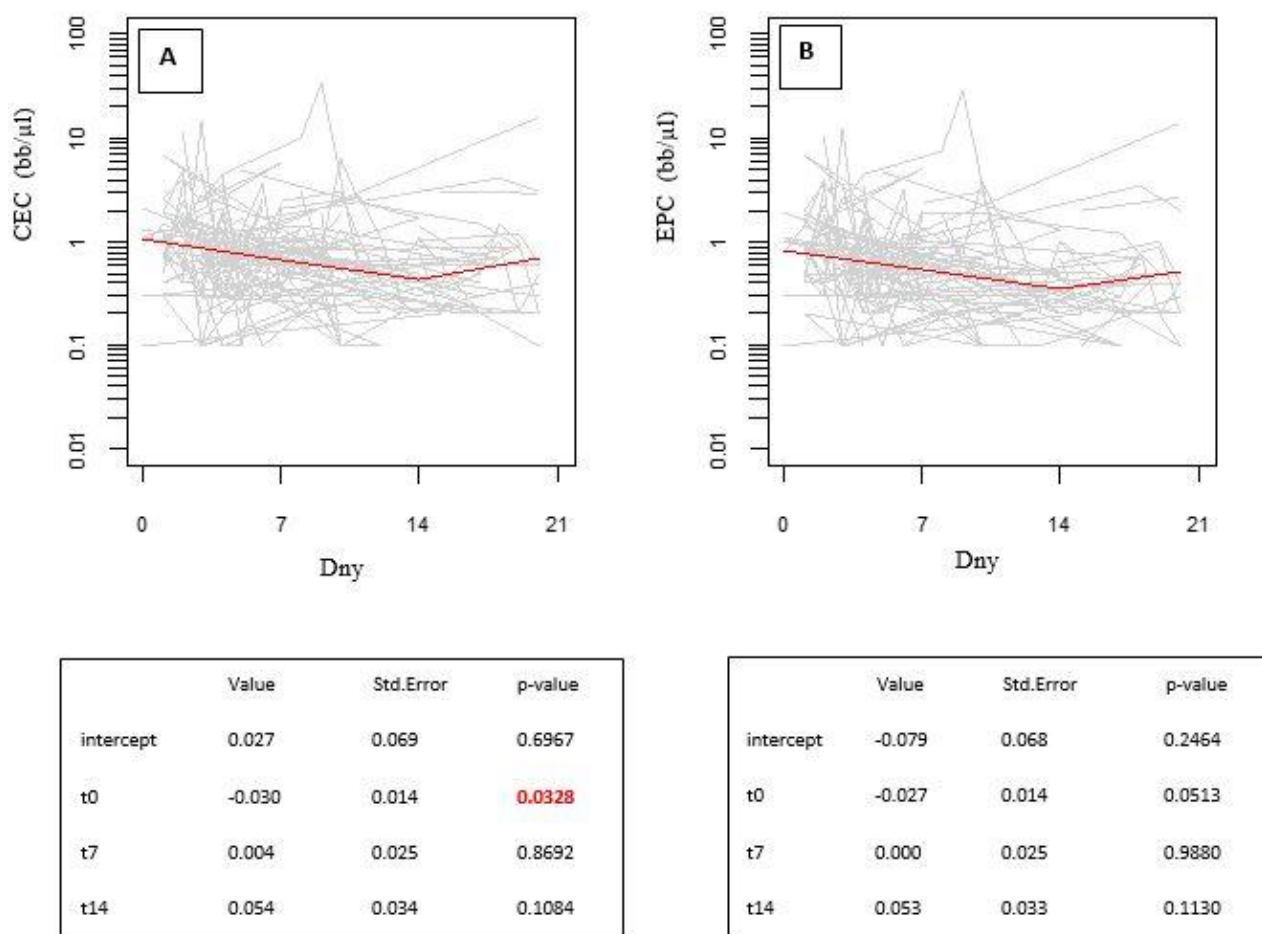
Pro analýzu tohoto cíle byly použity data ze souboru pacientů s konvenční chemoterapií z předchozí analýzy. Soubor činil celkem 12 pacientů.

5.4.1 Korelace množství CEC a EPC s febrilní neutropenií

Jako den 0 byl označen první den s antibiotickou léčbou.

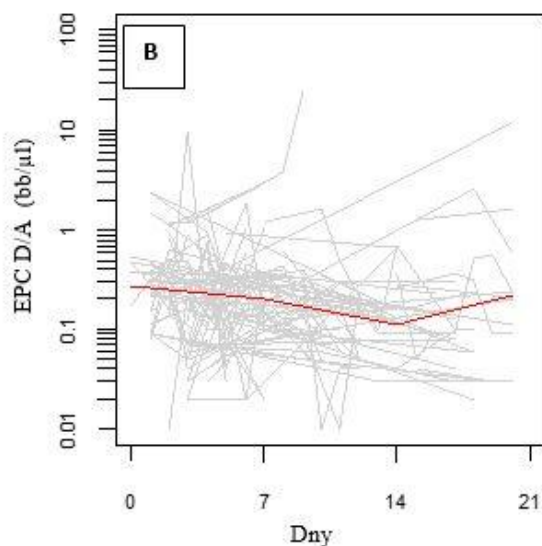
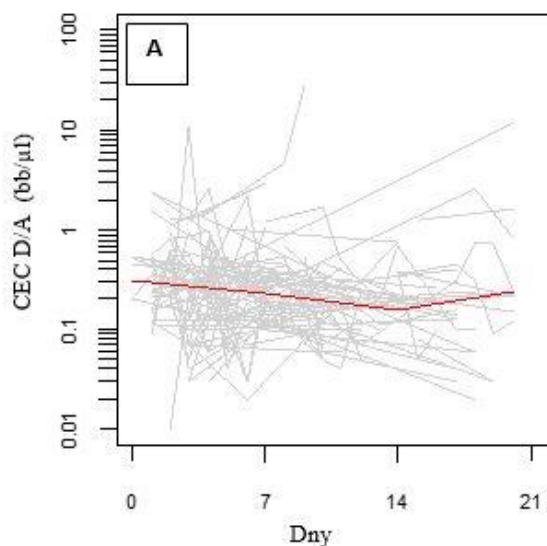
Množství CEC v prvních dnech febrilní neutropenie vykazovalo sestupný trend až ke dni 14, kdy byl patrný opět nárůst hodnot CEC. Iniciální pokles v hodnotách CEC byl statisticky signifikantní (obr. 23 A).

Dynamika hodnot EPC byla v průběhu febrilní neutropenie obdobná, iniciální pokles byl na hranici statistické významnosti (obr. 23 B).



Obr. 23 A, B - Dynamika CEC v průběhu febrilní neutropenie (CEC – cirkulující endoteliální buňky; EPC – cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

Trend v hodnotách mrtvých/apoptotických CEC a EPC byl stejný, u EPC D/A byl statisticky signifikantní vzestup hodnot po dni 14 (obr. 24 A, B).



	Value	Std.Error	p-value
intercept	-0.514	0.072	0.0000
t0	-0.016	0.014	0.2537
t7	-0.008	0.026	0.7631
t14	0.050	0.036	0.1667

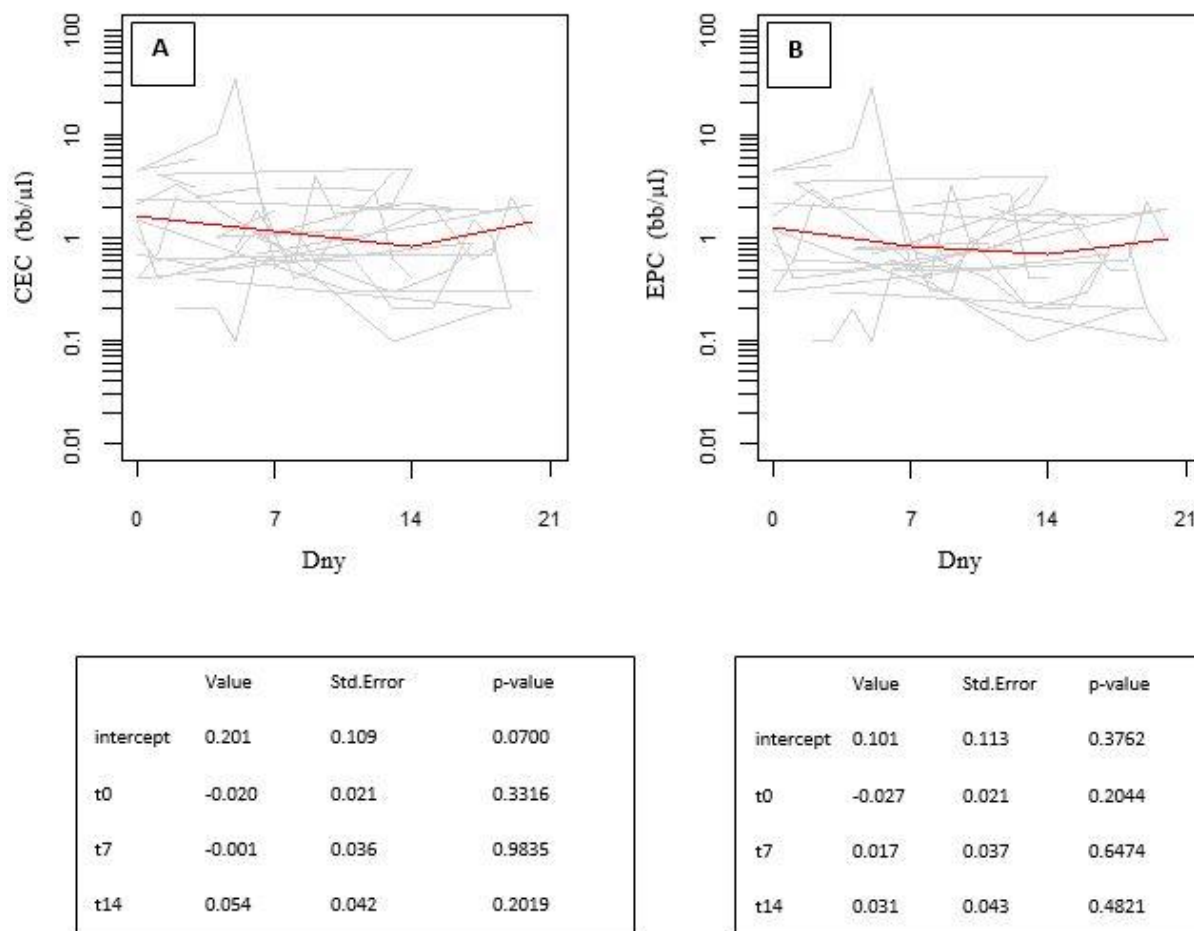
	Value	Std.Error	p-value
intercept	-0.569	0.076	0.0000
t0	-0.017	0.015	0.2794
t7	-0.022	0.028	0.4231
t14	0.080	0.037	0.0309

Obr. 24 A, B - Dynamika CEC D/A a EPC D/A v průběhu febrilní neutropenie. (CEC D/A – mrtvé/apoptotické cirkulující endoteliální buňky; EPC D/A – mrtvé/apoptotické cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

5.4.2 Korelace množství CEC a EPC s operačním zákrokem

Jako den 0 byl označen den operace, biopsie, či zavedení centrálního žilního katetru.

Dynamika v hodnotách CEC a EPC v pooperačním období nevykazovala žádný statisticky významný trend, viz obr. 25 A, B.



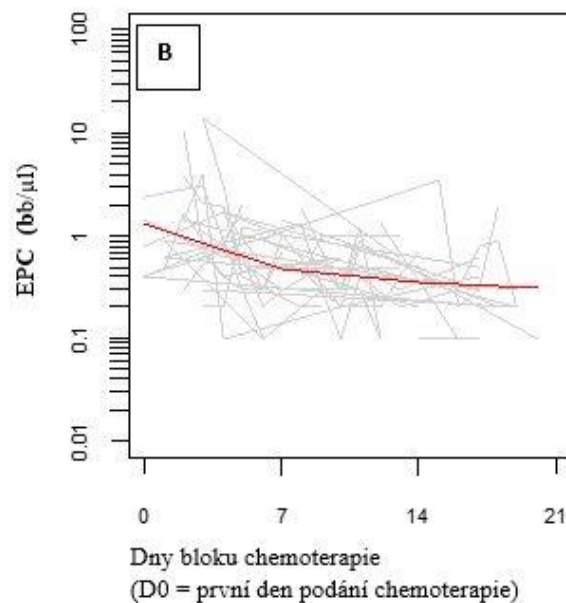
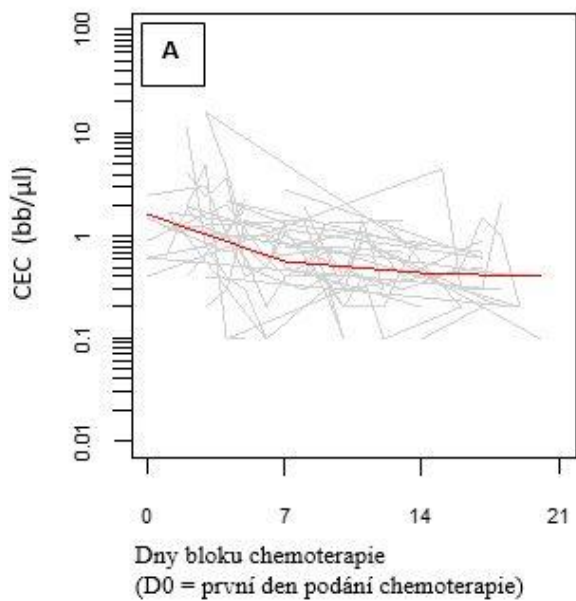
Obr. 25 A, B - Dynamika CEC v pooperačním období. (CEC - cirkulující endoteliální buňky; EPC - cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

Obdobné výsledky byli patrné i u mrtvých/apoptotických CEC a EPC.

5.4.3 Korelace množství CEC a EPC s podáváním rekombinantního G-CSF (Neupogen)

Jako den 0 byl označen den zahájení podávání Neupogenu.

Množství CEC a EPC v prvních dnech podávání Neupogenu vykazovalo sestupný trend ke dni 7, kdy se pokles zmírnil. Tento iniciální pokles v hodnotách CEC a EPC byl statisticky signifikantní (obr. 26 A, B).

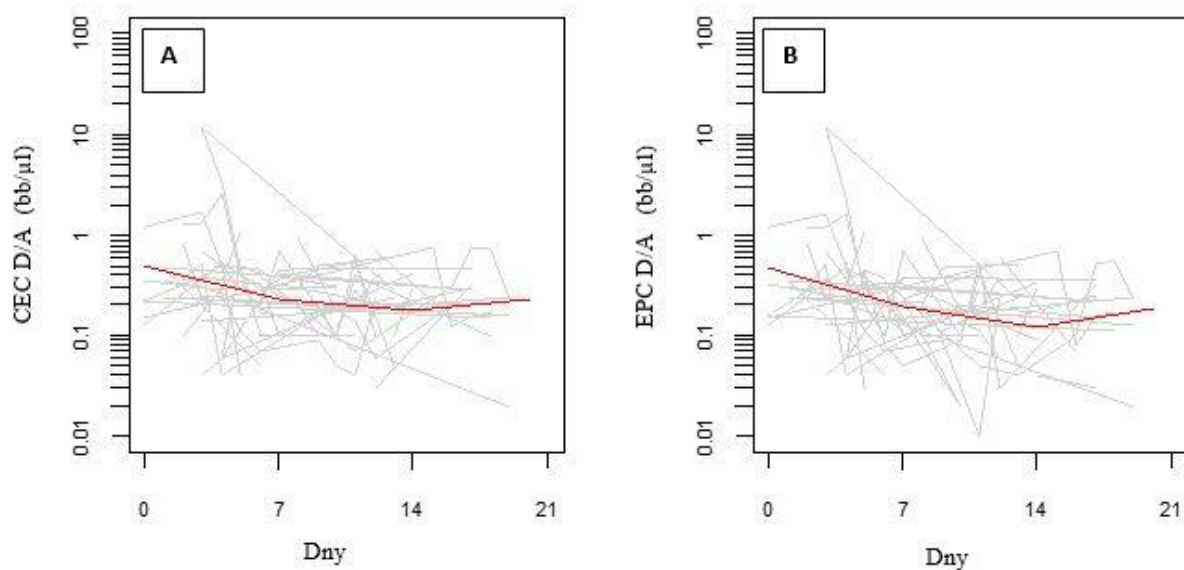


	Value	Std.Error	p-value
intercept	0.199	0.107	0.0660
t0	-0.064	0.021	0.0036
t7	0.048	0.036	0.1846
t14	0.013	0.046	0.7811

	Value	Std.Error	p-value
intercept	0.114	0.104	0.2749
t0	-0.064	0.021	0.0027
t7	0.046	0.035	0.1851
t14	0.011	0.044	0.8028

Obr. 26 A, B - Dynamika CEC a EPC v průběhu podávání Neupogenu. (CEC - cirkulující endoteliální buňky; EPC - cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

Obdobně i u mrtvých/apoptotických CEC i EPC byl iniciální pokles hodnot ke dni 7 statisticky signifikantní (obr. 27 A, B).



	Value	Std.Error	p-value
intercept	-0.314	0.109	0.0050
t0	-0.045	0.021	0.0384
t7	0.027	0.036	0.4574
t14	0.035	0.049	0.4817

	Value	Std.Error	p-value
intercept	-0.319	0.120	0.0092
t0	-0.057	0.024	0.0182
t7	0.029	0.039	0.4716
t14	0.054	0.053	0.3111

Obr. 27 A, B - Dynamika CEC D/A a EPC D/A v průběhu podávání Neupogenu. (CEC D/A – mrtvé/apoptotické cirkulující endoteliální buňky; EPC D/A – mrtvé/apoptotické cirkulující endoteliální progenitorové buňky; bb – buňky)

6 Diskuze

K zajištění svých nutričních potřeb a přísunu dostatečného množství kyslíku potřebuje nádor adekvátní cévní zásobení. Novotvorba cév je tak nedílnou součástí nádorového růstu, má zásadní význam pro jeho invazivitu a metastazování. Cévní zásobení si nádor nejčastěji zajišťuje angiogenezi z cév již existujících, méně často pak vytváří cévy de novo vaskulogenezi z endoteliálních progenitorových buněk, jež pocházejí z kostní dřeně. Tyto poznatky vedly k četným pokusům o nové léčebné strategie ve snaze ovlivnit novotvorbu cév a tím zabránit nádoru v šíření a tvorbě metastáz.

S rozvojem antiangiogenní léčby se objevila také potřeba spolehlivého markeru angiogeneze, jenž by měl jak prognostický, tak prediktivní význam. Zatímco účinnost konvenční chemoterapie, která cílí na nádorové buňky, lze měřit zobrazovacími metodami, určit klinický benefit, jež přináší cílená léčba, je obtížnější. Účinek většiny antiangiogenních látek je cytostatický. Regrese velikosti tumoru tak nemusí představovat realistické zhodnocení léčebné odpovědi a také to není optimální indikátor biologické aktivity. Spolehlivý biomarker je tedy nutný k určení optimální dávky, k měření biologické aktivity a identifikaci pacientů, kteří by z dané léčby nejvíce profitovali.

Cirkulující endoteliální buňky a cirkulující endoteliální progenitorové buňky byly několika studii navrženy jako potenciální neinvazivní biomarker nádorové angiogeneze. Nicméně výsledky těchto studií jsou rozporuplné. Zatímco v některých byl prokázán vliv rozsahu onemocnění a léčby, jak antiangiogenní tak i chemoterapie, na množství CEC a EPC, v jiných tento vliv prokázán nebyl.

V předkládané práci jsme se v první fázi zaměřili na rozdíly v množství CEC a EPC u různých diagnostických skupin. Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi hodnotami aCEC a mCEC u jednotlivých diagnostických skupin a to jak iniciálně před zahájením léčby, tak i při druhém odběru v rámci přešetření. V naší studii jsme neměli tzv. zdravou kontrolu. Jako kontrolu jsme proto použili skupinu pacientů s neonkologickým onemocněním hospitalizovaných na Klinice dětské onkologie FN Brno v rámci diferenciální diagnostiky. Nicméně třetina těchto dětí měla zánětlivé onemocnění, které je v literatuře spojováno se zvýšenými hodnotami CEC. Tři dívky z této skupiny měly torzi vaječníků, stav, který vede k narušení cév a tím i endotelia, což ve finále může také vést ke zvýšeným hodnotám CEC. Stejně tak byli do této skupiny zahrnuti tři pacienti s cévní malformací, kde

je narušení endotelu více než pravděpodobné. I přes tyto důvody při srovnání hodnot CEC u pacientů s neonkologickým onemocněním z naší studie s hodnotami uvedenými v publikaci Taylor a spol. u zdravých dětí není patrný výrazný rozdíl. Hodnoty mCEC ve skupině dětí s neonkologickým onemocněním v naší studii byly v rozsahu 1,1-98,1 bb/ml, medián 12,5 bb/ml, hodnoty CEC u zdravých dětí uvedené v publikaci Taylor a spol., kde CEC byly definovány obdobně jako u našich pacientů, byly v rozsahu 0-56 bb/ml s mediánem 7,5 bb/ml. Nicméně ve srovnání s hodnotami uvedenými v publikaci Duboisa a kol. byly hodnoty u zdravých dětí několikanásobně vyšší než v naší studii – medián 1670 bb/ml, rozsah 330-4700 bb/ml. Definice CEC přitom byla obdobná jako v naší studii. Důvod pro tento rozdíl se zdá být metodologický, analytická fáze je však obdobná, rozdíl může tedy být v preanalytické fázi, jež v publikaci není uvedena.

Také hodnoty EPC se u jednotlivých diagnostických skupin významně nelišily. Obdobné závěry byly publikovány i ostatními skupinami investigátorů, nicméně korelace s těmito studiemi je obtížná, jelikož definice EPC se mezi jednotlivými studiemi lišila, zejména v expresi CD133. V první etapě naší studie jsme protilátku proti tomuto antigenu nepoužili, což může být limitující pro definitivní stanovení EPC.

Výsledky pro druhý odběr u pacientů v době přešetření byly obdobné jako u prvního odběru.

Při srovnání dynamiky hodnocených buněk iniciálně a v průběhu přešetření byl nalezen statisticky signifikantní pokles v aCEC a mCEC. Tento pokles může být díky normalizaci cévního zásobení tumoru působením chemoterapie, jež vede ke stabilizaci cév a tím i endotelia, což by odpovídalo nižším hodnotám CEC ve srovnání s hodnotami při diagnóze.

Ve své první studii Pradhan a spol. prokázali signifikantně nižší hodnoty CEC u dětských onkologických pacientů ve srovnání se zdravou kontrolou a to jak iniciálně při stanovení diagnózy, tak i D21 léčby, tedy pro prvním cyklu chemoterapie. Nicméně při srovnání hodnot CEC u pacientů v těchto dvou bodech nebyl patrný žádný významný rozdíl. Je nutno podotknout, že Pradhan definoval CEC jako pouze apoptotické zralé CEC, což může být důvodem pro rozdílné výsledky mezi naší a jeho studií.

Ve druhé Pradhanově studii z roku 2015 byly hodnoty CEC u onkologických pacientů signifikantně nižší ve srovnání se zdravou kontrolou a tento významný rozdíl zůstal zachován v průběhu a po ukončení léčby. Nicméně zde již byl statisticky signifikantní rozdíl mezi hodnotami CEC po ukončení léčby u pacientů, kteří dosáhli kompletní remisi a množství CEC

u nich bylo nižší, ve srovnání s těmi, jež kompletní remisi nedosáhli. I přesto však nebyl patrný významný rozdíl mezi hodnotami CEC iniciálně a po ukončení léčby.

Manusco a spol. ve své studii z roku 2006 naopak prokázali zvýšené hodnoty CEC u těch pacientek s pokročilým karcinomem prsu, jež měly klinický benefit z podávané metronomické terapie. Větší část těchto buněk však byla apoptotická, reflektující antiangiogenní působení metronomické léčby.

Jelikož jsme v první etapě nepoužili barvení na viabilitu buněk, nelze přesně určit, zda došlo ke snížení viabilních CEC nebo i těch apoptotických.

V korelaci s ostatními skupinami investigátorů jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hodnotách aCEC, mCEC a EPC mezi pacienty s lokalizovanou vs. metastatickou chorobou. U hodnot mCEC byl patrný výraznější klesající trend ve skupině s metastatickou chorobou ve srovnání s lokalizovaným onemocněním, což by hypoteticky mohlo odpovídat výraznější odezvě rozvinutější nádorové vaskulatury při již metastatickém onemocnění na chemoterapii. Možná ale je i opačná hypotéza – mírnější klesající trend u lokalizovaného onemocnění by také mohl být způsoben současně stoupající hodnotou apoptotických CEC, jež se při naší definici těchto buněk promítnou do mCEC taky, což by poukazovalo na lepší efekt chemoterapie u těchto pacientů, obdobně jako ve studii Manusca a spol.

Na hranici statistické významnosti byl rozdíl v absolutním počtu EPC mezi pacienty s lokalizovanou vs. metastatickou chorobou iniciálně i při druhém odběru v průběhu přešetření, přičemž dynamika u obou skupin zůstala stejná. Hodnoty EPC u pacientů s metastázemi byly nižší než u těch s pouze primárním tumorem.

Taylor a spol. ve své studii naopak prokázali korelaci výši hodnot EPC s metastatickým onemocněním. Jelikož analyzovaný soubor byl obdobný našemu souboru včetně heterogenity zkoumaných diagnóz, důvod takto rozdílného výsledku se zdá být opět spíše metodologický. Taylor a spol. k analýze použili suspenzi mononukleárních buněk obohacenou o progenitory, zatímco v naší studii jsme použili plnou krev bez předchozí separace buněk. EPC ve francouzské studii byly definovány jako $CD45^{dim}CD34^{+}VEGFR2^{+}7AAD^{-}$, zatímco u nás jako $CD45^{+/-}CD34^{+}CD146^{+}$.

Při sledování vlivu léčby na hodnoty aCEC, mCEC a EPC, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi dětmi pouze po operačním zákroku ve srovnání s těmi, jež následně absolvovali léčbu chemoterapií a/nebo radioterapií. Pouze při srovnání hodnot EPC v době

diagnózy a v rámci přešetření byl patrný výraznější klesající trend ve skupině s následnou léčbou. Pradhan a spol. ve své práci z roku 2011 prokázali naopak zvýšené množství ECFC u dětských onkologických pacientů po prvním bloku chemoterapie ve srovnání se zdravou kontrolou, přičemž ale rozdíl hodnot ECFC u těchto pacientů před léčbou a den 21 bloku nebyl statisticky významný, tedy šlo nejspíše jen o mírný nárůst hodnot mezi těmito dvěma daty. Také definice ECFC je v této práci rozdílná od definice EPC v naší studii. Tudíž srovnání zde není úplně možné.

Při korelaci dynamiky hodnot cirkulujících endotelií s odpovědí na léčbu jsme u mCEC a EPC nenalezli statisticky signifikantní rozdíl mezi pacienty, kteří dosáhli objemovou regresi tumoru (s kompletní a parciální remisí) a pacienty, kteří dosáhli pouze stabilizaci onemocnění nebo u nichž došlo k progresi tumoru. V hodnotách aCEC byl ale pozorován výrazný klesající trend ve skupině bez objemové redukce tumoru ve srovnání s druhou skupinou s kompletní či parciální remisí. Tento rozdíl mezi dynamikou obou skupin byl statisticky významný, nicméně hodnoty aCEC při druhém odběru, provedeném v rámci přešetření, byly u obou skupin obdobné. Rozdíl byl tedy zejména v iniciačních hodnotách před zahájením léčby. Tyto výsledky mohou naznačovat, že pacienti s iniciačně vyšší hladinou aCEC hůře odpovídají na konvenční léčbu.

Pradhan a spol. ve své studii ohledně hodnot cirkulujících endotelií u dětských onkologických pacientů se sarkomem prokázali naopak významně nižší hodnoty CEC na konci léčby u pacientů, kteří dosáhli kompletní remisí ve srovnání s pacienty, kteří kompletní remisí nedosáhli. Důležité je připomenout, že CEC byly v této studii definovány jako apoptotické buňky, v naší se jednalo o aktivované (CD105⁺) endotelie.

V druhé etapě naší studie jsme na základě nových poznatků ohledně CEC a EPC a také vzhledem k dostupnosti kvalitnějšího flowcytometru pozměnili imunofenotypickou definici pro CEC a EPC. U CEC jsme přidali barvení na viabilitu pomocí 7AAD ve snaze odlišit živé buňky od těch mrtvých či apoptotických, jež by mohlo lépe korelovat s cévním postižením než rozdělení na aktivované a zralé CEC, u kterých viabilita není známa. U EPC jsme vzhledem k antigenní promiskuitě CD34 zvolili raději CD133, který je exprimován progenitorovými buňkami. Zaměřili jsme se na dynamiku hodnot CEC a EPC v čase v návaznosti na podání bloku chemoterapie a srovnání této dynamiky u konvenční chemoterapie a metronomické léčby, která by měla působit zejména antiangiogenně. Podrobněji jsme se pak věnovali vlivu febrilní neutropenie, operace a podání G-CSF na hodnoty CEC a EPC.

V průběhu konvenční chemoterapie docházelo již od prvního dne bloku k nárůstu množství CEC až do dne 7, potom hodnoty postupně klesaly až ke dni 21, jenž je obvykle zároveň i prvním dnem dalšího bloku. Tento nárůst a následný pokles po dni 7 byl statisticky významný. Obdobný trend byl patrný i u EPC, kde byl patrný signifikantní vzestup množství EPC 7. den bloku, zatímco následný pokles byl na hranici statistické významnosti. U mrtvých/apoptotických CEC a EPC byla sice dynamika podobná, nicméně bez statistické významnosti.

Vysvětlením pro vzestup CEC i EPC 7. den léčby by mohla být chemoterapií indukovaná odpověď organismu, na níž se pravděpodobně podílejí zejména různé cytokiny a růstové faktory, např. VEGF, či SDF-1 α .

Roodhartová a spol.⁹⁷ prokázali statisticky významnou korelaci mezi zvýšením CEC a EPC 7. den chemoterapie a hladinou SDF-1. Ve své studii z roku 2010 monitorovali množství CEC a EPC u 72 dospělých pacientů s různými typy malignit před zahájením léčby, 4 hodiny po podání cytostatik a následně 7 a 21 dnů po podání chemoterapie. Imunofenotypická definice CEC a EPC byla obdobná naší studii. U téměř poloviny pacientů byl pozorován mírný vzestup množství CEC již 4 hodiny po podání chemoterapie, téměř u všech pacientů byl pak patrný výrazný nárůst 7. a 21. den léčby. U EPC byl pozorován vzestup 4 hodiny po podání chemoterapie pouze u pacientů léčených taxany, zatímco 7. a 21. den chemoterapie již byl patrný vzestup u všech pacientů bez ohledu na typ podávané chemoterapie.

Monestiroli a spol. ve své práci z roku 2001⁸⁷ monitorovali kinetiku CEC u myších modelů nesoucích lidský Burkittův lymfom před podáním cyklofosfamidu v maximální tolerované dávce a 24 hodin po podání. Po podání cyklofosfamidu pozorovali výrazný vzestup počtu cirkulujících buněk, jež byly 7AAD⁺, čili jednalo se o apoptotické buňky. Většina z nich (cca 85%) byla CD45⁺, tedy šlo primárně o hematopoetické buňky, zatímco přibližně 40% cirkulujících buněk označených autoři jako CEC (CD45⁻FLK⁺) bylo 7AAD⁻, tedy jednalo se o viabilní CEC. Tyto výsledky jsou tedy obdobné jako i v naší studii.

Následný pokles v množství CEC a méně výrazně i EPC v naší studii může poukazovat na stabilizaci narušené nádorové vaskulatury v časové prodlevě nutné mezi dvěma bloky chemoterapie založené na maximálních tolerovaných dávkách. Důvodem rozdílných výsledků 21. den chemoterapie ve srovnání s kolegy Roodhartovou a spol. může být fakt, že zatímco v jejich studii byly CEC a EPC odebírány pouze v průběhu prvního cyklu chemoterapie, v naší studii byly odebírány CEC a EPC s každým odběrem krve z klinické indikace v průběhu celé

léčby, tudíž i různých bloků chemoterapie, kde s každým dalším blokem chemoterapie může postupně docházet ke klesajícímu trendu v množství CEC a EPC. Dalším důvodem pro tyto rozdílné výsledky může být také rozdílné zastoupení tumorů – zatímco v našem souboru jsou primárně zastoupeni pacienti s embryonálními tumory či sarkomy, ve studii Roodhartové a spol. jsou to ve většině případů zejména karcinomy, přičemž mezi karcinomy a jinými typy nádorů mohou být zásadní rozdíly v samotném procesu angiogeneze. Například dráha, jež reguluje expresi VEGF je rozdílná mezi ras-transformovanými fibroblasty a epiteliálními buňkami.¹⁶⁹ Také v distribuci cév je mezi karcinomy a sarkomy patrný rozdíl.¹⁷⁰

Ve srovnání s konvenční chemoterapií množství CEC a EPC u pacientů v průběhu 21 dnů metronomické léčby nevykazovalo výraznější rozdíly. Na rozdíl od preklinické studie Bertoliniho a spol., ve které prokázali postupný pokles množství EPC po podání cyklofosfamidu v metronomickém dávkování, zatímco po podání cyklofosfamidu v maximální tolerované dávce došlo k nárůstu množství EPC.¹⁷¹ Důvodem pro neklesající množství EPC v naší studii, trend, jenž byl vzhledem k předpokládanému antiangiogennímu působení metronomické chemoterapie očekáván, může být dán typem tumoru – většina pacientů v našem souboru měla nádor s nízkým stupněm malignity na podkladě vrozených neurokutánních syndromů jako je neurofibromatóza či tuberózní skleróza, menší část pacientů pak byla v pokročilém stádiu onemocnění (metastatické onemocnění, relaps). Na rozdíl od konvenční chemoterapie ale v sledovaném souboru nedošlo ani k přechodnému nárůstu hodnot CEC či EPC.

Hodnoty CEC a EPC mohou být v průběhu léčby konvenční chemoterapií ovlivněny febrilní neutropenií, jež přichází u většiny pacientů 7. až 10. den bloku, operačním zákrokem jako je zavedení centrálního žilního katetru, biopsií/resekcí tumoru nebo podáním rekombinantního G-CSF. Dalším cílem naší studie bylo zjistit míru vlivu těchto událostí na hodnoty sledovaných buněk.

Při sledování vlivu febrilní neutropenie byl patrný signifikantní pokles množství CEC až ke dni 14, poté došlo opět k nárůstu hodnot, přičemž dnem 0 byl označen první den febrilní neutropenie s antimikrobiální terapií. Obdobný trend na hranici statistické významnosti byl patrný i v EPC. U EPC D/A byl statisticky významný vzestup množství po dni 14.

Příčinou poklesu CEC i EPC by mohla být úspěšná antibiotická léčba febrilní neutropenie, kdy došlo ke stabilizaci endoteliální dysfunkce původně způsobené infekčním stavem. Mutunga a spol. prokázali zvýšené množství CEC v souboru pacientů v sepsi a septickém

šoku 24 hodin od diagnózy ve srovnání se zdravou kontrolou a ventilovanými pacienty hospitalizovanými na jednotce intenzivní péče bez známek infekce.⁷⁹ Leclerc a spol. aplikovali lipopolysacharid bakteriální stěny (LPS) králíkům a sledovali míru endoteliální dysfunkce v aortě septických králíků 24 hodin po aplikaci, 5. a 21.den. První den po aplikaci LPS bylo 10% obvodu aorty bez endoteliálních buněk, 5.den tvořila takto obnažené místa již 26% celkového obvodu aorty, zatímco 21.den okrsky bez endoteliálních buněk nebyly patrné vůbec. Došlo tedy k regeneraci cévní stěny, přičemž zvířata nebyla nijak léčena.¹⁷² Několik dalších studií prokázalo vliv LPS na indukci apoptózy endoteliálních buněk in vitro a v menší míře i in vivo.¹⁷³ Lze tedy předpokládat zvýšené hodnoty CEC jak vitálních, tak apoptotických v průběhu sepse (v naší studii tedy D0), přičemž v průběhu antimikrobiální léčby tyto hodnoty klesají v důsledku regenerace poškozeného endotelia. Febrilní neutropenie nastupuje u většiny pacientů kolem 7. až 10. dne bloku (při této analýze označen jako D0), tedy D14 v naší analýze se částečně může překrývat s prvním dnem dalšího bloku CHT. Příčinou opětovného nárůstu po D14 může být tedy i podání dalšího bloku CHT.

V průběhu léčby dětské pacienty s onkologickým onemocněním podstupují různé operační zákroky, jako například biopsie tumoru, zavedení či extrakce CVK, resekce tumoru. Woywodt a spol. prokázali ve své studii z roku 2003 zvýšené hodnoty CEC po traumatické venepunkci.⁷⁵ Scheubel se věnoval dynamice EPC u kardiologických pacientů po provedení koronárního arteriálního bypassu, kdy po provedeném výkonu došlo k výraznému zvýšení množství EPC a chemokinů.¹⁷⁴ Dalším dílčím cílem naší studie tedy bylo posoudit vliv operace na množství CEC a EPC. V pooperačním období však dynamika CEC či EPC nevykazovala žádný statisticky významný trend. Možnou příčinou je i častá koincidence událostí ovlivňujících hodnoty těchto buněk – podání chemoterapie v časné návaznosti na operační zákrok, febrilní neutropenie v průběhu zavedení či extrakci CVK a podobně.

Rekombinantní G-CSF (Neupogen) se v dětské onkologii používá od začátku 90. let s cílem zmírnit a zkrátit epizody febrilní neutropenie během intenzivní chemoterapeutické léčby. Zatímco existuje řada publikací o výhodnosti používání Neupogenu v průběhu chemoterapie, objevily se také studie poukazující na nežádoucí proangiogenní a pronádorový efekt tohoto léku.

V roce 2000 Jeha a kol. publikoval zajímavou kazuistiku pacienta s těžkou vrozenou neutropenií, jemuž byl od 3 let věku aplikován Neupogen v dávce 2x 5 µg/kg/den. Po 9 letech léčby byla u chlapce diagnostikována AML a současně i těžká otitida s celulitidou okolní

tkáně. Léčba G-CSF byla přerušena a pacient zahájil intravenózní léčbu antibiotiky. Po 5 dnech došlo k ústupu infekce, ale také k vymizení leukemických blastů v periferní krvi. Vzhledem k dobrému stavu pacient nadále pokračoval v profylaktickém podávání antibiotik bez chemoterapie či Neupogenu. Po 4 týdnech byla provedena kontrolní aspirace kostní dřeně, jež prokázala kompletní morfológickou i cytogenetickou remisi leukémie, která trvala 11 týdnů. Poté bylo opět zahájeno podávání Neupogenu ve snížené dávce 2x 3 µg/kg/den. Kontrolní aspirace kostní dřeně po 7 týdnech však prokázala relaps AML se dvěma klony – původním a novým s odlišnými cytogenetickými znaky. Po 14 dnech od vysazení došlo opět k remisi AML, která trvala 6 týdnů, než pacient absolvoval transplantaci kostní dřeně. Dle dalších publikovaných studií zavedením Neupogenu do léčby Kostmannovho syndromu došlo ke zvýšené incidenci AML a myelodysplastického syndromu (MDS) u takto léčených pacientů. Jelikož tato transformace do AML či MDS nebyla pozorována u pacientů s idiopatickou či cyklickou neutropenií, kteří jsou dlouhodobě v léčbě G-CSF, může se v etiologii těchto maligních myeloidních onemocnění promítat spíše vlastní myelopoetický defekt u pacientů s vrozenou neutropenií než přímý vliv Neupogenu. Nicméně tato kazuistika jednoznačně prokázala přímý vliv užívání Neupogenu na počet leukemických blastů u pacienta s těžkou vrozenou neutropenií a tedy jeho možný pronádorový účinek u některých diagnóz.

V roce 2009 Shaked a kol. prokázali možný podíl G-CSF na rapidní mobilizaci EPC po podání léku zaměřených na disrupci již existujících nádorových cév ("vascular disrupting agents" – VDA). U onkologických pacientů, jež dostávají Neupogen, by tak mohlo dojít ke snižování efektu chemoterapie díky proangiogennímu působení tohoto léku, jelikož výraznou mobilizací EPC z kostní dřeně může dojít i ke zvýšené vaskulogenezi v samotném tumoru.

V naší studii však v prvních dnech podávání Neupogenu došlo naopak k významnému poklesu množství jak EPC tak i CEC, viabilních i apoptotických, až ke dni 7, kdy se tento pokles zmírnil. Jelikož v literatuře neexistují data o dynamice hodnot EPC či CEC při podávání Neupogenu, důvod tohoto poklesu není jasný. Možnou teorií je fakt, že velká část pacientů dostávala Neupogen intervenčně až v průběhu febrilní neutropenie, tedy opět výsledky mohou být ovlivněny současně zvládající se infekcí.

Na závěr diskuze je nutno poznamenat, že hlavním problémem cirkulujících endoteliálních buněk a to jak CEC, tak i EPC je absence jednoznačné imunofenotypické definice těchto buněk, což činí srovnávání výsledků různých studií jen velice obtížné. Také tento fakt brání

jejich eventuálnímu využití jako markeru angiogeneze u onkologických pacientů. Navíc se ukazuje, že množství CEC i EPC se po stimulaci mohou měnit během hodin, tedy problémem zůstává i načasování jednotlivých odběrů, což může být limitující i pro naši studii (například odběr krve ráno ještě před podáním samotné chemoterapie). Také množství těchto buněk je ovlivňováno několika faktory, jež se často u dětských onkologických pacientů prolínají, například febrilní neutropenie, menší operační zákrok, podávání Neupogenu atd. může proběhnout v jeden den. Vzhledem ale k nárůstu antiangiogenních modalit používaných stále častěji i v praxi by další studium těchto buněk jako potenciálních biomarkerů nemělo být opomíjeno.

7 Závěr

Cílem naší práce byla podrobná analýza množství CEC a EPC u dětských onkologických pacientů jak iniciálně ve vztahu k typu nádoru, rozsahu onemocnění, typu dosažené odpovědi na léčbu, tak i monitorace dynamiky těchto buněk v průběhu léčby, srovnání konvenční chemoterapie a metronomické/antiangiogenní léčby, zhodnocení vlivu febrilní neutropenie, operačního zákroku či podávání rekombinantního G-CSF.

V iniciální části jsme se zaměřili na srovnávání množství EPC a zralých či aktivovaných CEC mezi pacienty s odlišnými typy nádoru a také pacienty s neonkologickým onemocněním při diagnóze a během prvního přešetření buď v průběhu léčby, nebo v rámci pravidelného sledování u pacientů dále neléčených. Nenalezli jsme statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami pacientů a to jak iniciálně, tak i při druhém odběru. U pacientů, u nichž byl k dispozici i druhý odběr, byla srovnána dynamika v čase bez ohledu na diagnózu. Zde byl patrný statisticky významný pokles aktivovaných a zralých CEC mezi iniciálním odběrem a odběrem v rámci přešetření. Výsledek může poukazovat na stabilizaci cévní struktury nádoru v průběhu efektivní léčby u onkologických pacientů či po operačním zákroku u pacientů s benigním tumorem, kteří dále léčeni nebyli.

Při sledování vlivu rozsahu onemocnění a typu léčby (pouze operace vs. chemoterapie +/- radioterapie) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v dynamice hodnot EPC, mCEC a aCEC, což odpovídá ostatním publikovaným studiím. Statisticky významný rozdíl byl patrný pouze v iniciální hodnotě aCEC u pacientů, kteří dosáhli pouze SD nebo u nichž došlo k progresi onemocnění v průběhu léčby (hodnoty byly vyšší) ve srovnání s pacienty, kteří dosáhli objemovou redukcí tumoru (CR+PR). Nicméně hodnoty již byly obdobné u obou skupin při druhém odběru, tedy u pacientů bez objemové redukce tumoru byl výraznější klesající trend v hodnotách aCEC. Tyto výsledky by mohly odpovídat více aktivované vaskulatuře iniciálně u pacientů s méně příznivým tumorem, tento rozdíl se však v průběhu chemoterapie ztrácí.

Ve druhé fázi jsme na základě nových poznatků objevujících se v literatuře a také díky přístupu ke kvalitnějšímu flowcytometru pozměnili imunofenotypickou definici CEC a EPC a zavedli rozlišení jejich viabilních a mrtvých/apoptotických variant. Vzhledem k publikovaným údajům o rychlé změně v množství CEC a EPC v reakci na stimul jsme také přidali více odběrů ve snaze o co nejpodrobnější monitoraci dynamiky hodnot CEC a EPC.

Zaměřili jsme se na srovnání dynamiky v průběhu bloku konvenční chemoterapie a metronomické či jiné antiangiogenní léčby a také na podrobnou monitoraci vlivu febrilní neutropenie, operačního zákroku a podávání Neupogenu na hodnoty EPC a CEC.

Při podání bloku konvenční chemoterapie došlo nejdříve k nárůstu hodnot CEC i EPC až ke dni 7, poté hodnoty klesaly. Tento nárůst i pokles byl statisticky signifikantní u viabilních buněk. Nárůst po podání chemoterapie je v souladu s publikovanými daty a zejména u EPC může poukazovat na paradoxní efekt chemoterapie založené na maximálně tolerovaných dávkách, která může vést ke stimulaci vyplavení EPC z kostní dřeně a tím podporovat vaskulogenezi v tumoru. Následný pokles nebyl dalšími skupinami investigátorů pozorován a publikován. Na rozdíl od konvenční chemoterapie nebyl pozorován výraznější trend v dynamice hodnot EPC a CEC u pacientů léčených metronomickou/antiangiogenní léčbou. Toto pozorování by mohlo podporovat kombinaci cílených léků, zejména TKI, indikovaných na základě přítomnosti příslušného biomarkeru, s metronomickou terapií. Příčinou absence poklesu hodnot, který byl očekáván při předpokládaném antiangiogenním působení metronomické léčby a léčby multikinázovými inhibitory, může být velkým podílem pacientů s nízkým stupněm malignity na podkladě vrozených neurokutánních syndromů jako je neurofibromatóza a tuberózní skleróza.

Při febrilní neutropenii došlo k statisticky signifikantnímu poklesu v hodnotách viabilních CEC od zahájení antimikrobiální léčby až ke dni 14. Tento pokles by mohl odpovídat úspěšné antibiotické léčbě infekce, a tak by koreloval s publikovanou literaturou. Operační zákrok nevedl k výraznějšímu ovlivnění hodnot CEC a EPC. Při podávání Neupogenu došlo ale k statisticky významnému poklesu v hodnotách EPC i CEC až ke dni 7. Dynamika těchto buněk v závislosti na podávání G-CSF nebyla zatím v literatuře publikována, ale tento výsledek nepodporuje publikované hypotézy, že podávání Neupogenu může vést naopak ke zvýšené neoangiogenezi.

V naší studii jsme tedy nepotvrdili význam EPC a CEC jako spolehlivého snadno dostupného markeru u onkologických pacientů, jelikož hodnoty byly srovnatelné i s pacienty s benigním tumorem nebo neonkologickým onemocněním. Toto pozorování koresponduje i s observací zkušených chirurgů, kteří poukazovali na to, že ty nejvíce krvácející dětské nádory jsou ty nejhůře dopadající. Při podávání konvenční chemoterapie může docházet k přechodné stimulaci neoangiogeneze, zatímco při metronomické léčbě nebo léčbě multikinázovými inhibitory k výraznějším výkyvům v hodnotách EPC a CEC nedochází. Pro další využitelnost

EPC a CEC je nutná jednoznačná imunofenotypická definice těchto buněk a jasný protokol pro analýzu pomocí flowcytometru, aby bylo možné výsledky jednotlivých studií věrohodně srovnávat.

8 Soupis literatury a pramenů

1. Jelínek R, Dostál M, Likovský Z, Halášková M et al. *Histologie. Embryologie*. Praha, Czechia: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy; 1992. www.histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf. Accessed February 12, 2017.
2. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *AJP Cell Physiol*. 2002;282(5):C947-C970. doi:10.1152/ajpcell.00389.2001.
3. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-936. doi:10.1038/nature04478.
4. Klener P. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, Czechia: Grada; 2013.
5. Alberts B, ed. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
6. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol*. 1999;94(5):295-314. doi:10.1007/s003950050156.
7. Vrablík M, Janotová M, Motyková E, Prusíková M. Endoteliální dysfunkce—první stadium aterosklerózy. *Med. Praxi*. 2011; 8(3): 119-122.
8. Ryan US, ed. *Endothelial Cells*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1988.
9. Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*. 1984;49(4):405-413.
10. Vajner L, Univerzita Karlova. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie*. Praha: Karolinum; 2012.
11. Barlow KD, Sanders AM, Soker S, Ergun S, Metheny-Barlow LJ. Pericytes on the Tumor Vasculature: Jekyll or Hyde? *Cancer Microenviron*. 2013;6(1):1-17. doi:10.1007/s12307-012-0102-2.
12. Stephenson JA, Goddard JC, Al-Taan O, Dennison AR, Morgan B. Tumour Angiogenesis: A Growth Area—From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. *J Cancer Res*. 2013;2013:1-6. doi:10.1155/2013/895019.

13. Greene HS. HETEROLOGOUS TRANSPLANTATION OF MAMMALIAN TUMORS : I. THE TRANSFER OF RABBIT TUMORS TO ALIEN SPECIES. *J Exp Med.* 1941;73(4):461-474.
14. Folkman J. Toward an Understanding of Angiogenesis: Search and Discovery. *Perspect Biol Med.* 1985;29(1):10-36. doi:10.1353/pbm.1985.0049.
15. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972;175(3):409-416.
16. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol.* 1976;16:207-248.
17. Klener P. Angiogeneze jako součást nádorového “ekosystému” a možnosti jejího ovlivnění. *Klin Onkol.* 2010;23(1):14-24.
18. André N, Verschuur A, Rossler J, Sterba J. Anti-angiogenic therapies for children with cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(8):879-889.
19. Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med.* 1995;1(2):120-122.
20. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-257. doi:10.1038/35025220.
21. Adighibe O, Leek RD, Fernandez-Mercado M, et al. Why some tumours trigger neovascularisation and others don't: the story thus far. *Chin J Cancer.* 2016;35(1). doi:10.1186/s40880-016-0082-6.
22. Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008;358(19):2039-2049. doi:10.1056/NEJMra0706596.
23. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
24. Gerber H-P, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature.* 2002;417(6892):954-958. doi:10.1038/nature00821.
25. Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1085-1096. doi:10.1177/1947601911432334.

26. Cao Y, Cao R, Hedlund E-M. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med.* 2008;86(7):785-789. doi:10.1007/s00109-008-0337-z.
27. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011;17(11):1359-1370. doi:10.1038/nm.2537.
28. Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal.* 2013;11(1):97. doi:10.1186/1478-811X-11-97.
29. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varnier JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science.* 1995;270(5241):1500-1502.
30. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1(1):27-31.
31. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(3):219-227.
32. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006;57(1):1-18. doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131306.
33. Nyberg P. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(10):3967-3979. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2427.
34. Banfi A, von Degenfeld G, Blau HM. Critical role of microenvironmental factors in angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep.* 2005;7(3):227-234.
35. Ribatti D, Nico B. Tumor angiogenesis. From bench to bedside. 2016. doi:10.13128/IJAE-18340.
36. Bugyik E, Renyi-Vamos F, Szabo V, et al. Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth. *Chin J Cancer.* 2016;35(1). doi:10.1186/s40880-016-0083-5.

37. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004;231(3):474-488. doi:10.1002/dvdy.20184.
38. Paku S, Dezső K, Bugyik E, et al. A New Mechanism for Pillar Formation during Tumor-Induced Intussusceptive Angiogenesis: Inverse Sprouting. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1573-1585. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.033.
39. Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol Cancer.* 2017;16(1). doi:10.1186/s12943-017-0631-x.
40. Williamson SC, Metcalf RL, Trapani F, et al. Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer. *Nat Commun.* 2016;7:13322. doi:10.1038/ncomms13322.
41. Qian C-N, Tan M-H, Yang J-P, Cao Y. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. *Chin J Cancer.* 2016;35(1). doi:10.1186/s40880-015-0070-2.
42. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Lett.* 2007;248(1):18-23. doi:10.1016/j.canlet.2006.06.007.
43. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(1):102-111. doi:10.1016/j.gde.2004.12.005.
44. Vande Broek I. Circulating endothelial cells as a biomarker for angiogenesis in cancer: where do we stand? *Belg J Med Oncol.* 2010(4):10-17.
45. Bertolini F, Mancuso P, Shaked Y, Kerbel RS. Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology. *Drug Discov Today.* 2007;12(19-20):806-812. doi:10.1016/j.drudis.2007.08.011.
46. Pool EH, Dunlop GR. Cancer Cells in the Blood Stream. *Am J Cancer.* 1934;21(1):99-102. doi:10.1158/ajc.1934.99.

47. Herbeuval H, Fourot M. [Comparative Study of the Vascular Endothelium and its Basal on a Section and in Leukoconcentration]. *Comptes Rendus Séances Société Biol Ses Fil.* 1964(158):137–141.
48. Herbeuval H, Fourot M, Hettich C, Herbeuval R. ENDOTHELIAL CELLS AND CIRCULATING-BLOOD CLUMPS: DIFFERENTIAL DIAGNOSIS. *Acta Cytol.* 1965;9:68-72.
49. Wright HP, Glacometti NJ. Circulating endothelial cells and arterial endothelial mitosis in anaphylactic shock. *Br J Exp Pathol.* 1972;53(1):1-4.
50. Hladovec J, Rossmann P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb Res.* 1973;3(6):665-674. doi:10.1016/0049-3848(73)90014-5.
51. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost.* 2005;93(2):228-235. doi:10.1160/TH04-09-0578.
52. Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, Scarlattini M, Rossi G, van Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood.* 1991;77(4):764-769.
53. George F, Brisson C, Poncelet P, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost.* 1992;67(1):147-153.
54. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;105(1):71-77. doi:10.1172/JCI8071.
55. Boos CJ, Lane DA, Kang D, Goon PKY, Blann AD, Lip GYH. Temporal and venepuncture-related decline in circulating endothelial cell capture from mixed venous blood. *J Thromb Thrombolysis.* 2006;22(2):125-131. doi:10.1007/s11239-006-8422-z.
56. Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, et al. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus

- protocol. *J Thromb Haemost.* 2006;4(3):671-677. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01794.x.
57. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010;49(9):1618-1631. doi:10.1093/rheumatology/keq045.
 58. Goon PKY, Lip GYH, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia N Y N.* 2006;8(2):79-88. doi:10.1593/neo.05592.
 59. Oguey D, George PW, Rüegg C. Disruption of integrin-dependent adhesion and survival of endothelial cells by recombinant adenovirus expressing isolated β integrin cytoplasmic domains. *Gene Ther.* 2000;7(15):1292-1303. doi:10.1038/sj.gt.3301236.
 60. Holmen C. Circulating Inflammatory Endothelial Cells Contribute to Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Patients with Vasculitis and Kidney Involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):3110-3120. doi:10.1681/ASN.2005040347.
 61. Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta.* 2006;373(1-2):17-26. doi:10.1016/j.cca.2006.05.016.
 62. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;64B(1):1-8. doi:10.1002/cyto.b.20040.
 63. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):835-845. doi:10.1038/nrc1971.
 64. Shaffer RG, Greene S, Arshi A, et al. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70(2):56-62. doi:10.1002/cyto.b.20085.

65. Wang C, Li H, Fu P, Zhang S, Xiu R. Serum C-reactive protein and circulating endothelial cells in patients with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;32(4):287-296.
66. Strijbos MH, Rao C, Schmitz PIM, et al. Correlation between circulating endothelial cell counts and plasma thrombomodulin levels as markers for endothelial damage. *Thromb Haemost.* 2008;100(4):642-647.
67. Fabbri-Arrigoni FI, Clarke L, Wang G, et al. Levels of circulating endothelial cells and colony-forming units are influenced by age and dyslipidemia. *Pediatr Res.* 2012;72(3):299-304. doi:10.1038/pr.2012.76.
68. Obeid J, Nguyen T, Walker RG, Gillis LJ, Timmons BW. Circulating endothelial cells in children: role of fitness, activity, and adiposity. *Med Sci Sports Exerc.* 2014;46(10):1974-1980. doi:10.1249/MSS.0000000000000313.
69. Tropea MM, Harper BJA, Graninger GM, et al. Isolation of a circulating CD45-, CD34dim cell population and validation of their endothelial phenotype: *Thromb Haemost.* 2014;112(4):770-780. doi:10.1160/TH14-01-0043.
70. Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, Shaked Y, Kerbel RS. The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2009;1796(1):27-32. doi:10.1016/j.bbcan.2009.04.003.
71. Strijbos MH, Gratama JW, Kraan J, Lamers CH, Bakker M den, Sleijfer S. Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises. *Br J Cancer.* 2008;98(11):1731-1735. doi:10.1038/sj.bjc.6604383.
72. Kraan J, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Clinical value of circulating endothelial cell detection in oncology. *Drug Discov Today.* 2012;17(13-14):710-717. doi:10.1016/j.drudis.2012.01.011.
73. Kraan J, Strijbos MH, Sieuwerts AM, et al. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients: Circulating endothelial cell detection. *J Thromb Haemost.* 2012;10(5):931-939. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04681.x.

74. Danova M, Comolli G, Manzoni M, Torchio M, Mazzini G. Flow cytometric analysis of circulating endothelial cells and endothelial progenitors for clinical purposes in oncology: A critical evaluation (Review). *Mol Clin Oncol*. March 2016. doi:10.3892/mco.2016.823.
75. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet Lond Engl*. 2003;361(9353):206-210. doi:10.1016/S0140-6736(03)12269-6.
76. Strijbos MH, Kraan J, den Bakker MA, Lambrecht BN, Sleijfer S, Gratama JW. Cells meeting our immunophenotypic criteria of endothelial cells are large platelets. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72B(2):86-93. doi:10.1002/cyto.b.20156.
77. Goon PKY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GYH. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: A methodological comparison. *Thromb Haemost*. June 2006. doi:10.1160/TH06-04-0185.
78. Hulspas R, O’Gorman MRG, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76B(6):355-364. doi:10.1002/cyto.b.20485.
79. Bonello L, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease¹. *J Thromb Haemost*. 2006;4(5):979-981. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01858.x.
80. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, et al. Circulating Endothelial Cells in Patients with Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):195-200. doi:10.1164/ajrccm.163.1.9912036.
81. Clancy R, Marder G, Martin V, Belmont HM, Abramson SB, Buyon J. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: Further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis Rheum*. 2001;44(5):1203-1208. doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<1203::AID-ANR204>3.0.CO;2-C.

82. Bull TM, Golpon H, Hebbel RP, et al. Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost.* 2003;90(4):698-703. doi:10.1160/TH03-04-0251.
83. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating Activated Endothelial Cells in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med.* 1997;337(22):1584-1590. doi:10.1056/NEJM199711273372203.
84. Woywodt A. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2004;103(9):3603-3605. doi:10.1182/blood-2003-10-3479.
85. Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, et al. ELEVATED NUMBERS OF CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS: *Transplantation.* 2003;76(1):1-4. doi:10.1097/01.TP.0000074569.65127.26.
86. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood.* 2001;97(11):3658-3661.
87. Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, et al. Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood.* 2006;108(2):452-459. doi:10.1182/blood-2005-11-4570.
88. Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A, et al. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res.* 2001;61(11):4341-4344.
89. Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P. A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell.* 2005;7(1):3-4. doi:10.1016/j.ccr.2004.12.014.
90. Goodale D, Phay C, Brown W, et al. Flow cytometric assessment of monocyte activation markers and circulating endothelial cells in patients with localized or metastatic breast cancer. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009;76(2):107-117. doi:10.1002/cyto.b.20449.
91. Goon PKY, Lip GYH, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in breast cancer: relationship to endothelial

damage/dysfunction/apoptosis, clinicopathologic factors, and the Nottingham Prognostic Index. *Neoplasia N Y N*. 2009;11(8):771-779.

92. Vroiling L, Lind JSW, de Haas RR, et al. CD133+ circulating haematopoietic progenitor cells predict for response to sorafenib plus erlotinib in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2010;102(2):268-275. doi:10.1038/sj.bjc.6605477.
93. Yuan D, Zhang Q, Lv Y, et al. Predictive and prognostic significance of circulating endothelial cells in advanced non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015;36(11):9031-9037. doi:10.1007/s13277-015-3657-y.
94. Ronzoni M, Manzoni M, Mariucci S, et al. Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as predictive markers of clinical response to bevacizumab-based first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2010;21(12):2382-2389. doi:10.1093/annonc/mdq261.
95. Manzoni M, Mariucci S, Delfanti S, et al. Circulating endothelial cells and their apoptotic fraction are mutually independent predictive biomarkers in Bevacizumab-based treatment for advanced colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(7):1187-1196. doi:10.1007/s00432-012-1190-6.
96. Ramcharan KS, Lip GYH, Stonelake PS, Blann AD. Increased pre-surgical numbers of endothelial progenitor cells and circulating endothelial cells in colorectal cancer fail to predict outcome. *Int J Colorectal Dis*. 2015;30(3):315-321. doi:10.1007/s00384-014-2116-3.
97. Lin C-C, Liu C-Y, Chen M-J, et al. Profiles of circulating endothelial cells and serum cytokines during adjuvant chemoradiation in rectal cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(10):855-860. doi:10.1007/s12094-013-1004-6.
98. Starlinger P, Brugger P, Reiter C, et al. Discrimination between circulating endothelial cells and blood cell populations with overlapping phenotype reveals distinct regulation and predictive potential in cancer therapy. *Neoplasia N Y N*. 2011;13(10):980-990.
99. Yu H-K, Lee H-J, Choi H-N, et al. Characterization of CD45-/CD31+/CD105+ circulating cells in the peripheral blood of patients with gynecologic malignancies. *Clin*

Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2013;19(19):5340-5350. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3685.

100. Farace F, Gross-Goupil M, Tournay E, et al. Levels of circulating CD45(dim)CD34(+)VEGFR2(+) progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer.* 2011;104(7):1144-1150. doi:10.1038/bjc.2011.72.
101. Bhatt RS, Zurita AJ, O'Neill A, et al. Increased mobilisation of circulating endothelial progenitors in von Hippel-Lindau disease and renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2011;105(1):112-117. doi:10.1038/bjc.2011.186.
102. Blann AD, Balakrishnan B, Shantsila E, Ryan P, Lip GYH. Endothelial progenitor cells and circulating endothelial cells in early prostate cancer: a comparison with plasma vascular markers. *The Prostate.* 2011;71(10):1047-1053. doi:10.1002/pros.21319.
103. Fuereder T, Wacheck V, Strommer S, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells in Castration Resistant Prostate Cancer: A Randomized, Controlled, Biomarker Study. Perez-Gracia JL, ed. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e95310. doi:10.1371/journal.pone.0095310.
104. DuBois SG, Stempak D, Wu B, et al. Circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in patients with osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58(2):181-184. doi:10.1002/pbc.23046.
105. Cuppini L, Calleri A, Bruzzone MG, et al. Prognostic Value of CD109+ Circulating Endothelial Cells in Recurrent Glioblastomas Treated with Bevacizumab and Irinotecan. Pieper RO, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e74345. doi:10.1371/journal.pone.0074345.
106. Brunner M, Thurnher D, Heiduschka G, Grasl MC, Brostjan C, Erovic BM. Elevated levels of circulating endothelial progenitor cells in head and neck cancer patients. *J Surg Oncol.* 2008;98(7):545-550. doi:10.1002/jso.21139.
107. Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, et al. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(1):267-273. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0432.

108. Kuo Y-H, Lin C-H, Shau W-Y, et al. Dynamics of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in breast cancer patients receiving cytotoxic chemotherapy. *BMC Cancer*. 2012;12(1). doi:10.1186/1471-2407-12-620.
109. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
110. Gao D, Nolan D, McDonnell K, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2009;1796(1):33-40. doi:10.1016/j.bbcan.2009.05.001.
111. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001;7(11):1194-1201. doi:10.1038/nm1101-1194.
112. Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(4):484-492. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03486.x.
113. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:1-7. doi:10.1155/2012/143209.
114. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9(11):1370-1376. doi:10.1038/nm948.
115. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, et al. Role of β 2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*. 2005;201(1):63-72. doi:10.1084/jem.20041402.
116. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med*. 2005;11(2):206-213. doi:10.1038/nm1182.

117. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(5):733-742. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.07.003.
118. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003;108(20):2511-2516. doi:10.1161/01.CIR.0000096483.29777.50.
119. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95(4):343-353. doi:10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.
120. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92(2):362-367.
121. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5(4):434-438. doi:10.1038/7434.
122. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952-958.
123. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3422-3427. doi:10.1073/pnas.070046397.
124. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004;94(2):230-238. doi:10.1161/01.RES.0000110419.50982.1C.
125. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004;109(12):1543-1549. doi:10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57.
126. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;29(23):2851-2858. doi:10.1093/eurheartj/ehn456.

127. Jiang D-M, Han J, Zhu J-H, Fu G-S, Zhou B-Q. Paracrine Effects of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells: Cyclooxygenase-2/Prostacyclin Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension. West J, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e79215. doi:10.1371/journal.pone.0079215.
128. Lu C, Zhang J, Zhang D, Uzan G, Li M. EPCs in vascular repair: how can we clear the hurdles between bench and bedside? *Front Biosci Landmark Ed*. 2014;19:34-48.
129. Rauscher FM. Aging, Progenitor Cell Exhaustion, and Atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108(4):457-463. doi:10.1161/01.CIR.0000082924.75945.48.
130. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired Progenitor Cell Activity in Age-Related Endothelial Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9):1441-1448. doi:10.1016/j.jacc.2004.12.074.
131. Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol*. 2006;102(3):847-852. doi:10.1152/jappphysiol.01183.2006.
132. Sugihara S, Yamamoto Y, Matsuura T, et al. Age-related BM-MNC dysfunction hampers neovascularization. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(9):511-516. doi:10.1016/j.mad.2007.06.009.
133. Jie KE, Goossens MHJ, van Oostrom O, Lilien MR, Verhaar MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):345-347. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.012.
134. Zaldivar F, Eliakim A, Radom-Aizik S, Leu S-Y, Cooper DM. The Effect of Brief Exercise on Circulating CD34+ Stem Cells in Early and Late Pubertal Boys. *Pediatr Res*. 2007;61(4):491-495. doi:10.1203/pdr.0b013e3180332d36.
135. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012;110(4):624-637. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243386.
136. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother*. 1992;1(2):115-129. doi:10.1089/scd.1.1992.1.115.

137. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*. 1996;5(3):213-226. doi:10.1089/scd.1.1996.5.213.
138. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors: CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *STEM CELLS*. 2014;32(6):1380-1389. doi:10.1002/stem.1661.
139. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*. 1999;285(5433):1553-1558.
140. Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):318-332.
141. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2008;13(1):87-102. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x.
142. Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res*. 2010;79(3):200-206. doi:10.1016/j.mvr.2010.01.012.
143. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Endothelial progenitors. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;52(4):186-194. doi:10.1016/j.bcnd.2013.11.004.
144. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000;86(12):1198-1202.
145. Herbrig K. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(2):157-163. doi:10.1136/ard.2005.035378.
146. Egan CG, Caporali F, Garcia-Gonzalez E, Galeazzi M, Sorrentino V. Endothelial progenitor cells and colony-forming units in rheumatoid arthritis: association with

- clinical characteristics. *Rheumatology*. 2008;47(10):1484-1488. doi:10.1093/rheumatology/ken299.
147. Kim JH, Jung J-H, Phi JH, et al. Decreased level and defective function of circulating endothelial progenitor cells in children with moyamoya disease. *J Neurosci Res*. 2009;NA-NA. doi:10.1002/jnr.22228.
148. Bruyndonckx L, Hoymans VY, Frederix G, et al. Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Microparticles Are Independent Predictors of Endothelial Function. *J Pediatr*. 2014;165(2):300-305. doi:10.1016/j.jpeds.2014.04.015.
149. Bruyndonckx L, Hoymans VY, De Guchenaere A, et al. Diet, Exercise, and Endothelial Function in Obese Adolescents. *PEDIATRICS*. 2015;135(3):e653-e661. doi:10.1542/peds.2014-1577.
150. Hortenhuber T, Rami-Mehar B, Satler M, et al. Endothelial Progenitor Cells Are Related to Glycemic Control in Children With Type 1 Diabetes Over Time. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1647-1653. doi:10.2337/dc12-1206.
151. Rusak M, Radzikowska U, Glowinska-Olszewska B, et al. Endothelial progenitor cell levels in juvenile idiopathic arthritis patients; effects of anti-inflammatory therapies. *Pediatr Rheumatol*. 2015;13(1):6. doi:10.1186/s12969-015-0001-4.
152. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow–derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*. 2005;11(3):261-262. doi:10.1038/nm1200.
153. Naik RP, Jin D, Chuang E, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(1):133-138. doi:10.1007/s10549-007-9519-6.
154. Jain S, Ward MM, O'Loughlin J, et al. Incremental increase in VEGFR1⁺ hematopoietic progenitor cells and VEGFR2⁺ endothelial progenitor cells predicts relapse and lack of tumor response in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(1):235-242. doi:10.1007/s10549-011-1906-3.
155. Bogos K, Renyi-Vamos F, Dobos J, et al. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in

- human small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(5):1741-1746. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1372.
156. Nowak K, Rafat N, Belle S, et al. Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2010;37(4):758-763. doi:10.1016/j.ejcts.2009.10.002.
157. Morita R, Sato K, Nakano M, et al. Endothelial progenitor cells are associated with response to chemotherapy in human non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(12):1849-1857. doi:10.1007/s00432-011-1043-8.
158. Sakamori Y, Masago K, Ohmori K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells predicts response in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2012;103(6):1065-1070. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02249.x.
159. Qiu H, Cao L, Wang D, Xu H, Liang Z. High levels of circulating CD34+/VEGFR3+ lymphatic/vascular endothelial progenitor cells is correlated with lymph node metastasis in patients with epithelial ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(7):1268-1275. doi:10.1111/jog.12047.
160. Kim YB, Chung YW, Bae HS, et al. Circulating endothelial progenitor cells in gynaecological cancer. *J Int Med Res.* 2013;41(2):293-299. doi:10.1177/0300060513476999.
161. Yang B, Gu W, Peng B, et al. High level of circulating endothelial progenitor cells positively correlates with serum vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma. *J Urol.* 2012;188(6):2055-2061. doi:10.1016/j.juro.2012.08.039.
162. Corsini E, Ciusani E, Gaviani P, et al. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in treated glioma patients. *J Neurooncol.* 2012;108(1):123-129. doi:10.1007/s11060-012-0805-8.
163. Sieghart W, Fellner S, Reiberger T, et al. Differential role of circulating endothelial progenitor cells in cirrhotic patients with or without hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2009;41(12):902-906. doi:10.1016/j.dld.2009.04.013.

164. Taylor M, Rossler J, Georger B, et al. High Levels of Circulating VEGFR2+ Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Correlate with Metastatic Disease in Patients with Pediatric Solid Malignancies. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4561-4571. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2363.
165. Pradhan KR, Mund JA, Johnson C, Vik TA, Ingram DA, Case J. Polychromatic flow cytometry identifies novel subsets of circulating cells with angiogenic potential in pediatric solid tumors. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80B(5):335-338. doi:10.1002/cyto.b.20602.
166. Pradhan KR, Mund JA, Claussen HL, et al. A Pilot Study of Circulating Endothelial and Hematopoietic Progenitor Cells in Children With Sarcomas. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015;37(6):443-448. doi:10.1097/MPH.0000000000000386.
167. Shaked Y. Therapy-Induced Acute Recruitment of Circulating Endothelial Progenitor Cells to Tumors. *Science.* 2006;313(5794):1785-1787. doi:10.1126/science.1127592.
168. Kyr M, Fedora M, Elbl L, Kugan N, Michalek J. Modeling effect of the septic condition and trauma on C-reactive protein levels in children with sepsis: a retrospective study. *Crit Care.* 2007;11(3):R70. doi:10.1186/cc5955.
169. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, et al. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 2000;60(2):490-498.
170. Tomlinson J, Barsky SH, Nelson S, et al. Different patterns of angiogenesis in sarcomas and carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999;5(11):3516-3522.
171. Bertolini F, Paul S, Mancuso P, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res.* 2003;63(15):4342-4346.
172. Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state: *Crit Care Med.* 2000;28(11):3672-3678. doi:10.1097/00003246-200011000-00023.

173. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007;83(3):536-545. doi:10.1189/jlb.0607373.
174. Scheubel RJ, Zorn H, Silber R-E, et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(12):2073-2080. doi:10.1016/j.jacc.2003.07.025.

9 Seznam zkratek

7-AAD	7-aminoactinomycin D
aCEC	aktivované cirkulující endoteliální buňky
aFGF	acidický fibroblastový růstový faktor
AML	akutní myeloidní leukémie
ANG1	angiopoetin 1
ANG2	angiopoetin 2
Arg	arginin
Asp	aspartát
ATP	adenosintrifosfát
bb	buňky
bFGF	bázický fibroblastový růstový faktor
BSA	bovine serum albumin
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CEC	cirkulující endoteliální buňky
CNS	centrální nervový systém
CPC	cirkulující hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
CR	kompletní remise
CSF	faktor stimulující makrofágové kolonie
CVK	centrální venósní katetr
CXCR4	CXC receptor 4
D/A	mrtvé/apoptotické buňky
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol

DCE-MRI	dynamické zobrazování magnetickou rezonancí s T1 kontrastem (Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging)
dg	diagnóza
DIPG	difusní intrinsický pontinní gliom
Dll4	Delta-like ligand-4
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRAQ5	deep red Anthraquinone 5
DS	Downův syndrom
EC	endoteliální buňky
EC	endoteliální buňky
ECFC	cirkulující endoteliální progenitorové buňky s potenciálem tvořit kolonie
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EPC	cirkulující endoteliální progenitorové buňky
Eph 2A	efrin typ A receptor
Eph B4	efrin typ B receptor
EPO	erythropoetin
ERK	extracelulární signál regulující kináza ERK kinase)
F	žena
FCM	flowcytometrie
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FGFR	receptor pro fibroblastový růstový faktor

Flk1	fetal liver kinase 1
Flt	tyrozinkináza podobná fMS
FN	fakultní nemocnice
FS	forward scatter
G-CSF	faktor stimulující granulocytární kolonie (granulocyte colony-stimulating factor)
GLUT1	glukozový transportér 1
Gly	glycin
GM-CSF	faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie
HCC	hepatocelulární karcinom
HG	high grade
HGF	růstový faktor hepatocytů
HIF1 α	hypoxií indukovaný faktor α (hypoxia inducible factor α)
HRE	hypoxia response element
HSC	cirkulující hematopoetické buňky
HUVEC	endoteliální buňky z lidské umbilikální žíly
CHSPC	hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
CHT	chemoterapie
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula
IFN- α	interferon α
IL8	interleukin 8
KDR	kinase-insert domain-containing receptor
LDH-A	laktát dehydrogenáza A

LG	low grade
lokaliz	lokalizované onemocnění
LPS	lipopolysacharid bakteriální stěny
M	muž
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen activated protein kinases)
mCEC	zralé cirkulující endoteliální buňky
mCRC	metastatický kolorektální karcinom
MDS	myelodysplastický syndrom
MEK	mitogenem aktivovaná proteinkináza ERK kináza (mitogen-activated protein kinase)
MkitL	na membránu vázaný Kit ligand
MMP	matrix metaloproteináza
MTD	maximálně tolerované dávky
mTOR	savčí rapamycinový cílený receptor (mammalian target of rapamycin)
mts	metastatická choroba
MVD	mikrovaskulární hustota
NHL	Non-Hodgkinův lymfom
nCHSPC	nonangiogenní hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
OBN	kostní obrovskobuněčný nádor
PAI-1	plasminogen-aktivator inhibitor

PD	progrese onemocnění
PDGF	růstový faktor z trombocytů (platelet derived growth factor)
PDGFR	receptor pro růstový faktor z trombocytů
PDK1	pyruvátdehydrogenáza kináza 1
pCHSPC	proangiogenní hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
PI3K	fosfatidyl inositol-3-kináza
PIGF	placentou indukovaný růstový faktor (placenta induced growth factor)
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PR	parciální remise
RCC	renální karcinom
RGD	arginin (R) – glycin (G) – aspartát (D)
SCLC	malobuněčný karcinom plic
SD	směrodatná odchylka
SD	stabilní onemocnění
SDF-1	faktor derivovaný ze stromálních buněk (stromal-derived factor 1)
SEGA	subependymální obrovskobuněčný astrocytom
SkitL	solubilní forma Kit ligandu
SS	side scatter
TAF	tumor angiogenesis factor
TGF β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
TKI	inhibitor tyrosinkinázy
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)

tPA	tkáňový aktivátor plasminogenu
TSP	trombospondin
UEA-1	Ulex Europaeus Lectin-1
VCAM-1	vaskulární adhezivní molekula
VDA	vascular disrupting agents
VE cadherin	vaskulární endoteliální cadherin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
VHL	Von Hippel Lindau
vWf	von Willebrandův faktor
WBC	bílé krvinky

10 Seznam obrázků

Obr. 1 – Proces fyziologické angiogeneze.	15
Obr. 2 – Proces angiogeneze intususcepceí.	27
Obr. 3 - Expresse antigenů na jednotlivých buňkách.....	36
Obr. 4 - Distribuce vybraných antigenů exprimovaných na CEC.....	37
Obr. 5 - Mechanismus mobilizace EPC z kostní dřeně.....	44
Obr. 6 - Stanovení prvního gatu.	55
Obr. 7 - Gate K (počet kuliček – flow count).....	55
Obr. 8 - Nastavení gatu D na buňky CD31 ⁺	55
Obr. 9 - Scattegramy se znakem CD31.	56
Obr. 10 - Rozložení diagnóz v analyzovaném souboru.....	62
Obr. 11 - Rozložení diagnostických skupin v analyzovaném souboru.....	63
Obr. 12 A, B, C - Hodnoty EPC, aCEC a mCEC u jednotlivých diagnostických skupin.....	65
Obr. 13 A, B, C - Hodnoty EPC, aCEC a mCEC u jednotlivých diagnostických skupin při druhém odběru.....	68
Obr. 14 A, B, C - Hodnoty EPC, aCEC a mCEC při prvním a druhém odběru bez ohledu na diagnózu	69
Obr. 15 - Dynamika mCEC v korelaci s rozsahem onemocnění.....	71
Obr. 16 - Dynamika EPC v korelaci s rozsahem onemocnění.	71
Obr. 17 - Dynamika EPC v korelaci s léčbou	72
Obr. 18 - Dynamika a CECv korelaci s odpovědí na léčbu.....	73
Obr. 19 - Dynamika CEC v průběhu konvenční chemoterapie.	75
Obr. 20 - Dynamika EPC v průběhu konvenční chemoterapie	76
Obr. 21 A, B - Dynamika CEC D/A a EPCD/A v průběhu konvenční chemoterapie	76
Obr. 22 A, B - Dynamika CEC a EPC v průběhu metronomické a jiné antiangiogenní léčby.....	77
Obr. 23 A, B - Dynamika CEC v průběhu febrilní neutropenie.....	78
Obr. 24 A, B - Dynamika CEC D/A a EPC D/A v průběhu febrilní neutropenie.....	79
Obr. 25 A, B - Dynamika CEC v pooperačním období.....	80
Obr. 26 A, B - Dynamika CEC a EPC v průběhu podávání Neupogenu	81
Obr. 27 A, B - Dynamika CEC D/A a EPC D/A v průběhu podávání Neupogenu.....	82

11 Seznam tabulek

Tab. 1 - Přehled vybraných studií, jež se zabývají množstvím CEC u onkologických pacientů	39
Tab. 2 - Přehled klinických korelací z vybraných studií zabývajících se množstvím CEC u onkologických pacientů	41
Tab. 3 - Přehled vybraných studií zabývajících se množstvím EPC u onkologických nemocných.....	47
Tab. 4 - Přehled klinických korelací z vybraných studií zabývajících se množstvím EPC u onkologických pacientů.....	48
Tab. 5 - Směs protilátek v jednotlivých zkumavkách pro analýzu flowcytometrem.	54
Tab. 6 - Směs protilátek v jednotlivých zkumavkách pro analýzu flowcytometrem.	56
Tab. 7 - Přehled bloků konvenční chemoterapie použitých k analýze	58
Tab. 8 - Popisní statistika souboru dle diagnóz	61
Tab. 9 - Diagnostické skupiny.....	62
Tab. 10 - Přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPC v jednotlivých diagnostických skupinách.....	63
Tab. 11 - Souhrnný přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPCu všech pacientů	64
Tab. 12 - Popisní statistika souboru dle diagnóz při druhém odběru.	66
Tab. 13 - Přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPC v jednotlivých diagnostických skupinách při druhém odběru	67
Tab. 14 - Souhrnný přehled výsledků CEC (zralých a aktivovaných) a EPCu všech pacientů v průběhu léčby	67
Tab. 15 - Popisní statistika souboru dle diagnóz k analýze rozsahu onemocnění, léčby a odpovědi na léčbu.....	70
Tab. 16 - Popisní statistika souboru pacientů s konvenční chemoterapií.....	73
Tab. 17 - Popisní statistika souboru pacientů s metronomickou a jinou antiangiogenní léčbou	74

12 Seznam odborných publikací autora

1. **Zapletalova D**, André N, Deak L, et al. Metronomic Chemotherapy with the COMBAT Regimen in Advanced Pediatric Malignancies: A Multicenter Experience. *Oncology*. 2012;82(5):249-260. doi:10.1159/000336483.
Časopis s IF (2012) 2.165 / 61citací
2. Sterba J, Pavelka Z, Andre N, **Bronisova D**, et al. Second complete remission of relapsed medulloblastoma induced by metronomic chemotherapy. *Pediatric Blood & Cancer*. 2009; 54(4):616-7. doi:10.1002/pbc.22382.
Časopis s IF (2009) 2.134
3. Zambo I, Hermanova M, **Zapletalova D**, et al. Expression of nestin, CD133 and ABCG2 in relation to the clinical outcome in pediatric sarcomas. *Cancer Biomarkers*. 2016;17(1):107-116. doi:10.3233/CBM-160623.
Časopis s IF (2016) 2.274
4. **Bronisova D**, Mudry P, Sterba Ph.D J, et al. Metronomická léčba v onkologii jako nová léčebná metoda. *Onkologie*. 2009;3(4):227-229.
5. Mudry P, Kutnikova L, **Zapletalova D**. Pokroky ve farmakoterapii kostních sarkomu. *Onkologie*. 2012;6(4):205-208.

Kapitoly v odborných knihách:

1. **Zapletalová D. Hyperleukocytóza a hyperviskózní syndrom.** In: Bajčiová V et al, *Náhlé příhody v dětské onkologii*. Praha, Czechia: Mladá fronta; 2013: 110-115.
2. **Zapletalová D. Akutní pankreatitida.** In: Bajčiová V et al, *Náhlé příhody v dětské onkologii*. Praha, Czechia: Mladá fronta; 2013: 180-183.
3. **Domanský J, Bernatíková H, Zapletalová D. ALL u 20letého chlapce.** In: Bajčiová V. *Vybrané kazuistiky nádorů u adolescentů a mladých dospělých..* Praha, Czechia: Mladá fronta; 2012: 29-33.

4. **Bernatíková H, Zapletalová D, Mendelová D. AML u 15letého chlapce.** In: Bajčiová V. *Vybrané kazuistiky nádorů u adolescentů a mladých dospělých..* Praha, Czechia: Mladá fronta; 2012: 34-42.

Vybrané přednášky a postery:

1. **Circulating endothelial cells and blood-marrow-derived endothelial precursor cells in pediatric oncologic patients at the time of diagnosis and after neoadjuvant chemotherapy - preliminary data.** Přednáška. 2nd International Workshop on Metronomic and Anti-Angiogenic Chemotherapy in Paediatric Oncology, 18.-19.3.2010, Marseille, France

2. **Maintenance therapy in pediatric NHL and ALL – metronomic model?** Přednáška. I-BFM Annual Meeting, 2010, TR-Antalya (Yüksel-Soycan), Turkey.

3. **Monitorace hladin CEC a CEP pomocí flowcytometru u dětských onkologických pacientů - pilotní studie srovnávající konvenční chemoterapii s metronomickou léčbou.** Poster. XXII. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky. 2011. Bratislava, SR.

4. **Cirkulujúce endoteliálne buňky a progenitorové endoteliálne buňky u detských pacientov s nádorovým ochorením v dobe diagnózy a po neoadjuvantnej chemoterapii – predbežné data.** Přednáška. XIX. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky. 2009. Košice, SR.

5. **Léčba osteosarkomů u dětí a adolescentů.** Přednáška. Edukační Sborník XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky: 21.-23. dubna 2011, Brno: Masarykův onkologický ústav; 2011.

6. **Antiangiogenní a biodiferenciační terapie COMBAT u dětí s refrakterními či recidivujícími non-CNS solidními tumory.** Přednáška. Edukační sborník: XXXIII. Brněnské onkologické dny a XXIII. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky: 16.-18. dubna 2009, Brno: Masarykův onkologický ústav; 2009.

7. **Metronomická léčba v dětské onkologii jako nova léčebná metoda.** Přednáška. IX. Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Olomouc, 19.–22. 5. 2010. Česko-Slovenská Pediatrie, 65, 2010, 5.

8. **Germinal mutation of PDGFRalpha in patient with tuberous sclerosis complex.** Poster. Coalition Against Childhood Cancer Research Conference, 2016, Cold Spring, USA.
9. **Girl with parosteal osteosarcoma. Přednáška.** 3rd SIOP Masterclass in Paediatric Oncology, 12.-18.6. 2010, Castel Gandolfo, Itálie.
10. **Circulating endothelial cells and blood-marrow-derived endothelial precursor cells in paediatric patients with sarcoma at the time of diagnosis and after neoadjuvant chemotherapy - preliminary data.** Přednáška. Paediatric, Teenage and Young Adults with Sarcomas. 23.-24.4. 2009, Barcelona, Spain
11. **Children with secondary/tertiary therapy-related AML/ALL – description of 7 cases reports.** Přednáška. 3rd Midsummer Meeting on Paediatric Haematology and Oncology. 10.-12.6.2011, Liberec, Czechia

13 Souhrn poznatků

V naší studii jsme u pacientů neprokázali signifikantní rozdíl v hodnotách CEC a EPC s ohledem na typ malignity, ani ve srovnání s pacienty s benigním nádorem nebo neonkologickým onemocněním. Hodnoty sledovaných parametrů nekorelovaly s rozsahem onemocnění ani s použitou modalitou. Pacienti s objemovou redukcí tumoru v průběhu léčby měli iniciálně signifikantně nižší hodnoty aCEC ve srovnání s pacienty, u kterých došlo pouze ke stabilizaci choroby nebo, kteří progredovali na léčbě, což by bylo potenciálně využitelné jako časný prediktor odpovědi. V průběhu konvenční chemoterapie došlo iniciálně k signifikantnímu vzestupu CEC i EPC, což by zejména u EPC mohlo poukazovat na paradoxní efekt chemoterapie založené na MTD - vyplavením EPC z kostní dřeně by mohlo dojít k podpoře vaskulogeneze v tumoru. Na rozdíl od konvenční chemoterapie nebyl pozorován výraznější trend v dynamice EPC a CEC u pacientů léčených metronomickou/antiangiogenní léčbou. Výsledky naší práce tak nepodporují použití CEC a EPC jako markerů angiogeneze pro rutinní klinické použití. Nejzásadnějším problémem zůstává nejasná imunofenotypická definice těchto buněk a neexistující standardizovaný protokol pro flowcytometrii. Spíše než jako markery pro monitorování antiangiogenní léčby by CEC a EPC mohly přispět k objasnění patogeneze komplikovaného a komplexního procesu nádorové angiogeneze.

Publikace:

Zapletalova D, André N, Deak L, et al. Metronomic Chemotherapy with the COMBAT Regimen in Advanced Pediatric Malignancies: A Multicenter Experience. *Oncology*. 2012;82(5):249-260. doi:10.1159/000336483.

Časopis s IF (2012) 2.165 / 61citací

.....
Jméno a podpis studenta

.....
Jméno a podpis školitele