

Vaskulární endoteliální faktor D potenciální prediktor a screeningový marker karcinomu ovaria

Vascular endothelial growth factor D potential predictor and screening marker in ovarian carcinoma

M. Náležinská, J. Chovanec

Oddělení gynekologické onkologie, Klinika operační onkologie, MOÚ, Brno
Lékařská fakulta, MU, Brno

Souhrn: Úvod: Dosud stále platí, že pozdní záchyt onemocnění karcinomem vaječníku je zásadní příčina jeho špatné prognózy. Zatím nebyl identifikován žádný dostatečně senzitivní a zároveň specifický marker ani kombinace markerů a zobrazovacích metod, které by jednoznačně umožňovaly záchyt časných, potenciálně dobře kurabilních stadií a dále prebiopticky diferencovaly skupinu ultrazvukově špatně odlišitelných benigní lézí od maligních tumorů. V designu retrospektivní studie byly zkoumány hladiny sérového vaskulárního endoteliálního faktoru D (VEGF-D). VEGF-D má vztah k nádorem indukované angiogenezi, lymfangiogenezi a remodelaci cév s efektem facilitace metastazování a zlepšené distribuce kyslíku a živin pro nádorovou tkáň. Na druhou stranu lymfatická síť slouží jako bariéra proti nádorové diseminaci a je to transportní systém pro imunitně činné elementy v potlačování nádorového bujení. Cílem studie bylo prověřit, zda existuje rozdíl v hladinách sérového VEGF-D ve skupině pacientek s maligními tumory, s benigními lézemi vaječníku a u zdravých kontrol bez patologického nálezu na adnexech.

Metody: Retrospektivně bylo zhodnoceno 162 sér odebraných předoperačně a uchovaných procesem mrazení v biobance v letech 2022–2023. Testovaný soubor byl stratifikován na základě histopatologického výsledku vyšetření adnex na skupinu maligních tumorů ($n = 54$), skupinu benigních lézí ($n = 47$) a skupinu zdravých kontrol ($n = 61$). Ke statistickému vyhodnocení parametrů byly použity metody deskriptivní statistické analýzy. Pro porovnání sérových hladin VEGF-D byly použity neparametrické testy. Všechny analýzy byly uvažovány na hladině významnosti 5 %. Sérový VEGF-D byl analyzován metodou ELISA Quantikine® Human VEGF D R&D Systems a hodnoty byly odečteny spektrofotometricky na readeru TECAN. **Výsledky:** Výsledek srovnání deskriptivních statistických parametrů je ve vyšetřovaném souboru statisticky významný ($p = 0,00067$) pro rozdíl mezi hodnotami sérového VEGF-D v souboru benigních lézí a maligních tumorů. Dále existuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami pacientek s maligními tumory a mezi zdravými kontrolami ($p = 0,0008$). Mezi hodnotami u pacientek s benigními lézemi a u zdravých kontrol nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p = 0,4308$). Ve srovnání s konvenčním markerem CA125 korelovala patologicky zvýšená hladina sérového CA125 s nízkou hodnotou sérového VEGF-D u pacientek s maligními tumory. Stejná shoda panovala ve srovnání s markerem HE4: vysoké sérové hladiny HE4 byly ve skupině pacientek s maligním tumorem doprovázeny nízkou hladinou VEGF-D, navíc v bodovém grafickém zobrazení se jasně stratifikovala skupina pacientek s maligními tumory od skupiny benigních lézí a zdravých kontrol. **Závěr:** S ohledem na získané výsledky má vyšetřování sérové hladiny VEGF-D potenciál diagnostického testu s přínosem ke stratifikaci obtížně prebiopticky diferencovatelných adnextumorů.

Klíčová slova: gynekologická onkologie – ovariální karcinom – lymfangiogeneze – VEGF-D

Úvod

Důvodem k evaluaci screeningového potenciálu vaskulárního endoteliálního faktoru D (VEGF-D) je přetrvávající absence metody nebo jejich kombinace zachycující karcinom vaječníku v časném, potenciálně dobře kurabilním

stadiu. Stále platí, že pozdní záchyt onemocnění karcinomem vaječníku je zásadní příčina jeho špatné prognózy. Pětileté přežití ve skupině pokročilých onemocnění nepřesahuje 30 % oproti více než 90% přežití ve skupině časných fází onemocnění. Dosud neexistuje

populační screeningová metoda. První hypotéza, kterou jsme postulovali, je, že sérová hodnota VEGF-D bude využitelná pro screeningové účely. Druhou hypotézou a cílem výzkumné práce je ověření přínosu hodnoty sérové hladiny VEGF-D v prebioptickém diagnostickém

Summary: Introduction: Until now, it is still true that late detection of ovarian cancer is a major cause of its poor prognosis. So far, no sufficiently sensitive and specific marker or combination of markers and imaging methods has been identified that would unambiguously allow the detection of early potentially highly-curable stages and furthermore prebiologically differentiate a group of poorly distinguishable benign lesions from malignant tumours on ultrasound. In a retrospective study design, serum levels of vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) were investigated. VEGF-D is related to tumour-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, and vascular remodelling with the effect of facilitating metastasis and improved oxygen and nutrient distribution into tumour tissue. On the other hand, the lymphatic network serves as a barrier against tumour dissemination and is a transport system for immune-active elements in suppressing tumorigenesis. The aim of this study was to investigate that there is a difference in serum VEGF-D levels in a group of patients with malignant tumours, benign ovarian lesions, and healthy controls without pathological findings in the adnexa. **Methods:** 162 sera collected preoperatively and preserved by a freezing process in a bio-bank in 2022–2023 were retrospectively evaluated. The test set was stratified on the basis of histopathological results of the adnexal examination into the malignant tumour group (N = 54), benign lesion group (N = 47), and healthy control group (N = 61). Descriptive statistical analysis methods were used for the statistical evaluation of the parameters. Nonparametric tests were used to compare serum VEGF-D levels. All analyses were considered at a significance level of 5%. Serum VEGF-D was analysed by ELISA Quantikine® Human VEGF D R&D Systems and values were read spectrophotometrically on a TECAN reader. **Results:** The result of the comparison of descriptive statistical parameters was statistically significant (P = 0.00067) for the difference between serum VEGF-D levels in the set of benign lesions and malignant tumours. Furthermore, there was a statistically significant difference between the values of patients with malignant tumours and healthy controls (P = 0.0008). No statistically significant difference was found between the values of patients with benign lesions and healthy controls (P = 0.4308). Compared to the conventional marker CA125, pathologically elevated serum CA125 levels correlated with low serum VEGF-D levels in patients with malignant tumours. The same concordance was observed in comparison with the HE4 marker: high serum HE4 levels were accompanied by low VEGF-D levels in the group of patients with malignant tumours; moreover, the dot plot clearly stratified the group of patients with malignant tumours from the group of benign lesions and healthy controls. **Conclusion:** In view of the results obtained, the investigation of serum VEGF-D levels has the potential of a diagnostic test with a contribution to the stratification of the difficult of prebiologically differentiating adnexal tumours.

Key words: gynaecologic oncology – ovarian carcinoma – lymphangiogenesis – VEGF-D

protokolu adnextumorů. Zejména nás zajímal přínos v řešení ultrazvukově obtížně diferencovatelné skupiny adnextumorů, jako jsou ovariální fibromy, thékomy, některé borderline tumory či kystomy u mladých pacientek plánujících těhotenství, kde je snaha minimalizovat zbytečné operační vstupy. Diagnóza adnextumorů se stanovuje histologicky z celého bezpečně odstraněného tumoru. Biopsie z tumorů, které jsou lokalizovány pouze v oblasti adnex, bez šíření na okolní orgány a peritoneum, se nedoporučuje pro riziko upstagingu. Naopak pokročilá stadia s metastatickými procesy na peritoneu či v omentu jsou indikována k biopsii buď metodami intervenční radiologie, nebo v rámci diagnostické laparoskopie před zahájením neoadjuvantní systémové léčby.

Termín karcinom vaječnicku v současné době zahrnuje široké spektrum histopatologických entit, které mají původ v maligních kmenových buňkách pocházejících z mülleríanského traktu. Patří sem karcinom vaječnicku, vejcovodu

a karcinomy primárně diagnostikované na pobřišnici – primární peritoneální karcinom. Karcinom vaječnicku nepatří mezi časté nádory a jeho celoživotní riziko v geneticky nezátížené populaci se pohybuje kolem 2 % [1]. Incidence za rok 2021 byla v ČR 17,36 nových případů na 100 000 žen, což odpovídá v absolutních číslech 925 nových pacientek za rok. Mortalita se pohybuje kolem 700 případů za rok (11,6/100 000/rok) [2]. Z dat Národního onkologického registru (NOR) je zřejmé, že oba parametry incidence a mortalita mají mírně klesající trend, nicméně tento fakt je obtížné interpretovat [2].

Pro karcinom vaječnicku neexistuje populační screeningová metoda, a to ani v rámci rizikových skupin. Požadavky na populační test jsou vysoké: co nejvyšší senzitivita (minimálně 75 %) a specifita (99,6 %) [3,4]. V průběhu minulých let bylo organizováno několik klinických studií prověřujících kombinace vaginálního ultrazvuku a panelu sérových nádorových markerů, avšak bez úspěchu na vyšší podíl záchytu časných fází

onemocnění s lepší nadějí na úplné vyléčení. Nejstarší studií byla americká PLCO (Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial), která zkoumala účinnost screeningových programů na vyjmenované typy karcinomů [3,5]. Další studií byla UKTOCS (UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening), využívala kombinaci zobrazovací metody (vaginálního ultrazvuku) a panelu sérových markerů. I když multimodální screening vedl k dřívější detekci karcinomu vaječnicku, vliv na snížení úmrtnosti nebyl prokázán [6,7]. UKFOCSS (UK Familial Ovarian Cancer Screening Study) se zaměřila na ženy s vysokým rizikem rakoviny vaječnicku v důsledku rodinné anamnézy nebo genetické predispozice (nosičství BRCA1, BRCA2 mutace a Lynchova syndromu), tedy screening omezený na rizikovou skupinu pacientek. Nábor probíhal mezi lety 2007 a 2012. Vyšetřování probíhalo formou tzv. ROCA modelu (risk of ovarian cancer algorithm), kdy ženy absolvovaly à 4 měsíce odběr na stanovení sérové hodnoty markeru CA125 a jednou ročně

vaginální ultrazvuk. V průběhu studie byla každá pacientka sledovaná 4,5 roku. Ani v tomto uspořádání nebyly získány výsledky směřem ke snížení úmrtnost. Avšak určitá schopnost včasné detekce lokalizovaného karcinomu vaječníku s indikací radikální operace a dobrým výhledem na úplné uzdravení takové pacientky prokázána byla. Algoritmus ROCA dle výsledků této studie představuje alternativu pro ženy ze skupiny nosiček hereditárních syndromů, pokud odmítají radikální risk redukující salpingooforektomii (preventivní chirurgická resekce obou vaječníků a vejcovodů) [8].

V současné době se uznává tzv. duální model patogeneze karcinomu ovaria [9], který stratifikuje ovariální karcinomy do dvou hlavních typů na základě tkáně původu, histologických charakteristik, typu prekurzorové léze, molekulárních změn a hereditárních genetických predispozic. Celkem je rozřazeno pět subtypů, i když s ohledem na soudobé poznatky z mutační analýzy i dualistický koncept je model zpochybňován. Poslední klasifikace dle Světové zdravotnické organizace (WHO) karcinomů ženského genitálního traktu z roku 2020 nepoužívá typ I a typ II, ale pět hlavních typů ovariálních karcinomů:

- high-grade serózní karcinom (HGSC, 70 %);
- endometrioidní karcinom (EC, 10 %);
- světlobuněčný karcinom neboli clear cell karcinom (6–10 %);
- low-grade serózní karcinom (LGSC, 5 %);
- mucinózní karcinom (MC, 3–4 %).

I tyto skupiny ale do budoucna mohou být rozštěpeny v souvislosti s očekávanými poznatky na základě molekulárních studií [9–12].

Histologicky nejčastějším typem jsou high-grade serózní karcinomy (HGSC) s vysokou proliferací nádorových buněk. Obecně se jedná o karcinomy chemosenzitivní. Často dojde i k remisi navozené chemoterapií, avšak pravidelně dochází k relapsu a progresi

onemocnění, která je pak obtížně léčitelná. Z molekulárně biologického hlediska jde převážně o nádory s chromozomální nestabilitou, která je doprovázena inaktivací tumor supresorového genu *TP53*. Celkově jde o nádory se špatnou prognózou, které jsou zodpovědné za většinu úmrtí na ovariální karcinom [9,10].

Dosud rozpoznané prekurzorové léze pro HGSC jsou STIC (Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma) a SCOUT (Secretory Cell Outgrowth). SCOUT je termín pro drobné proliferace sekretorických buněk a pravděpodobně představuje rané stadium v kaskádě, která vede k tvorbě STIC a HGSC. STIC je považován za hlavní prekurzorovou lézi pro HGSC, nachází se ve fimbriální části sliznice vejcovodu a často vykazuje mutace v *TP53* ještě před vznikem HGSC. Epitel vejcovodu je místem vzniku mnoha HGSC [9,13]. Předpokládá se, že léze STIC po deskvamaci může vycestovat z fimbriálního konce vejcovodu a implantovat na pánevní peritoneum, ovarium, viscerální peritoneum kteréhokoliv nitrobřišního orgánu. Jednou z popsaných minimálně invazivních cest, jak zachytit deskvamované buňky z prekurzorové léze STIC ve vejcovodu, jsou výplachy dělohy a vejcovodů s následnou analýzou získané tekutiny – IUL (intrauterinní laváž). Studijní skupina prof. Speisera vyvinula a patentovala speciální trojcestný katétr (tzv. Speiser Catheter Ovartec GmbH, Illingen, Německo) k výplachu dutiny děložní a proximální části vejcovodu v ambulantním designu, za sterilních podmínek a v lokální anestezii. Proces si lze přestavit podobně jako zavádění intrauterinního tělíska. Dosud neznáme publikační výstupy ze studie prof. Speisera [14,15].

V diagnostickém protokolu se zásadně využívají tumor markery. Sérové tumor markery jsou snadno dostupné, vyšetření je obvykle ekonomicky málo nákladné, s minimální invazivitou pro pacientku. Přesto se na tomto poli mnoho podstatných změn využitelných populačně od dob zavedení markeru

CA125 v roce 1988 neudálo. Přes svou nízkou specifitu zůstává sérová hladina CA125 zlatým standardem v klinických diagnostických protokolech. Ke zvýšení specifity vyšetření existují různé multivariantní panely, které k CA125 doplňují další markery, např. index ROMA, OVA1 nebo RMI. Mnoho klinických studií se zabývalo i ostatními potenciálně využitelnými tumor markery: např. cirkulující miRNA, test metylace, cirkulující nádorová DNA (ctDNA), protilátky proti nádorovým antigenům (AABs) [4]. K identifikaci jednoznačného markeru ani panelu markerů s přesahem směrem k časně detekci ovariálního karcinomu a k prodloužení celkového přežití tak zatím nedošlo [4].

CA125 je membránově asociovaný glykoprotein exprimovaný všemi tkáněmi původně z Müllerových ductů. Embryogeneticky se jedná o diferenciací antigen celomového epitelu a bronchiálního epitelu. S tím souvisí i omezená orgánová specifita. Cut-off pro fyziologickou sérovou hladinu je dohodou stanoveno obvykle na 35 kU/l. Rosen et al. prokázali, že pouze 79 % serózních karcinomů ovaria elevuje nad normu sérovou hladinu, u ostatních 21 % je sérová hladina v normě. V časných stádiích onemocnění má pouze 50 % karcinomů ovaria elevovanou hladinu nad normu. Z epitelových karcinomů ovaria nejvíce zvyšují sérovou hladinu CA125 serózní adenokarcinomy, nejméně světlobuněčné, mucinózní a endometrioidní [16–18]. Specifita je nízká, více než 60 % pacientek s elevovanou hodnotou CA125 netrpí karcinomem ovaria. Elevace CA125 byla zjištěna v průběhu menstruačního cyklu, v těhotenství, u benigních tumorů ovaria (zejména fibromy a fibrothékomy), při pánevní zánětlivé nemoci, při divertikulitidě, při endometrióze, adenomyóze, při jiných maligních onemocněních, jako je karcinom prsu, pankreatu, plic, kolorekta, jater, dělohy a žaludku [4,17,19]. ROCA (Risk of Ovarian Cancer) je analýza, která hodnotí trend sérové hladiny

markeru CA125, tzn. nehodnotí jednotlivé měření, ale dynamiku hodnot v čase.

HE4 byl poprvé identifikován v epitelu distální epididymis v 90. letech 20. století výzkumnou skupinou Pacific Northwestern Research Institute v Seattlu, kteří předpokládali, že se jedná o specifický epididymální tkáňový marker protein, který se účastní procesu maturace spermií [20]. HE4 protein se fyziologicky nevyskytuje ve tkáních ovaria, je over-exprimován ve tkáních karcinomu ovaria, odkud je secernován do extracelulárního prostředí a do krevního řečiště [21]. Souvislost HE4 s karcinomem ovaria byla poprvé publikována Hellstromem et al. v roce 2003 [22].

Z provedených výzkumů víme, že má vysokou specifitu 96 %, avšak nízkou senzitivitu 67 %. Má vyšší senzitivitu pro časná stadia ovariálního karcinomu. Nebývá elevovaný u fyziologického menstruačního cyklu, gravidity či benigních stavů, jako jsou myomatóza a benigní adnextumory [23]. Avšak není specifický pouze pro ovariální karcinom, k jeho elevaci dochází i u karcinomu endometria, plic, prsu a u mezoteliomu. Hladiny HE4 je nutno korelovat v souvislosti s věkem a menopauzálním stavem. S věkem dochází ke zvyšování sérové hladiny HE4. Rovněž je nutno zohledňovat úroveň renálních funkcí a anamnestické informace o užívání hormonální antikoncepce a o kouření. Pro pacientky se sníženou hodnotou glomerulární filtrace se doporučuje korelovat hladinu HE4 na tuto úroveň jako tzv. HE4ren marker. V souvislosti se všemi uvedenými faktory senzitivita i specifita vyšetření HE4 klesá [24]. HE4 má ale i jiné souvislosti než diagnostické a prognostické. Z dalších výzkumů se nyní ukazuje, že HE4 se svou podstatou chová jako antiproteáza a má důležitou roli v procesech karcinogeneze, v metastazování, v angiogenezi a v modelaci imunitních odpovědí v nádoru asociovaném mikroprostředí [24–28]. Zajímavý je vztah HE4 a rodiny VEGF, kterým se zabývá James et al. Z jejich výzkumů bylo

postulováno, že sérová hladina HE4 koreluje s úrovní mikrovaskulární density [28]. Dále HE4 suprimuje cytotoxické funkce mononukleárů i tumor infiltrujících lymfocytů a celkově působí zásadní pokles imunokompetence v nádorovém mikroprostředí. HE4 není pouhým markerem, ale silným promotorem, který vede ke vzniku agresivních charakteristik ovariálního karcinomu. Níže ve výsledcích našeho výzkumu uvádíme zajímavou shodu mezi hodnotami sérového HE4 a sérového VEGF-D u ovariálního karcinomu oproti rameni pacientek s benigním adnextumorem a oproti zdravým kontrolám.

Takzvaný ROMA index byl představen výzkumným týmem Moore et al. a byl schválen k užívání v diagnostice ovariálního karcinomu v 2010, neboť má větší diagnostickou sílu než užití samotných tumorových markerů CA125 a HE4. Index ROMA je diagnostický nástroj používaný k odhadu rizika malignity ovariálních nádorů. Tento algoritmus je založen na kombinaci dvou sérových markerů a menopauzálního statusu pacientky. Výsledkem je procentuální hodnota, která představuje riziko malignity. Vyšší hodnota ukazuje na větší pravděpodobnost, že nádor je zhoubný [29]. Metaanalýza 5 954 případů retrospektivně hodnocených ukázala 90% senzitivitu a 91% specifitu. Dále bylo zjištěno, že diagnostická přesnost u časných stadií ovariálního karcinomu dosahuje 83 % a senzitivita je vyšší u postmenopauzálních pacientek [29,30]. Nicméně jiné studie zase tuto efektivitu ROMA zpochybnilly [31].

Dosud nebyl nalezen marker nebo jejich panel, který by překonal dosud zlatý standard – sérovou hladinu CA125, který je zatím nejvíce klinicky využíván i přes svou malou specifitu a nízkou senzitivitu v časných stadiích [32–42].

Vaskulární endoteliální faktory – regulace angiogeneze a lymfangiogeneze

Nádorová indukce angiogeneze je jedním ze získaných znaků definujících

maligní tumor (spolu s poškozenou regulací buněčného cyklu, deregulací apoptózy, schopností pronikat přes bazální membránu) a je původním konceptem Judah Folkmana rozvíjeným od 70. let 20. století [43]. V nádorech je regulace angiogeneze patologicky změněna přepnutím na angiogenní fenotyp – angiogenní switch, ke kterému dochází v raných fázích karcinogeneze. Dochází k němu skokově při vychýlení rovnováhy proangiogenních a antiangiogenních faktorů [44]. Impulzy pro výdej proangiogenních faktorů jsou jednak epigenetické, jednak genetické. Z epigenetických je nejdůležitější hypoxie. Regulace výdeje vaskulárních endoteliálních faktorů v závislosti na tenzi kyslíku se účastní tumor supresorový gen *VHL* (von Hippel-Lindau), který za normoxie potlačuje výdej VEGF degradací transkripčního faktoru HIF-1 α (hypoxií indukovaný faktor 1 α). Angiogenní přepnutí je facilitováno expresí onkogenů v nádorových buňkách. Mezi genetické faktory patří např. aktivované onkogeny nebo mutace p53 [43,45].

Potlačování nádorem indukované angiogeneze je v současné době jedním z pilířů moderní cílené onkologické léčby (monoklonální protilátky proti angiogenním faktorům, kompetitivní inhibice receptorů, inhibitory signálních drah).

Ovariální karcinom je metabolicky náročné onemocnění, právě novotvorba cév je odpovědí na zvýšenou poptávku po kyslíku a živinách. Za angiogenezi včetně lymfangiogeneze je zodpovědná rodina vaskulárních endoteliálních faktorů (VEGF). Jedná se o faktory odvozené od krevních destiček (PDGF – platelet derived growth factors), což je jejich původní název. Rodina VEGF zahrnuje: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF (placental growth factor – placentární růstový faktor). Stimulují proliferaci, migraci a přežití aktivovaných endotelových buněk. Za fyziologických okolností jsou esenciální v době embryogeneze. VEGF jsou za fyziologických

podmínek produkovány zejména fibroblasty, za patologických podmínek také nádorovými buňkami. Angiogeneze v organismu dospělé ženy se odehrává pouze v místě hojení ran, ve fertilním věku v endometriu folikulární fáze a v corpus luteum ovaria. Jedná se o složitý proces, mimo aktivovaných endotelií se na něm podílejí hladké svalové buňky, pericyty, adipocyty, fibroblasty, krevní destičky, makrofágy a další. Jejich produkty – angiogenní substance (VEGF, interleukiny, angiopoetiny, proteázy) – nastolují proces označovaný jako proangiogenní synergismus podléhající zpětnovazebným regulacím [44,46]. Vyšetřování hladin VEGF v séru je komplikované procesem krevní srážlivosti. Celkově proces srážení krve zahrnuje komplexní interakce mezi koagulačními faktory, destičkami, endoteliálními buňkami a růstovými faktory, což může vést ke změnám v sérových hladinách různých vaskulárních faktorů, vč. VEGF [44].

V maligní tkáni je proces angiogeneze chaotický, dochází k alternativní novotvorbě cév. Tyto nádorové cévy jsou nevyzrálé, neuspořádané, strukturálně deficientní, bez souvislé bazální membrány, a téměř zcela bez vnější vrstvy podpůrných pericytů. To vede k vysokému průniku plazmy do intersticia (leakage), častému krvácení nebo naopak ke trombózám. Není výjimkou propojování arteriol s venulami se vznikem zkratů. Všechny tyto jevy vedou ke zvýšenému intratumorálnímu tlaku a dalšímu zhoršování hypoxie v tumoru, což zpětnovazebně podporuje další angiogenezi [44–46].

VEGF se s různou specificitou a afinitou váže na tři typy receptorů. Receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 jsou exprimovány na povrchu endotelových buněk krevních cév (VECs – vascular endothelial cells), VEGFR-3 se nachází především na povrchu endotelových buněk lymfatických cév (LECs – lymphatic endothelial cells). VEGFR-1 slouží k signalizaci v době embryogeneze. I když má VEGF asi desetinásobně vyšší afinitu

k VEGFR-1, signalizace spouštěná tímto receptorem je velice slabá [44], kanoická angiogeneze probíhá vazbou na VEGFR-2. Lymfangiogeneze je řízena přes VEGFR-3 [47,48]. Důležitým poznatkem je to, že se VEGFR-1 vyskytuje v solubilní formě, ve které funguje jako negativní regulátor angiogeneze. Vazba VEGF na receptory je ještě posílena koreceptory: neuropilin 1 nebo 2 (NRP-1/2). Neuropiliny byly původně identifikovány v neuronech, mají pleiotropní funkci, zasahují nejen do regulace angiogeneze a lymfangiogeneze, ale také do imunitních reakcí, do procesu invaze a metastazování, do rezistence k antiangiogenní terapii [49].

Nejpotentnějším a nejvíce prozkoumaným členem rodiny VEGF je VEGF-A. Byl objeven v roce 1989 a byl označován jako faktor cévní permeability (VPF – vascular permeability factor). Název souvisí s tím, že je padestátisickrát potentnější v permeabilitě cévní stěny než histamin. Ve starší literatuře, před objevem ostatních členů rodiny VEGF, je označován bez dalšího písmenného indexu. Fyziologicky je nezastupitelný v embryonální angiogenezi, jeho vyblokovaním na myším embryonálním modelu uhynou embrya v časně fázi vývoje [48]. Patologicky je VEGF-A produkován endotelovými buňkami kooptovanými nádorem, což vede ke zmíněné chaotické angiogenezi. Stupeň vaskularizace tumorů se označuje termínem (mikro)vaskulární denzita a její posouzení má význam právě v ultrazvukové diagnostice pánevních tumorů (v dopplerovském módu a barevném škálování). Benigní léze jsou typicky avaskulární [50]. Monoklonální protilátka proti VEGF-A bevacizumab je v gynekologické onkologii součástí terapeutického portfolia ovariálního karcinomu a metastatického a rekurentního karcinomu čípku děložního již mnohé roky.

Lymfangiogeneze ve vztahu k biologii nádorů je stále předmětem intenzivního výzkumu často s protichůdnými závěry. Na první poznatky o využití lymfatické

vaskulatury nádorem k šíření v organismu a zakládání metastáz navazují další: lymfangiogeneze v tumorech může být asociována s navozením imunosuprese, resp. imunotolerance [51–76], čímž se i vysvětluje, proč tumory s hustou sítí lymfatických cév mají horší prognózu. Zcela proti tomu jdou poznatky ze studií na nádorových tkáňových modelech, kde byl podáván VEGF-C s efektem regrese lymfatických cév [77]. Nyní je známo, že lymfatické uzliny, aby mohly sloužit nádorovým buňkám jako podpůrná struktura, musí projít signifikantní remodelací, zejména metabolickou [78]. Primární nádor nejprve produkcí specifických lymfangiogenních faktorů drénovaných do lymfatických uzlin „připravuje“ uzlinu (sinusoidní hyperplazie) k přijetí nádorových buněk a k transformaci na metastatickou uzlinu [54], což je nazýváno teorií semínka a půdy (seed and soil). Sentinelová uzlina je nejprve nádorem alterovaná morfologicky a funkčně, ale v tu chvíli ještě bez průkazu přítomnosti onkologických buněk [70,79]. Z těchto pohledů se jeví role lymfatického systému v nádorové patofyziologii jako konfliktní. Jednak je to síť sloužící k distribuci nádorových buněk, zároveň slouží jako bariéra proti nádorové diseminaci [79]. Tím se posunujeme k recentnímu názoru ohledně lymfatické soustavy v nádorové biologii: podpora lymfangiogeneze současně s metodami podporujícími T-buňčnou specifickou imunitu by mohly být nejvíce efektivní v léčbě nádorových onemocnění.

Klinický význam lymfangiogeneze indukované faktorem VEGF-D

Souvislosti mezi VEGF-D a nádorovou lymfangiogenezi a přesah směrem k nádorové progresi, metastazování, k vlivu na parametry intervalu do progresu (PFS – progression free survival) a celkového přežití (OS – overall survival) byly zkoumány v mnoha experimentálních modelech i v klinických studiích. Imunohistochemicky byla zvýšená exprese

VEGF-D prokázána u karcinomu plic, prostaty, maligního melanomu, u gynekologických malignit (cervix uteri, ovarium), karcinomu žaludku, karcinomu pankreatu a u metastatického kolorektálního karcinomu [67].

Z experimentálních modelů je to zejména práce Kopfstein et al., 2007, kteří zkoumali myši transgenní modely s navozenou zvýšenou expresí VEGF-D. Pozorovali zvýšenou peritumorální i intratumorální lymfangiogenezi. Funkcionalita nově vzniklých lymfatických cév byla prokázána přítomností nádorových buněčných clusterů. Nádorová lymfangiogeneze byla asociována se zvýšenou přítomností nádorem postižených lymfatických uzlin a s přítomností plicních metastáz. V kontrolní skupině transgenních myši bez zvýšené exprese VEGF-D uvedené jevy chyběly [80]. K podobným závěrům v experimentálních modelech dospěly i jiné výzkumné skupiny, navíc byla popsána role VEGF-D v modelaci de novo vzniklých lymfatických kapilár, jež facilitovala vstup nádorových buněk do lymfatického řešišť [63,80,81].

V několika klinických studiích zkoumajících souvislosti mezi mírou imunohistochemického průkazu VEGF-D ve tkáních maligních tumorů a parametry intervalu do progresu a celkového přežívání jsou výsledky nekonzistentní [80–87].

George et al. 2001, zkoumali soubor kolorektálních karcinomů z operačních výkonů a srovnávali je s benigními polypy z kolonoskopii: imunohistochemicky přítomnost VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, stejné faktory i v séru metodou ELISA a prokazovali VEGF mRNA ve tkáních. Na základě výsledků postulovali závěr, že ve všech případech kolorektálního karcinomu byla přítomnost VEGF-D ve tkáni tumoru snižena, v séru nízké hladiny VEGF-D a nízká přítomnost VEGF-D mRNA. V diskuzi tento fakt vysvětlili kompetitivní inhibicí na receptorech VEGFR-2 a VEGFR-3. VEGF-D je vyvázaný na (solubilních) receptorech a mnohem potentnější VEGF-A a VEGF-C potom ve tkáních vedou k indukci

lymfangiogeneze a k metastazování. Jinými slovy jsou nízké hladiny VEGF-D prognosticky závažné [83], resp. poměr mezi VEGF-D a VEGF-C ve prospěch zvýšených hladin VEGF-C je zásadní pro proces nádorové lymfangiogeneze a metastazování [84,85].

Hladiny VEGF-D v séru nebo v plazmě jsou v provedených výzkumech vyšetřovány metodou ELISA (enzyme linked immune-sorbent assay) nebo multiplexovou metodou (např. Luminex) zkoumající více biomarkerů současně, případně nákladnějšími metodami, jako je hmotnostní spektrofotometrie či microarray technologie [80–87].

Cíle

Cílem výzkumného projektu je ověřit protein VEGF-D ve smyslu funkčnosti jako diagnostický biomarker.

VEGF-D splňuje definici biomarkeru, neboť je objektivně měřitelný v periferní krvi a je indikátorem patologického procesu: lymfangiogeneze.

Výzkumný projekt testuje, zda hodnota markeru VEGF-D průkazně odlišuje skupiny pacientek s ovariálním karcinomem od pacientek s benigním tumorem adnex oproti zdravým kontrolním skupinám – retrospektivní vyvážená studie případů a kontrol.

Cílem je porovnat sérovou hladinu VEGF-D u pacientek s maligním tumorem a u zdravých žen. Popsat vztah mezi sérovou hladinou VEGF-D, klinickými charakteristikami pacientek a hladinou běžně užívaných tumor markerů CA125 a HE4.

Metodické postupy, materiální a přístrojové postupy

Metodické postupy

Pro ověření sérové hladiny markeru VEGF-D byl zvolen design retrospektivní vyvážené studie případů a kontrol.

Retrospektivně bylo zhodnoceno 162 předoperačně zmrazených sér v bance biologického materiálu pacientek operovaných v Masarykově

onkologickém ústavu v Brně v letech 2022–2024 pro benigní a maligní tumory pánve. Kontrolní skupina byla vytvořena ze sér od zdravých pacientek z preventivní ambulance (profylakticky operovaných pro hereditární nádorové syndromy s negativním histopatologickým výsledkem vyšetření vaječníků a vejcovodů). Pacientky odeslané do konziliární ambulance pro nejasný tumor v pánvi byly týž den odeslány ke krevním odběrům, krevní sérum použité k analýze konvenčních nádorových markerů CA125 a HE4 bylo následně standardním procesem zamraženo a uchováno v bance biologického materiálu pod číselným identifikátorem, který se sestává z pořadového čísla vyšetření v roce 2022 a 2023. Pouze oprávněné osoby, které vstupují do lékařské dokumentace, mohou přiřadit číselný identifikátor vyšetření ke konkrétní pacientce. Stejně tak byly odeslány pacientky z preventivní ambulance před profylaktickou operací k stejným odběrům krve a sérum bylo stejně zamraženo. Takto uchovaná krevní séra jsou uložena v biobance Masarykova onkologického ústavu 12 měsíců, po uplynutí této lhůty jsou protokolárně likvidována. Všechny pacientky před vstupem do konziliární gynekologické ambulance nebo do preventivní ambulance podepsaly svobodný informovaný souhlas s explicitním dotazem na uchování biologického materiálu a jeho využití k vědeckým účelům. Tyto informované souhlasy jsou nedílnou součástí dokumentace pacientky a jsou archivovány v souladu se zákony.

Testovaný soubor byl rozdělen dle výsledků histopatologického vyšetření (benigní, maligní) z operačních výkonů a k nim byla vytvořena kontrolní skupina pacientek. Pacientky byly rozděleny přibližně početně stejně podle věku, menopauzálního statutu, BRCA mutačního stavu, anamnézy hormonální terapie (tab. 1). V tab. 2 ještě podrobně uvádíme zastoupení pacientek ve skupině s maligními nádory, kam jsme ale

Tab. 1. Popisné parametry a jejich četnosti v testovaném souboru. Ve skupině jiné mutace jsou zařazeny mutace v souboru Lynchova syndromu, PALB2, CHECK, RAD-51 a další.

Tab. 1. Descriptive parameters and their frequencies in the tested file. Mutations in the Lynch syndrome file, PALB2, CHECK, RAD-51, and others are included in the group of other mutations.

Parametr	Celkem n = 162	Kontrolní n = 61	Benigní n = 47	Maligní n = 54	p hodnota
Věk					< 0,001
medián (min., max.)	58 (20, 84)	50 (29, 75)	53 (22, 75)	66 (20, 84)	
průměr (SD)	55 (14)	51 (12)	52 (15)	63 (12)	
Menopauzální status					< 0,001
postmeno	103 (64 %)	29 (48 %)	28 (60 %)	46 (85 %)	
premeno	59 (36 %)	32 (52 %)	19 (40 %)	8 (15 %)	
Mutace					< 0,023
BRCA1	21 (13 %)	13 (21 %)	3 (6,5 %)	5 (9,3 %)	
BRCA2	17 (11 %)	10 (16 %)	2 (4,3 %)	5 (9,3 %)	
jiné	123 (76 %)	38 (62 %)	41 (89 %)	44 (81 %)	
neznámo	1	0	1	0	
Hormonální terapie					< 0,001
HAK	39 (25 %)	25 (44 %)	11 (23 %)	3 (5,6 %)	
HRT	8 (5,1 %)	1 (1,8 %)	3 (6,4 %)	4 (7,4 %)	
HT (TX, AI)	4 (2,5 %)	2 (3,6 %)	1 (2,1 %)	1 (1,9 %)	
žádná	92 (58 %)	20 (35 %)	29 (62 %)	43 (80 %)	
neznámo	4	4	0		
Klinické symptomy	62 (38 %)	1 (1,6 %)	21 (45 %)	40 (74 %)	< 0,001

AI – aromatázové inhibitory, AK – hormonální antikoncepce, HRT – hormonální substituční terapie, HT – hormonální terapie, SD – směrodatná odchylka, TX – tamoxifen

Mezi klinické symptomy patří především bolest, nepravidelnosti ve vyprazdňování stolice, nevolnost a zvracení, krvácení, výkyvy tělesné hmotnosti.

zařadili všechny pacientky operované v 2022–2023 (za 12 měsíců). Rozdělení dle stadií kopíruje reálný stav distribuce stadií onemocnění v populaci při absenci screeningové metody a při pozdní klinické manifestaci onemocnění.

Vzhledem k primárně deskriptivnímu charakteru projektu byl počet pacientek stanoven pragmaticky s ohledem na možnosti laboratorního stanovení. Ke statistickému vyhodnocení byly použity popisné statistiky dle charakteru dat, tj. počty a procentuální zastoupení pro kategoriální charakteristiky a medián a mezikvartilové rozpětí (IQR) či průměr a směrodatná odchylka (SD) pro spojité charakteristiky. Pro porovnání hladin VEGF-D v hodnocených skupinách pacientek byl použit neparametrický Mann-Whitney U test (M-W-U test). Kruskal-Wallis test byl použit jako statistická neparametrická metoda ke srovnání tří skupin. Všechny statistické analýzy byly uvažovány na hladině významnosti 5 %

a pro jejich zpracování byl využit software MedCalc verze 23.0.6. a software R.

Materiální a přístrojové postupy

Vyšetření provádíme metodou ELISA (enzyme linked immune – sorbent – assay) – Quantikine® Human VEGF D (R&D Systems), který používá sendvičový formát ELISA, v němž jsou použity dvě protilátky. Jedna protilátka je imobilizována na destičce a slouží k zachycení VEGF-D, zatímco druhá je konjugována s enzymem a používá se k detekci. Po navázání protilátky na VEGF-D se přidá substrát, který reaguje s enzymem a vytváří barevnou reakci. Intenzita této barvy je úměrná množství VEGF-D ve vzorku séra a měří se na spektrofotometru – readeru TECAN.

Výsledky

Parametry souboru

Do výzkumného projektu bylo zařazeno celkem 162 pacientek s průměrným

věkem 58 let (20, 84). Celkem 103 (64 %) pacientek bylo v době odběru krevního séra premenopauzálních, 59 (36 %) pacientek bylo v době odběru krevního séra postmenopauzálních. V analyzované skupině byl dle anamnestických dat medián věku menopauzy 50 let (36,0; 60,0), průměr 49,6 let, u 67 pacientek data o věku menopauzy nebyla k dispozici (tab. 1).

V souboru bylo 21 pacientek BRCA1 pozitivních (13 %), 17 pacientek pozitivních pro BRCA2 (11 %), do kategorie jiných patologických mutací patří mutace v souboru genů Lynchova syndromu II (PALB2, CHEK2, RAD51) (tab. 1).

Z analýzy anamnestických dat se zaměřením na hormonální terapii negovalo celkem 92 (58 %) pacientek užívání hormonálních preparátů. Ze skupiny s pozitivní odpovědí celkem 39 (25 %) pacientek užívalo někdy hormonální antikoncepci (HAK), ve skupině s maligními tumory vaječníku byly tři (5,6 %)

Tab. 2. Popisná charakteristika souboru pacientek s maligním karcinomem ovaria, rozložení četností jednotlivých stádií kopíruje reálnou situaci v populaci, časná stadia jsou vzácná, více než polovinu (červeně) tvoří pokročilá stadia s diseminací v pánvi a dutině břišní.

Tab. 2. Descriptive characteristics of the group of patients with malignant ovarian cancer, the frequency distribution of individual stages copies the real situation in the population, where early stages are rare, and more than half (in red) are advanced stages with dissemination in the pelvis and abdominal cavity.

FIGO	Četnost n = 54 (100 %)
IA	4 (7,8 %)
IB	2 (3,9 %)
IC1	4 (7,8 %)
IC2	1 (2,0 %)
IC3	3 (5,9 %)
IIA	1 (2,0 %)
IIB	5 (9,8 %)
IIIA	7 (12 %)
IIIB	8 (16 %)
IIIC	17 (28,8 %)
IVA	1 (2 %)
IVB	1 (2 %)

FIGO – Mezinárodní federace gynekologů a porodníků / International Federation of Gynecology and Obstetrics

pacientky uživatelky HAK, zatímco 43 (80 %) žen nikdy HAK neužívalo. Hormonální substituční terapie byla ve sledovaném souboru zastoupena pouze

v osmi případech (5,1 %), v polovině ve skupině pacientek s maligním tumorem (čtyři pacientky, 7,4 %), tři pacientky (6,4 %) byly ve skupině s benigními tumory a jedna pacientka (1,8 %) ve skupině kontrol. Celkem tři pacientky ze souboru (po jedné pacientce v každé analyzované skupině) měly v anamnéze užívání jiných hormonálních preparátů: norethisteron, tamoxifen, aromatázový inhibitor (tab. 1).

Ze subjektivních údajů byl v prvotní dokumentaci (konziliární gynekologické vyšetření nebo vyšetření v preventivní ambulanci, které těsně předcházelo laboratornímu odběru) vyhledán údaj o symptomech. Celkem 62 (38 %) pacientek mělo pozitivní údaj (bolest trupu různé lokalizace: břicho, bedra, pánev, nepravidelné gynekologické krvácení, gastrointestinální symptomatologie: nechutenství, zvracení, nevolnost, poruchy vyprazdňování stolice, změny tělesné hmotnosti). Ve skupině pacientek s maligním tumorem mělo některý z vyjmenovaných symptomů 40 (74 %) pacientek. Ve skupině s benigními tumory bylo 21 (45 %) pacientek symptomatických. V kontrolní skupině zdravých pacientek vyjádřila potíže jedna pacientka (1,6 %) (tab. 1).

V tab. 2 uvádíme soubor pacientek s maligním tumorem rozdělený dle rozsahu postižení do stádií dle klasifikace Mezinárodní federace gynekologů a porodníků (FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics). Celkem 54 pacientek za 12 měsíců (v roce

2022 a 2023) bylo operováno pro karcinom ovaria, dle výsledků histopatologického vyšetření z operačního výkonu a dle výsledků stagingových vyšetření předoperačně bylo určeno stadium FIGO. Tento soubor kopíruje populační distribuci klinických stádií u karcinomu ovaria při absenci populační screeningové metody a dlouhém asymptomatickém průběhu, kdy symptomatická jsou právě červeně vyznačená pokročilá stadia (tab. 2).

Analýza sérových hladin VEGF-D

Sérové hladiny VEGF-D se spektrofotometricky měří v ng/l. V analyzovaném souboru byla minimální naměřená hodnota 114, maximální hodnota 1 625. Medián hodnot byl 410 a průměrná hodnota 457. Ve skupině pacientek s maligním tumorem byl medián 345 (114, 756) a průměrná hodnota 378 (tab. 3).

Ve skupině pacientek s benigním tumorem byla hodnota mediánu 474 (187, 900), průměrná hodnota byla 470 (tab. 3).

Zdravé kontroly měly hodnotu mediánu 488 (157, 1 625), průměrnou hodnotu pak 517 (tab. 3).

Výsledek srovnání deskriptivních statistických parametrů pomocí Mann-Whitney U testu je ve vyšetřovaném souboru statisticky významný ($p = 0,00067$) (graf 1) pro rozdíl mezi hodnotami sérového VEGF-D v souboru benigních lézí a maligních tumorů (tab. 3). Dále existuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami pacientek s maligními

Tab. 3. Analýza sérových hladin VEGF-D v souboru pacientek s benigními lézemi, maligními tumory ovaria a u zdravých kontrol.

Tab. 3. Analysis of serum VEGF-D levels in a group of patients with benign lesions, malignant ovarian tumours, and in healthy controls.

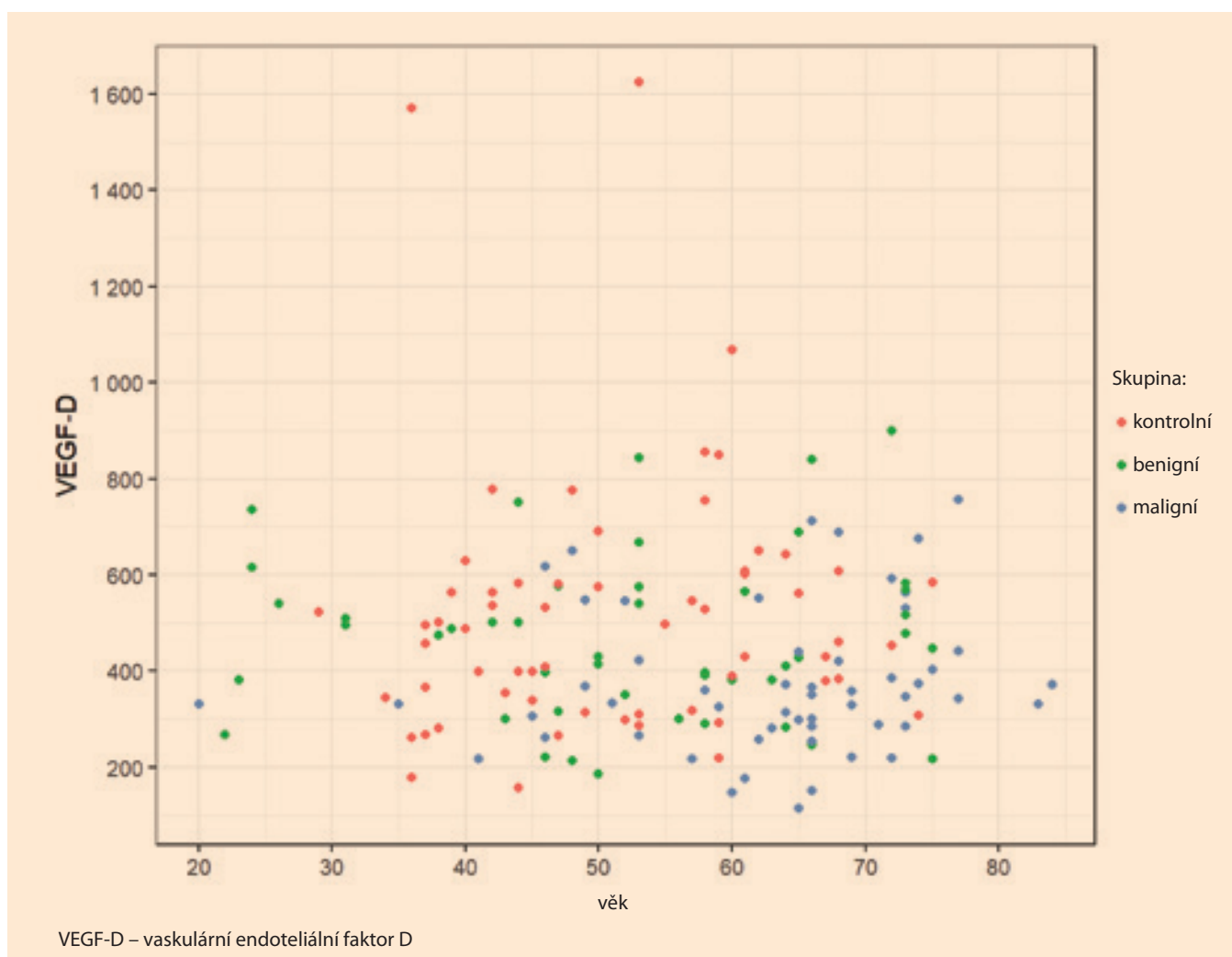
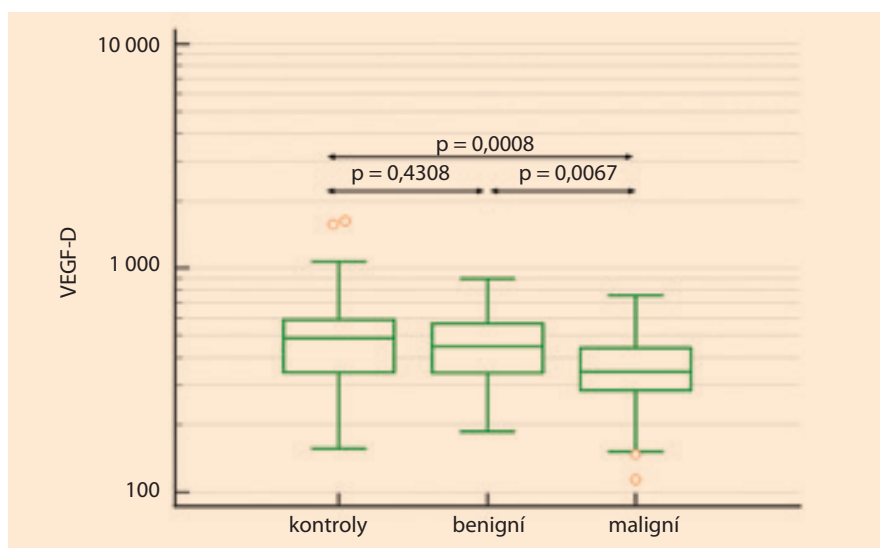
Vzorky séra celkem	n = 162	VEGF-D (ng/l)					p hodnota (U-test)
		průměr	SD	medián	5. percentil	95. percentil	
kontroly	61	517,8	268,5	487,9	242,3	951,4	
benigní léze	47	474,4	171,7	473,6	217,4	840,4	0,4308
maligní tumory	54	377,8	151,7	345,1	156,9	687,1	0,0008

SD – směrodatná odchylka, VEGF-D – vaskulární endoteliální faktor D

Graf 1. Grafické zobrazení výsledků sérových hladin VEGF-D v jednotlivých kategoriích pacientek, box-graf. Krabice obsahuje středních 50 % dat. Čára uprostřed krabice je hodnota mediánu – 50. percentil.

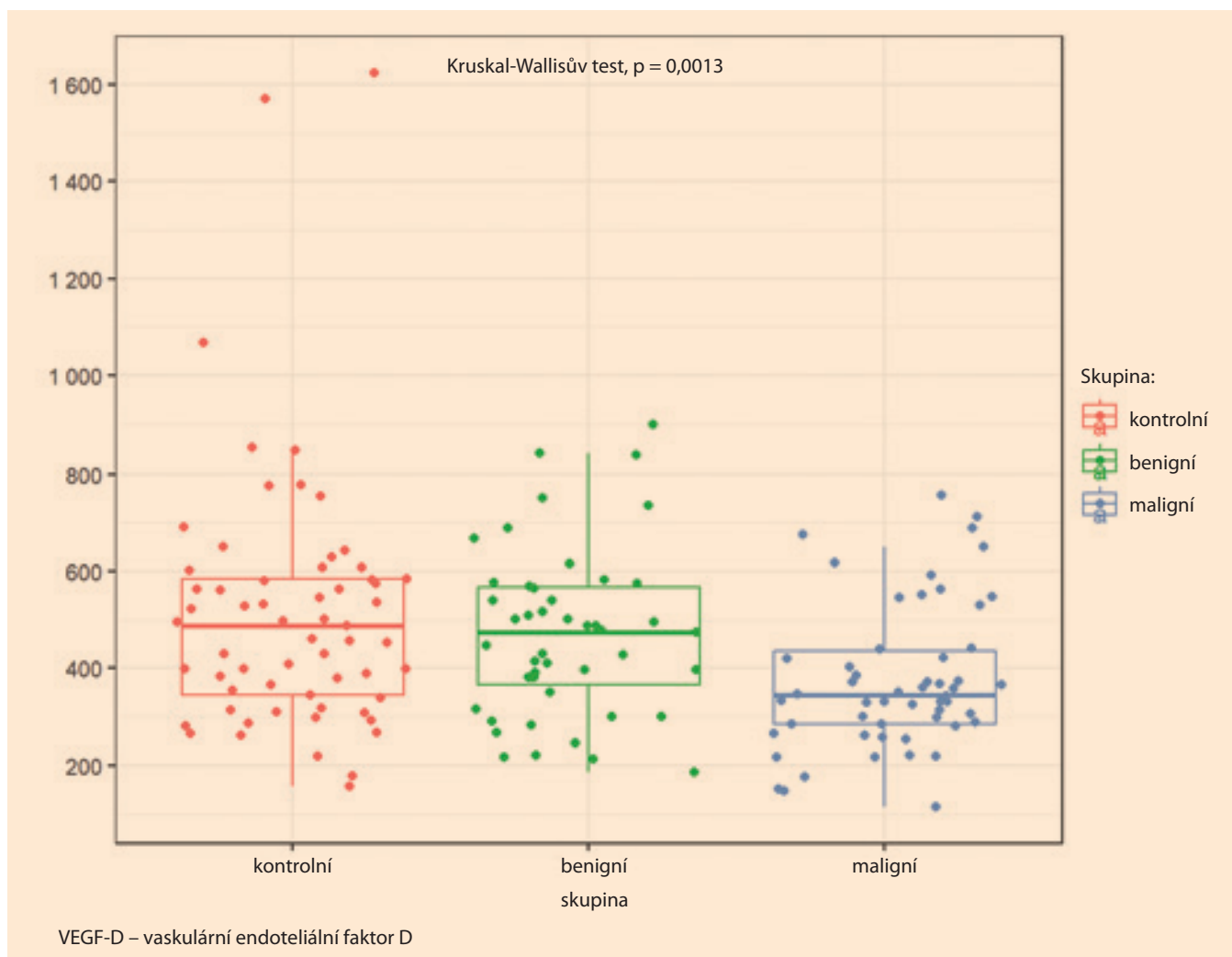
Graph 1. Graphic display of the results of serum VEGF-D levels in individual categories of patients, box-graph. **The box contains the medial 50% of the data.** The line in the middle of the box is the value of the median – 50th percentile.

VEGF-D – vaskulární endoteliální faktor D



Graf 2. Bodové zobrazení jednotlivých naměřených hodnot sérového VEGF-D s ohledem na distribuci ve věkových kategoriích. Data vykazují velkou variabilitu, nelze vypočítat trend v jednotlivých skupinách podle věku. Graf dobře zobrazuje extrémní hodnoty.

Graph 2. Dot chart of individual measured values of serum VEGF-D with regard to distribution in age categories. The data show great variability, and no trend can be observed in individual age groups. The graph shows extreme values well.



Graf 3. Box graf znázorňuje hladiny VEGF-D ve třech skupinách: benigní léze, maligní tumory a zdravé kontroly. Rozdíl mezi skupinami byl testován pomocí Kruskal-Wallisova testu ($p = 0,0013$), což naznačuje, že alespoň jedna dvojice skupin se statisticky významně liší. Z box grafu je patrné, že medián a rozpětí hodnot VEGF-D jsou nejnižší u maligních tumorů.

Graph 3. Box plot shows VEGF-D levels in three groups: benign lesions, malignant tumours, and healthy controls. The difference between groups was tested using the Kruskal-Wallis test ($P = 0.0013$), indicating that at least one pair of groups is statistically significantly different. It can be seen from the box graph that the median and range of VEGF-D values are the lowest in malignant tumours.

tumory a mezi zdravými kontrolami ($p = 0,0008$). Mezi hodnotami u pacientek s benigními lézemi a u zdravých kontrol nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p = 0,4308$) (tab. 3). Pod tabulkou následuje box graf (boxplot), krabicový diagram s vizualizací dat a jejich rozložením (graf 1). Na ose y jsou hodnoty sérového VEGF-D, na ose x potom jednotlivé kategorie pacientek.

Následuje grafické znázornění výsledků ve formě bodového grafu (scatter plot, strip plot) (graf 2). Barevné body

reprezentují jednotlivé naměřené hodnoty sérového VEGF-D na ose y a na ose x je spojitý parametr – věk. Barevně, viz legenda grafu, jsou odlišeny histologické výsledky nálezů. Data vykazují velkou variabilitu (rozptýl hodnot), nelze vypočítat trend hodnot v žádné porovnávané skupině vzhledem k věku. Výhodou tohoto zobrazení je rychlá identifikace odlehlých (extrémních) hodnot.

Vzhledem k tomu, že porovnáваме tři skupiny dat, používáme grafický výstup z Kruskal-Wallis testu za účelem zjištění,

zda se hodnoty mezi těmito skupinami statisticky významně liší: $p = 0,0013$, což znamená, že mezi alespoň dvěma skupinami existuje statisticky významný rozdíl v hodnotách VEGF-D (graf 3).

Výsledky analýzy sérových hladin VEGF-D ve vztahu k dalším parametrům

V tab. 4 prezentujeme další sledované parametry ve vyšetřovaných skupinách. Informace o přítomnosti ascitu v pávní a dutině břišní byly vyhledávány v operačních

Tab. 4. Výsledky analýzy markeru VEGF-D v séru pacientek s doplněnými vstupními hodnotami markerů CA125 a HE4 z dokumentace pacientek a dále je uvedena přítomnost ascitu z operačního protokolu. Výsledky demonstrují známou nízkou specifitu elevace CA125 a HE4; stejně přítomnost ascitu není jednoznačně maligním znakem.

Tab. 4. Results of the analysis of the VEGF-D marker in the patient's serum with supplemented input values of the CA125 and HE4 markers from the patient's documentation, and the presence of ascites from the operative protocol is also indicated. The results demonstrate the known low specificity of CA125 and HE4 elevation; however, the presence of ascites is not an unambiguously malignant sign.

Parametr	Celkem (n = 162)	Kontrolní (n = 61)	Benigní (n = 47)	Maligní (n = 54)	p hodnota
Ascites					< 0,001
ano	25 (15 %)	0 (0 %)	5 (11 %)	20 (37 %)	
ne	137 (85 %)	61 (100 %)	42 (89 %)	34 (63 %)	
VEGF-D ng/l					< 0,001
medián (min., max.)	410 (114, 1 625)	488 (157, 1 625)	474 (187, 900)	345 (114, 756)	
průměr (SD)	457 (215)	517 (269)	470 (172)	378 (152)	
CA125 ku/l					< 0,001
medián (min., max.)	26 (5, 4 249)	14 (5, 82)	24 (6, 341)	132 (20, 4 249)	
průměr (SD)	180 (494)	18 (14)	41 (58)	469 (765)	
neznámo	5	2	3	0	
CA125					< 0,001
elevace > 35,5 ku/l	65 (41 %)	7 (12 %)	15 (34 %)	43 (80 %)	
neznámo	5	2	3	0	
HE4 pmol/l					< 0,001
medián (min., max.)	44 (20, 3 578)	31 (20, 61)	34 (20, 140)	142 (33, 3 578)	
průměr (SD)	151 (400)	33 (8)	42 (24)	360 (626)	
neznámo	17	8	6	3	
HE4					< 0,001
elevace > 80 pmol/l	30 (21 %)	0 (0 %)	1 (2,4 %)	29 (57 %)	
neznámo	17	8	6	3	

SD – směrodatná odchylka, VEGF-D – vaskulární endoteliální faktor D

protokolech, nejednalo se o údaj ze zobrazovacích metod. Ascites je v souboru přítomen u 25 pacientek (15 %) všech případů, z toho u benigních lézí u 5 pacientek (11 %), u maligních tumorů ve 20 případech (37 %). Ascites může být přítomen i u benigních adnextumorů, typicky u fibromů a thékómů (v odborné literatuře tento jev bývá označován jako tzv. Meigsův syndrom). Ascites byl hodnocen pouze formou ano/ne a nebyl vztahován k dalším parametrům tabulky.

Grafické srovnání hladin markerů VEGF-D a CA125 ve skupinách pacientek s benigními lézemi, maligními tumory a u zdravých kontrol

V bodovém grafu je každý bod reprezentován jedním klinickým případem a znázorňuje hodnotu VEGF-D na ose y a hodnotu CA125 na ose x v séru. V grafu

jsou přesně vidět již popsané výsledky: maligní tumory mají vyšší hodnoty CA125 a nižší hodnoty VEGF-D než benigní léze a zdravé kontroly (graf 4).

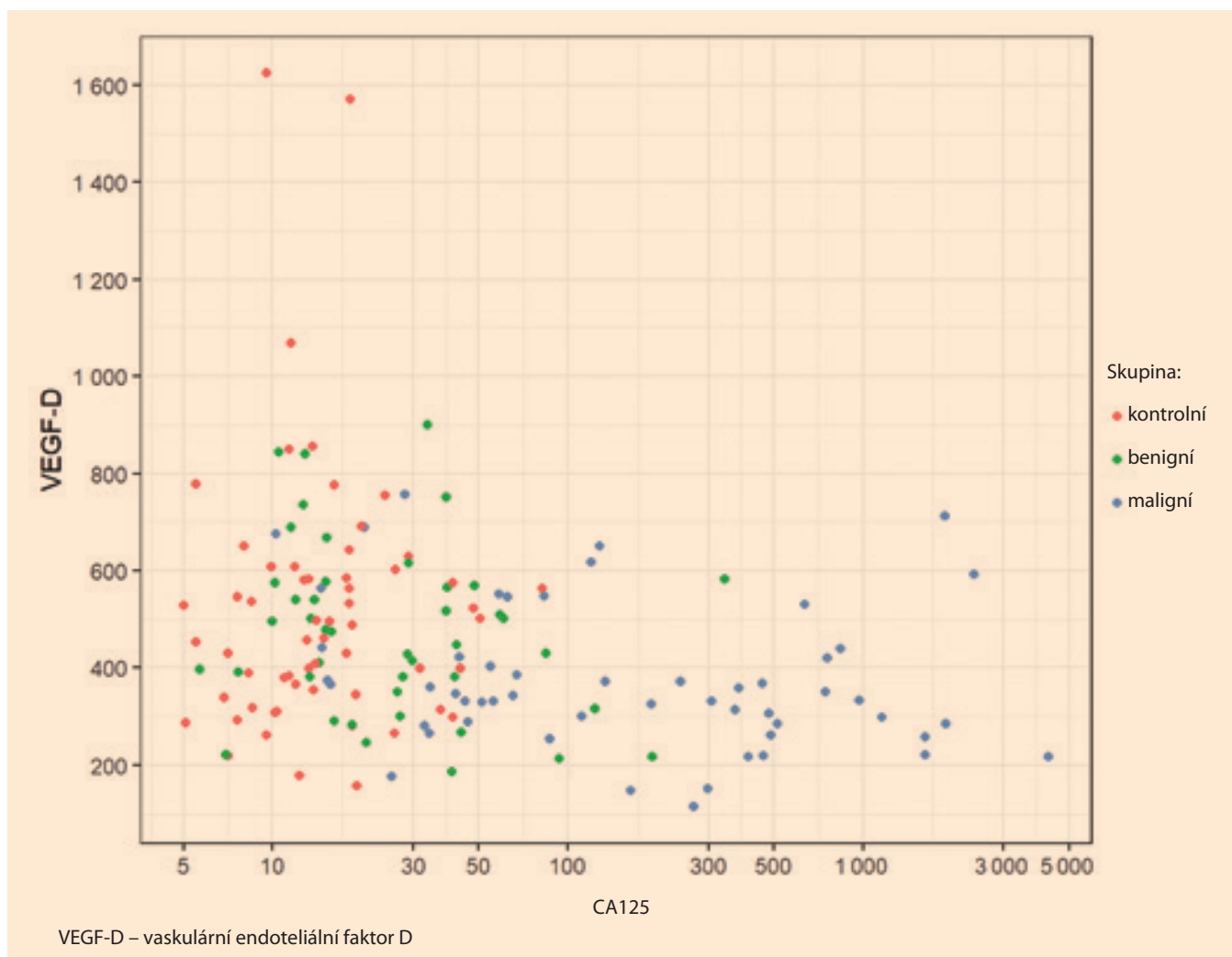
Grafické srovnání hladin markerů VEGF-D a HE4 ve skupinách pacientek s benigními lézemi, maligními tumory a u zdravých kontrol

V tomto grafickém zobrazení – bodový graf – je každý bod jeden klinický případ a je zastoupen hladinou sérového VEGF-D na ose y a hodnotou sérového HE4 na ose x. Je evidentní, že většina maligních nádorů má elevovaný HE4 a zároveň nízkou hladinu VEGF-D. Skupina maligních tumorů je v tomto zobrazení jasně oddělená od skupiny pacientek s benigními tumory a zdravými kontrolami. Naopak benigní léze a zdravé tumory mají podobné hodnoty obou markerů (graf 5).

Diskuze

Retrospektivní design studie byl zvolen pro jasnou stratifikaci pacientek do skupin na základě již známého histopatologického výsledku vyšetření odoperovaných vaječníků a vejcovodů. Skupina zdravých kontrol byla doplněna z pacientek z preventivní ambulance opeřovaných z profylaktických důvodů, kde byly známé negativní výsledky vyšetření. Tím jsme se záměrně dopustili selekčního bias, avšak cílem bylo vybrat skupinu pacientek s nezpochybnitelně negativním nálezem na adnexech.

Velikost vzorku byla stanovena pragmaticky s ohledem na dobu uchování prebipticky odebraných vzorků sér v biobance Masarykova onkologického ústavu (MOÚ), tj. 12 měsíců. Druhým hlediskem pro velikost vzorku byly možnosti provedení analýz v laboratořích Oddělení laboratorní medicíny MOÚ



Graf 4. Bodový graf. Každý bod reprezentuje jednotlivý klinický případ s naměřenou hodnotou CA125 a VEGF-D.

Graph 4. Dot chart. Each point represents an individual clinical case with a measured value of CA125 and VEGF-D.

za plného standardního provozu. Záchyt nových pacientek s karcinomem ovaria je již několik let přibližně stejný a pohybuje se okolo čísla 50. Tedy konkrétně k 54 vzorkům od pacientek s maligním tumorem za období 2022–2023 byly dohledány vzorky od pacientek s benigními lézemi a od zdravých kontrol tak, aby srovnávané parametry byly početně přibližně stejně zastoupeny. Navýšení počtu pacientek v tomto konkrétním uspořádání by bylo možno provést pouze v multicentrickém designu se všemi riziky plynoucími z technologických bias ve zpracování a transportu primárního vzorku séra.

Všechna séra byla odebrána vstupně prebiopticky a prošla stejným procesem

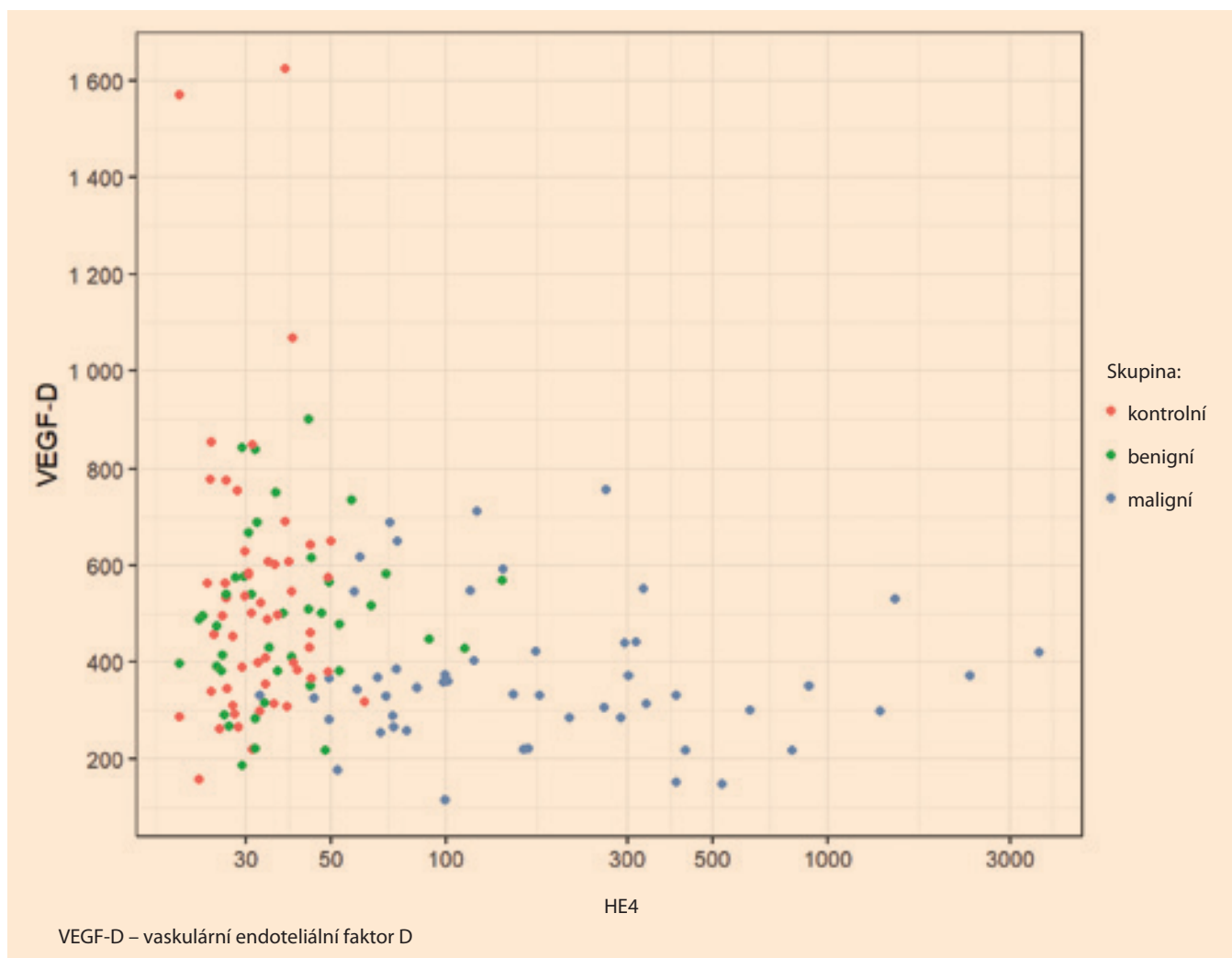
zmrazení. Obrácený postup – rozmrazování sér – byl rovněž identický. Nebyla vyšetřována žádná nativní séra.

Vyšetřování hladin VEGF v séru je komplikované procesem krevní srážlivosti. Celkově proces srážení krve zahrnuje komplexní interakce mezi koagulačními faktory, destičkami, endoteliálními buňkami a růstovými faktory, což může vést ke změnám v sérových hladinách různých angiogenních faktorů, včetně VEGF. Z posledně uvedeného je evidentní, že by měl navazovat projekt vyšetřující hladiny VEGF-D v plazmě neovlivněné proběhlými koagulačními procesy.

Analýza VEGF-D v séru metodou ELISA může mít jisté nedostatky v analytickém principu: jedna specifická protilátka

vychytává jednu specifickou izoformu VEGF-D. Z uvedených informací v úvodu sdělení je prokázáno, že VEGF-D je různými proteázami štěpen na různé izoformy. Je tedy otázkou, zda získané nízké hodnoty sérového VEGF-D u pacientek s maligními tumory jsou správné a reprezentují skutečné množství VEGF-D produkované tumorem. Řešením by bylo provedení některé z multiplexových metod (např. Luminex) nebo analýzy metodou hmotnostní spektrofotometrie či microarray technologie.

Nutno je zvažovat i fakt, že nádorem produkované izoformy VEGF-D mohou být vázány v extracelulární formě a jenom malá solubilní frakce se uvolňuje do krevního řečiště. Zde by bylo



Graf 5. Korelace sérových hodnot VEGF-D a HE4, která výborně stratifikuje pacientky se skutečně maligním nádorem od pacientek s benigními tumory od zdravých kontrol. Ve skupině benigních lézí a zdravých kontrol je pak již stratifikace setřelá.

Graph 5. Correlation of serum VEGF-D and HE4 values, which excellently stratifies patients with truly malignant tumors from patients with benign tumors and from healthy controls. In the group of benign lesions and healthy controls, the stratification is already erased.

zajímavé provést stejný design studie doplněný o imunohistochemickou analýzu proteinu VEGF-D ve tkáních maligních tumorů, benigních lézí a ve tkáních od zdravých kontrol.

Z uvedených prací na karcinomech kolorekta a plic v úvodu dizertační práce se nejvíce ztotožňujeme s vysvětlením nízkých sérových hladin VEGF-D u pacientů s malignitou principem kompetitivní inhibice substrátů (členů rodiny VEGF) o vazbu na receptory.

Dosud stále platí, že pozdní záchyt onemocnění karcinomem vaječníku je

zásadní příčina jeho špatné prognózy. Zatím nebyl identifikován žádný dostatečně senzitivní a specifický marker ani multivariantní analýza kombinující markery a zobrazovací metody, které by jednoznačně diferencovaly skupinu obtížně ultrazvukově rozlišitelných adnextumorů. Zejména je to zásadní pro mladší pacientky ve fertilním věku, u nichž se snažíme minimalizovat zbytečné operační vstupy. Nejčastější typ ovariálního karcinomu – high-grade serózní karcinom – vzniká ve většině případů jako diseminovaný extrapelvický tumor. Ani

jeho prekurzorová léze STIC není k dnešnímu dni identifikovatelná jinak než morfoloicky v epitelu fimbriální části vejcovodu. Angiogeneze, resp. lymfangiogeneze jako základní znak maligních tumorů je předmětem intenzivního výzkumu. Nicméně role lymfatického systému je v nádorové biologii poněkud konfliktní: lymfatická síť představuje distribuční prostor pro maligní elementy, zároveň je to soustava sloužící jako bariéra proti nádorové diseminaci. Angiogením faktorem, který je prokazatelně overexprimován v maligních tumorech

a přispívá k nádorové lymfangiogenezi a remodelaci krevních a lymfatických cév, je VEGF-D.

Závěr

V práci předkládáme analýzy sérových hladin VEGF-D ve skupině pacientek s maligními tumory, benigními lézemi adnex a u zdravých kontrol. Výsledek srovnání deskriptivních statistických parametrů pomocí Mann-Whitney U testu je ve vyšetřovaném souboru statisticky významný pro rozdíl mezi hodnotami sérového VEGF-D v souboru benigních lézí a maligních tumorů. Dále existuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami pacientek s maligními tumory a mezi zdravými kontrolami. Ve srovnání s konvenčním markerem – zlatým standardem CA125 – korelovala patologicky zvýšená hladina sérového CA125 s nízkou hodnotou sérového VEGF-D u pacientek s maligními tumory. Stejná shoda panovala ve srovnání s markerem HE4: vysoké sérové hladiny HE4 byly ve skupině pacientek s maligním tumorem doprovázeny nízkou hladinou VEGF-D, v naší analýze se kombinace markeru HE4 a VEGF-D v grafickém zpracování jevila diagnosticky přesněji.

S ohledem na získané výsledky má vyšetřování sérové hladiny VEGF-D potenciál diagnostického testu s přínosem ke stratifikaci obtížně prebiopicky diferencovatelných adnextumorů. K přesnému ověření uvedeného závěru je nutno ještě dalších analýz, především v prospektivním designu.

Literatura

- Zikán M. Léčba karcinomu ovaria z pohledu gynekologa. In: Karcinom ovaria. 2. vyd. Praha: Framakon Press, spol. s.r.o. 2023: 8–12.
- SVOD. 2024 [online]. Available from: <https://old.svod.cz/>.
- Buys SS, Partridge E, Black A et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2011; 305(22): 2295–2303. doi: 10.1001/jama.2011.766.
- Zhang R, Siu MK, Ngan HY et al. Molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2022; 23(19): 12041. doi: 10.3390/ijms231912041.
- Gohagan JK, Prorok PC, Greenwald P et al. The PLCO cancer screening trial: background, goals, organization, operations, results. *Rev Recent Clin Trials* 2015; 10(3): 173–180. doi: 10.2174/1574887110666150730123004.
- Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet* 2021; 397(10290): 2182–2193. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00731-5.
- The Lancet. UKCTOCS and the evaluation of screening for ovarian cancer. *Lancet* 2016; 387(10022): 918. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00631-0.
- Rosenthal AN. Ovarian cancer screening in the high-risk population – the UK Familial Ovarian Cancer Screening Study (UKFOCSS). *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22 Suppl 1: S27–S28. doi: 10.1097/IGC.0b013e318251cc3f.
- Kurman RJ, Shih IM. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *Am J Pathol* 2016; 186(4): 733–747. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.011.
- Škapa P. Patologie a histopatologická klasifikace karcinomů ovaria. In: Karcinom ovaria. 2. vyd. Praha: Framakon Press, spol. s.r.o. 2023: 12–25.
- Salazar C, Campbell IG, Goringe KL. When is “Type I” ovarian cancer not “Type I”? Indications of an out-dated dichotomy. *Front Oncol* 2018; 8: 654. doi: 10.3389/fonc.2018.00654.
- Board WC of TE. Female Genital Tumours. 2024 [online]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Female-Genital-Tumours-2020>.
- Medeiros F, Muto MG, Lee Y et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(2): 230–236. doi: 10.1097/01.pas.0000180854.28831.77.
- Uterine and tubal lavage for earlier cancer detection using an innovative catheter: a feasibility and safety study – PubMed. 2024 [online]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30376484/>.
- Sia TY, Yaari Z, Feiner R et al. Uterine washings as a novel method for early detection of ovarian cancer: trials and tribulations. *Gynecol Oncol Rep* 2024; 51: 101330. doi: 10.1016/j.gore.2024.101330.
- Pujade-Lauraine E, Ray-Coquard I, Lécur F. *Ovarian Cancers*. 1st ed. USA: Springer International Publishing 2017.
- Masopust J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. II. část. Praha: Calamarus, s.r.o. 1998.
- Rosen DG, Zhang Z, Shan W et al. Morphological and molecular basis of ovarian serous carcinoma. *J Biomed Res* 2010; 24(4): 257–263. doi: 10.1016/S1674-8301(10)60036-X.
- Anastasi E, Farina A, Granato T et al. Recent insight about HE4 role in ovarian cancer oncogenesis. *Int J Mol Sci* 2023; 24(13): 10479. doi: 10.3390/ijms241310479.
- Kirchhoff C, Habben I, Ivell R et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* 1991; 45(2): 350–357. doi: 10.1095/biolreprod45.2.350.
- James NE, Chichester C, Ribeiro JR. Beyond the biomarker: understanding the diverse roles of human epididymis protein 4 in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Front Oncol* 2018; 8: 124. doi: 10.3389/fonc.2018.00124.
- Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(13): 3695–3700.
- Hamed EO, Ahmed H, Sedeek OB et al. Significance of HE4 estimation in comparison with CA125 in diagnosis of ovarian cancer and assessment of treatment response. *Diagn Pathol* 2013; 8: 11. doi: 10.1186/1746-1596-8-11.
- Lycke M, Ulfenborg B, Malchau Laesgaard J et al. Consideration should be given to smoking, endometriosis, renal function (eGFR) and age when interpreting CA125 and HE4 in ovarian tumor diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59(12): 1954–1962. doi: 10.1515/cclm-2021-0510.
- Barr CE, Funston G, Jeevan D et al. The performance of HE4 alone and in combination with CA125 for the detection of ovarian cancer in an enriched primary care population. *Cancers (Basel)* 2022; 14(9): 2124. doi: 10.3390/cancers14092124.
- Cao H, You D, Lan Z et al. Prognostic value of serum and tissue HE4 expression in ovarian cancer: a systematic review with meta-analysis of 90 studies. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; 18(4): 371–383. doi: 10.1080/14737159.2018.1457436.
- Plotti F, Terranova C, Guzzo F et al. Role of BRCA mutation and HE4 in predicting chemotherapy response in ovarian cancer: a retrospective pilot study. *Biomedicines* 2021; 9(1): 55. doi: 10.3390/biomedicines9010055.
- James NE, Emerson JB, Borgstadt AD et al. The biomarker HE4 (WFDC2) promotes a pro-angiogenic and immunosuppressive tumor microenvironment via regulation of STAT3 target genes. *Sci Rep* 2020; 10(1): 8558. doi: 10.1038/s41598-020-65353-x.
- Wang H, Liu P, Xu H et al. Early diagnosis of ovarian cancer: serum HE4, CA125 and ROMA model. *Am J Transl Res* 2021; 13(12): 14141–14148.
- Suri A, Perumal V, Ammalli P et al. Diagnostic measures comparison for ovarian malignancy risk in epithelial ovarian cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep* 2021; 11(1): 17308. doi: 10.1038/s41598-021-96552-9.

31. Zhang P, Wang C, Cheng L et al. Comparison of HE4, CA125, and ROMA diagnostic accuracy: a prospective and multicenter study for Chinese women with epithelial ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(52): e2402. doi: 10.1097/MD.0000000000002402.
32. Zhang R, Siu MK, Ngan HY et al. Molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2022; 23(19): 12041. doi: 10.3390/ijms231912041.
33. Meys EM, Jeelof LS, Achten NM et al. Estimating risk of malignancy in adnexal masses: external validation of the ADNEX model and comparison with other frequently used ultrasound methods. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49(6): 784–792. doi: 10.1002/uog.17225.
34. Minar L, Felsing M, Cermakova Z et al. Comparison of the Copenhagen Index versus ROMA for the preoperative assessment of women with ovarian tumors. *Int J Gynaecol Obstet* 2018; 140(2): 241–246. doi: 10.1002/ijgo.12371.
35. Karlsen MA, Høgdall EV, Christensen IJ et al. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer – an international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecol Oncol* 2015; 138(3): 640–646. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.06.021.
36. Kurosaki A, Hasegawa K, Kato T et al. Serum folate receptor alpha as a biomarker for ovarian cancer: implications for diagnosis, prognosis and predicting its local tumor expression. *Int J Cancer* 2016; 138(8): 1994–2002. doi: 10.1002/ijc.29937.
37. Leung F, Dimitromanolakis A, Kobayashi H et al. Folate-receptor 1 (FOLR1) protein is elevated in the serum of ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 2013; 46(15): 1462–1468. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.03.010.
38. Anastasi E, Manganaro L, Granato T et al. Is CA72-4 a useful biomarker in differential diagnosis between ovarian endometrioma and epithelial ovarian cancer? *Dis Markers* 2013; 35(5): 331–335. doi: 10.1155/2013/984641.
39. Gericke B, Raila J, Sehoul J et al. Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2005; 5: 133. doi: 10.1186/1471-2407-5-133.
40. Kozak KR, Su F, Whitelegge JP et al. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005; 5(17): 4589–4596. doi: 10.1002/pmic.200500093.
41. Zheng X, Chen S, Li L et al. Evaluation of HE4 and TTR for diagnosis of ovarian cancer: comparison with CA-125. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2018; 47(6): 227–230. doi: 10.1016/j.jogoh.2018.03.010.
42. Gong G, Lin T, Yuan Y. Integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2020; 13(1): 30. doi: 10.1186/s13048-020-00632-9.
43. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3): 353–364. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80108-7.
44. Slabý O. *Molekulární Medicína*. 1. vyd. Praha: Galén 2015.
45. Klener P jr., Klener P. *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing s.r.o.; 2013.
46. Cibula D, Henzl M, Živný J. *Základy gynekologické endokrinologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing s.r.o. 2022.
47. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1): 198. doi: 10.1038/s41392-023-01460-1.
48. Bokhari SM, Hamar P. *Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D): an angiogenesis bypass in malignant tumors*. *Int J Mol Sci* 2023; 24(17): 13317. doi: 10.3390/ijms241713317.
49. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126(21): 4895–4902. doi: 10.1242/dev.126.21.4895.
50. Fruhauf F. *Diagnostika ovariálního karcinomu*. In: *Karcinom ovaria*. 2. vyd. Praha: Framakon Press, spol. s.r.o. 2023: 39–53.
51. Künnapuu J, Bokharaie H, Jeltsch M. Proteolytic cleavages in the VEGF family: generating diversity among angiogenic VEGFs, essential for the activation of lymphangiogenic VEGFs. *Biology (Basel)* 2021; 10(2): 167. doi: 10.3390/biology10020167.
52. Jha SK, Rauniyar K, Chronowska E et al. KLK3/PSA and cathepsin D activate VEGF-C and VEGF-D. *Elife* 2019; 8: e44478. doi: 10.7554/eLife.44478.
53. Chen R, Lee C, Lin X et al. Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 2019; 143: 33–39. doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.002.
54. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S et al. VEGF-C – induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007; 109(3): 1010–1017. doi: 10.1182/blood-2006-05-021758.
55. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002; 98(6): 946–951. doi: 10.1002/ijc.10283.
56. Song E, Mao T, Dong H et al. VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature* 2020; 577(7792): 689–694. doi: 10.1038/s41586-019-1912-x.
57. Ogawa S, Oku A, Sawano A et al. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998; 273(47): 31273–31282. doi: 10.1074/jbc.273.47.31273.
58. Shibuya M. *Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E*. *Cancer Sci* 2003; 94(9): 751–756. doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01514.x.
59. Komori Y, Nikai T, Taniguchi K et al. *Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper)*. *Biochemistry* 1999; 38(36): 11796–11803. doi: 10.1021/bi990562z.
60. Ferreira IG, Pucca MB, de Oliveira IS et al. *Snake venom vascular endothelial growth factors (svVEGFs): unravelling their molecular structure, functions, and research potential*. *Cytokine Growth Factor Rev* 2021; 60: 133–143. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.05.003.
61. De Falco S. *The discovery of placenta growth factor and its biological activity*. *Exp Mol Med* 2012; 44(1): 1–9. doi: 10.3858/emmm.2012.44.1.025.
62. Macarulla T, Montagut C, Sánchez-Martin FJ et al. *The role of PIGF blockade in the treatment of colorectal cancer: overcoming the pitfalls*. *Expert Opin Biol Ther* 2020; 20(1): 15–22. doi: 10.1080/14712598.2020.1677603.
63. Stacker SA, Achen MG. *Emerging roles for VEGF-D in human disease*. *Biomolecules* 2018; 8(1): 1. doi: 10.3390/biom8010001.
64. *Tissue expression of VEGFD – Summary – the Human Protein Atlas*. 2024 [online]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165197-VEGFD/tissue>.
65. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E et al. *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(2): 548–553. doi: 10.1073/pnas.95.2.548.
66. Tammela T, Alitalo K. *Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise*. *Cell* 2010; 140(4): 460–476. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.045.
67. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM et al. *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. *Science* 2015; 347(6220): 1260419. doi: 10.1126/science.1260419.
68. Byzova TV, Goldman CK, Jankau J et al. *Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns *in vivo**. *Blood* 2002; 99(12): 4434–4442. doi: 10.1182/blood.v99.12.4434.
69. Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S et al. *Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors*. *FASEB J* 2006; 20(9): 1462–1472. doi: 10.1096/fj.05-5646com.
70. Oliver G, Kipnis J, Randolph GJ et al. *The lymphatic vasculature in the 21st century: novel functional roles in homeostasis and disease*. *Cell* 2020; 182(2): 270–296. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.039.
71. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K et al. *Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins*. *Nat Immunol* 2004; 5(1): 74–80. doi: 10.1038/ni1013.

72. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438(7070): 946–953. doi: 10.1038/nature04480.
73. Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 2005; 7(2): 121–127. doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.017.
74. Clavin NW, Avraham T, Fernandez J et al. TGF-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(5): H2113–H2127. doi: 10.1152/ajpheart.00879.2008.
75. Ran S, Wilber A. Novel role of immature myeloid cells in formation of new lymphatic vessels associated with inflammation and tumors. *J Leukoc Biol* 2017; 102(2): 253–263. doi: 10.1189/jlb.1MR1016-434RR.
76. Lund AW, Wagner M, Fankhauser M et al. Lymphatic vessels regulate immune microenvironments in human and murine melanoma. *J Clin Invest* 2016; 126(9): 3389–3402. doi: 10.1172/JCI79434.
77. Song E, Mao T, Dong H et al. VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature* 2020; 577(7792): 689–694. doi: 10.1038/s41586-019-1912-x.
78. Lee CK, Jeong SH, Jang C et al. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. *Science* 2019; 363(6427): 644–649. doi: 10.1126/science.aav0173.
79. Naxerova K, Reiter JG, Brachtel E et al. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science* 2017; 357(6346): 55–60. doi: 10.1126/science.aai8515.
80. Kopfstein L, Veikkola T, Djonov VG et al. Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis. *Am J Pathol* 2007; 170(4): 1348–1361. doi: 10.2353/ajpath.2007.060835.
81. Yonemura Y, Endo Y, Tabata K et al. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Clin Oncol* 2005; 10(5): 318–327. doi: 10.1007/s10147-005-0508-7.
82. Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2004; 57(8): 829–834. doi: 10.1136/jcp.2003.015644.
83. George ML, Tutton MG, Janssen F et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001; 3(5): 420–427. doi: 10.1038/sj.neo.7900186.
84. Niki T, Iba S, Tokunou M et al. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6(6): 2431–2439.
85. Feng Y, Wang W, Hu J et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D as significant markers for assessment of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293(5): 802–812. doi: 10.1002/ar.21096.
86. Izawa N, Shitara K, Yonesaka K et al. Early tumor shrinkage and depth of response in the second-line treatment for KRAS exon2 wild-type metastatic colorectal cancer: an exploratory analysis of the randomized phase 2 trial comparing panitumumab and bevacizumab in combination with FOLFIRI (WJOG6210G). *Target Oncol* 2020; 15(5): 623–633. doi: 10.1007/s11523-020-00750-w.
87. Nixon AB, Sibley AB, Liu Y et al. Plasma protein biomarkers in advanced or metastatic colorectal cancer patients receiving chemotherapy with bevacizumab or cetuximab: results from CALGB 80405 (Alliance). *Clin Cancer Res* 2022; 28(13): 2779–2788. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2389.

ORCID autorky

M. Náležinská 0009-0005-2659-1157

*Doručeno/Submitted: 28. 9. 2024**Přijato/Accepted: 30. 10. 2024*

*MUDr. Monika Náležinská
Oddělení gynekologické onkologie
Klinika operační onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
monika.nalezinska@mou.cz*

Publikační etika: Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.**Publication ethics:** The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE uniform requirements for biomedical papers.**Konflikt zájmů:** Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie/práce nemají žádný konflikt zájmů.**Conflict of interests:** The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning the drugs, products or services used in the study.**Dedikace:** Podpořeno MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805). Při práci byly použity vzorky z Banky biologického materiálu MOÚ – Síť českých biobank (BBMRI.cz) registrační č.: LM2023033.**Dedication:** Supported by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805). Samples from the MMCI Biological Material Bank (BBMRI.cz) were used in the work – BBMRI.cz, registration No. LM2023033.**Poděkování:** Autoři článku děkují spolupracovníkům Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu za významnou pomoc s realizací výzkumného projektu. Jmenovitě prim. MUDr. Z. Čermákové, Ph.D., RNDr. Bc. I. Selingerové, Ph.D., a Mgr. K. Greplové. Dále děkujeme spolupracovníkům z oddělení Onkologické patologie Masarykova onkologického ústavu, MUDr. P. Fabianovi, Ph.D., a MUDr. R. Nenutilovi, Csc.**Acknowledgment:** The authors of the article would like to thank the staff of the Department of Laboratory Medicine and Department of Pathology of the Masaryk Memorial Cancer Institute for their significant help with the implementation of the research project. Namely prim. Z. Čermáková, MD, PhD, RNDr. B.Sc. I. Selingerová, PhD, and M.Sc. K. Greplová. We also thank the colleagues from the Department of Oncological Pathology of the Masaryk Institute of Oncology, P. Fabian, MD, PhD. and R. Nenutil, MD, Csc.