

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



**Stanovení nádorové mRNA u kolorektálního karcinomu jako
screeningové a prognostické metody**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Karel Rupert

Chirurgická klinika Fakultní nemocnice Plzeň

2007

Obsah:

I . Teoretická část	5
1. Anatomie tlustého střeva	5
1.1. Caecum – slepé střevo	6
1.2. Colon ascendens a hepatální flexura	8
1.3. Colon transversum a lienální flexura	8
1.4. Colon descendens	9
1.5. Colon sigmoideum	9
1.6. Rektum	10
1.6.1. Sliznice rekta	10
1.6.2. Svalovina rekta	12
1.6.3. Povrchová vrstva rekta	13
1.7. Tepenné zásobení tlustého střeva	13
1.8. Žilní odtok z tlustého střeva	14
1.9. Lymfatická drenáž tlustého střeva	15
1.10. Inervace tlustého střeva	17
2. Histologie tlustého střeva	18
2.1. Sliznice tlustého střeva	19
2.2. Podslizniční vazivo	21
2.3. Svalovina tlustého střeva	21
2.4. Serosa tlustého střeva	21
3. Obecná patologie nádorového růstu	22
4. Kolorektální karcinom	24
4.1. Epidemiologie	24
4.2. Etiologie a patogeneze	26
4.2.1. Predisponující změny	27
4.2.2. Genetický model kolorektálního karcinomu	28
4.3. Patologický nález	29
4.4. Histologie nádorů tlustého střeva (typing)	30
4.5. Šíření nádorů	31
4.5.1. Nejčastější predilekční místa metastáz	31
4.6. Klasifikace kolorektálního karcinomu	32
4.6.1. Anatomické dělení (dle lokalizace)	32
4.6.2. Staging	32
4.6.2.1. Dukesova klasifikace	33
4.6.2.2. Astler – Kollerova klasifikace	33
4.6.2.3. TNM klasifikace	33

4.6.2.4. Skupiny stadií kolorektálního karcinomu	34
4.6.3. Histopatologický grading	35
4.6.4. Reziduální nádor	35
4.7. Screening	36
4.7.1. Screening nerizikové populace	36
4.7.2. Screening rizikových skupin	37
4.7.2.1. Všechny formy difúzní střevní polypózy	37
4.7.2.2. Syndrom hereditárního nepolypózního karcinomu	38
4.7.2.3. Kolorektální karcinom u nejbližších příbuzných	38
4.7.2.4. Osobní anamnéza adenomatózního polypu nebo nádoru	39
4.7.2.5. Stav po odstranění adenomového polypu	39
4.7.2.6. Nespecifické střevní záněty	39
4.8. Diagnostika kolorektálního karcinomu	40
4.8.1. Anamnéza	40
4.8.2. Klinický obraz	40
4.8.2.1. Pravá polovina tračnicku	41
4.8.2.2. Levá polovina tračnicku	41
4.8.2.3. Rektum	41
4.8.3. Laboratorní vyšetření	42
4.8.3.1. Nádorové markery kolorektálního karcinomu	43
4.8.3.1.1. CEA (karcinoembryonální antigen)	43
4.8.3.1.2. CA 19-9	44
4.8.3.1.3. CA 72-4	44
4.8.3.1.4. Proliferační nádorové markery	45
4.8.3.1.5. Méně známé nádorové markery	45
4.8.4. Vyšetřovací metody	46
4.8.4.1. Endoskopie	46
4.8.4.2. Rentgenové metody	47
4.8.4.3. Sonografie	47
4.8.4.4. CT vyšetření	48
4.8.4.5. Magnetická rezonance	48
4.8.4.6. Další vyšetření	49
4.9. Léčba kolorektálního karcinomu	49
4.9.1. Chirurgická léčba	49
4.9.1.1. Elektivní výkony	49
4.9.1.2. Akutní výkony	53
4.9.1.3. Paliativní výkony	54
4.9.1.4. Chirurgická léčba metastáz	54
4.9.2. Radioterapie	55

4.9.3. Chemoterapie	55
4.9.4. Další možnosti léčby	56
4.10. Prognóza	56
4.11. Prevence a dispenzární péče	57
4.11.1. Diagnostika v průběhu follow up	58
II. Výzkumná část	61
1. Cíle projektu	61
2. Metodika	62
2.1. Metodika stanovení mRNA RT-PCR	62
2.1.1 Izolace RNA z tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu	62
2.1.2. Izolace RNA nádorových buněk z periferní krve	63
2.1.3. Metodika RT real-time PCR	65
2.2. Metodika stanovení nádorových markerů	66
3. Deskriptivní statistika základních souborů	67
3.1. Soubor Nádory	68
3.2. Ostatní kontrolní soubory	73
4. Výsledky	74
4.1. Exprese MMP-2, MMP-7 a TIMP-1, TIMP-2	74
4.2. Exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění	80
4.3. Korelace mezi hladinami exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	81
4.4. Ověření biologických vlastností resekčních linií kolorektálního karcinomu kvantitativní expresí mRNA CEA a TIMP-1	82
4.5. Exprese mRNA v periferní krvi kontrolních skupin	86
4.6. Exprese mRNA v periferní krvi skupiny Nádory	86
4.7. Sérové nádorové markery u kontrolních skupin	88
4.8. Sérové nádorové markery u skupiny Nádory	93
5. Diskuze	109
6. Souhrn	122
6.1. Summary	125
7. Splnění cílů projektu	129
III. Literatura	131
1. Použitá literatura	131
2. Literatura autora	143
IV. Přílohy	147

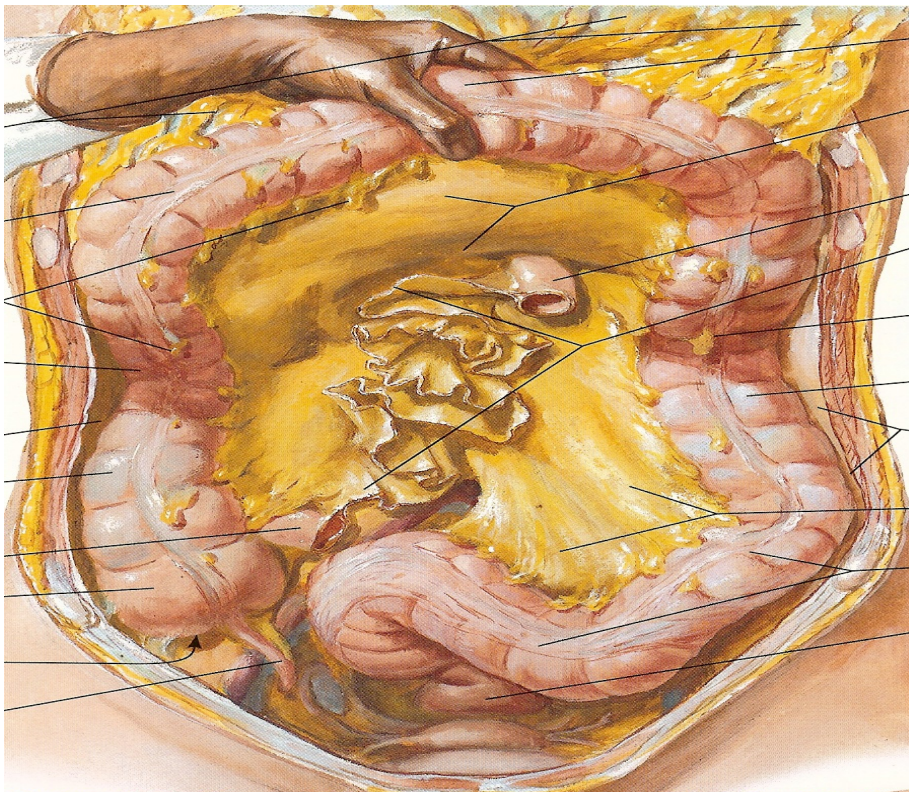
Rád bych poděkoval všem osobám, bez jejichž přispění by tato práce nemohla vzniknout. Svému školiteli doc. MUDr. Luboši Holubcovi, CSc. za poskytnutí námětu, odborné vedení a cenné rady. Dále všem spoluřešitelům Grantu IGA – NR 7894-3/2004 jmenovitě prof. MUDr. Vladimíru Třeškovi, DrSc., MUDr. Luboši Holubcovi ml., PhD., Mgr. Martinu Peštovi za odvedenou práci a cenné rady. Ing. S. Kormundovi děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků. MUDr. J. Koželuhové za pomoc při odběru vzorků kontrolních skupin. V neposlední řadě i všem svým kolegům z chirurgické kliniky FN Plzeň za odborné rady a cenné zkušenosti. Chci poděkovat i své rodině za trpělivost a projevovanou lásku.

I. Teoretická část

1. Anatomie tlustého střeva

Tlusté střevo je poslední část trávicí trubice, která přijímá chymus z tenkého střeva. Z něj vstřebává postupně vodu a elektrolyty a obsah je formován ve stolici. Na tomto procesu se podílejí i hnilobné a kvasné procesy vznikající působením mikroorganismů, jež jsou stálou součástí střevního obsahu. Tlusté střevo je úsek dlouhý 1,2 – 1,5 m, široký 7,5 až 4 cm, ve kterém za sebou následují caecum, colon ascendens, transversum, descendens, sigmoideum, rectum a anus. Mezi úseky tračníku jsou typická ohbí – flexura coli dextra (hepatica), flexura coli sinistra (lienalis) – obr. 1.

Obr. 1. Tlusté střevo (56)



Tlusté střevo je charakteristické svým větším průsvitem, tmavší barvou, utvářením povrchu i charakterem sliznice. Na povrchu jsou

viditelné tři podélně probíhající pruhy – taeniae coli, tvořené ztluštěním longitudinální vrstvy svaloviny. Taeniae se označují podle polohy na povrchu tlustého střeva.

Taenia mesocolica – vzadu, v místě mesocolon transversum.

Taenia omentalis – vpředu nahoře, v místě kde přes colon přechází a s ním srůstá omentum majus.

Taenia libera – vpředu dole, volně přístupná.

Všechny tři taeniae se sbíhají na apendix a tvoří zde souvislou vrstvu, obdobně se taeniae rozšiřují na přechodu esovité kličky a konečníku v souvislý plášť podélné svaloviny konečníku. V blízkosti taenií se vyskytují appendices epiploicae – tukovým vazivem vyplněné výběžky serózy tlustého střeva.

Tah taenií nakrčí střevo, takže vznikají zevně vyklenutá místa, haustra coli, a mezi nimi zevnitř patrné poloměsíčné řasy – plicae semilunares. (12, 56)

1.1. Caecum – slepé střevo

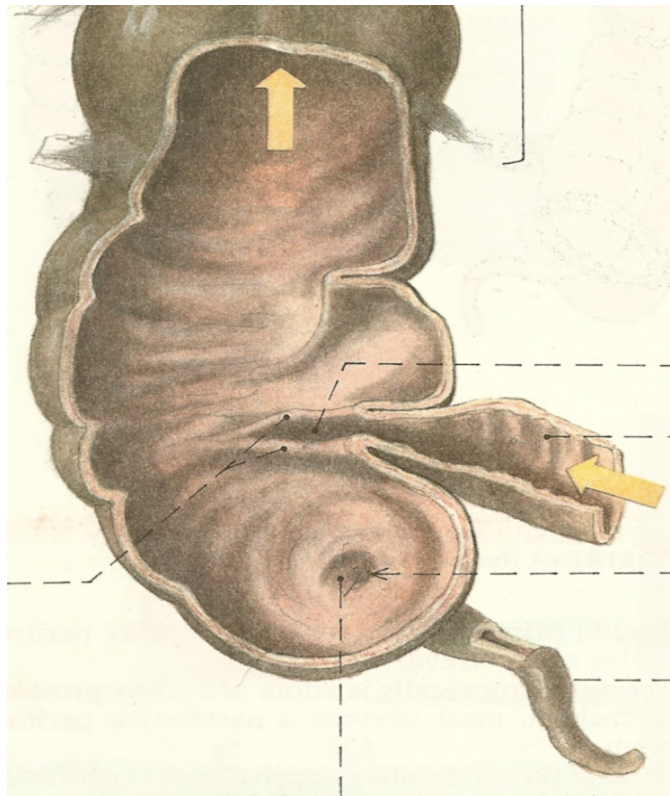
Slepé střevo vytváří vak v pravé jámě kyčelní kaudálně od ileocaecálního ústění. Caecum je 6-8 cm dlouhé a 6-7,5 cm široké. Dozadu se opírá o musculus iliacus a o musculus psoas major a je od jejich fascií odděleno nástěnným peritoneem, pod nímž zpravidla probíhá nervus cutaneus femoris lateralis. Caecum není svým slepým koncem dozadu přirostlé a ani nemá typický peritoneální závěs a vytváří tak recessus retrocaecalis, zdola volně přístupný prostor mezi střevem a nástěnným peritoneem. Zbylá část caeca je přirostlá k nástěnnému peritoneu jen malou částí svého dorsálního obvodu.

V případě, že není přirostlé a má zachovanou část mesenteria (mesocaecum), jedná se o perzistenci stavu z vývoje a bývá označováno

jako caecum liberum. Tento stav je často spojen s vysokou polohou caeca, někdy až v subhepatické oblasti.

Z mediální strany ústí do caeca ileum. Ostium ileocaecale je na slizniční straně upraveno jako chlopeň, která propouští chylus jen jedním směrem. Kaudálně od tohoto vústění se nalézá ostium appendicis vermiformis, které je vstupem do slepého výběžku caeca, označovaného jako appendix vermiformis – obr. 2.

Obr. 2. Caecum



Appendix má vlastní závěs – mesoappendix, v němž probíhá arteria appendicularis. Jsou popisovány různé polohy apendixu (positio pelvina, retrocaecalis, ileocaecalis, laterocaecalis, subcaecalis, praecaecalis). Pro appendix je také typická výrazně vyšší přítomnost lymfatické tkáně v jeho stěně a je považován za jeden z orgánů, kde část lymfocytů získává svou imunokompetenci. (12)

1.2. Colon ascendens a hepatální flexura

Colon ascendens navazuje na caecum a po pravé straně břišní dutiny směřuje kraniálně pod játra, kde hepatální flexurou (flexura coli dextra) přechází v colon transversum. Je dlouhé 12 – 16 cm a užší než ceacum. Prakticky nemá mesocolon, neboť to je tak krátké, že střevo proužkem svého zadního obvodu přímo srůstá se zadní stěnou dutiny břišní. V místě tohoto srůstu vymizelo i původní nástěnné peritoneum.

Colon ascendens naléhá na endoabdominální fascii kryjící musculus iliacus a musculus quadratus lumborum, na prerenální fascii dolního pólu pravé ledviny.

Hepatální flexura naléhá kraniálně na játra, dorsálně na dolní a laterální část pravé ledviny, mediálně na pars descendens duodeni a anteromediálně na žlučník. Někdy bývá flexura coli dextra spojena druhotnými peritoneálními řasami s játry (ligamentum hepatocolicum) a se žlučníkem (ligamentum cystocolicum). (12)

1.3. Colon transversum a lienální flexura

Colon transversum je dlouhé 50 – 60 cm a ve svém příčném průběhu dutinou břišní visí colon transversum kaudálně prohnuté. Vlevo lienální flexurou přechází v colon descendens. Lienální flexura (flexura coli sinistra) je uložena pod slezinou a tedy výše než flexura hepatica a je ostřejší.

Mesocolon transversum je závěs, který při pravém úseku colon transversum krátký (2 – 3 cm), při levém úseku delší (10 – 16 cm). Levý úsek příčného tračníku je tedy pohyblivější.

Úpon mesocolon transversum na zadní stranu dutiny břišní probíhá od středu přední plochy pravé ledviny, kříží pars descendens duodeni a caput pankreatis, pak prochází po dolním okraji těla pankreatu, nad flexura duodenojejunalis, až na přední plochu levé ledviny.

Mezi velkou kurvaturou žaludku a colon transversum je rozepjato ligamentum gastrocolicum, součást velké předstěry. Na colon transversum se připojuje v místě taenia omentalis. Délka tohoto ligamenta je různá v závislosti na stupni srůstů peritoneálních listů omenta, nejčastěji 2 - 4 cm. (12)

1.4. Colon descendens

Je užší než colon transversum (cca 4 cm), sestupuje kaudálně při levém okraji dutiny břišní v délce 22 – 30 cm od flexura lienalis do levé jámy kyčelní, kde plynule přechází v colon sigmoideum. Dorsálně se dotýká se symetrickými útvary jako colon ascendens na pravé straně. Nemá mesocolon a je širokým pruhem přirostlé se zadní stěnou břišní a v místě tohoto srůstu zcela chybí nástěnné peritoneum. (12)

1.5. Colon sigmoideum

Colon sigmoideum je dlouhé 30 – 40 cm a přechází od konce colon descendens z levé jámy kyčelní (od úrovně crista iliaca) kaudálně, pak zahýbá vzhůru a mediálně přes okraj malé pánve – přitom kříží za nástěnným peritoneem probíhající arteria et vena ilaca externa sinistra, při nižší poloze arteria et vena iliaca externa sinistra a arteria spermatica (ovarica), dále pak levý ureter.

Druhým ohbím pak zatáčí kaudálně před křížovou kost, kde v úrovni obratlů S2 a S3 přechází v konečník. Jedná se o nejužší oddíl tlustého střeva s průměrem kolem 3,7 cm.

Mesocolon sigmoideum je dobře vytvořený závěs colon sigmoideum a na zadní stěně probíhá stejně jako colon sigmoideum. (12, 56)

1.6. Rektum

Rektum je poslední část tlustého střeva, uložená v malé pánvi, dlouhá 12 – 16 cm, široká asi 4 cm. Otvor, jímž konečník ústí navenek, je označován jako anus. Naplněné rektum je trojitě bočně zakřivené, což je způsobeno zmnožením cirkulární svaloviny v místě Kohlrauschovy řasy, a dvojitě esovitě zakřivené předozadně a je tak rozděleno na flexuru sacralis a flexuru perinealis.

Kraniální část rekta je označována jako ampulla recti a je širší, dlouhá cca 10 – 12 cm a perineální flexurou přechází do druhého úseku označovaného jako canalis analis, který je dlouhý 2,5 – 3,5 cm, je užší a liší se i podélnou orientací slizničních řas. (12, 56)

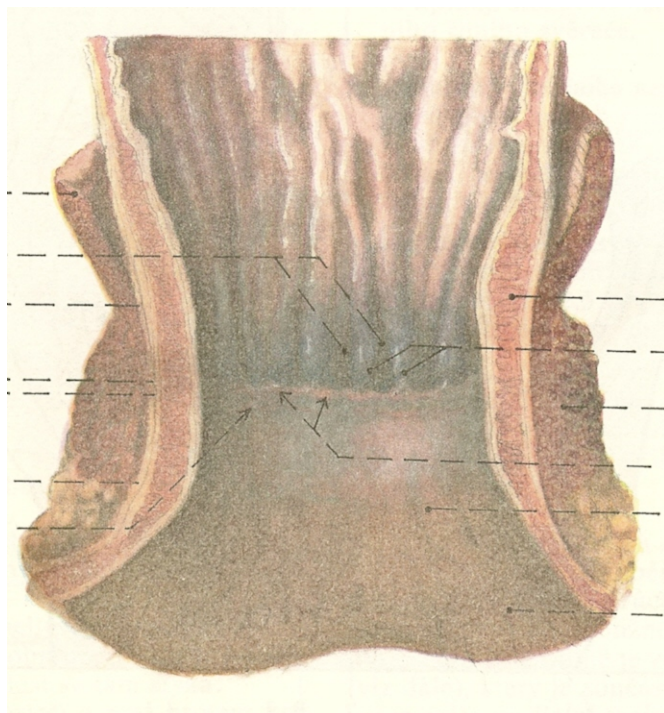
1.6.1. Sliznice rekta

V oblasti ampulla recti má stejnou barvu a vzhled jako v colon, nacházejí se zde však typické příčné poloměsíčité slizniční řasy vystávající z bočních stěn rekta. Jsou obvykle tři, horní a dolní řasy zleva, prostřední z pravé stěny – Kohlrauschova řasa ve vzdálenosti 6,5 – 7 cm od řitního otvoru. Linea anorectalis je hranice ampulární části rekta a análního kanálu procházející napříč rektem při hrotu kostrče. Na sliznici však není nápadná.

V canalis analis je sliznice bledší a prosvítají skrz ni žíly a nese podélné řasy označované jako columnae anales, rozložené v počtu 6 – 10 po celém obvodu análního kanálu kaudálně zakončené vkleslinou označovanou jako sinus analis a zakončené slizniční řasou ve tvaru příčných obloučků, které kaudálně zakončují sinus analis zvané valvulae anales. Tato oblast je označována jako zona haemorrhoidalis, neboť sliznice je zde podložena venozní pletením (plexus venosus rectalis) a zesílenou cirkulární svalovinou, která vytváří musculus sphincter ani internus – obr. 3.

Epitel sliznice rektu je v ampule cylindrický, jednovrstevný se schopností resorbce. Lieberkühnovy krypty jsou četné s množstvím pohárkových buněk, které jsou četnější i na volném povrchu sliznice. Slizniční žlázy ústící v místě sinus anales jsou složeny ze šesti tubulů a zasahují hluboko do stěny rektu, často až do musculus sphincter ani internus a jsou označovány jako glandulae anales.

Obr. 3. Sliznice rektu



V průběhu análního kanálu se postupně mění epitel sliznice. Typické jednovrstevný cylindrický epitel se místy stává více vrstevným, postupně mizí Lieberkühnovy krypty a cylindrický epitel zřetelnou hranicí přechází v epitel mnohovrstevný dlaždicový bez rohovění. Za vlastní hranici se považuje úroveň valvulae anales. Následně navazuje asi 15 mm široký světlejší pás sliznice označovaný jako pecten analis, který je zakončen nepravidelnou linea anocutanea, ve které končí mnohovrstevný dlaždicový nerohovějící epitel análního kanálu a začíná rohovějící kožní epitel řitního otvoru. (12, 36)

1.6.2. Svalovina rekta

Na rozdíl od ostatních částí tlustého střeva je charakteristická souvislým pláštěm zevní podélné vrstvy svaloviny a zmnožením cirkulární vrstvy v oblasti zona haemorrhoidalis, valvulae anales a pecten ani označovaná jako musculus sphincter ani internus, který končí těsně nad linea anocutanea.

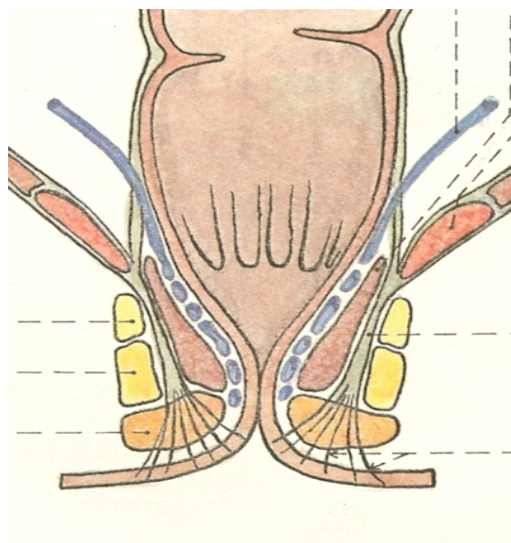
Ke svalovině rekta směrem od hráze se příkládá svěrač z příčně pruhované svaloviny zvenčí obemykající musculus sphincter ani internus a zdola přiložený k musculus levator ani. Skládá se ze tří částí.

Pars profunda je uložena nejkraniálněji těsně pod průchodem rekta skrze diaphragma pelvis a skládá se z mediálních svalových vláken, která jsou cirkulární a z laterálních vláken, která tvoří dopředu otevřenou vidlici, jejíž volné konce jsou fixovány k okraji hiatus urogenitalis. Pars profunda společně s musculus puborectalis tvoří nejdůležitější složku aparátu označovaného jako musculus compressor recti.

Pars superficialis obsahuje vlákna upořádaná převážně cirkulárně zakotvená vpředu na centrum tendineum perinei a vzadu na ligamentum anococcygeum, svým smrštěním zužuje anální kanál.

Pars subcutanea je podkožní prstenec svalových vláken, fixovaný pruhy vaziva a hladké svaloviny ke kůži okolo análního otvoru, kterou svým smrštěním vtahuje a zřasuje – obr. 4. (12)

Obr. 4. Svalovina rekta



1.6.3. Povrchová vrstva rekta

Spojené peritonea se stěnou rekta sahá nejkaudálněji na přední straně rekta – u žen do výše Kohlrauschovy řasy, u muže o něco výše – odkud peritoneum přechází u muže na močový měchýř a vytváří tak excavatio rectovesicalis, u ženy pak na dělohu a vytváří tak excavatio rectouterina (Douglassi). Tyto prostory jsou nejkaudálnějšími prostory peritoneální dutiny. Laterálně pak peritoneum vytváří recessus pararectales.

Od zanoření pod peritoneum je povrch rekta kryt vazivovou adventicií (fascia recti), která překračuje ze subserosního vaziva a zevně přechází v řidší vazivo, zvané paraproctium. U muže je vpředu rektum prostřednictvím listu tuhé fascie v úzkém kontaktu se zadní stěnou močového měchýře a s vesiculae seminales a tento list je označován jako septum rectovesicale, u žen septum rectovaginale vzhledem ke kontaktu se zadní stěnou vaginy. (12, 56)

1.7. Tepenné zásobení tlustého střeva

Tepny tlustého střeva jsou větve arteria mesenterica superior, a. mesenterica inferior a a. iliaca interna.

Pro caecum, colon ascendens a colon transversum odstupují z pravého boku a. mesenterica superior postupně a. ileocolica, ze které vystupují přední a zadní větve pro caecum, a. appendicularis, větve pro konec ilea a větve pro začátek colon ascendens, dále a. colica dextra, která nástěnným peritoneem přichází ke colon ascendens a a. colica media, která probíhá skrze mesocolon transversum k jeho pravé části.

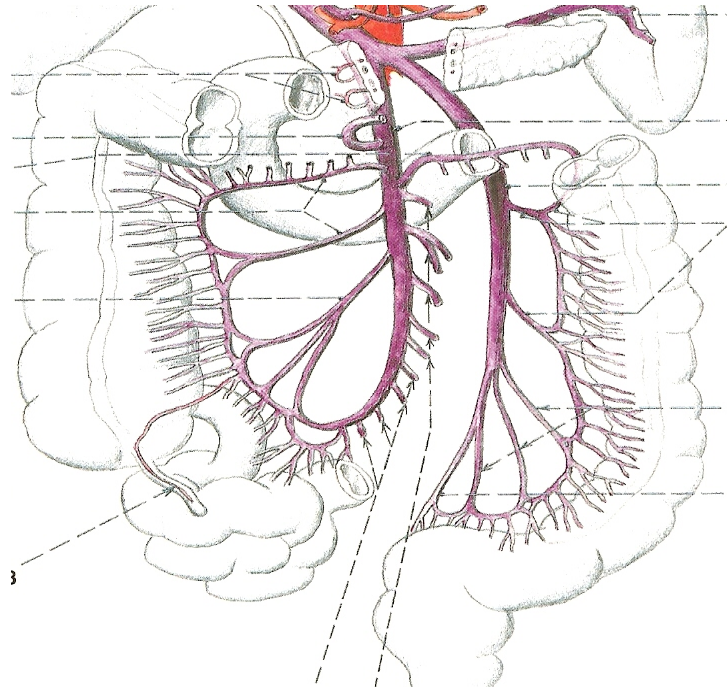
Ke zbývajícím částem colon transversum, colon descendens, colon sigmoideum a k rektu vystupují větve a. mesenterica inferior. Nejprve a. colica sinistra, jenž svou vzestupnou větví zásobuje okolí lienální flexury a zasahuje i do mesocolon transversum, kde vytváří anastomozu s větví a. colica media, označovanou jako anastomosis magna Halleri. Dolů a mediálně odstupují z kmene a. mesenterica inferior zpravidla dvě aa. sigmoideae a k horní části rekta a. rectalis superior. Zbývá část rekta je zásobena větvemi a. iliaca interna a to a. rectalis media, často přímo z kmene této tepny, a dále cestou a. pudenda interna větví označovanou jako a. rectalis inferior. Všechny tepny zásobující rektum spolu navzájem anastomozují, avšak tyto spojky nestačí k plnému zásobení sousedních úseků, jestliže je přítok některým ze zdrojů porušen. (12)

1.8. Žilní odtok z tlustého střeva

Žíly tlustého střeva probíhají podél výše uvedených tepen a za pankreatem vstupují do v. portae, která vzniká soutokem v. mesenterica superior a v. lienalis, do které zpravidla vstupuje před soutokem v. mesenterica inferior – obr. 5.

Spojky mezi vv. rectales inferiores a mediae, které odtékají cestou v. iliaca interna do v. cava inferior a v. rectalis superior, která odtéká cestou v. mesenterica inferior do v. portae představují jedny z portokaválních anastomoz, k jejichž zvětšení dochází při portální hypertenzi. (12)

Obr. 5. Žilní odtok z tlustého střeva

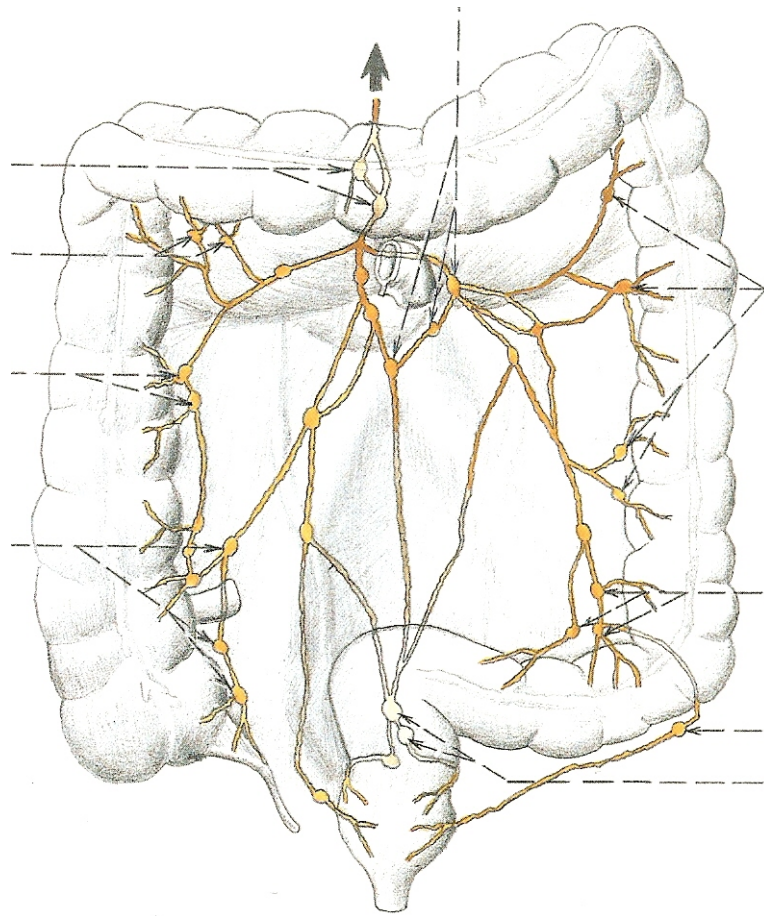


1.9. Lymfatická drenáž tlustého střeva

Mízní cévy tlustého střeva se sbírají ze sítí mízních kapilár ve vrstvách stěny střevní a jsou jako mízní kolektory podél tepen do uzlin, jejichž skupiny jsou nazvány podle tepen, při kterých leží.

Z oblasti cévního zásobení a. mesenterica superior do nodi lymphatici mesenterici superiores, z oblasti cévního zásobení a. mesenterica inferior do nodi lymphatici inferiores – obr. 6. (12)

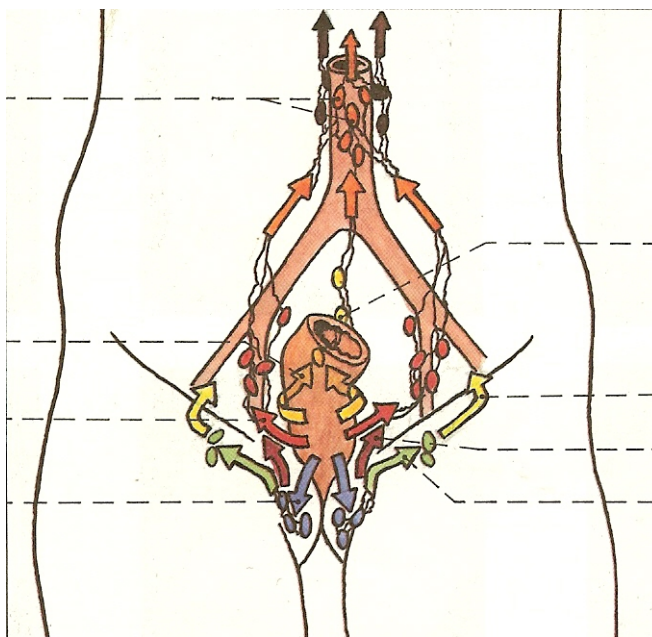
Obr. 6. Lymfatická drenáž tlustého střeva



Z dolní části rekta a z oblasti análního kanálu až po linea anocutanea jdou mízní cévy podél tepen do nodi lymphatici iliaci interni, předsunuté uzliny při bocích rekta se nazývají nodi lymphatici pararectales.

Z análního kanálu pod diaphragma pelvis a z oblasti análního otvoru jdou mízní kolektory dopředu po hrázi do tříselné krajiny do nodi lymphatici inguinales superficiales, z nich pak do nodi lymphatici iliaci externi. Část mízních cév od zadního okraje análního kanálu proráží do pánve a vstupuje do nodi lymphatici sacrales – obr. 7. (12)

Obr. 7. Lymfatická drenáž rekta



1.10. Inervace tlustého střeva

Inervaci tlustého střeva zajišťují především vlákna sympatiku a parasympatiku, již ke střevu přicházejí v pleteních podél tepen.

Parasympatická vlákna od začátku tlustého střeva až do hranice střední a levé třetiny colon transversum pocházejí z nervus vagus, od tohoto místa až do konce střeva pocházejí tato vlákna ze sakrálního parasympatiku cestou nn. splanchnici pelvici a plexus mesentericus inferior.

Sympatická přívodná vlákna přicházejí k tlustému střevu převážně z ganglia coeliaca, z ganglion mesentericum superius a z ggl. mesentericum inferius, podél stejnojmenných tepen, v pleteních smíšených s větvemi parasympatickými.

Senzitivní vlákna pro střevo jsou obsažena ve větších větvích vagových a v nervech sakrálního parasympatiku.

Ve stěně střevní pak nervy vytvářejí typické pleteně označované souhrnně jako plexus entericus, jehož jednotlivými součástmi jsou plexus subserosus, plexus myentericus a plexus submucosus. Na střevu působí

parasympaticus zvýšení kontrakcí a zrychlení peristaltiky a zároveň snižuje sekreci střevních žláz. Sympatikus působí opačně.

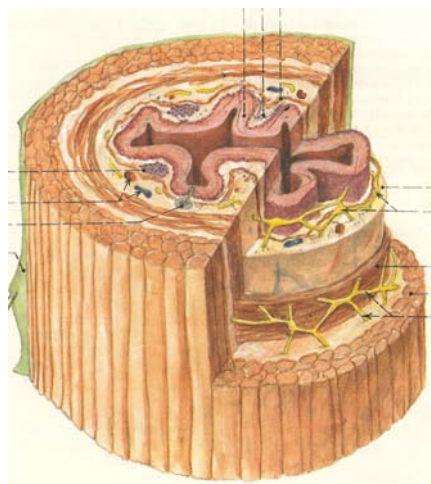
Svaly análního uzávěru dostávají nervová vlákna takto. Musculus sphincter ani internus ze sakrální části kmene sympatiku cestou nn. splanchnici sacrales, a ze sakrálního parasympatiku cestou nn. splanchnici pelvici. Sympatická vlákna vyvolávají sevření, parasympatická uvolnění vláken vnitřního svěrače.

Musculus sphincter ani externus dostává nn. rectales inferiores cestou n. pudendus (kořenově S3-S4), m. puborectalis (složka m. levator ani) dostává přímá vlákna z plexus sacralis, jež k němu přicházejí po horní ploše m. levator ani (kořenová vlákna přicházejí z míšních segmentů S3-S4). (12)

2. Histologie tlustého střeva

Stěna tlustého střeva se skládá ze čtyř vrstev – sliznice, podslizničního vaziva, svaloviny a serozy – obr. 8.

Obr. 8. Obecná stavba trávicí trubice

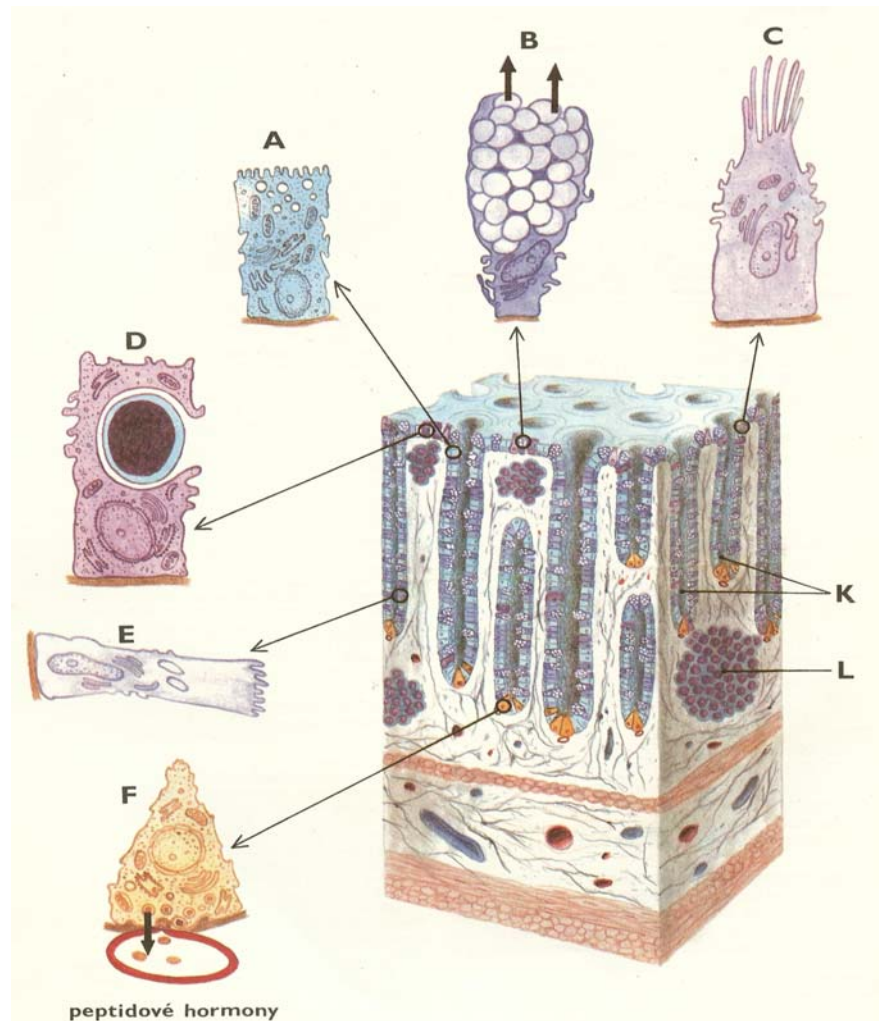


2.1. Sliznice tlustého střeva

Sliznice tlustého střeva je bledá, bez klků a je kryta jednovrstvným cylindrickým epitelem, obsahuje četné žlázy a jednoduché poměrně dlouhé Lieberkühnovy krypty. Mezi buňky sliznice patří enterocyty, buňky pohárkové, membránové a chomáčkové, mezi buňky vyskytující se v Lieberkühnových kryptách patří buňky pohárkové, nediferencované (kmenové) a endokrinní buňky – obr. 9. (12, 56)

Obr. 9. Sliznice tlustého střeva

A: enterocyt, B: pohárková buňka, C: chomáčková buňka, D: M-buňka, E: kmenová buňka, F: endokrinní buňka, K – krypta, L – lymfatická tkáň



Enterocyty mají řidší a nižší mikroklky než enterocyty tenkého střeva obsahují při lumenárním povrchu granula, která jsou buď hlenová

nebo obsahují imunoglobulin IgA jako ochranu sliznice před působením mikroorganismů střevní flory. Enterocyty vznikají diferenciací z kmenových buněk, které se před tímto procesem dělí a jen polovina se diferencuje a tím zůstává zachován jejich počet v Lieberkühnových kryptách střeva. Životnost enterocytu je odhadována na 2 dny.

Pohárkové buňky jsou roztroušené v celé sliznici tlustého střeva. Jejich hlavním obsahem jsou kapénky mucinu, které vyplňují apikální polovinu buňky a zatlačují jádro a další organely k bazální části buňky. Ta proto nabývá tvaru pohárku s nožkou. Vytlačovaný mucin vytváří na povrchu sliznice ochranný film a zvlhčuje povrch. Více než na povrchu sliznice jsou obsaženy v Lieberkühnových kryptách.

Membránové buňky (M-buňky) se vyskytují v místech, kde je pod epitelem nahromaděná lymfatická tkáň. Dovedou vytvořit jakousi kapsu, do které skrze bazální membránu vystoupí lymfocyty a M-buňky svou ztenčenou stěnou zprostředkují styk lymfocytů s prostředím tlustého střeva. Mimo to selektivně vychytávají z lumina střeva makromolekulární látky antigenní povahy a předávají je lymfocytům. Jsou tedy zapojeny do obranných mechanismů střevní sliznice.

Chomáčkové buňky se vyskytují ojediněle mezi enterocyty. Mají na povrchu chomáčky vyšších a silnějších mikrokloků, které vystupují nad úroveň ostatních enterocytů. Funkce těchto buněk není zatím známa, uvažuje se o funkci receptoru, přijímajícího podněty z lumina střeva.

Kmenové buňky jsou uloženy v Lieberkühnových kryptách, vyznačují se vysokou mitotickou aktivitou. Následnou diferenciací dceřinných buněk po mitóze kmenových buněk vznikají z poloviny tohoto počtu všechny buňky obsažené v sliznici tlustého střeva, druhá polovina zůstává nediferencována jako další generace kmenových buněk a jejich počet se tak výrazněji v průběhu stárnutí nemění.

Endokrinní buňky tlustého střeva produkují především enteroglukagon, který se podílí na metabolismu glukózy a dalším účinkem stimuluje motilitu střeva, a tzv. substanci P, která je též důležitým faktorem pro pohyb střeva.

Další vrstvou je slizniční vazivo, které obsahuje lymfatické uzlíky, jejichž maximální koncentrace je v apendixu, dále jsou poměrně časté v caeku, ve zbylém průběhu tlustého střeva jejich výskyt postupně klesá.

Lamina muscularis mucosae je dobře vytvořena a obsahuje cirkulární a podélné snopce svaloviny. (12, 56)

2.2. Podslizniční vazivo

Podslizniční vazivo je poněkud řidší vrstva kolagenního vaziva s bohatými sítěmi krevní i mízních cév, které odtud pronikají do jemnějších sítí slizničního vaziva. Je zde i pleteň nervová – plexus submucosus (Meissneri). (12)

2.3. Svalovina tlustého střeva

Svalovina tlustého střeva má typickou vnitřní cirkulární vrstvu, zevní longitudinální vrstva je tenká, mohutnější je jen v teaniích, kde je zahuštěná. Místní nahromadění cirkulárních snopců v různých místech kolon je považováno za funkční sfinktery regulující pasáž střevem a jsou ve všech úsecích tlustého střeva. V tenké vrstvičce vaziva mezi oběma vrstvami svaloviny je uložen nerový plexus myentericus (Auerbachi). (12)

2.4. Serosa tlustého střeva

Serosa tlustého střeva je tvořena peritoneem, které v blízkosti taenií vytváří výběžky, které jsou často delší a stopkaté, vyplněné tukovým vazivem – appendices epiploicae. Vytvářejí se již ve fetálním období, kdy však neobsahují tuk a jejich význam je nejasný. (12)

3. Obecná patologie nádorového růstu

Při posuzování biologické povahy nádorového procesu je užitečné si částečně zachovat oddělený pohled na nádorově transformovanou buňku v podmínkách *in vitro* a na rakovinu jako nemoc (*in vivo*). Izolované nádorové buňky vykazují v tkáňové kultuře některé typické charakteristiky, jako je immortalita, ztráta kontaktní inhibice a hustotní limitace růstu nebo onkogenicita. Existuje zjevné pojitko mezi těmito vlastnostmi a vývojem rakoviny jako onemocnění, avšak uvedené charakteristiky nevystihují tuto nemoc v celé její šíři. Aby mohlo vůbec dojít k pomnožení nádorových buněk *in vivo*, musí tyto buňky nejprve proklouznout systémem komplexního imunitního dozoru. Jen soubor této a dalších vlastností může definovat rakovinu jako nemoc a jen některé z nich jsme přitom schopni studovat na úrovni *in vitro*.

Jednou z nejcharakterističtějších vlastností maligních nádorů je určitá tendence k postupné progresi od benigního k malignímu a konečně metastatickému fenotypu. Při tomto procesu hrají zásadní roli následující vlastnosti nádorových buněk. (60)

Vlastností nádorových buněk je jejich klonální povaha, tzn. že celá sekvence nádorové progresi začíná u jediné transformované buňky. (60)

Na genetické úrovni jsou v tomto ohledu zásadní dva procesy - postupující akumulace genetických změn podél dráhy nádorové progresi a selektivní interakce nádorových buněk s okolními stromálními a infiltrujícími imunitními a zánětlivými buňkami.

Většina nádorových buněk je charakterizována snížením sumárního množství přirozených antigenů všech typů, což souvisí s jejich špatnou identifikovatelností vlastním imunitním systémem a projevuje se možností dlouhodobého přežívání. Na druhé straně takřka u všech experimentálních nádorů a i u většiny „spontánních“ zvířecích nádorů byly v jejich

parenchymových buňkách nalezeny neoantigeny specifické pro nádorovou buňku. Část z nich je při odpovídající imunizaci schopna standardně vyvolat proti sobě dobře detekovatelnou reakci autoimunního systému.

Část nádorových antigenů je transformovanou buňkou prezentována mimo membránový povrch a mnohdy jsou solubilně vyplavovány do oběhu hostitele. Jsou využitelné diagnosticky, nebo při sledování průběhu nádorové choroby, ale neuplatňující se v patogenezi nádorové choroby. Příkladem jsou onkofetální a embryonální stadiální antigeny přítomné na embryonální tkáni v určitém stadiu vývoje a nepřítomné v diferencovaných netransformovaných buňkách dospělého organismu, ale běžně nacházené v nádorových buňkách a séru nositelů řady nádorů. Patří sem např. α -fetoprotein (AFP) a karcinoembryonální antigen (CEA). (60)

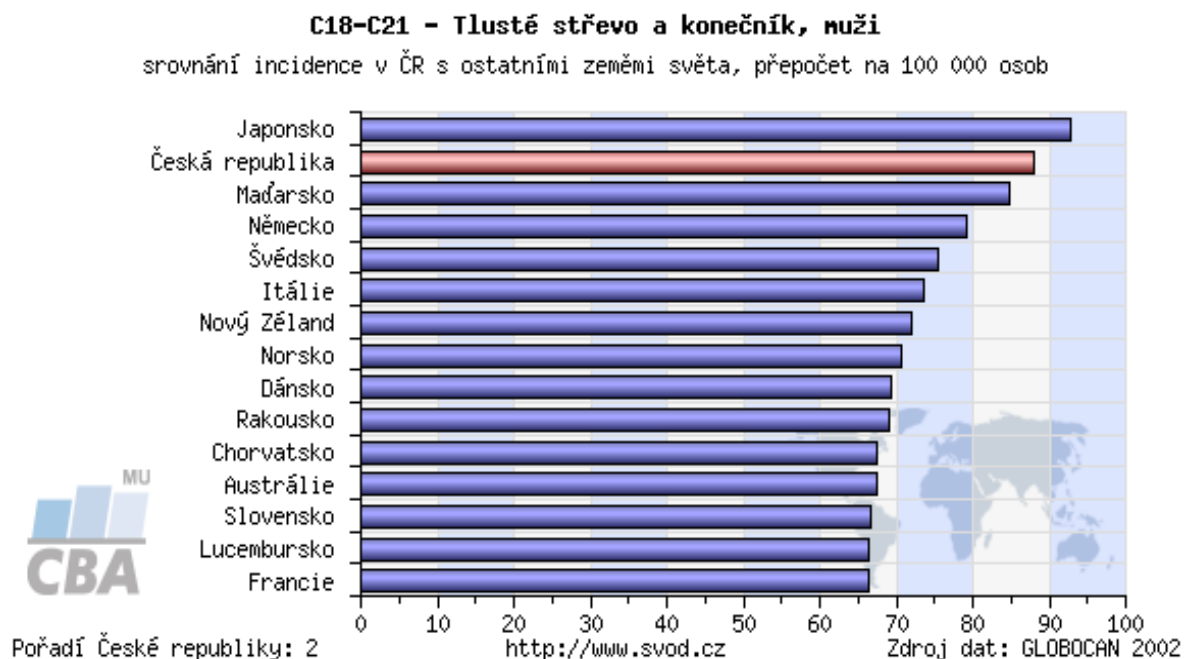
Proces onkogeneze na buněčné úrovni je úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy (programované buněčné smrti). Výše jmenované procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Většina nádorových buněk obsahuje mnohočetné genetické změny, které podporují proces onkogeneze právě poškozováním důležitých kontrolních drah. U nádorových onemocnění se takřka pravidelně setkáváme se dvěma základními typy genetických poškození. Prvním typem poškození jsou dominantní poruchy protoonkogenů a druhým typem jsou recesivní poruchy antionkogenů. Genetické poruchy, které ovlivňují protoonkogeny, jsou zodpovědné za vyvolání stimulačních účinků, zatímco poruchy ovlivňující antionkogeny jsou zodpovědné za ztrátu jejich inhibiční funkce. (39)

4. Kolorektální karcinom

4.1. Epidemiologie

Nádory tlustého střeva a konečníku jsou celosvětově frekvencí svého výskytu a celkovou úmrtností třetím nejčastějším nádorovým onemocněním. (36) V České republice tvoří kolorektální karcinom 17,6 % všech nádorů u mužů a 15,6 % všech nádorů u žen, což představuje s karcinomem plic hlavní nádorovou lokalizaci. (4) V Asii či v Africe incidence tohoto onemocnění vykazuje značný pokles. V USA a v zemích západní Evropy se incidence příliš nemění, naproti tomu ve státech střední a jihovýchodní Evropy dramaticky narůstá – graf 1. (36)

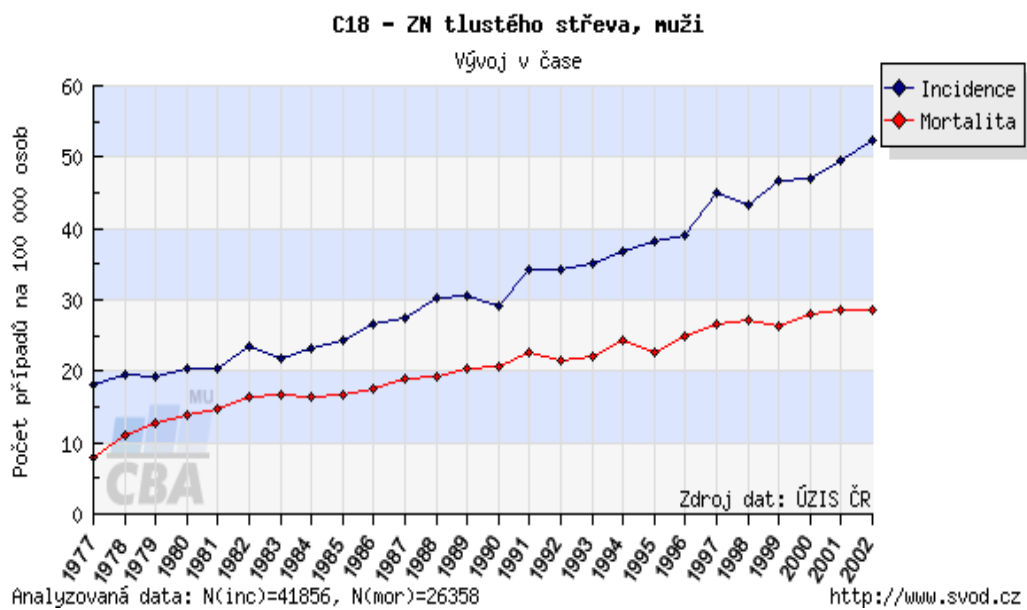
Graf 1. Incidence kolorektálního karcinomu ve světě



V České republice je v produktivním věku od 35 do 64 let incidence zhoubného nádoru tlustého střeva v Evropě nejvyšší u mužů a pátá nejvyšší u žen. U nádorů konečníku je v České republice incidence v této věkové kategorii nejvyšší v Evropě u mužů i u žen (44).

Incidence výrazně narůstá s věkem (ve věku 50 let: 0,39 nemocných na 1000 obyv./rok; ve věku 80 let: 4,5 nemocných na 1000 obyv./rok). Nejvyšší výskyt je v pozdním věku nad 70 let, kde kolorektální karcinom tvoří 21,2 % všech nádorů u žen (je na prvním místě před nádory prsu) a 20,2 % všech nádorů u mužů (kde je na druhém místě po plicních nádorech) – graf 2. (58)

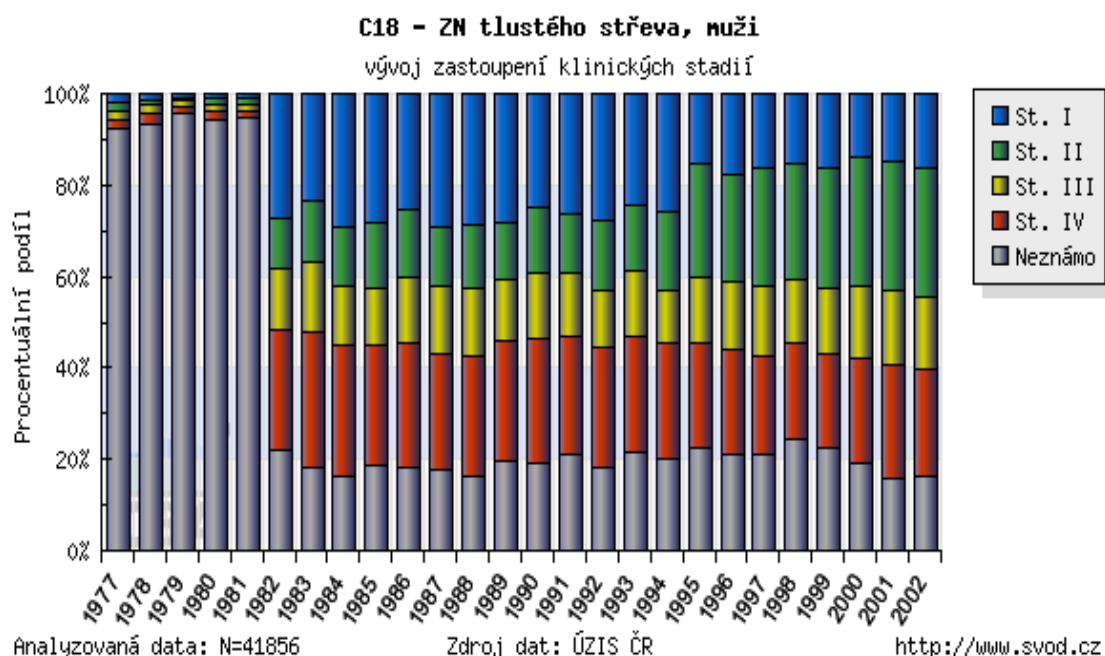
Graf 2. Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR



Nádory tlustého střeva se vyskytují stejně často u mužů jako u žen, nádory konečníku jsou častější u mužů (1,5:1). Synchronní nádory tlustého střeva, tzn. 2 nebo více tumorů, které se vyskytují současně se nachází u 2 - 5 % nemocných; metachronní nádory (tzn. nová primární léze u nemocného, kde již dříve byla provedena resekce pro karcinom) jsou popisovány u 20 - 30 % nemocných (25). Zastoupení jednotlivých stadií kolorektálního karcinomu nejlépe charakterizuje následující graf – graf 3.

Varovný je fakt, že Česká republika má u nádorů kolorekta celosvětově nejvyšší mortalitu (52,7/100.000 obyv.) ve srovnání např. s Albánií (4,2/100.000 obyv.), kde je nejnižší. (36)

Graf 3. Zastoupení klinických stadií kolorektálního karcinomu v ČR



4.2. Etiologie a patogeneze

Na vzniku kolorektálního karcinomu se podílejí jednak faktory hereditární a dále faktory exogenní. Faktory exogenní odpovídají především za výskyt nádorů v sestupném tračníku, sigmoideu a konečniku. Faktory hereditární odpovídají především za familiární výskyt karcinomů v oblasti céka a vzestupného tračníku. (4, 5)

Mezi exogenní faktory patří nadbytek tuků v potravě, nedostatek fermentabilní vlákniny v potravě, nevhodná tepelná úprava stravy, nadměrná exkrece žlučových kyselin do stolice, nedostatek vápníku v potravě (snížená schopnost detoxikace žlučových kyselin ve střevě), nedostatek vitamínů A, C, E a selenu (snížená ochrana před toxickým efektem volných kyslíkových radikálů) a v neposlední řadě i kouření a alkohol, které jsou významné především v oblasti konečniku.

Mezi hereditární faktory patří především syndromy mnohotné adenomatózní polypózy (Familiární adenomatózní polypóza, Gardnerův syndrom, Turcotův syndrom), což jsou familiární autozomálně dominantní onemocnění zapříčiněné mutací APC genu – 5 q; riziko maligního zvratu je až 100 %, a to již ve věku 20 - 25 let. Dále syndromy familiárního výskytu nepolypózních karcinomů tlustého střeva (Lynchův syndrom I, II), kdy většinou dochází k mutaci alel genu hMSH2-2q, hMLH1-3q popř. hPMS1, hPMS2. Charakteristický je autozomálně dominantní typ přenosu, časný začátek onemocnění (i u osob mladších 40 let), dále výskyt synchronních a metachronních tumorů.

4.2.1. Predisponující změny

Adenomatózní polypy jakékoli etiologie, kdy riziko maligního zvratu závisí na velikosti a histologické skladbě polypů. Adenomy větší než 2 cm vykazují signifikantně vyšší tendenci k malignímu zvratu a riziko maligního zvratu stoupá od tubulárních, přes tubulovilózní a vilózní adenomy, maligní zvrát se uvádí ve 30 – 50 %. Riziko malignizace adenomů ve vztahu k velikosti a histologickému typu je znázorněno v tab. č. 1 (64).

Tab. 1. Riziko malignizace adenomů ve vztahu k velikosti a histologickému typu

	Riziko malignizace adenomu		
Velikost polypu	Tubulární	Tubulovilózní	Vilózní
< 1 cm	1%	4%	10%
1-2 cm	10%	7%	10%
> 2 cm	35%	46%	53%

Pouze malá část karcinomů vzniká *de novo*, přes 90 % většiny adenokarcinomů vzniká z adenomů. (73) Na malignizaci se podílejí somatické mutace onkogenů a genů potlačujících nádory, mutaci *genu APC* lze prokázat u 50 – 60 % malých adenomů. (43)

Ulcerózní kolitida je autoimunním onemocněním tlustého střeva, při kterém je maligní zvrát častý, pravděpodobnost stoupá s délkou trvání kolitidy - 5 % po 20 letech, 12 % po 25 letech, dokonce v totálním tvaru je pravděpodobnost vzniku karcinomu až 35 %.

Dalším z autoimunních chorob postihujícím střevo je Crohnova choroba. Maligní zvrát je méně častý než u ulcerózní kolitidy, karcinomy vznikají obvykle v postižené části střeva, ale mohou být též metachronní, či se vyskytovat v jizvě po předcházející operaci.

V neposlední řadě je predisponujícím faktorem i předcházející karcinom tlustého střeva, který znamená zvýšené riziko vzniku nového karcinomu, dále předcházející ozáření malé pánve pro nádorové onemocnění též zvyšuje riziko nádoru tlustého střeva především v oblasti sigmatu.

4.2.2. Genetický model kolorektálního karcinomu

Genetický model vzniku kolorektálního karcinomu předpokládá mutaci protoonkogenů a inaktivaci tumor supresorových genů. (4) Pro vznik nádorového onemocnění musí dojít ke kumulaci těchto změn. Ke genetickým změnám (mutacím) vedou mutageny, kterými mohou být rozličné exogenní faktory. Navíc mutací pozměněné geny jsou citlivější na změny zevního prostředí. Protoonkogeny jsou normální geny, které mohou být aktivovány mutací jedné alely. Takto aktivované proonkogeny se nazývají onkogeny. Narušují normální buněčný růst a celulární diferenciaci. U kolorektálního karcinomu svědčí řada údajů o velkém

významu mutace *K ras* genu při vzniku dysplazií a v kancerogenezi. *K ras* gen je nejčastějším onkogenem. (50)

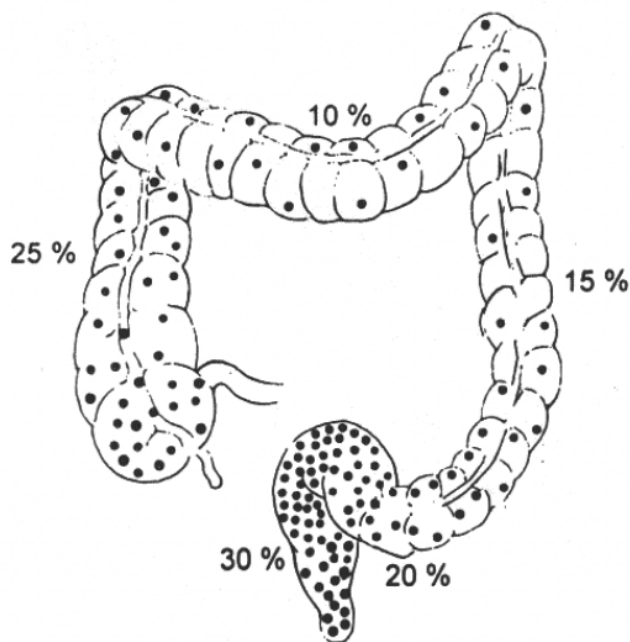
Tumorsupresorové geny (antionkogeny), respektive jejich proteinové produkty, kontrolují normální buněčnou proliferaci a diferenciaci. Při selhání této kontroly přejde diferenciaci normálních kolonocytů do nádorové transformace. Ztráta funkce (inaktivace) při velké chromozomální aberaci obou kopií supresorových genů (otcovské a mateřské) má závažný význam v kancerogenezi kolorektálního karcinomu. Jde především o *gen p 53* (na krátkém raménku 17. chromozomu – *p 17*), *APC gen* (na dlouhém raménku 5. chromozomu – *q 5*) a *DCC gen – q 18*. Ztráta heterozygosity (mutace a delece) těchto genů se zásadně podílí na přeměně adenomu v karcinom a na vývoji malignity. Tyto změny jsou zjištěné u 70 – 80 % kolorektálních nádorů. V poslední době se ukazuje, že existují ještě další geny s vlastnostmi tumorsupresorových genů: *JV 18*, *DPC 4*, *MADR 2*, což poukazuje na skutečnost, že genetický model kancerogeneze kolorektálního karcinomu je složitější, než se zprvu zdálo. (4, 36, 43)

4.3. Patologický nález

Distribuce karcinomu tlustého střeva je znázorněna na obr. č. 10, kde v oblasti rektosigmoidea je lokalizováno zhruba 50 – 60 % karcinomů. Deset procent je v dosahu palpujícího prstu. (36, 73)

Makroskopicky se kolorektální karcinom může jevit jako exofytický (polypoidně) rostoucí nádorová hmota nebo nádor infiltrující stěnu střevní označovaný jako difusní typ nebo exulcerovaný útvar nebo jako plochý (superficiální) typ.

Obr. 10. Distribuce karcinomu tlustého střeva a konečníku (100)



4.4. Histologie nádorů tlustého střeva (typing)

Histologicky se jedná z 90 - 95 % o tubulární adenokarcinom, dále lze histologicky zastihnout mucinosní karcinom, karcinom z prstenčitých buněk, adenoskvamózní karcinom, medulární či anaplastický karcinom. Ostatní histologické typy se vyskytují poměrně zřídka, jedná se především o karcinoid, sarkomy, hematologické neoplazie atd. (4, 73, 76). Typing - stanovení histologického typu nádoru

Podrobnější popis zahrnuje i buněčnou stavbu nádoru. Mucinózní buňky tvaru pečetního prstenu a malobuněčné nádory jsou varianty běžného adenokarcinomu. Typing poskytuje další informace vzhledem k prognóze. Malobuněčné nádory a nádory z buněk tvaru pečetního prstenu mají špatnou prognózu, nádory s mucinózní složkou velmi často místně recidivují.

4.5. Šíření nádorů

Kolorektální karcinom se může šířit různým způsobem. První možností je přímé rozrůstání nádoru, kdy karcinom roste cirkulárně, podélné submukózní šíření se děje v intramurální lymfatické tkáni, postupně nádor penetruje vnější vrstvy stěny střevní a může prorůstat do okolních struktur.

Další možností je jeho hematogenní rozsev, kdy nádor nejčastěji proniká do žil střeva a cestou vena portae vytváří jaterní metastázy; cestou lumbálních a vertebrálních žil plicní metastázy. Rektální karcinom se též šíří cestou hypogastrických žil.

Nejčastější formou šíření nádoru je vytváření regionálních lymfatických metastáz, kdy se tumor šíří především podél extramurálních lymfatických cest.

Pokud primární tumor proniká serózou střeva, může dojít k odlučování jednotlivých nádorových buněk, které se pak místně implantují po peritoneu a vytvářejí tak intraperitoneální metastázy.

Odlučováním maligních buněk a jejich transportem ať už stolicí či nešetrnou manipulací peroperačně mohou vznikat intraluminární metastázy, které pak mohou být příčinou recidivy onemocnění. (4, 18, 73, 76)

4.5.1. Nejčastější predilekční místa metastáz

Nejčastěji postiženým orgánem jsou játra. Až 25 % pacientů má jaterní metastázy v době primární diagnózy, u dalších 50 % dojde k vývinu jaterních metastáz v průběhu follow up. (5)

Méně často jsou postiženy plíce, mozek, skelet, peritoneum, u žen ovária.

4.6. Klasifikace kolorektálního karcinomu

4.6.1. Anatomické dělení (dle lokalizace)

Dle kriterií UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (69) je anatomické dělení nádorů střeva a konečníku následující:

Kolon:	Apendix	(C18.1)
	Cékum	(C18.0)
	Vzestupný tračník	(C18.2)
	Hepatická flexura	(C18.3)
	Příčný tračník	(C18.4)
	Lienální flexura	(C18.5)
	Sestupný tračník	(C18.6)
	Sigmoideum	(C18.7)
Rektum:	Rektosigmoideum	(C19.9)
	Rektum	(C 20.9)

4.6.2. Staging

Základní parametry pro určení stupně stagingu jsou stupeň penetrace nádoru střevní stěnou, stupeň postižení regionálních uzlin a přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz. Doposud bylo vymyšleno mnoho stagingových systémů, ale žádná z těchto užívaných klasifikací není zcela dostačující.

Nejstarší a zároveň nejrozšířenější je Dukesova klasifikace, vzniklá před více než 60 lety, rozděluje pacienty dle stupně postižení na stadia A - C. V roce 1967 byla Dukesova klasifikace doplněna Turnbullem a kol. o stadium D. Z Dukesovy klasifikace vychází i Astler-Kollerova klasifikace, která se dosud hojně užívá především v německy mluvících zemích. V poslední době je nejvíce přijat systém TNM klasifikace, vyvinutý za pomoci American Joint Committee on Cancer (AJCC) and Union

Internationale Contre le Cancer (UICC), jehož současná podoba byla přijata v roce 1988. (3, 4, 5, 69)

4.6.2.1. Dukesova klasifikace

- A:** Nádor neprorůstá muskularis propria
- B:** Nádor prorůstá muskularis propria
- C:** Postižení regionálních lymfatických uzlin
- D:** Vzdálené metastázy (doplněno Turnbullem a spol. v r. 1967)

4.6.2.2. Astler – Kollerova klasifikace

- A:** Tumor neproniká mukózou - karcinoma in situ
- B1:** Tumor proniká muskularis mukóza, ale ne muskularis propria
- B2:** Tumor proniká muskularis propria
- C1:** Stadium B1 s postižením lymfatických uzlin
- C2:** Stadium B 2 s postižením lymfatických uzlin
- D:** Vzdálené metastázy

4.6.2.3. TNM klasifikace

V TNM klasifikaci písmeno T udává informace o primárním tumoru, N informuje o stupni postižení lymfatických uzlin a M o přítomnosti eventuelně nepřítomnosti vzdálených metastáz.

- TX:** Primární nádor nemůže být detekován
- T0:** Primární tumor nenalezen
- Tis:** Karcinoma in situ - neprorůstá mukózou
- T1:** Tumor proniká submukózou
- T2:** Tumor proniká muskularis propria
- T3:** Tumor proniká skrze muskularis propria do subserózy nebo do neperitonealizované perikolické či perirektální tkáně

T4: Tumor proniká viscerálním peritoneem nebo přímo do okolních orgánů a struktur

NX: Regionální lymfatické uzliny nemohou být posouzeny

N0: Bez metastáz v regionálních uzlinách

N1: 1 - 3 metastázy v perikolických nebo perirektálních lymfatických uzlinách

N2: Metastázy ve 4 nebo více perikolických nebo perirektálních lymfatických uzlinách

N3: Metastázy v uzlinách podél cévních struktur

MX: Přítomnost vzdálených metastáz nemůže být posouzena

M0: Vzdálené metastázy nejsou přítomny

M1: Vzdálené metastázy jsou přítomny

4.6.2.4. Skupiny stadií kolorektálního karcinomu

Stadium 0: Tis, N0, M0

Stadium I: T1 nebo T2, N0, M0

Stadium II: T3 nebo T4, N0, M0

Stadium III: jakékoliv T, N1-3, M0

Stadium IV: jakékoliv T nebo N, M1

Vzájemná korelace nejčastěji používaných klasifikací (tj. TNM a Dukesovy) se stadii dle UICC je uvedena v tabulce č. 2.

Vzhledem k závazným doporučením, která jsou platná v České republice, používá autor ve výsledkové části práce TNM klasifikaci. (75)

Tab. 2. Korelace TNM a Dukesy klasifikace se stagingem dle UICC

UICC stadium	TNM klasifikace			Dukes
	T	N	M	
0	Tis	N0	M0	
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	
II	T3	N0	M0	B
	T4	N0	M0	
III	Tx	N1-3	M0	C
IV	Tx	Nx	M1	D

4.6.3. Histopatologický grading

Histopatologický grading odráží ve svém hodnocení stupeň diferenciací nádorových buněk a je tedy důležitým prognostickým faktorem.

- GX:** Grading nemůže být stanoven
- G1:** Dobře diferencované tumory
- G2:** Středně diferencované tumory
- G3:** Málo diferencované tumory
- G4:** Nediferencované tumory

4.6.4. Reziduální nádor

Tato klasifikace patří k tzv. nezávažným deskriptorům charakterizujícím nádorové onemocnění. Používána je především v německy mluvících zemích. (4) Postterapeuticky je charakterizována takto :

- R₀:** Žádný reziduální nádor
- R₁:** Mikroskopický reziduální nádor
- R₂:** Makroskopický reziduální nádor

4.7. Screening

Na základě zjevných skutečností, které potvrzují skutečnost, že délka přežití po diagnostikování kolorektálního karcinomu je závislá především na včasnosti záchytu tohoto onemocnění, se jeví screening tohoto onemocnění jako nezbytný. Vzhledem k neexistenci jednoznačného screeningového parametru je screeningový proces odlišný pro nerizikovou skupinu populace a pro rizikové skupiny.

Nádorové markery (CEA, CA19-9) nejsou pro svoji nízkou senzitivitu a specificitu vhodné pro screening kolorektálního karcinomu ani u asymptomatické populace, ani u vysoce rizikových skupin. (21) Jako perspektivní se jeví u vysoce rizikových skupin provádění PCR diagnostiky k přesnému určení familiární zátěže. (35, 50, 73)

Dosavadní široký populační screening prováděný kombinací vyšetření stolice na OK a endoskopie vedl sice ke snížení incidence pokročilých nádorů, ale nebylo prokázáno prodloužení celkové doby přežití (24). Nicméně práce publikované v České republice poukazují na přínos (zdravotní i ekonomický) vyšetření stolice na OK ve screeningových programech a je kladně hodnocen i ve screeningových doporučeních. (75)

4.7.1. Screening nerizikové populace

Účinnost screeningových doporučení u nerizikové asymptomatické populace je stále předmětem diskuze. (25, 75) Doporučený screeningový plán u nerizikových osob je následující:

- od 40 let každoročně digitální vyšetření rekta
- od 45 let doplnit vyšetřením stolice na okultní krvácení (OK) - vzhledem k vysoké specificitě a relativně malému počtu falešných pozitivit je vyšetření stolice OK závazně doporučeno také v ČR (75)
- od 50 let koloskopie každých 3 - 5 let (předmětem diskuze)

4.7.2. Screening rizikových skupin

Vzhledem k poměrně široké paletě různých rizikových skupin, je screeningový plán logicky rozdělen podle závažnosti jednotlivých skupin a je i upraven dle patofyziologie jednotlivých příčin. (36, 73, 75, 76)

4.7.2.1. Všechny formy difúzní střevní polypózy

(**syndrom FAP, Gardnerův syndrom, Turcotův syndrom ...**)

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je autozomálně dominantně dědičná choroba (mutace supresorového APC genu krátkého raménka 5. chromozomu) charakterizovaná výskytem mnohočetných polypů (stovky) tračnicku s vysokým rizikem malignizace.

Gardnerův syndrom je obdoba FAP spojená s výskytem mezenchymových nádorů (osteom, exostózy, kožní cysty, karcinom ŠŽ, fibromatóza břišní stěny)

Turcotův syndrom je vzácná kombinace FAP s nádory CNS, nejčastěji gliomy.

Peutzův – Jeghersův syndrom je autozomálně dominantní syndrom projevující se melaninovou pigmentací bukalní sliznice a rtů od dětství a hamartomatózními polypy GIT (TK, žaludek, tračník, jícen). Malignizace nejvyšší v mládí (Evropa 2-3 % - gastrický a duodenální Ca; Japonsko 17% - kolorektální Ca)

Juvenilní polypóza se projevuje stopkatými hamartomovými polypy především v tračnicku. U 20 % nemocných se vyskytují dále vrozené srdeční vady, abnormality CNS, měkkých tkání a vylučovacího systému.

Ostatní syndromy (**M. Crowden, Cronkhiteův – Canadové syndrom**) jsou charakterizovány přítomností polypů v tračnicku a zpravidla bez zvýšeného rizika malignizace.

Doporučený screeningový plán u této skupiny osob je následující:

- genetický screening
- totální koloskopie ve věku 10 - 12 let s následnou sigmoidoskopií každé 2
- 3 roky

4.7.2.2. Syndrom hereditárního nepolypózního karcinomu (Lynch I, Lynch II , Muirův – Torrého syndrom)

Syndrom hereditárního nepolypózního karcinomu **Lynch I** Je charakterizován zvýšeným výskytem karcinomu pravého tračníku ve středním věku bez polypózy. Je přítomna germinální mutace pěti genů odpovídajících za reparaci DNA.

Syndrom hereditárního nepolypózního karcinomu **Lynch II** bývá nazýván též syndrom karcinomové rodiny. U těchto nemocných se vyskytuje nejen karcinom pravého tračníku, ale i endometria, moč. měchýře, pankreatu, kůže a dalších orgánů.

Muirův – Torrého syndrom je fenotypovou variantou Lynchova syndromu.

Doporučený screeningový plán u této skupiny osob je následující:

- od 20 let věku je doporučována totální koloskopie každé 2- 3 roky
- každoroční test na OK

4.7.2.3. Kolorektální karcinom u nejbližších příbuzných

Jedná se o nejbližší příbuzné (příbuzné 1. stupně), tedy rodiče, sourozence a děti.

Doporučený screeningový plán u této skupiny osob je následující:

- screening počínaje věkem 35 let
- totální koloskopie každých 3 - 5 let, při rodinném výskytu karcinomu před 55. rokem života, nebo pokud mají více než 2 příbuzní rakovinu pak koloskopie alespoň 1x za dva roky (tzv. Amsterodamská kriteria)
- každoročně kontrola na OK

4.7.2.4. Osobní anamnéza adenomatózního polypu nebo nádoru

Doporučený screeningový plán u této skupiny osob je následující:

- endoskopické vyšetření 1x za 3 - 5 let
- v mezidobí - vyšetření stolice na OK každoročně
- při postižení tří a více členů rodiny a výskytu karcinomu ve věku pod 30 let je třeba vyloučit hereditární syndromy kolorektálního karcinomu a adekvátně tomu upravit screeningový plán.

4.7.2.5. Stav po odstranění adenomového polypu

Doporučený screeningový plán u této skupiny osob je následující:

- koloskopie v intervalu 4 let po odstranění jednoho adenomu, po negativní první koloskopické kontrole, u žen a osob mladších 60 let
- koloskopie v intervalu 2 let po odstranění více adenomů u mužů a osob starších 60 let
- individuální postup po odstranění velkých přisedlých adenomů, či po odstranění adenomu s intramukózním karcinomem

4.7.2.6. Nespecifické střevní záněty

(Ulcerózní kolitida, Crohnova choroba)

Při ulcerózní kolitidě malignizace závisí na délce trvání nemoci a na dysplastických změnách epitelu. Udává se, že po 20 letech onemocnění je riziko malignizace 5 %, po 25 letech 12 %. Při totálním tvaru kolitidy je riziko malignizace až 35 %.

Při Crohnově chorobě je maligní zvrát méně častý než u ulcerózní kolitidy.

Doporučený screeningový plán u této skupiny osob je následující:

- kolonoskopie vyhledávající dysplazii- se doporučuje zahájit 8 let po začátku choroby u pacientů s pankolitidou, 15 let po začátku choroby u pacientů s kolitidou v levé části tračníku
- v případě negativní dysplazie se doporučuje provádět totální koloskopii každé dva roky, v případě pozitivního nálezu dle screeningových doporučení. (75)

4.8. Diagnostika kolorektálního karcinomu

4.8.1. Anamnéza

Při postižení příbuzných prvního stupně vzniká podezření na možnou hereditární formu rakoviny, zvláště pokud karcinom vznikl v mladším věku (pod 50 let).

Diagnosticky cenné jsou příznaky popisované nemocným jako váhový úbytek, krvácení do stolice, střídání zácpy a průjmů, pocit nucení na stolicí a jiné.

Je nezbytné odebrat anamnezu pečlivě, včetně časových údajů, neboť kvalitního diagnostika tyto údaje navedou k podezření na možnost tumorosního procesu, který je pak potvrzen či vyloučen dalšími metodami. (18, 68)

4.8.2. Klinický obraz

Klinické projevy kolorektálního karcinomu jsou výrazně závislé na lokalizaci procesu, dále na typu a rozsahu nádoru a na přítomnosti eventuelních komplikací.

4.8.2.1. Pravá polovina tračníku

V této lokalizaci se nejčastěji vyskytuje endofyticky rostoucí nádor, který v poměrně širokém střevu, jehož obsah je převážně tekutý, roste poměrně dlouhou dobu bezpříznakově. Mezi projevy patří nevysvětlitelná slabost zpravidla spojené s anemizací nemocného (mikrocytární hypochromní), což je způsobeno intermitentním krvácením z tumoru. Exulcerace nádoru vede většinou k jeho infikování a vzniku perikolického bolestivého a hmatného infiltrátu, který je v oblasti caeka jen těžko odlišitelný od zánětlivého periapendikulárního infiltrátu. Obstrukce bývá pozdním příznakem, kdy nádor už většinou metastazoval a zpravidla je i lokálně inoperabilní. (18, 73, 76)

4.8.2.2. Levá polovina tračníku

V této lokalizaci se nejčastěji vyskytuje infiltrativně rostoucí tumor, který v kombinaci s anatomickou predispozicí (úzké střevní lumen, tuhá stolice) vede nejčastěji k obstrukčním projevům. Nemocný si tedy stěžuje na střídání zácpy a páchnoucích průjmů, které jsou způsobeny bakteriálním rozkladem městnajícího obsahu nad překážkou, dále udávají nutnost používání projímadel, ztrátu váhy, slabost. Anemizace bývá méně výrazná. Mnohdy se nádor projeví až akutně vzniklým ileózním stavem. (73, 76)

4.8.2.3. Rektum

U karcinomů rekta bývá kromě symptomatologie popsané u karcinomu levé poloviny tračníku výrazněji přítomno krvácení, které bývá zaměňováno s krvácením při hemorhoidech, což bývá častou příčinou pozdní diagnostiky.

Nemocné často uvádějí pocit neúplné evakuace rekta, tenezmy a i změnu defekačního stereotypu.

Poruchy vyprazdňování ve smyslu průjmu s krví přicházejí později. Bolesti jsou příznakem pozdním a dostavují se většinou při prorůstání do sakrální nervové pleteně, zpravidla již v inoperabilním stavu. (36, 73, 76)

4.8.3. Laboratorní vyšetření

Je nutno provést základní biochemický rozbor krve a moči. Bývá urychlena sedimentace erytrocytů, zvýšená koncentrace mukoproteinů, zmnožení alfa globulinů, popřípadě známky sekundární anemie. Tyto ukazatele jsou však nekonstantní, mají význam vyhledávací a nerozhodují o diagnóze.

Ani vyšetření nádorových markerů (CEA, CA 19-9) nemá pro primární diagnostiku pro svou nespecifičnost a nízkou sensitivitu valný význam. Nicméně předoperační stanovení těchto hodnot je nezbytné pro další stanovení prognózy pacienta a eventuální kontroly efektu terapie, ve srovnání s pooperačními hladinami těchto markerů. Rovněž vysoce patologické hodnoty markerů (zejména CEA) jsou signifikantní pro možnou generalizaci nádoru. (21)

Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především ke včasnému záchytu recidivy onemocnění a tím i k výsledku následné terapie, která může prodloužit přežití nemocného. Orgánová specifita při vyšetřování jednoho izolovaného markeru je relativně nízká a zvyšuje se především při použití kombinací nádorových markerů. V průběhu follow up je nutné vyšetřovat nádorové markery v pravidelných intervalech, protože nejdůležitějším faktorem, který nás může upozornit na možnou recidivu onemocnění, je dynamika vzestupu nádorových markerů. Z jednoho vyšetření, které je provedeno náhodně, nelze dělat diagnostické závěry, i když se jedná o patologickou hodnotu.

4.8.3.1. Nádorové markery kolorektálního karcinomu

U nádorů tlustého střeva a konečníku je hlavním stanovovaným markerem karcinoembryonální antigen (CEA). (21, 36, 46) Jako marker druhé volby je doporučován CA 19-9. Jako optimální se jeví kombinace těchto dvou markerů. (13, 36) K dalším markerům, které jsou studovány v souvislosti s kolorektálním karcinomem patří CA 72-4, dále pak další nádorové markery CA typu (CA 242, CA 195), proliferační markery (TPA, TPS) a řada dalších.

4.8.3.1.1. CEA (karcinoembryonální antigen)

CEA je glykoprotein s molekulovou hmotností 180 kDa, který je z 55 % tvořen sacharidy a ze 45 % bílkoviny. Vysoká heterogenita molekuly je dána heterogenitou sacharidové složky, proteinová složka je konstantní. Až dosud bylo identifikováno 14 genů kódujících CEA (tzv. CEA skupina genů.)

CEA je onkofetální bílkovinou, kterou lze prokázat v epitelových buňkách především trávicího ústrojí a bronchů. U dospělých je produkován jen ve velice omezené míře epiteliálními buňkami bronchů, prsní žlázy a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se CEA vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. Nejvyšší koncentrace jsou ve slinných žlázách a jejich vývodech. CEA je metabolizován v játrech. (13)

Produkce CEA koreluje se stupněm diferenciaci maligní tkáně a je přítomná hlavně v dobře diferencovaných adenokarcinomech, obsahujících dostatek žlázových struktur. Patologicky zvýšené hodnoty se vyskytují zejména u kolorektálního karcinomu, u karcinomu žaludku, pankreatu, žlučových cest, plic, prsu, ovárií, dělohy, prostaty, štítné žlázy a při přítomnosti jaterních metastáz výše uvedených adenokarcinomů.

4.8.3.1.2. CA 19-9

CA 19-9 je monoklonální protilátkou definovaný mucin-sialoglykolipid s molekulovou hmotností více než 500 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery.

U dospělých je produkován jen ve velice omezené míře epiteliálními buňkami bronchů a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. CA 19-9 se eliminuje výhradně žlučí.

U málo diferencovaných karcinomů se jeho produkce snižuje a u anaplastických úplně chybí.

Patologicky zvýšené hodnoty se vyskytují zejména u kolorektálního karcinomu, u karcinomu žaludku, pankreatu, žlučových cest, plic, prsu, ovárií, dělohy, u primárních jaterních karcinomů a při přítomnosti jaterních metastáz výše uvedených adenokarcinomů. (36)

4.8.3.1.3. CA 72-4

CA 72-4 je monoklonální protilátkou definovaný glykoprotein mucinového typu s molekulovou hmotností okolo 400 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery.

Fyziologicky CA 72-4 intenzivně produkují povrchové epiteliální struktury jícnu, žaludku a pankreatu vyvíjejícího se plodu a ve velmi malé míře též u zdravých dospělých.

Patologicky zvýšené hodnoty se vyskytují zejména u kolorektálního karcinomu, u karcinomu žaludku, pankreatu, žlučových cest, plic, prsu, ovárií, dělohy, jícnu a při přítomnosti jaterních metastáz výše uvedených adenokarcinomů.

4.8.3.1.4. Proliferační nádorové markery

Pro praxi má největší význam stanovení proliferačních nádorových markerů TPA (tkáňový polypeptidový antigen), popř. TPS (specifický tkáňový polypeptidový antigen). Jedná se o fragmenty cytokeratinů, u nichž se předpokládá, že se uvolňují do tělních tekutin během proliferace nádorové tkáně. Jejich hladina je tedy úměrná rychlosti nádorového růstu. (55)

Některými autory byla prokázána korelace předoperačních hodnot TPA se stadiem onemocnění a přežíváním pacientů. (15, 78) Kombinované určování hladin TPA a CEA je dle některých autorů vhodnou kombinací pro včasnou diagnostiku recidiv kolorektálního karcinomu se senzitivitou okolo 70 – 90 %. (22, 19) TPS se jeví jako vhodný marker především pro časný záchyt relapsu onemocnění a pro kontrolu terapie. (51) Pro posouzení významu těchto cytokeratinů v běžné klinické praxi je však třeba více prospektivních studií, které posoudí význam těchto markerů ve srovnání s markery dosud používanými (CEA, popř. CA 19-9).

4.8.3.1.5. Méně známé nádorové markery

Z dalších nádorových markerů, které byly sledovány v souvislosti s kolorektálním karcinomem se jedná např. o nádorové markery CA typu: CA 242, CA 50, CA 195, CA 125. (22, 28, 34, 65)

Dále pak např. NuMa (Nuclear Mitotic Apparatus Protein), AFP (alfafetoprotein) a mnoho dalších. (4, 5, 22, 28, 65)

Jako nádorové markery lze uvádět i angiogenetické faktory, např. vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), jehož využití zřejmě spočívá ve zpřesnění prognózy a pro včasný záchyt jaterních metastáz.

Dále lze využít i adhezivních molekul, jejichž význam je v současné době předmětem výzkumu a jeví se jako vhodné pro včasný záchyt jaterních metastáz.

V neposlední řadě je předmětem výzkumu i možnost využití metaloproteináz a jejich inhibitorů jako nádorových markerů. Práce stanovující MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 a TIMP-1, TIMP-2 si však protiřečí stran využitelnosti. Využití se tedy jeví jako sporné, snad ve zpřesnění stanovení prognózy nemocného.

Nové možnosti v rozvoji diagnostiky a v hledání vhodných nádorových markerů přinesl rozvoj molekulární genetiky. Především rozvoj polymerázové řetězové reakce (PCR), event. kvantitativní reverzní transkripce (RT-PCR), či real- time PCR. Dále je možnost stanovování K-ras mutací v DNA nádorových buněk v krvi, ve stolici, stanovování mRNA (pro MMP, pro CK-20) v krvi, ve stolici. Vše je však ve fázi výzkumu, zatím bez využití v klinické praxi.

Žádný z těchto jmenovaných markerů však v porovnání s CEA či CA 19-9 nedosahoval lepších výsledků ani v případě předoperačních hodnot, ani v případě stanovení těchto markerů v průběhu follow up.

4.8.4. Vyšetřovací metody

4.8.4.1. Endoskopie

Pacient s podezřením na kolorektální karcinom se dnes podrobuje totální koloskopii s bioptickou verifikací. Pokud je nalezen karcinom, je případná operace naplánována bez potřeby irigografie.

Asi 50 – 60 % kolorektálních karcinomů je v dosahu flexibilního sigmoidoskopu a 30 – 40 % v dosahu 30 cm flexibilního sigmoidoskopu. Ještě méně (asi 20 %) je možné diagnostikovat pomocí rigidního

rektoskopu. Z důvodu omezené vyšetřitelnosti těchto metod se proto dnes dává přednost totální koloskopii. (73, 76)

4.8.4.2. Rentgenové metody

Z diagnostického hlediska je nejdéle a stále používanou radiodiagnostickou metodou irigografie či irigografie s dvojitým kontrastem, přestože je karcinom stále častěji diagnostikován koloskopicky a kontrastní rentgenové vyšetření pak není nutné. Irigografie je však indikována, pokud je koloskopický nález inkompletní, nebo jestliže koloskopie nedokáže vysvětlit symptomy onemocnění. Pokud je jako první vyšetření provedena samotná irigografie, měla by být doplněna totální koloskopií. Irigografie není vhodným vyšetřením pro diagnostiku karcinomu rekta. Rutinním vyšetřením je snímek srce a plic k posouzení možných metastáz plic.

4.8.4.3. Sonografie

Sonografická vyšetření nemají diagnostický význam pro primární nádor, ale slouží k vyloučení generalizace nádoru. Generalizace nádoru musí být vyloučena vždy před zamýšleným chirurgickým výkonem. Nejčastějším vyšetřením je sonografie břišní dutiny. Zde pátráme po metastázách v játrech, zda se expanzivní proces nešíří per continuitatem do sousedních orgánů, popřípadně pátráme po přítomnosti ascitu či hydronefróze, svědčící o útlaku močovodů. Může rovněž pomoci v diferenciální diagnostice útvarů v malé pánvi, i když spolehlivější výsledky poskytuje CT vyšetření.

Endorektální ultrasonografie poskytuje velmi přesné informace o hloubce penetrace do stěny, nebo skrze stěnu v případě karcinomu rekta.

Odhali též přítomnost zvětšených pararektálních uzlin, ale nedokáže rozlišit mezi reaktivním zvětšením uzlin a karcinomatózním postižením. (68, 76)

4.8.4.4. CT vyšetření

CT vyšetření břicha není vhodné pro diagnostiku primárního nádoru, i když často bývá při hledání malignity nejasného původu prvním vyšetřením, které zachytí kolorektální karcinom. V rutinní praxi by však mělo být CT prováděno výhradně v případě pátrání po generalizaci nádoru. Je proto indikováno především CT jater a plic, a to zvláště tehdy, kdy ostatní provedené zobrazovací techniky neposkytnou jednoznačný nález.

CT vyšetření je rovněž indikováno k diferenciaci diagnostice expanzivních procesů v malé pánvi a k odhalení extramurálního růstu nádoru u karcinomu rekta.

V dnešní době možnost použití PET CT jako kombinované metody užití CT a isotopového vyšetření přináší výrazný posun především při verifikaci zbytkového tumoru po operaci a při vyhledávání metastáz. Není vhodné k primární diagnostice, jeho hlavní význam však spočívá především při nejasných nálezech v průběhu follow up. (76)

4.8.4.5. Magnetická rezonance

Je indikována výjimečně, pouze v případě nejasného nálezu CT vyšetření. Účelné je toto vyšetření u nádorů rekta a patologických změn v retroperitoneu.

4.8.4.6. Další vyšetření

Z dalších vyšetření by mělo být předoperačně provedeno gynekologické vyšetření u všech žen a urologické vyšetření při nálezu

hematurie či při urologické symptomatologii svědčící pro progredující onemocnění.

4.9. Léčba kolorektálního karcinomu

4.9.1. Chirurgická léčba

V případě kolorektálního karcinomu se jedná o jedinou kurativní léčbu, předpokladem je ale málo pokročilé onemocnění (stadium I, II). Jako radikální lze operaci hodnotit pouze tehdy, jestliže byl odstraněn nejen nádor, ale i celý segment tračníku s adekvátním rozsahem lymfatické drenáže, za předpokladu nepřítomnosti vzdálených metastáz. U pokročilých forem je chirurgický výkon nezbytnou metodou paliativní, kdy jsou u nemocného předoperačně zjištěny vzdálené metastázy. Jedná se většinou o segmentální resekce s odstraněním spádových uzlin, nebo o založení stomie při lokální inoperabilitě nádoru.

Správně provedený chirurgický výkon je jedním z důležitých faktorů rozhodujících o dlouhodobém přežití pacienta. (25)

4.9.1.1. Elektivní výkony

Interval mezi zjištěním diagnózy a započítím léčby by neměl přesáhnout 4 týdny, optimum 20 dnů. Chirurgická léčba je metodou první volby. K lokální recidivě při správném postupu dochází zřídka.

Příprava k chirurgickému výkonu započítá přijetím do nemocnice a její nedílnou součástí je informovaný souhlas nemocného. Důležité je především vysvětlení možnosti založení kolostomie, částečné inkontinence stolice po nízkých resekcích, sexuálních potížích po operaci, častějších stolic, možnosti komplikací apod.

Ortográdní příprava střeva je na našem pracovišti preferována a považujeme ji za nedílnou součást přípravy. Je však nutné nemocného

upozornit na nutnost vyššího příjmu tekutin. Abychom zabránili dehydrataci a iontové disbalanci, která po tomto druhu přípravy vzniká, podáváme nemocnému infusní léčbu (např. 1000 ml Hartmanova roztoku + 20 – 40 ml KCl 7,5% na 6 hod.).

Profylaxe tromboembolické nemoci je samozřejmostí, začátek léčby je zpravidla večer před výkonem. Nutností je i antibiotická profylaxe, kdy podáváme první dávku antibiotika cca 30 min před započítím výkonu a další dávku po 2 hodinách. O nutnosti delší ATB léčby po výkonu rozhoduje operátor. Druh profylaktického ATB konzultujeme s ATB centrem v souvislosti s epidemiologickou situací na klinice. (36, 68, 71, 73, 76)

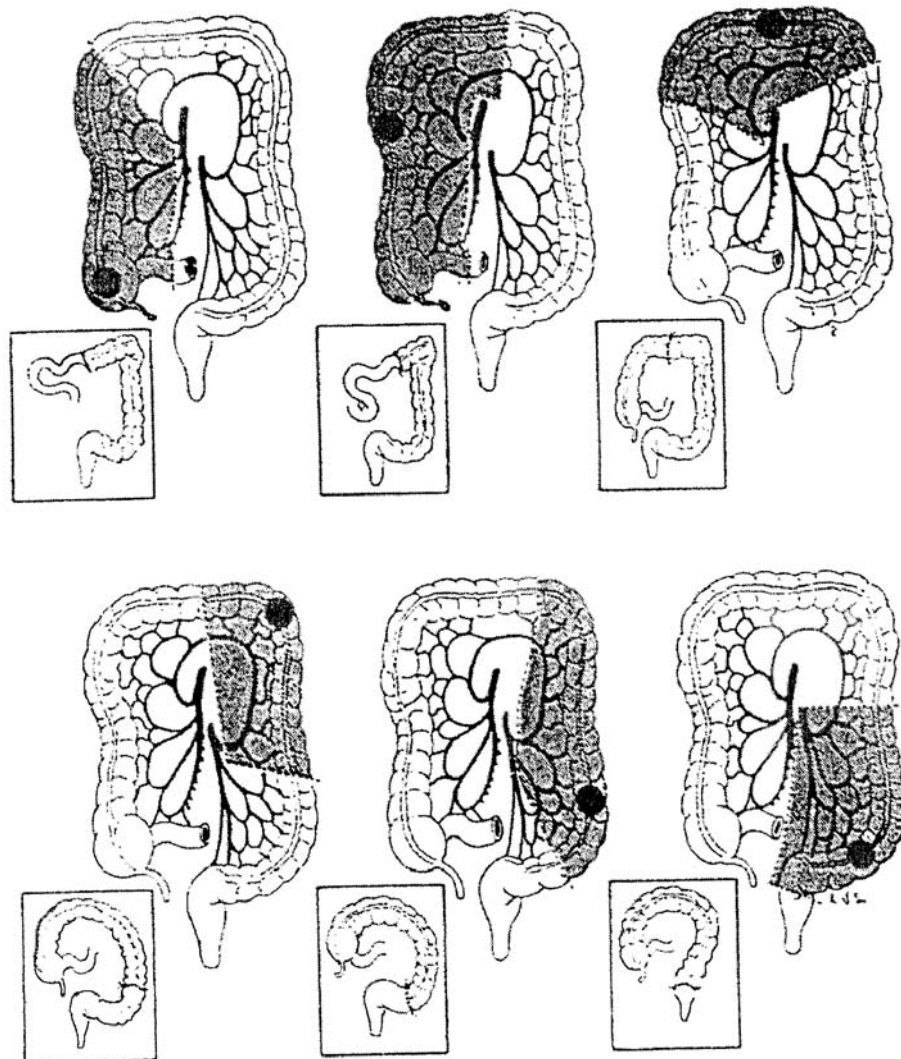
Kurativní resekci se rozumí odstranění viditelného tumoru dostatečně daleko do zdravé tkáně minimálně 5 cm pod a 10 nad tumor, odstranění regionálních lymfatických uzlin – minimum 12. Zásadně se musí histologicky vyšetřit resekční linie.

U karcinomů dolních 2/3 rekta je metodou volby princip totální mesorektální excize. U karcinomů horního rekta je nutné mesorektum přerušit nejméně 5 cm pod dolním okrajem nádoru. (Tím by se měl zajistit výskyt lokálních recidiv do 2,6%). V dnešní době jsou upřednostňovány velmi nízké resekce oproti amputacím rekta, neboť amputace rekta nesnižuje významně četnost lokálních recidiv. Stačí přerušit rekta 2 cm pod tumorem. (36, 71)

Druhy výkonů se liší dle lokalizace tumoru – obr. 11. Za radikální resekční výkon s dodržáním lymfadenektomie spádového lymfatického řečiště a s dostatečnou axiální radikalitou je považována pravostranná hemikolektomie při lokalizaci tumoru v caecu či colon ascendes, rozšířená pravostranná hemikolektomie při tumoru hepatální flexury, resekce transversa při lokalizaci karcinomu na transverzu, levostranná

hemikolektomie při tumoru na descendentu a sigmatu, resekce sigmatu při lokalizaci na vrcholu sigmatu.

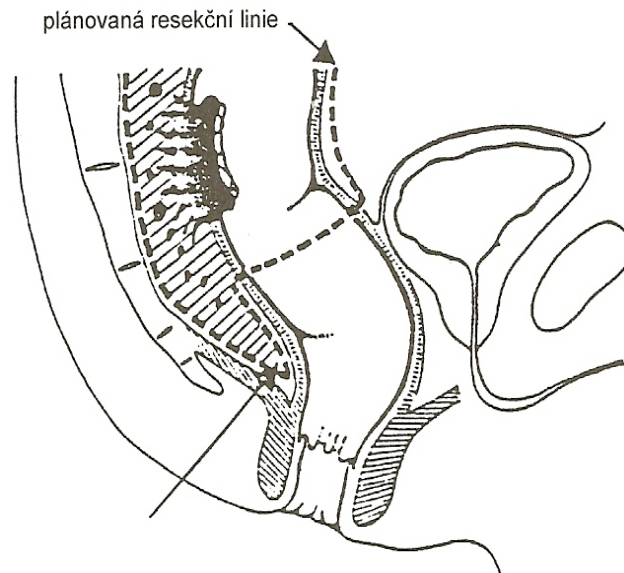
Obr. 11. Druhy resekčních výkonů na colon dle lokalizace primárního tumoru. (36)



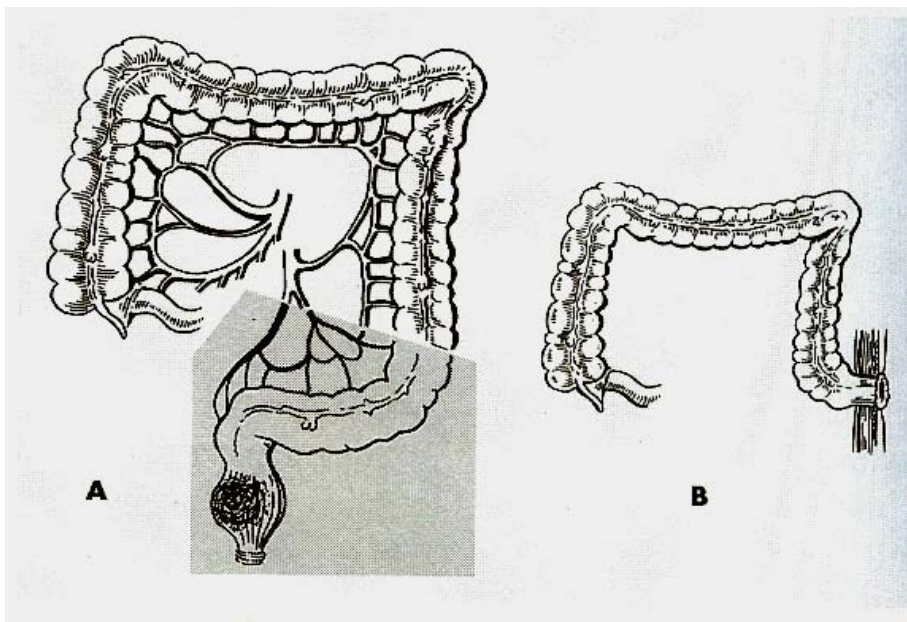
Při lokalizaci tumoru na rektu, kde resekční linie může být minimálně 2 cm pod nádorem rozhoduje o resekci rekta či o jeho amputaci funkčnost svěračů. Pokud je jejich funkce zachována, a zároveň splněna podmínka resekční linie 2 cm pod nádorem lze uvažovat o nízké přední resekci rekta double stapling s dodržením totální mesorektální excize,

eventuelně s resekcí mesorekta 5 cm pod tumorem – obr. 12. Pokud ne pak je výkonem volby amputace konečníku – obr. 13.

Obr. 12. Resekce rekta s naznačenou resekcí linií při totální mesorektální excizi.



Obr. 13. Amputace rekta s terminální kolostomií



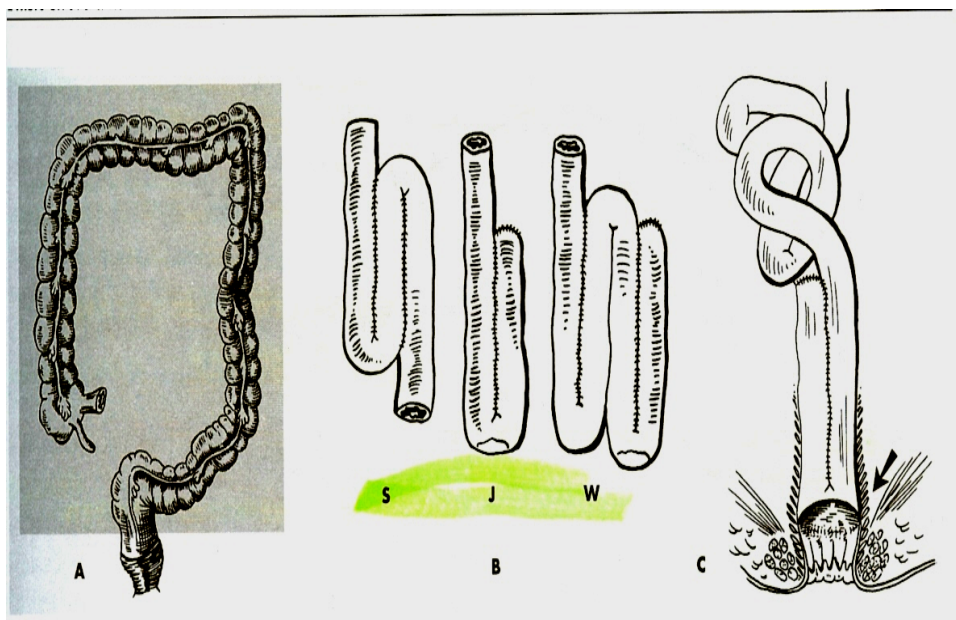
Pokud nádor neprorůstá do svaloviny rekta a má maximálně 3 cm v průměru lze uvažovat i o transanální excizi operačním rektoskopem (TEM).

4.9.1.2. Akutní výkony

Indikací k akutní operaci je nejčastěji ileus, méně často perforace a krvácení. Při lokalizaci na pravém tračníku se provádí pravostranná event. rozšířená pravostranná hemikolektomie. Při lokalizaci v levé polovině je metodou volby dvoudobá operace – Hartmanova resekce, při pokročilém ileu tlustého střeva pak subtotální kolektomie – obr. 14. (73, 76)

Při lokálně inoperabilním nádoru však nelze nález řešit výše uvedenými způsoby a je nutno stav řešit paliativně – viz následující kapitola.

Obr. 14. Subtotální kolektomie s možnostmi ileorektoanastomóz.

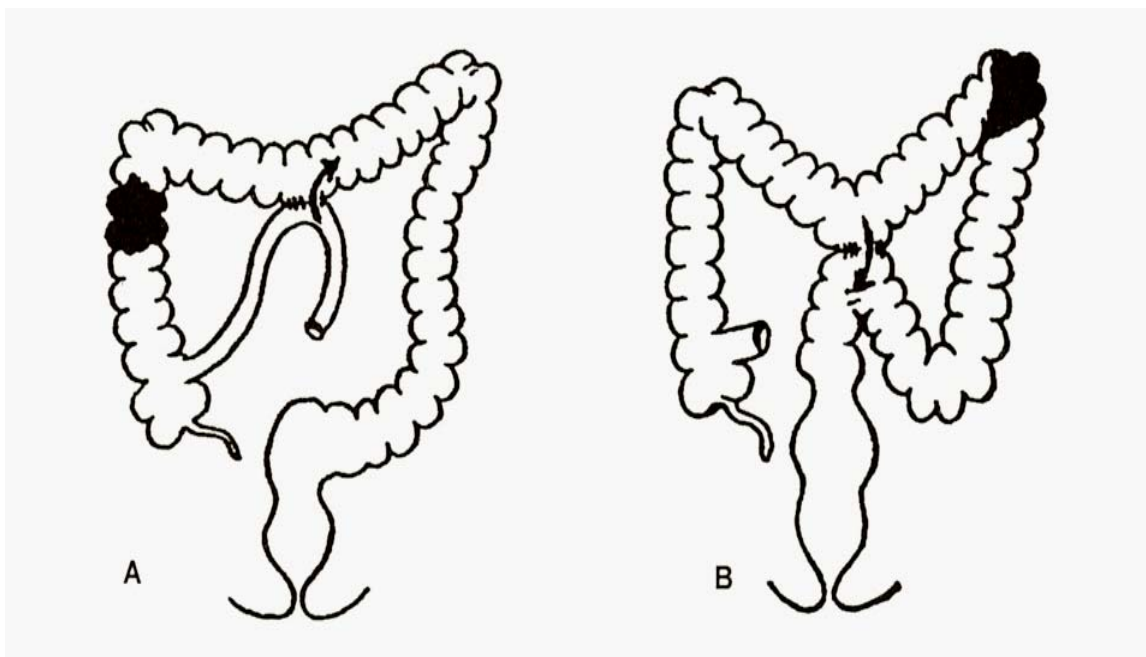


4.9.1.3. Paliativní výkony

Mezi paliativní výkony patří krátké resekce bez lymfadenektomie – u nemocných s generalizací.

Při inoperabilním nádoru jsou prováděny různé druhy paliativních anastomóz (ileotransverzoanastomóza, transverzosigmoideoanastomóza) zpravidla side to side – obr. 15, dále lze proximálně nad tumorem založit kolostomii či ileostomii. Nález na sigmatu event. v horním rektu lze za určitých okolností paliativně řešit endoskopicky a to zavedením stentu, lze použít pro nádory rekta paliativně i laserovou či argonovou elektrokoagulaci. (73, 76)

Obr. 15. Paliativní spojkové operace



4.9.1.4. Chirurgická léčba metastáz

V indikovaných případech je možno provést resekci jaterních metastáz, či solitárních plicních metastáz. Kontraindikací je multiorgánové metastatické postižení, karcinomatóza peritonea a neodstranitelné nádorové postižení lymfatik. Po dohodě s onkologem je další možností

terapeutického ovlivnění jaterních metastáz založení venózního či arteriálního portu k lokální perfuzi cytostatiky.

V některých případech lze úspěšně odstranit i mnohočetná ložiska metodou hypertermické destrukce metastáz nejčastěji radiofrekvenční ablací, v játrech pak eventuelně i kryalizací či alkoholizací metastáz. (4, 36)

4.9.2. Radioterapie

V komplexní léčbě kolorektálního karcinomu se jedná především o zevní ozáření. Předoperační ozáření (20-35 Gy/ 2 - 3 týdny) prodlužuje dobu přežití a oddaluje recidivu především u nemocných ve stadiu III, u nemocných ve stadiu I, II není přínos předoperační radioterapie průkazný. U nemocných s nádory, které mají hraniční operabilitu je možno použít i vyšších dávek (50-60 Gy ve 25-30 frakcích/ 5 - 6 týdnů). Pooperační ozáření pánve se považuje za vhodný doplněk chirurgické léčby pokročilého onemocnění, nebo jako paliativní léčba neresekovatelného nádoru. Byly též popsány příznivé výsledky sendvičové metody (radioterapie-operace-radioterapie). Radioterapie se také uplatňuje v paliativní léčbě vzdálených metastáz. Ostatní metody radioterapie (peroperační, intraluminární) mají zatím povahu experimentální. (4, 76)

4.9.3. Chemoterapie

Chemoterapie se u kolorektálního karcinomu používá především ve dvou hlavních indikacích a to jako léčba paliativní, nebo jako léčba adjuvantní.

K paliativní terapii lze použít monoterapii 5 - fluorouracilem, nebo některým z nově používaných chemoterapeutik (irinotekan), účinnější je

však kombinace 5 - fluorouracilu s leukovorinem nebo kombinace s jinými synergně působícími cytostatiky.

Význam adjuvantní chemoterapie byl prokázán u kombinace 5 - fluorouracilu s leukovorinem, kdy u stadia III tato kombinace významně zvyšuje procento pětiletého přežití. Další možností je konkomitantní chemoradioterapie (současné podání chemoterapie v kombinaci s ozářením), kde je také doložen pozitivní účinek na dlouhodobé přežití pacientů. (46) U nižších stadií nebyl význam adjuvantní chemoterapie spolehlivě doložen. (76)

Intraarteriální chemoterapie cestou arteria hepatica může být účinnou léčbou jaterních metastáz, kde se opět používá 5 - fluorouracil, účinnější je však 5 - fluorodeoxyuridil. O významu intraperitoneální chemoterapie jako profylaxe jaterních metastáz není zatím dostatek důkazů a možnosti této léčebné metody jsou předmětem klinických studií.

4.9.4. Další možnosti léčby

Z ostatních léčebných metod je předmětem výzkumu imunoterapie a to především s ohledem na možnost léčby nádorového onemocnění pomocí monoklonálních protilátek (např. protilátkou 17-1A), nadějně jsou studie zkoumající léčbu interferonem v kombinaci s melatoninem. Zkoušela se i autologní transplantace kostní dřeně po vysokodávkované chemoterapii, ale remise dosažené touto léčbou byly pouze krátkodobé. (4, 76)

4.10. Prognóza

Na prognózu nemocného s kolorektálním karcinomem má vliv několik faktorů. Především je to staging nádoru, dále reziduální nádor, histologické nález, lokalizace a komplikace.

Hloubka invaze a generalizace nádoru je jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů u pacientů s kolorektálním karcinomem. Pětileté

přežití u pacientů s nádorem tlustého střeva a rekta v závislosti na stadiu onemocnění je přibližně následující (25, 100): stadium I - 80 %, stadium II - 60 %, stadium III - 30 %, stadium IV - 5 %.

Výsledky multivariačních analýz poukazují, že přítomnost (R1, R2) či nepřítomnost (R0) reziduálního nádoru po primární terapii je významný nezávislý prognostický faktor. Pětileté přežití pacientů s R0 se udává okolo 57 % ve srovnání s pacienty s R1, R2, kde je udáváno přežití okolo 5 %. (4)

Méně diferencované nádory (grading 3, 4) mají obecně horší prognózu; přítomnost koloidní složky, intravaskulární propagace nádorových buněk a lymfatická či perineurální invaze mají též vliv na prognózu onemocnění. (5)

Nádory rekta mají obecně horší prognózu. (36, 73)

Prognózu nepříznivě ovlivňují komplikace, jakými jsou např. obstrukce či perforace.

Názory na ostatní diskutované faktory (jako např. věk, pohlaví, diabetes apod.), které mohou mít vliv na přežití jsou kontroverzní a vyžadují další studie.

4.11. Prevence a dispenzární péče

Karcinom tlustého střeva je prakticky jediným onkologickým onemocněním, kde je realizovatelná primární prevence nádoru. Jde o nádor, který je důsledkem především chyb životního stylu a vlivu životního prostředí. Proto je zde široké pole pro zdravotnickou osvětu všech stupňů a pokud možno v co nejširší populaci. Preventivní opatření jsou jednak charakteru doporučeného životního stylu a jednak mají charakter optimální diagnostiky prekanceróz a časných forem tohoto nádorového onemocnění. (4)

Obecná preventivní opatření lze řadit omezení celkové konzumace živočišných tuků, zvýšení obsahu vlákniny, vápníku; vitaminů C, E a selenu v každodenní stravě a omezení nevhodné tepelné úpravy potravy (pečení, smažení, grilování).

Mezi speciální preventivní opatření patří důsledné odstranění všech adenomů u asymptomatických a rizikových osob, následné periodické kontroly těchto jedinců. Dále preventivní podávání kyseliny acetylsalicylové, nesteroidních anirevmatik (diskutovaný účinek inhibice produkce prostaglandinů cyklooxygenázami), čímž dochází ke zpomalení růstu nádorových buněk kolorektálního karcinomu. (43)

Nezbytná je i dispenzarizace speciálních rizikových skupin. Všichni tyto nemocní by se měli koloskopicky vyšetřovat v pravidelných časových odstupech (viz kapitola 4.7.2.).

Dispenzarizace pacientů s kolorektálním karcinomem po primární terapii je stejná jako u všech onkologických onemocnění, tj. frekvence kontrol 1x za tři měsíce po dobu prvních dvou let, dále minimálně 2x ročně po dobu 5 let od skončení léčby. Kontrola spočívá v klinickém a komplementárním vyšetření (viz výše). Časový harmonogram provedení jednotlivých vyšetření v rámci poléčebného sledování pacientů. (viz kapitola 4.11.1.). U všech nemocných po nízké resekci rekta jsou nutné endoskopické kontroly anastomózy po 3 měsících během prvních dvou let pooperačního sledování. (73)

4.11.1. Diagnostika v průběhu follow up

Cílem pravidelných kontrol nemocného je včasná diagnostika relapsu či generalizace onemocnění. Pravidelné kontroly stavu nemocného dle doporučených schémat (25, 75) jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tab. 3. Doporučená vyšetření a intervaly kontrol pooperačního sledování pacientů s kolorektálním karcinomem

Follow up	Interval	Vyšetření
1. rok po operaci	1x za 6 měsíců	Sono jater; koloskopie ev. rektoskopie
	1x za 12 měsíců	RTG plic
	1x za 3 měsíce	Nádorové markery CEA, CA 19-9
2. rok po operaci	1x za 12 měsíců	Sono jater; koloskopie ev. rektoskopie;
	1x za 12 měsíců	RTG plic
	1x za 3 měsíce	Nádorové markery CEA, CA 19-9
3. rok po operaci	1x za 12 měsíců	Sono jater; RTG plic
	1x za 2-3 roky	Koloskopie ev. rektoskopie
	1x za 3 měsíce	Nádorové markery CEA, CA 19-9
Další sledování	1x za 6 měsíců	Nádorové markery CEA, CA 19-9
	1x za 12 měsíců	Sono jater; RTG plic
	1x za 2-3 roky	Koloskopie, event. rektoskopie

Sledování nádorových markerů je dle doporučení EGTM (European Working Group on Tumour Markers) následující: v 1. roce 1 měsíc, ve 2. roce 2 měsíce, po 3. roce 3 měsíce od 5. roku 2x ročně trvale do konce života (55). V rutinní praxi je však vzhledem k ekonomickým nákladům

optimální provádět stanovení nádorových markerů 1x za tři měsíce v prvních třech letech, dále pak v intervalu 6 měsíců. (13)

II. Výzkumná část

Výzkumná část vznikla za podpory grantu IGA – NR 7894-3/2004.

1. Cíle projektu:

1. Stanovení hladiny nádorové mRNA tumorosním ložiskem a v krvi nemocného, pomocí reverz-transkription polymerase chain reaction (RT-PCR), prověření možnosti využití těchto výsledků k dispenzarizaci nemocných po operacích pro kolorektální karcinom z hlediska recidivy a metastáz nádorového onemocnění.

2. Posouzení stupně malignity a prognózy nemocného v závislosti na hladinách nádorové mRNA v krvi pacienta v korelaci s klinickým a histopatologickým nálezem.

3. Určit možnosti využití stanovení nádorové mRNA jako screeningové metody vzhledem k předpokládané specifitě porovnáním s kontrolními skupinami pacientů s benigními diagnózami a skupinou pacientů s maligní diagnózou jiné lokalizace.

4. Porovnat citlivost metody z hlediska pooperační recidivy a metastáz nádorového onemocnění se stanovením běžných nádorových markerů – karcinoembryonální antigen (CEA), glykoproteinový antigen mucinosního typu: Carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9), proliferační nádorový marker tymidinkináza (TK), solubilních cytokeratininové fragmenty: tkáňového polypeptidového antigenu (TPA) a tkáňového specifického polypeptidového antigenu (TPS) - v séru.

2. Metodika

U nemocných s nádorovým onemocněním kolorekta bez známek metastáz či generalizace byl po resekcčním výkonu odebrán z preparátu vzorek tumoru velikosti 5x5x5 mm (pro možnost kontroly 2x) a byla z něj stanovena mRNA. Hladinu mRNA jsme stanovili v periferní krvi nemocného před výkonem, 7 dní po výkonu, dále 6 a 12 měsíců po výkonu. Stejně tak byla u těchto pacientů stanovena hladina klasických onkomarkerů – CEA, CA 19-9, TPS, TPA, TK ve stejných intervalech.

U kontrolních skupin (specifikace kontrolních skupin viz níže) – jsme provedli náběr periferní krve, ze které jsme stanovili mRNA CEA a CK20.

Krev byla pacientům odebírána z periferní žíly. Všichni nemocní byli o zařazení do projektu informováni a podepsali písemný souhlas (příloha 1.). mRNA z krevních vzorků a vzorků nádoru a onkomarkery stanovila radioimunologická laboratoř při II. interní klinice FN Plzeň.

2.1. Metodika stanovení mRNA RT-PCR

2.1.1. Izolace RNA z tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

Tkáňové vzorky kolorektálního karcinomu byly po chirurgickém výkonu histologicky verifikovány a zamraženy na -75°C. Ze 100 mg vzorku jsme izolovali celkovou RNA. Tkáň jsme homogenizovali ve zkumavkách se speciálními kuličkami přístrojem Fastprep (Fa Thermosavant, USA) a kitem FastRNA Pro Green Kit (Q BIOgene, USA).

2.1.2. Izolace RNA nádorových buněk z periferní krve

Izolace RNA nádorových buněk (cirkulující nádorové buňky – CTC) z periferní krve se provádí dvěma odlišnými přístupy. První přístup spočívá v izolaci volné RNA která se nachází v krvi pacienta resp. v plazmě. Tato volná RNA se nachází také u zdravých lidí. K detekci metastazování nádorového procesu se proto používá stanovený mRNA genů specifické pro nádorové buňky např. CEA nebo mRNA genů charakteristických pro epiteliální buňky (CK), jejichž RNA by se v periferní krvi vyskytovat neměla a proto se její původ odvozuje od rozpadlých nádorových buněk epiteliálního původu. Druhý způsob spočívá v přímé izolaci nádorových buněk. Zde se uplatňují různé přístupy jejich izolace resp. získání obohacené frakce. Využívají se způsoby imunomagnetické separace, používají se protilátky (proti adhezivní molekule EPCAM, cytokeratinum) navázané na magnetické kuličky, které umožní na protilátky navázané buňky separovat. Další přístup spočívá v zachycení CTC na membránu (MILLIPORE 8 μ m TETP), přes kterou se filtruje plná krev ředěná fyziologickým roztokem. Erytrocyty a lymfocyty projdou a větší buňky, mezi nimi nádorové, se zachytí.

Na výše uvedené metody navazuje vlastní izolace RNA a reverzní transkripce RT a stanovení genů (v naší práci CEA, CK20) real-time PCR.

Postupně jsme vyzkoušeli tyto 3 metody:

A. Imunomagnetické separace: Adna test Colon Cancer Select (příloha 10.)

Po resuspendování Colon Select kitu propipetováním (protilátky s magnetickými kuličkami) jsme přenesli příslušné množství do eppendorfky (100 μ l na vzorek / příslušný počet vzorků) a umístili ji do MPC-S (magnetický separátor – Dynal). Po jedné minutě jsme odstranili supernatant pipetou (bez stlačení kuliček) – odstranění store buffer a

vyjmuli eppendorfku z MPC-S. Následně jsme přidali 1ml PBS (fosfátový puffer) a resuspendovali špičkou. Vzorek jsme dále umístili na 1min do MPC-S a odstranili supernatant a zopakovali ještě dvakrát přidání fosfátového pufru. Pak jsme vyjmuli eppendorfku z MPC-S, přidali příslušné množství PBS (100μl na vzorek – příslušný počet vzorků) a přidali k 5 ml plné krve a dále jej jsme umístili do rotátoru (RS-24 BIOSAN, ČR) a 2 hod. inkubovali. Následně jsme v MPC-L (magnetický separátor – Dynal) odstranili supernatant a promyli vzorek PBS. Z takto izolovaných CTC (cirkulující nádorové buňky) jsme izolovali celkovou RNA.

B. Metoda izolace volné RNA z plazmy: TRI Reagent BD® (MRC, USA) – základní izolační roztok, zbytek chemikálií běžně dostupný v laboratoři.

Nejprve jsme centrifugovali zkumavky plné krve, 10min 2300 ot. a následně jsme odebrali 1ml plazmy + 3ml TRIReagentu BD + 80μl kys. octové. Po promíchání jsme přidali 0,8ml chloroformu (15 s. třepání a 5min stát.). Následovala opětovná centrifugace 10tis. ot. při 4°C, 15min. Po odebrání vodní fáze, jsme přenesli roztok do eppendorfky a přidali 2ml isopropanolu, protřepali a na 10 min nechali stát. Následovala opětovná centrifugace 12tis. ot. při 4°C, 10min. Po té jsme přidali 1ml 75% ethanolu, a opět následovala centrifugace 10tis. ot. při 4°C, 8min. Vzorek RNA jsme rozpustili v 50μl DPEC H₂O (deenzymovaná voda)

C. Metodu záchytu nádorových buněk na membráně Millipore následovaná izolací RNA - za užití TRI Reagent BD®

5ml plné krve jsme naředili 15 ml fyziologického roztoku a přes filtr (ISOPORE MEMBRANE FILTERS 8μm TETP) jsme přefiltrovali obsah

stříkačky. Membranu se zachycenými buňkami jsme přenesli do eppendorfky s 0,375 ml trireagentu BD. Po promíchání jsme přidali 0,8ml chloroformu, 15 s. třepali a 5min nechali vzorek stát s následnou centrifugací 10tis. ot. při 4°C, 15min. Po odebrání vodní fáze jsme přenesli vzorek do eppendorfky a přidali 250 µl isopropanolu, protřepali a 10min nechali stát. Následovala centrifugace 12tis. ot. při 4°C, 10min. Po té jsme přidali 1ml 75% ethanolu, a opět následovala centrifugace 10tis. ot. 8min. Po usušení (10 min) jsme vzorek RNA rozpustili v 50µl DPEC H₂O (deenzymovaná voda).

Pro vzorky periferní krve získané před a s různým odstupem po operaci jsme použily:

B. Metodu izolace volné RNA z plazmy

C. Metodu záchytu nádorových buněk na membráně následovanou izolací RNA

Metodou A jsme ve zkušebních vzorcích nedetekovali žádnou mRNA genů CK20 a CEA. Vzhledem k velké finanční náročnosti tohoto postupu a počtu vzorků jsme se rozhodli pro izolace RNA resp. CTC použít metody B a C.

2.1.3. Metodika RT real-time PCR

3 µg izolované celkové RNA jsme použili do reverzní transkripce (RT). Reverzní transkripci jsme provedli pomocí enzymu Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA). Jako primer pro RT jsme použili oligo d(T)21. Primery pro GAPDH, MMP-9, MMP-7, TIMP-2, TIMP-1, CEA a CK20 jsme navrhli tak, aby překračovaly minimálně jeden intron. Fragmenty získané PCR jsme inzertovali do vektoru pGEM (Promega Corporation, USA), klonovali a sekvenovali. Klonované

fragmenty MMP-9, MMP-7, TIMP-2 TIMP-1, CEA, CK20 a GAPDH jsme použili jako standardy o známém počtu molekul. 1 μ l cDNA každého vzorku jsme použili pro real-time PCR na přístroji Rotorgene (Corbet Research, Australia). Pro stanovení amplifikace DNA jsme použili barvu SYBR Green I. Specifitu reakce jsme ověřili pomocí teplotní křivky tání a elektroforézy. Stanovení jsme provedli jako absolutní (počet molekul cDNA) a jako standardy jsme použili klonované fragmenty cDNA. Výsledky jsou uváděny jako:

Absolutní hodnoty - kvantifikace byla provedena absolutně, za použití klonovaných fragmentů o známé koncentraci jako standard (počet kopií molekul/ 3 μ g RNA).

Normalizované hodnoty - výsledky jsou uváděny jako poměr sledovaného genu a GAPDH (př. TIMP-1/GAPDH).

2.2. Metodika stanovení nádorových markerů

Krev na stanovení nádorových markerů a doplňujících biochemických parametrů byla odebírána standardně z loketní žíly v ranních hodinách. Sérum získané z dvou tisíc gramů krve centrifugací na 10 min bylo skladováno až při teplotě -20°C . Bylo použito pro stanovení rutinních nádorových markerů a doplňujících laboratorních parametrů. Nádorové markery byly stanoveny na Oddělení nukleární medicíny, Úsek Imunoanalýzy (vedoucí prof. MUDr. O. Topolčan), pomocí komerčních diagnostických souprav dle doporučení výrobců. Jednalo se o následující komerční soupravy pro stanovení nádorových markerů: karcinoembryonální antigen (CEA, IRMA, Immunotech Česká republika), glykoproteinový antigen mucinosního typu: Carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9 Shering- CIS France), proliferální nádorový marker tymidinkináza (TK, REA Immunotech, Česká republika) a solubilních cytokeratininové fragmenty: tkáňového polypeptidového antigenu (TPA,

IRMA, DiaSorin Italy) a tkáňového specifického polypeptidového antigenu (TPS, IRMA, IDL Sweden), fragment cytokeratininu 19 (CYFRA 21-1, Shering- CIS France).

Doplňující biochemické parametry byly vyšetřovány standardizovanými laboratorními postupy v laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky FN Plzeň (přednosta prof. MUDr. J. Racek, CSc.).

Kontrola stanovení byla prováděna jednak pomocí kitového kontrolního séra, kontrolních sér pro dlouhodobou stabilitu metodiky a na základě mezilaboratorních kontrol Biorad (USA), Oncocheck (Francie) a SEKK (ČR).

3. Deskriptivní statistika základních souborů

Rozdělení nemocných do skupin:

I. Nádory - nemocní s kolorektálním karcinomem předoperačně bez generalizace

II. Kontrolní skupiny:

1. Plíce - nemocní s primárním karcinomem plic
2. Prekancerózy - nemocní s verifikovanou M. Crohn
3. Záněty - nemocní se zánětlivým onemocněním
4. Zdraví – nemocní bez zn. tumoru či zánětu např. před operací kýl
5. NED – ze skupiny nemocných s kolorektálním karcinomem byla vytvořena skupina nemocných s minimálně 12 měsíční remisí onemocnění (tito pacienti nikdy neměli progresi onemocnění, ze skupiny byly vyloučeni pacienti s benigním, či zánětlivým onemocněním, které by mohlo nespecificky ovlivnit hodnoty nádorových markerů).

3.1. Soubor Nádory

Soubor nemocných je tvořen 52 pacienty, 32 muži (62 %) a 20 ženami (38 %), průměrný věk nemocných je 63,41 roku (39,98 roku – 79,1 roku), věkový rozdíl mezi pohlavími není ($p = 0,9032$). U všech nemocných byl histologicky stanoven adenokarcinom tlustého střeva.

Tab. 1. Rozdělení souboru dle lokalizace karcinomu kolorekta

Lokalizace (diagnózy dle číselníku)	Počet	Procent
C18	25	48
C19	7	13,5
C20	20	38,5

Tab. 2. Rozdělení souboru dle provedené operace

Typ operace	Počet
Pravostranná hemikolektomie	13
Levostranná hemikolektomie	3
Resekce sigmatu	9
Nízká přední resekce rekta - double stapling	18
Amputace rekta dle Millese	7
Subtotální kolektomie s primární anastomózou	1
Resekce rektosigmatu dle Hartmana	1

Tab. 3. Rozdělení souboru dle TNM klasifikace

TNM klasifikace	Počet	Procent
T1	2	4
T2	13	25
T3	31	60
T4	6	11
N0	34	65
N1	10	20
N2	7	14
N3	1	1
M0	50	97
M1	2	3

Tab. 4. Rozdělení dle stagingu

Staging	Počet	Procent
1	12	22,5
2	20	38,5
3	18	36
4	2	3

Tab. 5. Rozdělení dle gradingu

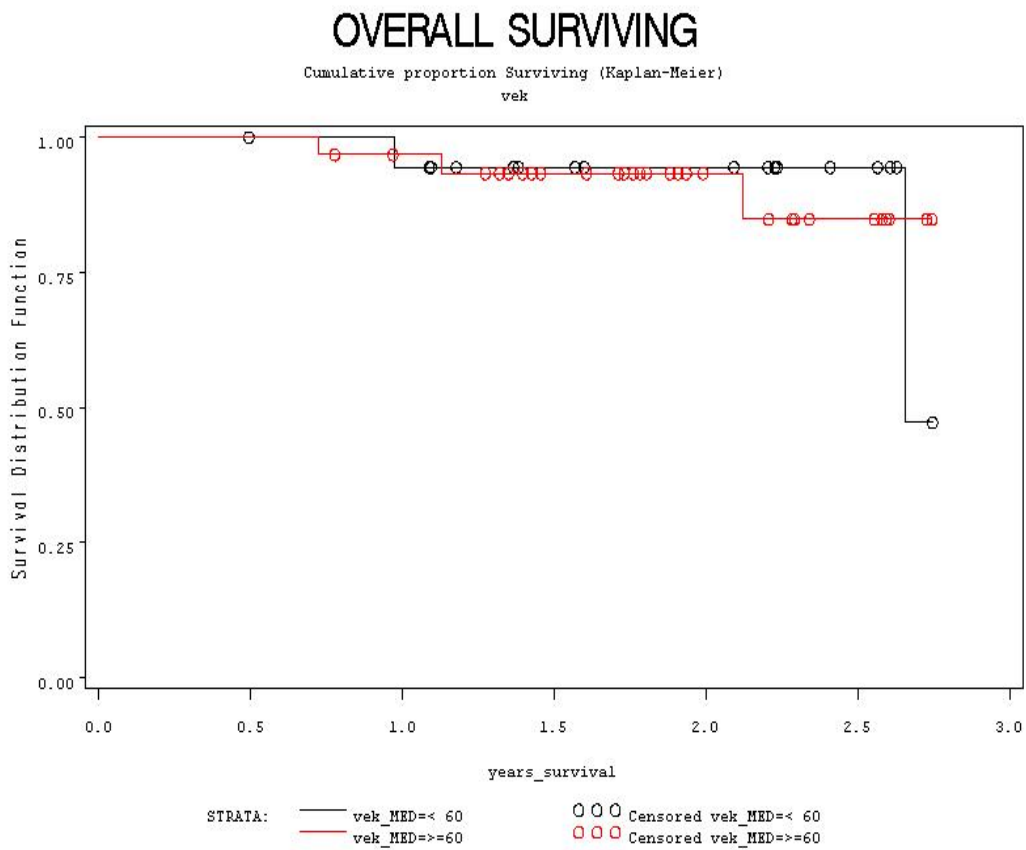
Grading	Počet	Procent
1	12	23
2	34	67
3	4	7
4	2	3

Tab. 6. Pozitivní uzliny a počet uzlin v resektátu

Počet uzlin Pozitivní / celkový počet	Počet
0/4	2
0/5	2
0/7	2
0/9	6
0/10	2
0/11	3
0/12	3
0/13	2
0/14	3
0/15	1
0/16	2
0/17	2
0/19	1
0/22	1
0/23	1
0/29	1
1/5	1
1/8	1
1/9	1
1/10	1
1/11	1
1/12	1
1/16	1
1/21	1
2/6	1

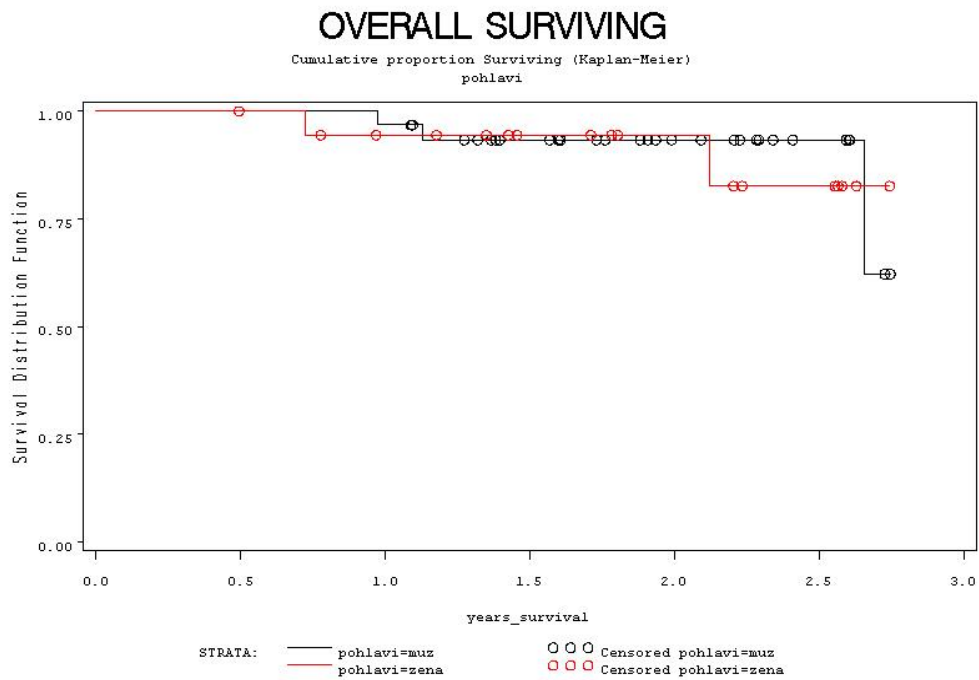
2/19	1
3/7	1
3/12	1
4/12	1
4/19	1
5/16	1
7/13	1
9/14	1
12/16	1

Graf. 1. Celkové přežití v závislosti na věku



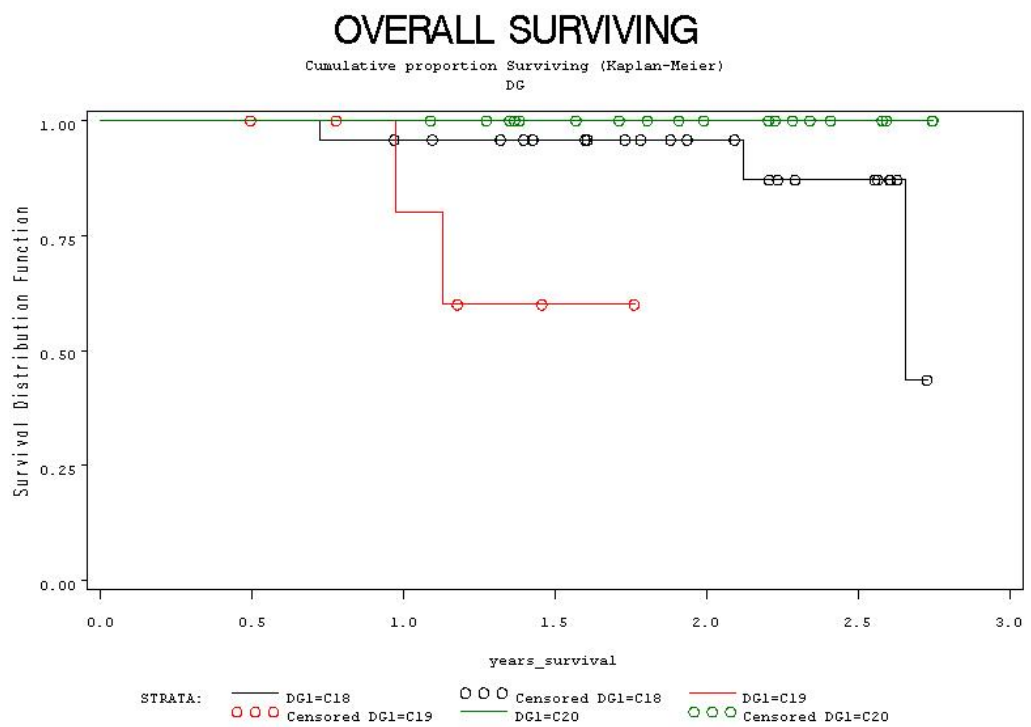
Celkové přežití není závislé na věku ($p = 0,7631$).

Graf. 2. Celkové přežití v závislosti na pohlaví



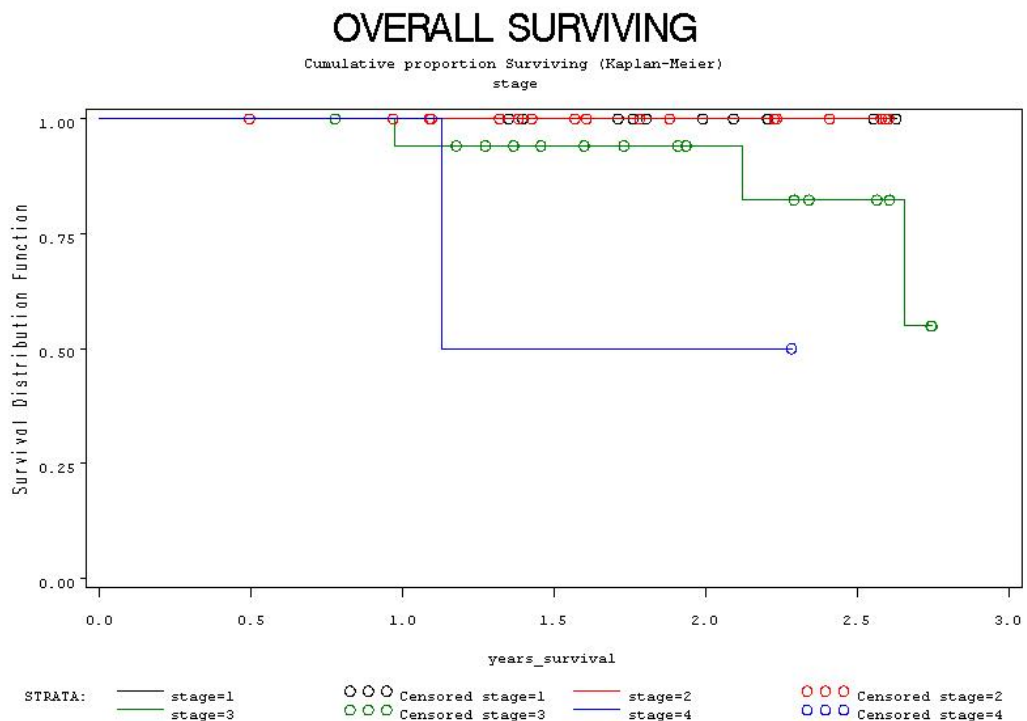
Celkové přežití není závislé na pohlaví ($p = 0,7599$).

Graf. 3. Celkové přežití v závislosti na diagnóze



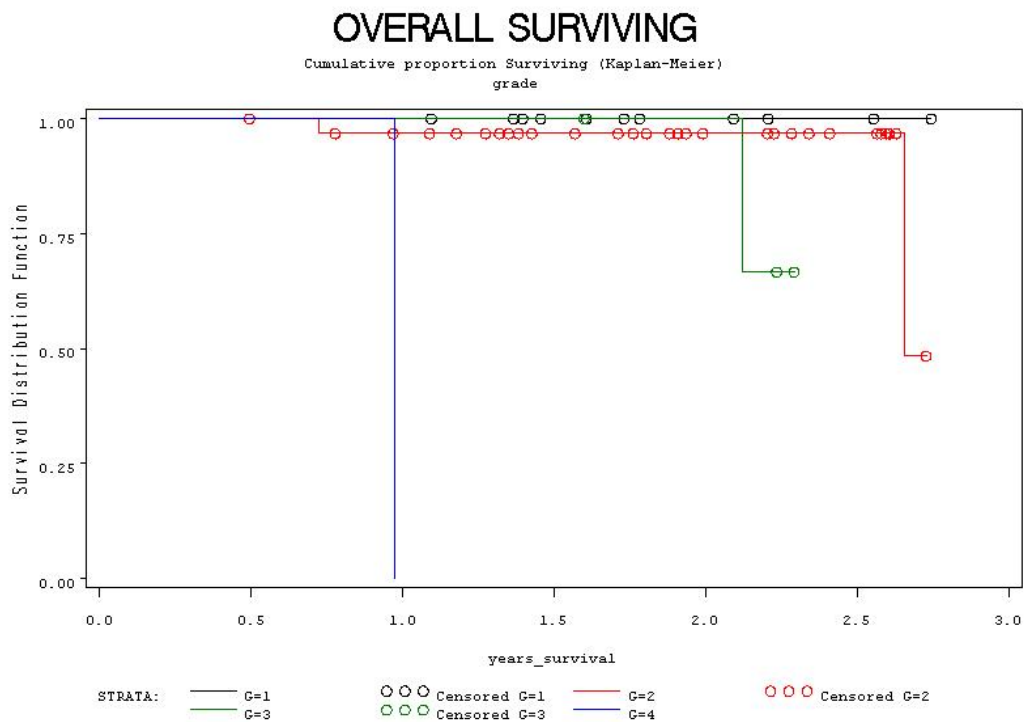
Existuje statisticky významný rozdíl v přežití nemocných s karcinomem kolorekta vzhledem k lokalizaci nádoru ($p = 0,0083$). Tento rozdíl je způsoben zřejmě dobou bezpříznakovosti onemocnění, kdy tumory rekta způsobují nejdříve a nejčastěji obtíže, tedy jsou i diagnostikovány v příznivějších stádiích. Nejhorší výsledek je v našem souboru u nádorů rektosigmoideálního přechodu, toto však může být zkresleno menším počtem nemocných.

Graf. 4. Celkové přežití v závislosti na stagingu



Existuje statisticky významný rozdíl v přežití nemocných v závislosti na stagingu onemocnění ($p = 0,300$), což potvrzuje kvalitní patologické zpracování jednotlivých vzorků a zdůrazňuje nutnost adekvátní onkologické léčby, neboť pro stadia I a II. se zdá být dostatečná chirurgická terapie s nutností pečlivé dispenzarizace v pooperačním období.

Graf. 5. Celkové přežití v závislosti na gradingu



Existuje statisticky významný rozdíl v přežití nemocných v závislosti na gradingu karcinomu ($p = 0,0001$), což potvrzuje kvalitní patologické zpracování jednotlivých vzorků i adekvátní chirurgickou léčbu.

3.2. Ostatní kontrolní soubory

V tab. 7. je základní deskriptivní statistika všech kontrolních skupin.

Tab. 7. Věk a pohlaví nemocných v kontrolních skupinách

Skupina	Počet	Mužů	Žen	Věk	Minimum	Maximum
Zdraví	20	10	10	51,58	20,73	79,98
Záněty	20	17	3	56,56	30,80	70,75
Prekancerozy	20	10	10	32,18	20,41	57,91
NED	22	16	6	66,4	54,11	79,10
Plíce	20	12	8	65,8	53,10	74,20

4. Výsledky

Pro větší přehlednost jsou výsledky řazeny do menších kapitol.

4.1. Exprese matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2)

Kolorektální karcinom je v České republice druhým nejčastějším karcinomem u mužů a žen. Pokud nedojde k včasné diagnostice a léčbě, pak karcinom tlustého střeva postupně prorůstá střevní stěnou do okolních struktur, infiltruje lymfatické a krevní cévy a vytváří vzdálené metastázy. Nezbytným krokem nádorové invazivity a metastazování je degradace extracelulární matrix (ECM) a prostup bazální membránou (BM). Matrixové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory, inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs), hrají důležitou roli v procesu degradace ECM a BM ve vztahu k nádorové invazivitě. (5, 66) MMP-2 (92kDa typ kolagenázy IV) degraduje molekuly kolagenu IV, který je hlavní komponentou BM. (60) MMP-7 (Matrilysin) je enzym degradující molekuly fibronektinu, elastinu a lamininu. Aktivita matrixových metaloproteináz závisí na rovnováze mezi hladinou aktivního enzymu a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz. TIMP-2 se váže specificky nekovalentní vazbou na pro-formu MMP-2 a inhibuje jeho enzymatickou aktivitu. (61) TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7. Stanovili jsme exprese MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 ve tkáňových vzorcích kolorektálního karcinomu metodou real-time PCR a korelovali jsme ji se stadiem choroby (příloha 7.).

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou druhem endopeptidáz, které mají schopnost degradovat většinu komponent bazální membrány. Regulace MMPs probíhá na několika úrovních, na úrovni transkripce,

jejich aktivace a prostřednictvím specifických tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs). Prostřednictvím remodelace extracelulární matrix (ECM) se MMPs uplatňují při procesech buněčné migrace extracelulární matrix, dále prostřednictvím změny extracelulární matrix matrixovými metaloproteinázami mohou buňky přejít do proliferace, apoptózy nebo morfogeneze a mohou měnit aktivitu biologických faktorů jako jsou růstové faktory a jejich receptory. V současnosti je známo více než 28 lidských MMPs a nové jsou stále objevovány.

Klasifikace a nomenklatura MMPs je založena na kombinaci substrátové aktivity *in vitro*, aminokyselinové sekvenci a proteinové struktury. Některé matrixové metaloproteinázy zachovávají historické číslování. Typy MMPs nevázané na membránu jsou klasifikovány podle jejich substrátové aktivity: kolagenózy (MMPs 1, 8, 13 a 18), želatinázy (MMP-2 a MMP-9), stromelysiny (MMPs 3, 10 a 11), matrilysiny (MMP-7 a MMP-26), makrofágová elastináza (MMP-12), enamelysin (MMP-20), membránové MMPs (MT-MMPs; MMPs 14-17, 24 a 25) a v současnosti objevené matrixové metaloproteinázy (MMPs 19, 21, 23, 27 a 28) jsou ve skupině nezařazené .

Tab. 8. Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a normální tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkání (n=19)	nádorová maligní tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0.0020
TIMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,0028	0.0467
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 3,2560	0.0007
TIMP-1/GAPDH	0-0.2394	0.0839-26.0146	0.0003

V tabulce 8. jsou hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi normální tkání a nádorovou

maligní tkání. Hladina exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně ve srovnání s normální tkání ($p < 0.0020$, $p < 0.0467$, $p < 0.0007$, $p < 0.0003$).

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi tkání benigního onemocnění a nádorovou maligní tkání jsou v tabulce 9. Zjistili jsme, že hladina exprese je signifikantně zvýšená pouze u mRNA MMP-2 nádorové maligní tkáně ve srovnání s benigní tkání ($p < 0.0464$). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi nádorovou a benigní tkání nebyl zjištěn ($p < 0.4042$, $p < 0.1139$, $p < 0.0780$).

Tab. 9. Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi nádorovou maligní tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	tkáň benigního onemocnění (n=11)	nádorová maligní tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0.0464
TIMP-2/GAPDH	0 - 0.0015	0 - 0,0028	0.4042
MMP-7/GAPDH	0 - 1.10987	0 - 3,2560	0.1139
TIMP-1/GAPDH	0 - 20.3014	0.0839 - 26.0146	0.0780

V tabulce 10. jsou hodnoty exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a jejich porovnání mezi normální tkání a benigní tkání. Protože jsme nenašli rozdíly v úrovni exprese genů MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi skupinami NORM a BENIGN ($p < 0.2231$, $p < 0.4615$, $p < 0.2691$, $p < 0.2932$) spojili jsme tyto tkáně do jedné skupiny, která umožňuje sledovat rozdíly mezi maligní tkání a tkání bez maligního postižení, tabulka 10.

Tab. 10. Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi normální tkání a benigní tkání (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkáň (n=19)	tkáň benigního onemocnění (n=11)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0	0.2231
TIMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0.0015	0.4615
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 1.10987	0.2691
TIMP-1/GAPDH	0-0.2394	0 - 20.3014	0.2932

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi normální tkání s tkání benigního onemocnění a nádorovou maligní tkání jsou v tabulce 11. Zjistili jsme, že hladina exprese mRNA MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně ve srovnání s normální tkání a benigního onemocnění ($p < 0.0005$, $p < 0.0004$, $p < 0.0007$). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi nádorovou maligní a nemaligní tkání byl hraniční ($p < 0.0549$).

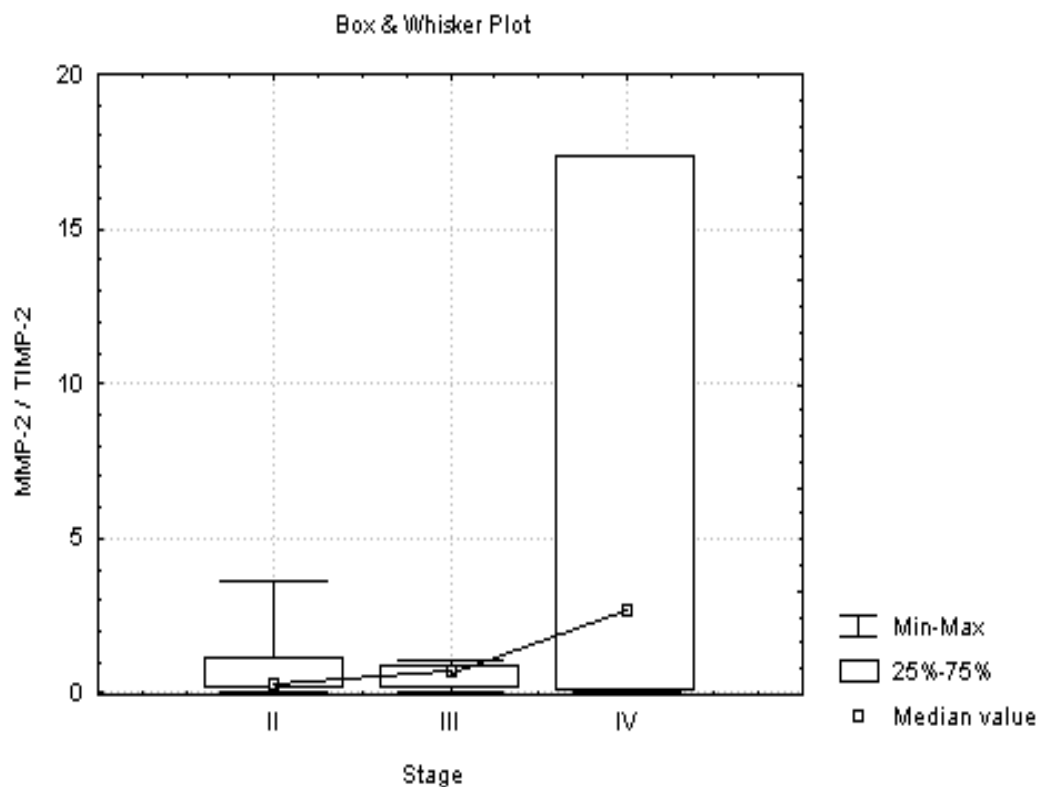
Tab. 11. Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi jednotlivými nádory a kontrolní skupinou (Wilcoxonův test).

mRNA	normální tkáň + benigní onemocnění (n=30)	nádorová maligní tkáň (n=38)	p
	rozpětí 25%-75%	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	0 - 0	0 - 0,00035	0,0005
TIMP-2/GAPDH	0 - 0,0001	0 - 0,0028	0,0549
MMP-7/GAPDH	0 - 0	0 - 3,2560	0,0007
TIMP-1/GAPDH	0 - 0,6665	0.0839 - 26.0146	0,0004

Vzhledem k funkční závislosti, stanovili jsme poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 a korelovali jej se stadiem nádorového onemocnění. Jak je vidět na grafu, vyšší stadium nádorového onemocnění koreluje s vyšším

mediánem hodnot poměru MMP-2/TIMP-2 (stage II: 0.29, stage III: 0.69, stage IV: 2.71) ale neregistrovali jsme statistickou signifikanci ($p < 0.58$).

Graf. 6. poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 u stádií nádorového onemocnění



Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi stádii onemocnění I a II oproti stádiím III a IV jsou v tabulce 12. Nejistili jsme žádné signifikantní rozdíly v hladinách exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV ($p < 0.8044$, $p < 0.8278$, $p < 0.7167$, $p < 0.4083$).

Tab. 12. Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi stádii I, II a stádii III, IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II		stádium III + IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0003	23	0 - 0.0004	0.8044
TIMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0033	23	0 - 0,0028	0.8278
MMP-7/GAPDH	15	0 - 2,8318	23	0 - 1,6036	0.7167
TIMP-1/GAPDH	15	1,4426 - 17,5642	23	0,0522 - 5,3530	0.4083

V tabulce 13. jsou hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a statistické významnosti vzorků kolorektálního karcinomu u pacientů s diagnózou karcinomu kolon (dg. C18 a C19) srovnány s hodnotami u pacientů s diagnózou karcinomu rekta (dg. C20). V hladinách exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1 jsme rozdíl mezi vzorky nezaznamenali ($p < 0.2949$, $p < 0.2473$, $p < 0.7689$, $p < 0.3745$).

Tab. 13. Hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP7 a TIMP-1 u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu, karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C18, C19, C20) (Wilcoxonův test).

mRNA	diagnóza C18 + C19		diagnóza C20		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2	17	0 - 0.0015	20	0 - 0.0002	0.2949
TIMP-2	17	0 - 0.0005	20	0 - 0.0101	0.2473
MMP-7	17	0 - 6.1422	20	0 - 2.9156	0.7689
TIMP-1	17	0.1712 - 0.2644	20	0.0681 - 10.3096	0.3745

4.2. Exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění

Hladiny relativní exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a MMP-7 a jejich rozdíly mezi stádii onemocnění I a II oproti stádiím III a IV jsou v tabulce 14. Nejistili jsme žádné signifikantní rozdíly v hladinách exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV ($p < 0.8044$, $p < 0.8278$, $p < 0.7167$, $p < 0.4083$).

Tab. 14. Relativní hladiny specifických mRNA kopií MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1. Hodnota p vyjadřuje statistický rozdíl mezi stádii I, II a stádii III, IV (Wilcoxonův test).

mRNA	stádium I + II		stádium III + IV		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0003	23	0 - 0.0004	0.8044
TIMP-2/GAPDH	15	0 - 0.0033	23	0 - 0,0028	0.8278
MMP-7/GAPDH	15	0 - 2,8318	23	0 - 1,6036	0.7167
TIMP-1/GAPDH	15	1,4426 - 17,5642	23	0,0522 - 5,3530	0.4083

V tabulce 15. jsou hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 a statistické významnosti vzorků kolorektálního karcinomu pacientů s diagnózou karcinomu kolonu (dg. C18) v.s. pacienti s diagnózou karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C19 a C20). V hladinách exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 jsme rozdíl mezi vzorky pacientů diagnózy C18 v.s. C19 a C20 nezaznamenali ($p < 0.2949$, $p < 0.2473$, $p < 0.7689$, $p < 0.3745$).

Tab. 15. Hodnoty hladin exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 u vzorku kolorektálního karcinomu pacientů diagnózou karcinomu kolonu, karcinomu rektosigmoideálního spojení a rekta (dg. C18, C19, C20) (Wilcoxonův test).

mRNA	diagnóza C18		diagnóza C19 + C20		p
	n	rozpětí 25%-75%	n	rozpětí 25%-75%	
MMP-2	17	0 - 0.0015	20	0 - 0.0002	0.2949
TIMP-2	17	0 - 0.0005	20	0 - 0.0101	0.2473
MMP-7	17	0 - 6.1422	20	0 - 2.9156	0.7689
TIMP-1	17	0.1712 - 0.2644	20	0.0681 - 10.3096	0.3745

4.3. Korelace mezi hladinami exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

V tabulce 16 jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese MMP-2 v.s. MMP-7, MMP-2 v.s. TIMP-2, MMP-7 v.s. TIMP-1, TIMP-2 v.s. TIMP-1, MMP-2 v.s. TIMP-1, MMP-7 v.s. TIMP-2. Vzájemná negativní korelace ($r=-0.85$) mezi mRNA MMP-7 a mRNA TIMP-2 byla výrazně signifikantní ($p<0.0001$). Další vzájemné korelace byly statisticky nevýznamné.

Tab. 16. Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese.

nádorová tkáň	Spearmanův korelační koeficient	p - value
MMP-2 X MMP-7	-0.17802	0.5426
MMP-2 X TIMP-2	0.30989	0.2809
MMP-7 X TIMP-1	-0.26154	0.3664
TIMP-2 X TIMP-1	0.16923	0.5630
MMP-2 X TIMP-1	0.28791	0.3182
MMP-7 X TIMP-2	-0.84615	0.0001

4.4. Ověření biologických vlastností resekčních linií kolorektálního karcinomu kvantitativní expresí mRNA CEA a TIMP-1

Chirurgický standard radikální léčby kolorektálního karcinomu vyžaduje radikální odstranění úseku střeva s nádorem a odstranění závěsu střeva s lymfatickým a cévním zásobením. Resekční výkony se liše dle lokalizace nádoru, zásadou však zůstává, že vzdálenost resekční linie od nádoru nesmí být menší než 5 cm (respektive 2 cm u nádorů rekta) aborálním směrem a 10 cm orálním směrem(přílohy 2. – 6.). Do úvahy o rozsahu resekce je třeba brát i cévní zásobení resekčních linií a odstranění regionálních lymfatických uzlin.

Pro ověření vlastností resekčních linií kolorektálního karcinomu jsme zvolili stanovení mRNA dvou odlišných genů a to mRNA karcinoembryonálního antigenu (CEA) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz-1 (TIMP-1). Kvantitativním stanovením mRNA těchto genů chceme zjistit do jaké míry je přítomná v resekčních linií kolorektálního karcinomu exprese genů, jejichž přítomnost či zvýšená exprese je charakteristická pro nádorovou tkáň. Černá a kol. pozorovali zvýšenou expresi mRNA CEA v nádorové kolorektální tkáni oproti tkáni kontrolní. (11) Prostřednictvím mRNA CEA již někteří autoři zjišťovali přítomnost nádorových buněk v lymfatických uzlinách a nádorové tkáni. (29, 30) Stejně tak řada autorů zaznamenala zvýšenou expresi TIMP-1 v nádorové tkáni oproti normální tkáni. (1, 10, 52, 74) TIMP-1 patří do skupiny inhibitorů matrixových metaloproteináz, podílí na regulaci aktivity některých matrixových metaloproteináz, zdá se však, že v nádorové tkáni převažuje jeho mitogení aktivita. (59)

Existuje statisticky významný rozdíl mezi resekční linií a nádorovou tkání při stanovení mRNA pro TIMP 1 (p-value 0,0436) pro kolorektální karcinom bez rozdílu lokalizace - tab. 17, nepodařilo se však prokázat statisticky významný rozdíl mezi vzorky z kolorektálního karcinomu a

resekční linií při lokalizaci nádoru v rektu stanovením mRNA pro TIMP-1 (p- value 0,1338) – tab. 18. Stejně tak neexistuje statisticky významný rozdíl mezi vzorky kolorektálního karcinomu a resekční linie při lokalizaci tumoru v oblasti tračníku stanovením mRNA pro TIMP-1 (p- value 0,2632) – tab. 19. Tento rozpor vysvětlujeme nižším počtem vzorků v jednotlivých skupinách (vzorky při lokalizaci nádoru v rektu a v colon), zatímco při spojení obou skupin již počet vzorků je statisticky signifikantní. Přesto je prokázána přítomnost TIMP-1 v resekční linii, i když v nižší hladině.

Tab. 17. Hladiny TIMP 1 - nádorová tkáň / resekční linie

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	44903,00	5846,50
Upper quartile	265492,00	116870,75
p-value	0,0436	0,0436
Počet pacientů	45	45

Tab. 18. Hladiny TIMP 1 - nádorová tkáň / resekční linie - rektum

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	44903,00	1237,00
Upper quartile	284116,00	182992,00
p-value	0,1338	0,1338
Počet pacientů	23	23

Tab. 19. Hladiny TIMP 1 - nádorová tkáň / resekční linie - tračník

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	41137,00	9937,00
Upper quartile	265492,00	112462,00
p-value	0,2632	0,2632
Počet pacientů	22	22

Při stanovení CEA existuje statisticky významný rozdíl mezi resekčními liniemi a nádorovou tkání bez rozdílu lokalizace (p- value nižší než 0,0001) – tab. 20, což prokazuje nepřítomnost nádorové tkáně v resekční linii, dále existuje statisticky významný rozdíl mezi resekčními liniemi a nádorovou tkání u nádorů rekta při stanovení hladin CEA v nádoru a resekční linii (p-value 0,0005) – tab. 21 a také existuje statisticky významný rozdíl mezi resekčními liniemi a nádorovou tkání u nádorů colon při stanovení hladin CEA v nádoru a resekční linii (p-value 0,0042) – tab. 22, což prokazuje nepřítomnost nádorové tkáně v resekční linii v obou skupinách. Z hladin uvedených v tabulkách vyplývá, že mRNA pro CEA je v resekční linii téměř nepřítomná, narušila od hladin mRNA pro TIMP-1.

Tab. 20. Hladiny CEA - nádorová tkáň / resekční linie

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	0	0
Upper quartile	25823,50	0
p-value	Nižší než 0,0001	Nižší než 0,0001
Počet pacientů	45	45

Tab. 21. Hladiny CEA - nádorová tkáň / resekční linie - rektum

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	0	0
Upper quartile	28518,50	0
p-value	0,0005	0,0005
Počet pacientů	23	23

Tab. 22. Hladiny CEA - nádorová tkáň / okraj resektátu - tračník

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	0	0
Upper quartile	25823,50	0
p-value	0,0042	0,0042
Počet pacientů	22	22

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi hladinami sledovaných markerů (CEA, TIMP-1) u jednotlivých stadií nádorového onemocnění (p- value 0,7778 pro CEA, 0,5684 pro TIMP-1) – tab. 23. Stejně tak neexistuje žádný statisticky významný rozdíl při rozdělení vzorků dle gradingu (p-value 0,3720 pro TIMP-1, 0,4608 pro CEA), ani podle velikosti tumoru (T1-T4) (p-value 0,4828 pro TIMP-1, 0,2261 pro CEA), ani podle pozitivivity uzlin (N0-N2) (p-value 0,5464 pro TIMP-1, 0,9274 pro CEA).

Tab. 23. Hladiny markerů u jednotlivých stadií nádorového onemocnění a srovnání, zda existuje rozdíl v hodnotách markerů u jednotlivých stadií nádorového onemocnění

	Stadium I.	Stadium II.	Stadium III.	Stadium IV.	p- value
TIMP-1	41137,00	45865,50	30421,25	140140,00	0,5684
25%-75%	- 50066,50	- 284116,00	- 225186,00	- 356721,50	
NormTIMP-1	0,7536 -	0,7641 -	0,9052 -	1,8974 -	0,8971
25%-75%	3,5753	- 5,7205	- 10,2193	- 8,5134	
CEA	0 -	0 -	0 -	7380,00 -	0,7778
25%-75%	8235,50	28518,50	24393,00	- 9055,00	
Norm. CEA	0 - 0,0703	0 - 0,2687	0 - 0,4654	0,0297 -	0,7854
25%-75%				- 0,1589	
Počet	10	21	12	2	

4.5. Expres m RNA v periferní krvi kontrolních skupin

V kontrolních skupinách jsme nezaznamenali, metoda izolace volné RNA z plazmy i metodu zachytu nádorových buněk na membráně (metody B,C) expresi mRNA pro CEA, CK 20. Zaznamenali jsme však expresi GAPDH, což svědčí o správně provedené izolaci RNA, RT i vlastním stanovení q PCR.

4.6. Expres m RNA v periferní krvi u skupiny Nádory

Vzorky periferní krve byly stanoveny v následujících intervalech:

Vzorek 1 - předoperačně (1 den před operací)

Vzorek 2 - pooperačně (7.-10. den po operaci)

Vzorek 3 - v průběhu dispenzární péče po 6 měsících od operace

Vzorek 4 – v průběhu dispenzární péče po 12 měsících od operace.

U vzorků 1 a 2 jsme metodou B (viz kapitola 2.1.2) stanovili koncentraci RNA a provedli reverzní transkripci (dle předpokladu, že právě v těchto vzorcích bude nejvyšší koncentrace mRNA) a pokusili jsme se stanovit mRNA CK20 a CEA, avšak přes opakované RT s různými oligoT_x (zde jsme předpokládali nejpravděpodobnější možnost problému) jsme žádné CEA nebo CK20 nedetekovali.

Změnili jsme proto metodiku stanovení mRNA v periferní krvi a metodou C (viz kapitola 2.1.2) jsme se pokusili stanovit mRNA CEA a CK 20 ve všech vzorcích periferní krve. Nepodařilo se nám v žádném vzorku detekovat přítomnost mRNA CEA, ale mRNA CK 20 se nám podařilo detekovat ve 13 vzorcích – viz tab. 24. Ve všech ostatních vzorcích se nám ani při opakovaném stanovení nepodařilo mRNA CK 20 prokázat (přílohy 8. a 9.).

Tab. 24. Detekce mRNA CK 20 v periferní krvi u jednotlivých pacientů a srovnání s klinikou.

Číslo pacienta	Pořadí náběru	Prům. mRNA CK 20	TNM klasifikace	Grading	Dg.	Počet pozitivních uzlin	Klinika
301101	1	7562	T3N0M0	1	C18.2	0/9	Remise
270213	1	70654	T2N0M0	2	C18.3	0/13	Remise
330324	2	11600	T2N0M0	2	C19	0/16	Remise
275523	1	8980	T3N1M0	1	C20	2/19	Remise
396027	2	99	T3N0M0	2	C20	0/11	Remise
440429	1	217	T3N1M0	2	C20	3/12	Remise

380816	2	27	T3N0M0	2	C18.9	0/9	Remise
500520	1	42	T3N0M0	2	C20	0/11	Remise
500520	2	46	T3N0M0	2	C20	0/11	Remise
301103	1	7	T3N1M0	1	C18.2	1/12	Progrese
301103	3	25	T3N1M0	1	C18.2	1/12	Progrese
481206	1	963	T3N0M0	2	C20	0/9	Remise
435419	1	10	T3N1M0	1	C19	1/10	Remise

Z tab. 24. je zjevné, že neexistuje korelace mezi zachycením mRNA CK20 v periferní krvi a pohlavím, ani diagnózou, ani stadiem onemocnění, ani pozitivitou či negativitou lymfatických uzlin, ani věkem nemocného.

Přesto u nemocného označeného jako 301103 došlo k zachycení mRNA CK 20 předoperačně a po 6 měsících od operace, kdy tato hodnota byla dokonce nepatrně vyšší než předoperační. Tento muž, v době operace 75 letý, byl operován 6.4.2005 a provedena pravostranná hemikolektomie. 14.4. 2006 však byla při koloskopické kontrole nalezena lokální recidiva a nemocný reoperován, v současné době je v péči onkologů a pravidelně dispenzarizován.

4.7. Sérové nádorové markery u kontrolních skupin

Sérové hladiny nádorových markerů byly sledovány u všech skupin s výjimkou skupiny Plíce, pro kterou stanovení sérových nádorových markerů pro kolorektální karcinom zjevně nemělo význam. Výsledky hodnot nádorových markerů jsou uvedeny v následujících tabulkách (tab. 25. – tab. 28.)

Tab. 25. Deskriptivní statistika nádorových markerů u kontrolní skupiny Zdraví

Marker	Průměr ± SD	Medián	25%	75%
TK	6,46 ± 2,59	6,0	5,3	6,8
CEA	1,46 ± 1,13	1,0	0,6	2,8
CA19-9	10,32 ± 9,66	6,9	4,0	11,9
TPA	23,34 ± 15,01	17,5	10,0	39,0
TPS	38,33 ± 21,44	44,0	16,0	48,0

Tab. 26. Deskriptivní statistika nádorových markerů u kontrolní skupiny Záněty

Marker	Průměr ± SD	25% kvartil	75% kvartil
TK	14,37 ± 13,58	6,3	14,5
CEA	1,49 ± 0,88	0,8	2,3
CA19-9	18,57 ± 26,71	5,8	17,4
TPA	49,10 ± 34,69	14,0	73,0
TPS	92,10 ± 62,17	46,0	127,0

Tab. 27. Deskriptivní statistika nádorových markerů u kontrolní skupiny Precancerozy

Marker	Průměr ± SD	Medián	25% kvartil	75% kvartil
TK	8,23 ± 3,23	8,3	5,85	10,2
CEA	1,46 ± 0,96	1,4	0,75	1,7
CA19-9	7,32 ± 9,22	3,6	0,8	8,9
TPA	40,70 ± 34,49	26,0	14,5	60,5
TPS	58,90 ± 36,49	56,0	26,5	73,0

Tab. 28. Deskriptivní statistika nádorových markerů u kontrolní skupiny NED

Marker	Průměr	Medián	25% kvartil	75% kvartil
TK	4,43 ± 2,07	3,6	2,9	5,6
CEA	2,65 ± 3,87	1,5	0,9	2,3
CA19-9	13,07 ± 11,45	10,9	4,5	17,6
TPA	49,53 ± 19,28	54,0	36,0	54,0
TPS	75,09 ± 104,91	43,0	24,0	75,0

Z tabulky 25. vyplývá, že průměrné hodnoty a mediány námi sledovaných nádorových markerů u kontrolní skupiny zdravých osob byly v rozsahu normálních mezí a to v souladu s těmi, které jsou v literatuře uváděny pro kontrolní skupiny zdravých pacientů a to pro CEA v rozsahu 1,5 - 5,0 ng/ml, CA 19-9 do 40 U/ml, TPS do 90 IU/l, TPA do 110 IU/l, TK do 6,0 IU/l resp do 8 IU/l. (32) V tabulce 26 je uvedena základní deskriptivní statistika nádorových markerů u kontrolní skupiny nemocných s akutním zánětlivým onemocněním (tj. apendicitidy a zánětlivá onemocnění končetin- např. abscesy a erysipel). Z tabulky vyplývá, že ve srovnání se zdravými kontrolami jsou u akutních zánětů vyšší především hodnoty thymidinkinázy, dále i hodnoty cytokeratininů.

V tabulce 27. je uvedena základní deskriptivní statistika nádorových markerů u kontrolní skupiny nemocných s prekancerózou (Crohnova choroba). Hodnoty CEA a CA 19-9 byly srovnatelné s hodnotami zdravých kontrol, hodnoty cytokeratininů a thymidinkinázy byly nižší než u kontrolní skupiny akutních zánětů.

Další kontrolní skupinou, kterou jsme stanovili byla skupina pacientů s primárním nádorem kolorekta v kompletní remisi nádorového onemocnění (n=22). Remisní hodnoty byly brány v úvahu pouze v případě, že pocházely od žijících nemocných, kteří nikdy neměli progresi a nebyly u nich nalezeny distanční metastázy. Kromě toho byly vyloučeny všechny výsledky v intervalu dvanácti měsíců po skončení primární terapie (nelze odhadnout vliv terapie, kdy především u adjuvantní léčby může být podáno až 12 cyklů chemoterapie). Zároveň byli vyloučeni pacienti, u kterých se v průběhu dispenzární péče vyskytovalo benigní, či zánětlivé onemocnění, které by mohlo nespecificky ovlivnit hodnoty nádorových markerů. V tabulkách 29. a 30. je uvedeno srovnání jednotlivých skupin.

Tab. 29. Srovnání markerů mezi skupinami

Marker	Záněty / Zdraví P value	Prekancerozy/Zdraví p value	Prekancerozy/Záněty P value
TK	0,020	0,056	0,323
CEA	0,650	0,596	0,840
CA199	0,261	0,158	0,038
TPA	0,024	0,086	0,477
TPS	0,005	0,067	0,110

Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou Zdraví a skupinou Záněty pro TK, TPS a TPA. Statisticky významný rozdíl nebyl zaznamenán mezi skupinou Zdraví a skupinou Prekancerozy. Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou Záněty a skupinou Prekancerozy pro nádorový marker CA 19-9.

Zejména rozdíl mezi skupinou zdravých kontrol a skupinou pacientů s akutními záněty u proliferačního markeru TK a cytokeratinů TPS a

TPA je v souladu s literárními závěry, kdy je známo, že především zánětlivé komplikace mohou nespecificky elevovat hodnoty těchto markerů a je nutné s touto skutečností počítat při klinické interpretaci laboratorních výsledků. (4, 13, 36)

Tab. 30. Srovnání skupiny NED s kontrolními skupinami.

Marker	NED/Prekancerozy p – value	NED/Záněty P – value	NED/Zdraví p – value
CEA	0,403	0,652	0,2819
CA19-9	0,036	0,717	0,333
TPS	0,689	0,050	0,467
TPA	0,147	0,778	0,002
TK	0,002	0,001	0,018

Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou NED a skupinou Prekancerozy pro nádorové markery CA19-9 a TK. Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou NED a skupinou Záněty pro TK, TPS. Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou NED a skupinou Zdraví pro TK, TPA.

Ve všech případech byl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl mezi hodnotou proliferačního markeru TK u skupiny pacientů v kompletní remisi nádorového onemocnění kolorektálního karcinomu a ostatními kontrolními skupinami, včetně zdravých kontrol. Medián hodnot TK byl u skupiny NED signifikantně nižší, než u ostatních kontrol, včetně zdravé kontrolní skupiny. Vysvětlení spočívá ve skutečnosti, že i u skupiny pacientů, které klinik označil za zdravé se vyskytovali pacienti s nespecifickou elevací TK, např. v důsledku reparačních procesů při zranění. Naopak u nádorového markeru TPA, byly hodnoty signifikantně vyšší u skupiny NED ve srovnání se skupinou zdravých kontrol, což může

souviset např. s progresí nádorového onemocnění, které dosud nebylo detekováno.

4.8. Sérové nádorové markery u skupiny Nádory

Nádorové markery byly dále vyšetřovány u souboru nemocných s primárně diagnostikovaným a histologicky verifikovaným adenokarcinomem tlustého střeva. Jednalo se o 52 pacientů (32 mužů, 20 žen) průměrný věk nemocných je 63,4 roku (40 –79,1 let). Jednalo se o pacienty s lokoregionálním nádorovým onemocněním (stadia I.- stadia III.), pouze u dvou pacientů byly v průběhu operace diagnostikovány vzdálené metastázy na játrech, které před operací nebyly patrné pomocí zobrazovacích metod. Hodnoty nádorových markerů byly stanoveny v následujících intervalech:

- předoperačně (v intervalu 2 týdny až 1 den před operací)
- pooperačně (7. den po operaci)
- v průběhu dispenzární péče v 6 měsíčních intervalech, tj. 6, 12, 18 a 24 měsíců po operaci.

V následujících tabulkách (tab. 31. – tab. 36.) je uvedena základní deskriptivní statistika pro výše uvedené intervaly odběrů nádorových markerů.

Tab. 31. Základní deskriptivní statistika předoperačních hodnot nádorových markerů

Typ markeru	Průměr \pm SD	Medián	25% Kvartil	75% kvartil
CEA	26,28 \pm 139,94	1,8	0,950	3,300
CA 199	15,78 \pm 21,12	10,2	4,450	19,600
CA 242	15,31 \pm 28,31	6,0	3,900	10,300
TPS	90,02 \pm 108,24	51,0	27,000	131,000
TPA	59,52 \pm 59,06	54,0	33,000	68,000
TK	5,98 \pm 5,29	4,7	3,100	5,600
CYFRA	1,63 \pm 2,64	0,8	0,500	1,700

Tab. 32. Základní deskriptivní statistika pooperačních hodnot nádorových markerů

Typ markeru	Průměr \pm SD	Medián	25% Kvartil	75% kvartil
CEA	22,72 \pm 101,38	0,7	0,4	1,5
CA 199	18,77 \pm 48,62	7,7	4,5	14,8
TPS	130,67 \pm 116,78	103,5	61,0	167,0

Tab. 33. Základní deskriptivní statistika hodnot nádorových markerů v průběhu follow up– 6 měsíců po operaci

Typ markeru	Průměr ± SD	Medián	25% Kvartil	75% kvartil
CEA	15,97± 87,14	1,3	0,9	2,6
CA 199	26,48± 81,66	11,0	5,3	15,4
TPS	82,98± 134,56	41,0	20,0	74,0

Tab. 34. Základní deskriptivní statistika hodnot nádorových markerů v průběhu follow up– 12 měsíců po operaci

Typ markeru	Průměr ± SD	Medián	25% kvartil	75% kvartil
CEA	3,36 ± 9,62	1,2	0,8	2,7
CA 199	12,87 ± 13,59	9,3	5,2	14,9
TPS	140,39 ± 253,39	63,0	35,0	147,0

Tab. 35. Základní deskriptivní statistika hodnot nádorových markerů v průběhu follow up– 18 měsíců po operaci

Typ markeru	Průměr ± SD	Medián	25% kvartil	75% kvartil
CEA	3,76 ± 9,08	1,2	0,9	2,6
CA 199	32,43 ± 107,87	9,8	4,7	19,2
TPS	193,57 ± 419,89	72,0	42,0	155,0

Tab. 36. Základní deskriptivní statistika hodnot nádorových markerů v průběhu follow up– 24 měsíců po operaci

Typ markeru	Průměr \pm SD	Medián	25% kvartil	75% kvartil
CEA	3,86 \pm 6,45	1,4	1,0	2,1
CA 199	20,44 \pm 34,13	9,1	2,8	17,1
TPS	215,22 \pm 252,62	85,0	50,0	335,0

Předoperačně byly stanoveny hodnoty následujících nádorových markerů:

CEA a CA 19-9 (markery doporučené odbornými společnostmi- Česká gastroenterologická společnost, European Group on Tumour Markers atd.) pro rutinní sledování nádorových markerů

TK, TPS, TPA- (proliferační marker thymidinkináza-TK, cytokeratininové nádorové markery- TPA a TPS, jedná se o nádorové markery, jejichž význam u kolorektálního karcinomu je předmětem výzkumu)

Pooperačně byly stanoveny hodnoty doporučených nádorových markerů CEA, CA 19-9 a jednoho cytokeratininového nádorového markeru- TPS.

V tabulce 37. je uvedena korelace předoperačních hodnot nádorových markerů a jejich vztah s TNM klasifikací, stadiem onemocnění a gradingem.

Tab. 37. Vztah předoperačních hodnot s TNM klasifikací, stadiem onemocnění, gradingem

	CEA	CA 19-9	CA 242	TPS	TPA	TK	CYFRA
Pt	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pn	r=0,35 p<0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS
M	r=0,35 p<0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Stadium	r=0,35 p<0,01	NS	NS	NS	r=0,35 p<0,01	NS	NS
Grading	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

r= Spearmanův korelační koeficient, p=statistická významnost, NS=není specifické

Prokázali jsme vztah předoperačních hodnot CEA s postižením lokoregionálních uzlin a výskytem vzdálených metastáz a se stadiem onemocnění, u nádorového markeru TPA jsme prokázali vztah se stadiem onemocnění. U ostatních nádorových markerů nebyly žádné významné vztahy prokázány, což může být dáno i velikostí námi sledovaného souboru.

V tabulce 38. jsou uvedeny pouze statisticky významné vzájemné korelace předoperačních hodnot nádorových markerů.

Tab. 38. Vzájemné korelace předoperačních hodnot nádorových markerů

Korelované markery	Spearmanův korelační koeficient	Statistická významnost
CEA vs. TPA	r= 0,40	p< 0,03
TPA vs. TPS	r= 0,58	p< 0,0009
TPA vs. TK	r= 0,39	p< 0,03
TK vs. TPS	r= 0,54	p< 0,002

r= Spearmanův korelační koeficient, p statistická významnost

U předoperačních hodnot jsme prokázali významnou korelaci mezi cytokeratininovým nádorovými markery TPA a TPS a dále mezi proliferačním markerem TK a TPS. V tabulce 39. je uvedeno srovnání před- a pooperačních hodnot nádorových markerů a jejich vzájemná korelace.

Tab. 39. Srovnání před- a pooperačních hodnot nádorových markerů a jejich vzájemná korelace

Marker	Medián		Dynamika		Korelace před-/po-	
	Předop.	Poop.	Typ	Významnost (p)	r	p
CEA	1,8	0,7	↓	< 0.0001	0.82	< 0.0001
CA 19-9	10,2	7,7	↓	NS	0.83	< 0.0001
TPS	51,0	103,5	↑	0,006	0.21	NS

U klasických nádorových markerů došlo pooperačně k poklesu hodnot nádorových markerů, statisticky významný byl pouze pokles CEA. U TPS došlo k signifikantnímu nárůstu, což je nejpravděpodobněji spjato

s reparačními pochody po provedené operaci (pooperační odběry byly provedeny 7. den po operaci).

V tabulce 40. je charakterizováno celkové přežití v závislosti na výši předoperačních hodnot nádorových markerů ve vztahu k provedené operaci. Vzhledem k malému počtu probandů v kontrolních skupinách jsme jako diskriminační hladinu použili laboratorních hraničních hodnot (laboratorní cut-off), které byly pro jednotlivé nádorové markery následující: CEA 3,5 ng/ml, CA 19-9 28.0 IU/ml, TK 6 IU/l, TPA 110 IU/l, TPS 90 IU/l.

Tab. 40. Celkové přežití v závislosti na výši předoperačních hodnot nádorových markerů ve vztahu k provedené operaci (laboratorní cut off)- univariační analýza

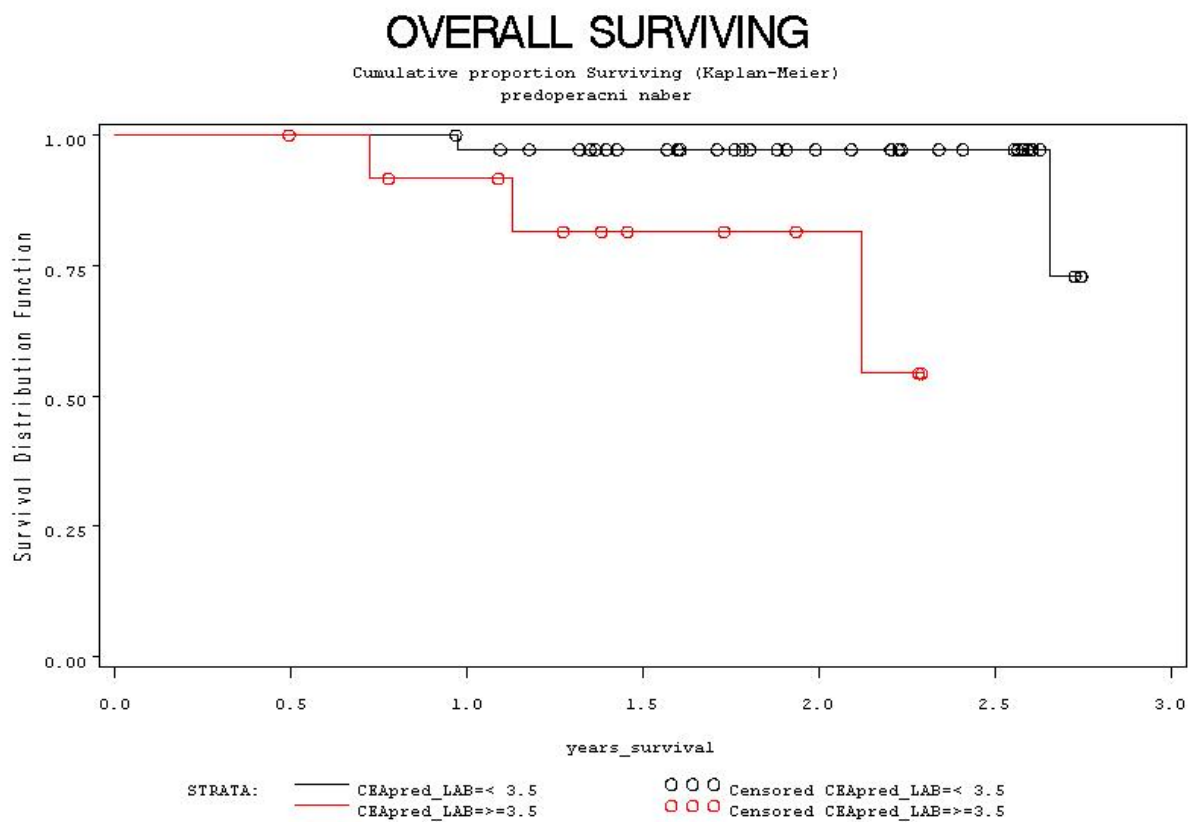
Marker	Kaplan Meier	Cox Model	
		HR (95% CI)	p-value
CEA	< 0.006	11,9 (1,2-115,9)	< 0,03
CA 19-9	NS	2,2 (0,2-21,6)	NS
TPS	NS	3,9 (0,6-23,3)	NS
TPA	< 0.001	ND	NS
TK	NS	1,9 (0,1-36,1)	NS

ND nedetekováno, NS nespecifické

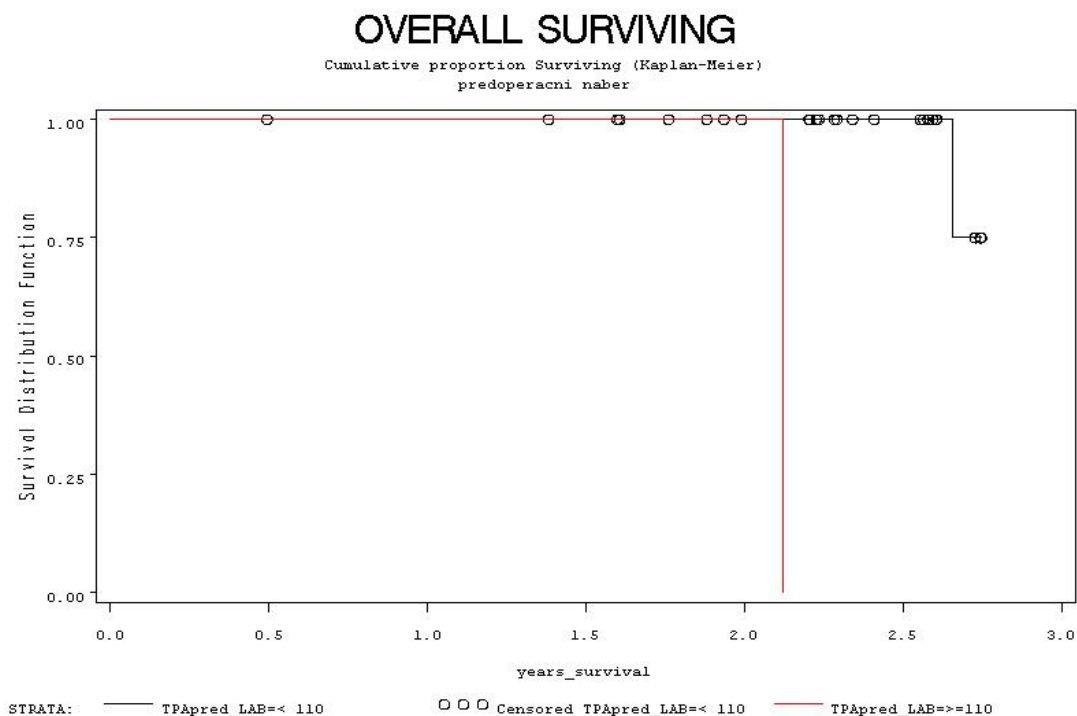
Z tabulky 40. vyplývá, že prognostický význam má dle očekávání předoperační stanovení CEA, zároveň cytokeratininový marker TPA (Log rank $p < 0.001$). K ověření významu tohoto markeru však bude nutné vyhodnocení přežití v delším časovém intervalu. Význam obou markerů pro přežití je zároveň uveden v grafech 7. a 8. Provedená multivariační

analýza (Coxův regresní model) neprokázala prognostický význam žádného z hodnocených nádorových markerů. Zde je ale vysvětlením opět příliš krátké follow up (2 roky).

Graf. 7. Celkové přežití v závislosti na výši předoperačních hodnot CEA ve vztahu k provedené operaci (laboratorní cut off)- univariační analýza



Graf. 8. Celkové přežití v závislosti na výši předoperačních hodnot TPA ve vztahu k provedené operaci (laboratorní cut off)- univariační analýza



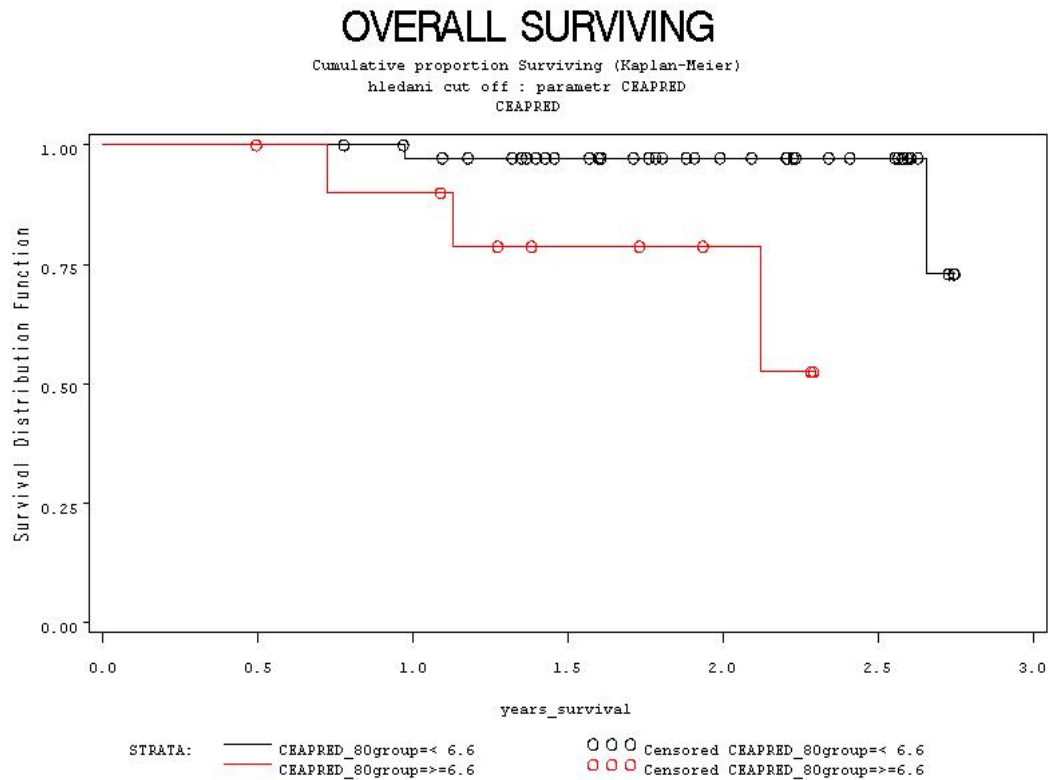
Tab. 41. Celkové přežití v závislosti na předoperačních hodnotách nádorových markerů (optimalizovaná cut off)- univariační analýza

Marker	Optimalizovaná cut- off	Kaplan Meier
CEA	6,6	p< 0.003
CA 19-9	23,4	p< 0.04
TPS	ND	NS
TPA	ND	NS
TK	ND	NS

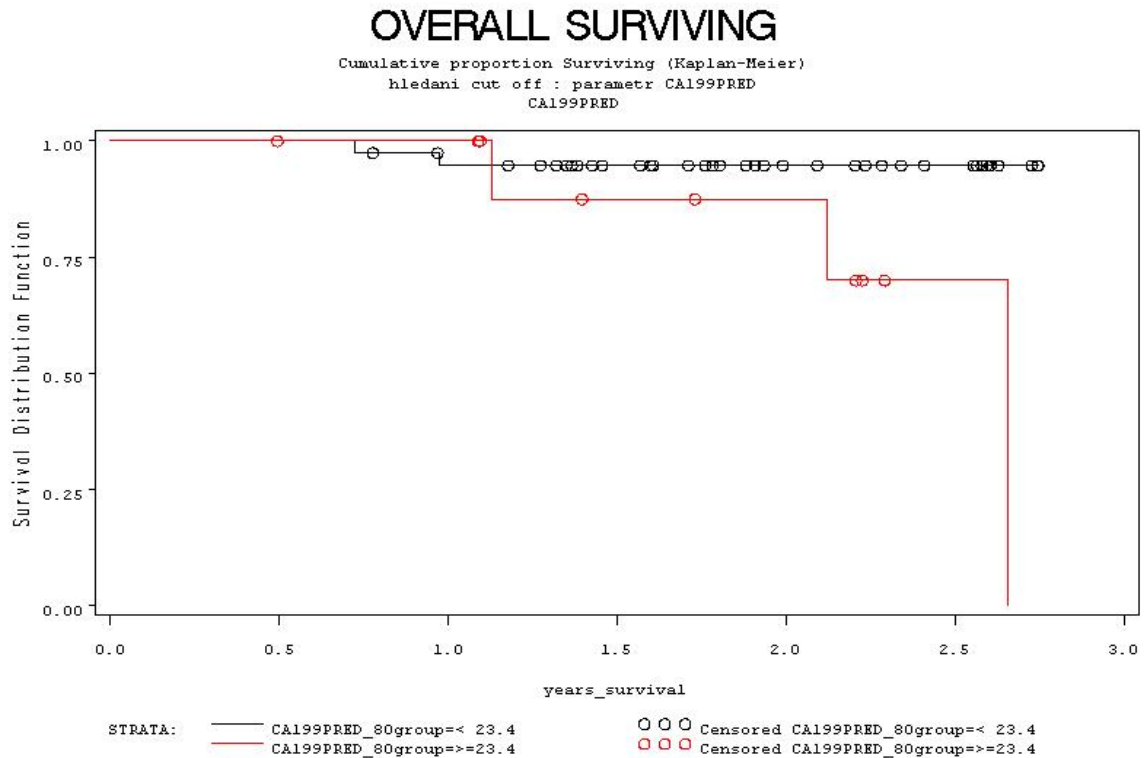
Z tabulky 41. vyplývá, že při použití optimalizované cut off má z hlediska celkového přežití prognostický význam předoperační hodnoty CEA a CA 19-9. Ostatní sledované nádorové markery byly bez statistické

významnosti. Význam obou markerů pro přežití je zároveň uveden v grafech 9. a 10.

Graf. 9. Celkové přežití v závislosti na předoperačních hodnotách CEA (optimalizovaná cut off)- univariační analýza



Graf. 10. Celkové přežití v závislosti na předoperačních hodnotách CA 19-9 (optimalizovaná cut off)- univariační analýza



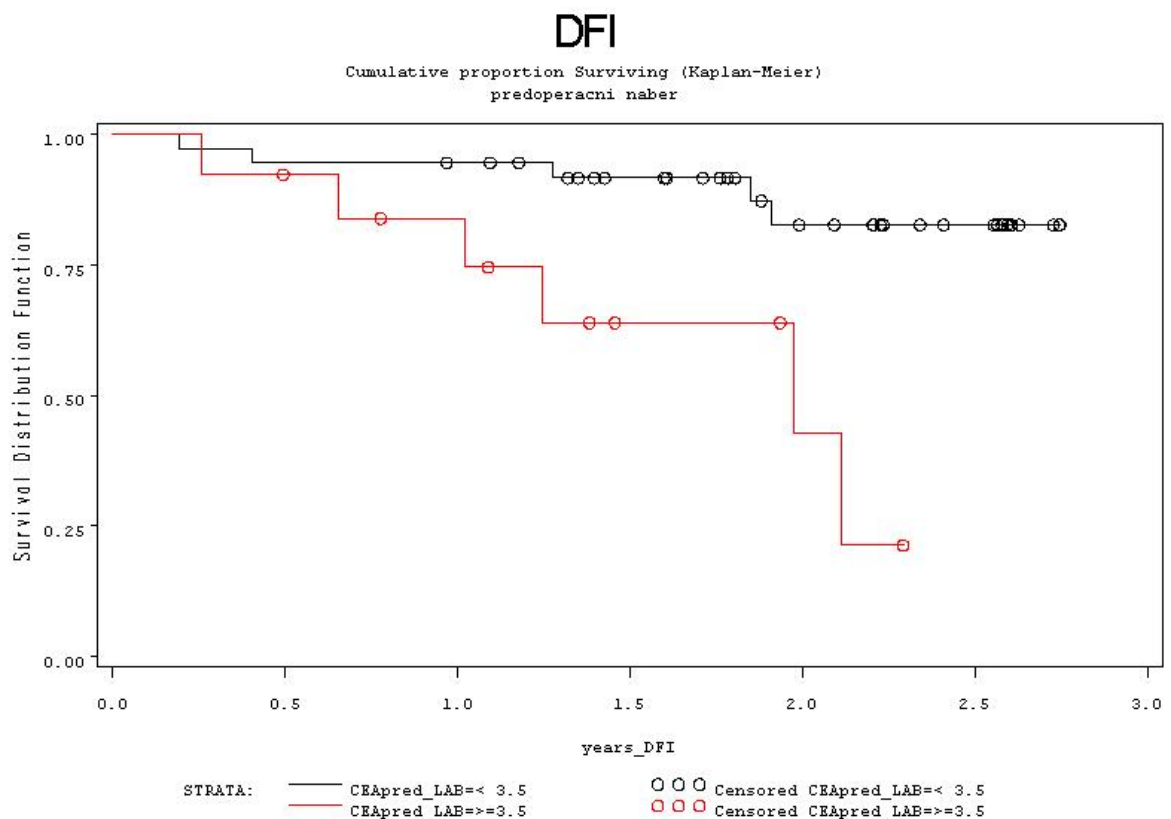
Provedená multivariační analýza (Coxův regresní model) prokázala prognostický význam u nádorového markeru CEA (hazard ratio 13,5; $p < 0,02$).

V tabulce 42. je charakterizováno bezpříznakové přežití (disease free interval= DFI) v závislosti na výši předoperačních hodnot nádorových markerů ve vztahu k provedené operaci. Opět jsme jako diskriminační hladinu použili laboratorních hraničních hodnot (laboratorní cut-off), které byly pro jednotlivé nádorové markery následující: CEA 3,5 ng/ml, CA 19-9 28.0 IU/ml, TK 6 IU/l, TPA 110 IU/l, TPS 90 IU/l.

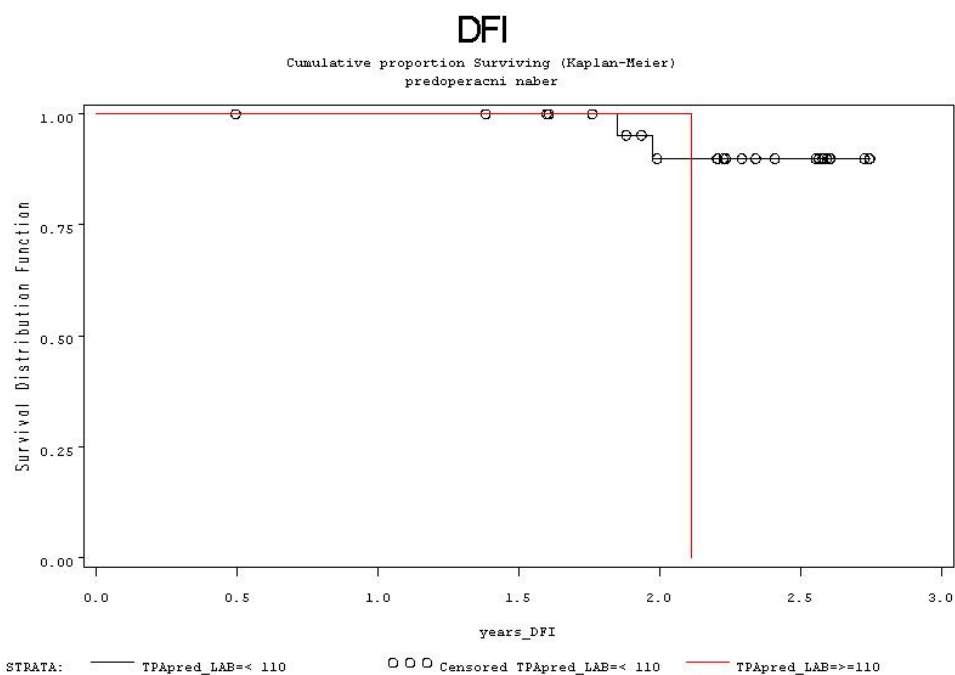
Tab. 42. Bezpříznakové přežití (disease free interval - DFI) v závislosti na předoperačních hodnotách nádorových markerů (laboratorní cut off)- univariační analýza

Marker	Kaplan Meier	Cox Model	
		HR (95% CI)	p-value
CEA	< 0,003	5,1 (1,5-17,1)	< 0,007
CA 19-9	NS	1,4 (0,3-6,7)	NS
TPS	NS	1,6 (0,5-5,8)	NS
TPA	< 0.03	9,1 (0,8-100,5)	NS
TK	NS	1,6 (0,1-17,3)	NS

Graf. 11. Bepříznakové přežití (disease free interval - DFI) v závislosti na předoperačních hodnotách CEA (laboratorní cut off) - univariační analýza



Graf.12. Bezpříznakové přežití (disease free interval - DFI) v závislosti na předoperačních hodnotách TPA (laboratorní cut off) - univariační analýza



Provedená multivariační analýza (Coxův regresní model) prokázala prognostický význam u nádorového markeru CEA (hazard ratio 11,3; $p < 0,04$).

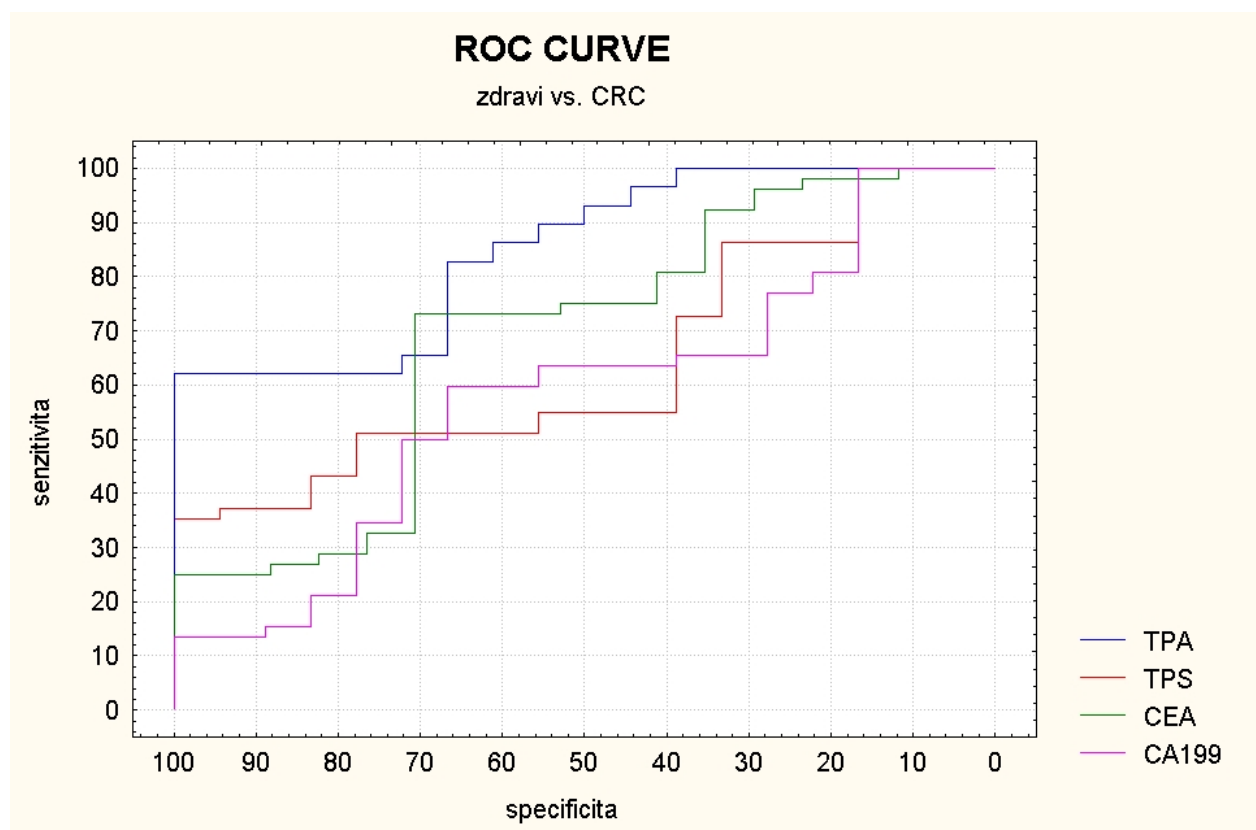
V tabulce 43. jsou uvedeny senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro primární diagnostiku kolorektálního karcinomu při 95% specifitě vůči zdravým kontrolám. Formou ROC křivek jsou senzitivity a specifity uvedené v grafu 13.

Tab. 43. Senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro primární diagnostiku kolorektálního karcinomu při 95% specifitě vůči zdravým kontrolám

Markery	Cut-off	Senzitivita	AUC
CEA	3,5	25%	0,68
CA 19-9	30,4	14%	0,55
TPA	48,0	62%	0,33
TPS	75,0	37%	0,62
TK	8,7	14%	0,28

AUC plocha pod křivkou

Graf. 13. ROC pro primární diagnostiku kolorektálního karcinomu



Z uvedené tabulky 43. a grafu 13. je zřejmé, že senzitivity jednotlivých nádorových markerů při 95% specifitě (vs. zdravé kontroly) jsou kromě TPA nízké.

V tabulce 44. je porovnání mediánů hodnot nádorových markerů v klinické remisi nádorového onemocnění (skupina NED- viz charakteristika kontrolních skupin) a hodnot nádorových markerů u pacientů v klinické progresi nádorového onemocnění. Do statistické analýzy byly zavzaty pouze hodnoty zjištěné při první progresi, která nastala po primární terapii.

Tab. 44. Porovnání remisních a progresních hodnot u nemocných s kolorektálním karcinomem

Marker	Klinika	Medián	25%-75% kvartil	Statistická významnost
CEA	Remise (n=22)	1,3	0,9-2,1	p < 0,007
	Progrese (n=12)	3,1	1,9-17,6	
CA19-9	Remise (n=22)	10,2	5,3-14,0	NS
	Progrese (n=12)	13,3	5,6-80,2	
TPS	Remise (n=22)	31,0	15,0-49,0	p < 0,0002
	Progrese (n=12)	225,0	101,0-636,0	

Z tabulky 44. vyplývá, že u hodnot CEA a TPS se signifikantně liší remisní a progresní hodnoty nádorových markerů. Tento rozdíl nebyl signifikantní u nádorového markeru CA 19-9.

V tabulce 45. jsou uvedeny senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro diagnostiku progrese (lokální recidiva, vzdálené metastázy)

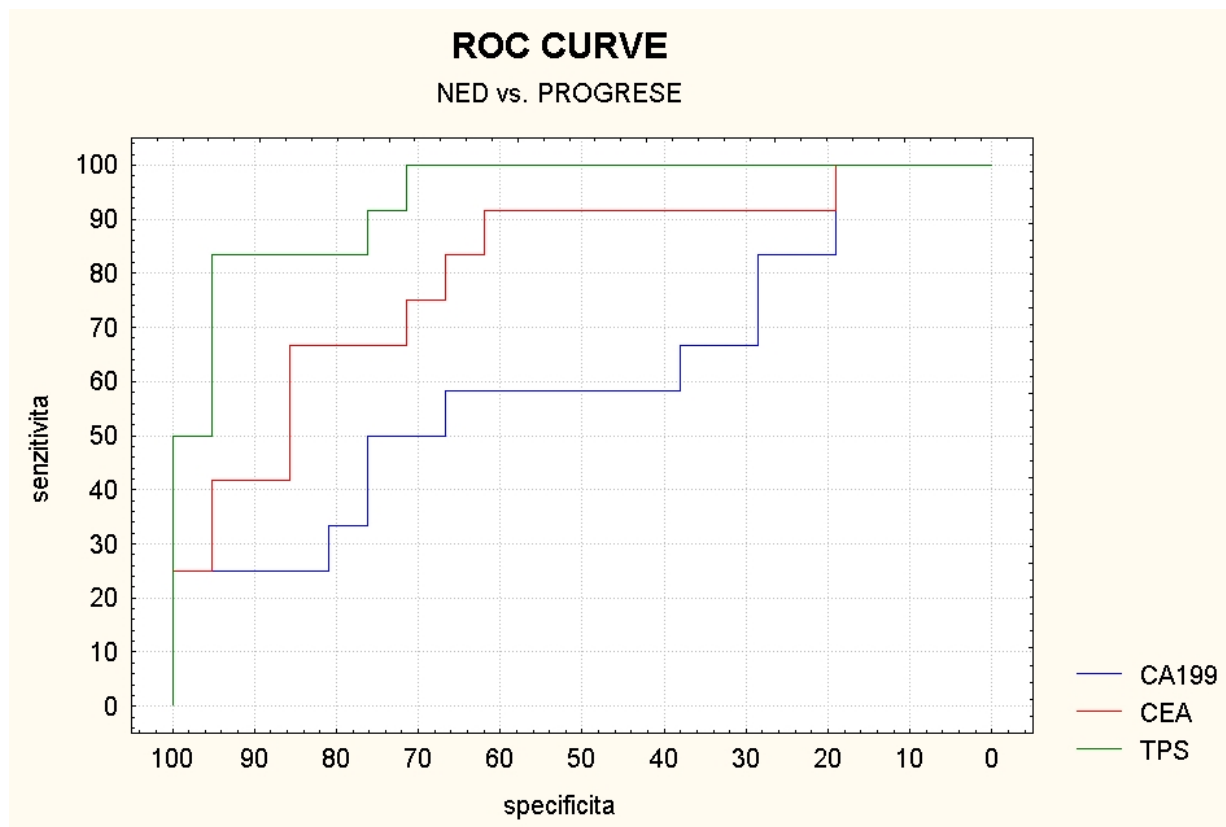
kolorektálního karcinomu při 95% specificitě vůči remisní skupině pacientů (NED- no evidence of disease). Formou ROC křivek jsou senzitivity a specificity uvedené v grafu 14.

Tab 45. Senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro diagnostiku progresu (lokální recidiva, vzdálené metastázy) kolorektálního karcinomu při 95% specificitě

Markery	Cut-off	Senzitivita	AUC
CEA	8,6	41%	0,80
CA 19-9	52,0	25%	0,60
TPS	101,0	83%	0,94

AUC plocha pod křivkou

Graf . 14. ROC pro diagnostiku progresu kolorektálního karcinomu



Z tabulky 45. a grafu 14. vyplývá, že nejvyšší senzitivity bylo dosaženo pro cytokeratininový marker TPS (senzitivita 83% při 95% specificitě), zatímco senzitivity klasických nádorových markerů byly nižší (CEA 41%, CA 19-9 25%).

5. Diskuze

Kolorektální karcinom je v civilizovaných zemích 2. nejčastějším karcinomem u mužů po karcinomu plic a u žen po karcinomu prsu. Mortalita spojená s tímto onemocněním je v České republice nejvyšší na světě a to u obou pohlaví. Jednou z příčin tohoto stavu je pozdní diagnostika kolorektálního karcinomu, kdy více než 50% nádorů je diagnostikováno v pozdních stádiích choroby (stadium III a IV). (36) Příčinami pozdní diagnostiky jsou jednak minimální obtíže v počátečních stádiích, jednak obava nemocných z této diagnózy, dále chyba v diagnostické rozvaze lékaře, kterému se nemocný svěřil se svými obtížemi a v neposlední řadě i neexistence screeningové metody pro včasnou diagnostiku.

Stanovení MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 jako proteinů v séru, ve tkáni nebo formou mRNA ve tkáni, v lymfatických uzlinách nebo periferní krvi a jejich korelace se stádiem choroby bylo publikováno v řadě prací, výsledky však nejsou jednoznačné. Námi zjištěná zvýšená exprese mRNA MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v nádorové tkáni je ve shodě se závěry některých publikací (10, 37, 52, 63) Výsledky exprese mRNA TIMP-2 nejsou tak jednoznačné. Zatímco práce Baker a kol. (1) uvádí sníženou hladinu mRNA TIMP-2 v nádorové tkáni Wan a kol. (72) detekovali zvýšenou hladinu mRNA TIMP-2 v nádorové tkáni.

Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi kolorektální maligní a nemaligní tkání, Baker

a kol. pozorovali zvýšení hladiny exprese mRNA TIMP-2 u normální kolorektální tkáně oproti nádorové. (1) Zaznamenali jsme statisticky signifikantní zvýšení hladiny exprese mRNA MMP-7 u kolorektální maligní tkáně, podobně Brabletz a kol. zaznamenali, že mRNA MMP-7 má zvýšenou expresi u 80% lidských kolorektálních nádorů. (7)

Dále jsme zjistili, že vyšší stádium onemocnění odpovídá vyšší hodnotě mediánu poměru MMP-2/TIMP-2 (median stádium II: 0.29, stádium III: 0.69, stádium IV: 2.71). Collins a kol. (7) popsali, že poměr MMP-2/TIMP-2 byl vyšší u nádorové kolorektální tkáně než u normální tkáně. Ornstein a kol. (57) pozorovali, že poměr TIMP-2/MMP-2 byl dvakrát menší u nádorové tkáně ve srovnání s normální mukózou. Z těchto výsledků vyplývá, že rovnováha mezi aktivací a inhibicí MMP-2 je u nádorů tlustého střeva zvýšená k aktivaci.

Neprokázali jsme korelaci mezi expresí mRNA MMP-7, TIMP-1 a MMP-2 a stádiem onemocnění ani diagnózou. Vzhledem k tomu, že jsme stanovovali mRNA ve vzorcích tkáně, pak je možné že se míra exprese těchto genů mění v okamžiku maligního zvratu a v následující progresi onemocnění se již výrazněji nemění.

Hlavní funkcí MMPs je přeměna ECM během tkáňové resorbce, jednotlivé MMPs mají různé, často protichůdné funkce během angiogeneze. V současnosti se ukazuje, že MMP-2 a MMP-7 jsou schopny štěpit plazminogen a podílet se na vytvoření angiostatinu, který specificky inhibuje proliferaci endotelových buněk. TIMPs jsou ve tkáních hlavními endogeními regulátory aktivity MMPs, ale TIMPs zastávají i další biologické funkce. TIMP-1 a TIMP-2 mají vliv na aktivitu řady buněčných typů, zároveň overexprese těchto inhibitorů tlumí růst nádorových buněk. Tyto biologické aktivity jsou nezávislé na inhibiční aktivitě metaloproteináz. Z uvedeného vyplývá že exprese těchto genů a jejich

vztah ke klinicko-patologickým projevům je komplikovanější a je nutno provést další výzkum.

Výsledky pilotní studie ukazují, že stanovení MMP-2, TIMP-2, MMP-7, TIMP-1 mRNA může být užitečné pro určení prognózy kolorektálního karcinomu. Abnormální exprese těchto genů může poskytnout užitečný cíl pro novou chemoprevenci a novou strategii adjuvantní terapie.

Karcinoembryonální antigen (CEA), neboli CACAM 5 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5) CEA, popsáný r. 1965 (41), patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům. Tvoří se v průběhu fetálního vývoje, a v menších množstvích v normální dospělé tkáni, avšak výrazná exprese v nádorech z něj činí velmi důležitý marker.

CEA patří do imunoglobulinové supergenové rodiny (19, 67), je to glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů (asi 55 %). Molekulová hmotnost je 180–200 kDa. Na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce vazbou N-acetylglukosaminu na asparagin. Fyziologická funkce CEA však není jednoznačně vysvětlena. Všeobecně je přijímán názor, že tyto molekuly patří podle, in vitro experimentů, k intercelulárním multifunkčním molekulám podílejícím se na adhezi buněk. (41, 77) Některé práce prokazují, že je to N-doména těchto molekul, která zodpovídá za adhezi. (24, 64)

CEA se nachází především ve tkáni nádorů karcinomů tlustého střeva a konečníku. Jeho výskyt je vázán na lépe diferencované struktury epiteliálních buněk těchto nádorů, kde je uložen na apikální straně buňky. Z dalších nádorů GIT je CEA produkován nádory žaludku, pankreatu, jícnu a žlučových cest. I v těchto lokalizacích se nachází především u nádorů dobře a středně diferencovaných.

Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs) jsou hlavními endogenními regulátory aktivity matrixových metaloproteináz (MMPs) ve tkáních. Matrixové metaloproteinázy se prostřednictvím remodelace extracelulární matrix (ECM) uplatňují při procesech migrace buněk extracelulární matrix, prostřednictvím změny extracelulární matrix metaloproteinázami mohou buňky přejít do proliferace, apoptózy nebo morfogeneze. Účastní se také procesu degradace ECM a BM ve vztahu k nádorové invazivitě. (10, 15, 27, 66) Regulace matrixových metaloproteináz probíhá na několika úrovních - na úrovni jejich transkripce, jejich aktivace a prostřednictvím specifických tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs). (2, 27) Do současnosti byly nalezeny 4 tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4. TIMP-2 se váže specificky nekovalentní vazbou na proform MMP-2 (61) a inhibuje jeho enzymatickou aktivitu. TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7. Bylo zjištěno, že zvýšené exprese TIMP-1 a TIMP-2 in vivo potlačuje metastázy (31), také však byla řadou autorů zjištěna zvýšená exprese TIMP-1 v nádorové tkáni. (10, 32, 52)

V této souvislosti bylo zjištěno, že exprese TIMP 1 v kolorektálním karcinomu je vyšší u nádorů bez prokázaných lymfatických metastáz než u nádorů s metastatickým postižením lymfatických uzlin (45), což naše studie nepotvrdila. Tento rozpor může být způsoben menším množstvím námi sledovaných pacientů.

Většina autorů zjistila zvýšenou expresi mRNA pro TIMP-1 v nádorové tkáni oproti normální tkáni ojediněle jsou však publikovány práce toto tvrzení popírající. Tento rozpor však může být způsoben charakterem tzv. normální tkáně, t.j. zda srovnáváme tkáň střeva zdravého a tkáň střeva sice bez nádorových buněk, ale právě třeba z resekční linie. V naší práci jsme potvrdili přítomnost TIMP-1 v resekční linii, i když v nižší hladině než v nádorové tkáni, což vzhledem k nízkému procentu

recidiv v anastomóze na našem pracovišti vysvětlujeme jako ochrannou reakci nádorem dosud nepostižených buněk tlustého střeva, kdy tlusté střevo reaguje jako orgán zvýšením produkce TIMP-1 v reakci na zvýšenou produkci matrixových metaloproteináz nádorem, neboť hladina TIMP-1 je zvýšená při všech nádorových, ale i zánětlivých onemocněních tlustého střeva. (40)

Nádorové markery lze charakterizovat jako látky produkované maligními buňkami či organizmem jako odpověď na nádorové bujení. Od látek produkovaných normálními buňkami se liší, buď kvalitativně (jsou nádorově specifické, a normální buňky je proto neprodukují) či kvantitativně (s nádory asociované, přítomné i u normálních buněk). Může se jednat o antigeny lokalizované na povrchu buněčných membrán, enzymy metabolických drah či fragmenty cytoplazmatických struktur uvolňované do okolí při zániku buněk. Nádorové markery lze detekovat jednak imunohistochemicky či v cytosolu nádorové buňky (celulární nádorové markery) a jednak cirkulují v krvi či v jiných biologických tekutinách (humorální nádorové markery), které lze prokázat imunoanalytickými metodami (4, 13, 36, 55)

Přítomnost nádorových markerů v tělních tekutinách a tím i možnost jejich stanovení závisí na celé řadě faktorů. Nádorové markery jsou produkovány dělícími se buňkami nádoru a jejich produkce je proto závislá na diferenciaci buněk. Málo diferencované buňky produkují pouze chemicky jednoduché sloučeniny, což jsou látky, které jsou součástí buněčného skeletu (jako jsou cytokeratininy, především TPA a TPS) nebo ty, které jsou nezbytnou součástí enzymatického vybavení každé buňky, jako je timidinkináza. Většinou autorů jsou tyto markery označovány jako markery proliferace. Většina ostatních nádorových markerů obsahuje ve své molekule proteiny, glycidy, mucin a podobné látky, které musí být tvořeny složitým buněčným enzymatickým aparátem, tzn. vysoce

diferencovanou nádorovou buňkou. Dalším předpokladem možnosti stanovení nádorových markerů v tělních tekutinách je vaskularizace nádoru. Avaskulární nádor sice může produkovat nádorový marker, ale při stanovení v biologických tekutinách jej nemáme možnost prokázat, pokud není do biologické tekutiny vyplaven. Vaskularizace nádoru tedy výrazně ovlivňuje přítomnost a prokazatelnost nádorových markerů v biologických tekutinách.

Přestože diagnostický práh nádorových markerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti 1 mg (10^6 maligních buněk), zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi 10^9 buněk, neexistuje dosud vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění univerzální nádorový marker a ani senzitivita při dostatečné specifitě nedosahuje optimální spolehlivosti.

Porovnali jsme sérové hodnoty nádorových markerů u kontrolní skupiny zdravých osob a nemocných s akutním zánětlivým onemocněním a dále u nemocných s benigním onemocněním GIT (Crohnova choroba). Především u proliferačního markeru thymidinkinázy (TK) a cytokeratinů TPA a TPS byl zaznamenán statisticky významný rozdíl, u pacientů s benigním onemocněním GIT byly signifikantně vyšší hodnoty TK. Tento výsledek je v souladu s odbornou literaturou a potvrzuje, že při interpretaci hodnot nádorových markerů je důležité brát v úvahu nesespecifické vlivy (infekce, benigní onemocnění), která mohou nesespecificky ovlivnit interpretaci výsledků nádorových markerů. (4, 13, 36) Při srovnání zdravé kontrolní skupiny se skupinou pacientů v kompletní klinické remisi nádorového onemocnění byly hodnoty TK paradoxně vyšší než u pacientů v kompletní remisi nádorového onemocnění. Vysvětlením může být skutečnost, že ve skupině probandů, které klinik označil za zdravé se vyskytovaly pacienti s nesespecifickou elevací TK, např. v důsledku reparačních procesů po drobném, ambulantně ošetřeném zranění. Naopak u

nádorového markeru TPA, byly hodnoty signifikantně vyšší u skupiny NED ve srovnání se skupinou zdravých kontrol, což může souviset např. s progresí nádorového onemocnění, které dosud nebylo detekováno. Protože jsme prokázali rozdíly v hodnotách nádorových markerů, nebylo možné spojit obě kontrolní skupiny ve skupinu jedinou pro další statistické výpočty.

Časná diagnostika kolorektálního karcinomu je důležitá z toho důvodu, že předpokladem kurativní chirurgické léčby je časně stadium onemocnění (stadium I, II). U pokročilých forem onemocnění (stadium III, IV) má chirurgický výkon pouze omezený charakter a další metody léčby, tj. chemo- či radioterapie sice mají vliv na dlouhodobé přežití pacientů, nicméně přežití těchto pacientů je ve srovnání s pacienty, u kterých byl nádor diagnostikován včas, podstatně nižší. (42)

O významu stanovení nádorových markerů u kolorektálního karcinomu se neustále vedou diskuze. Je zcela jasné, že nádorové markery nemohou splnit původní předpoklad ze šedesátých let, že budou univerzálním diagnostickým prostředkem. Je tomu tak proto, že nejsou ani tkáňově ani orgánově specifické a navíc se do cirkulace neuvolňují v časných stadiích nádorového onemocnění. (4, 13, 36, 48, 55)

Vzhledem k vysoké incidenci kolorektálního karcinomu se stále hledají cesty pro zajištění screeningu eventuálně časně primární diagnostiky. V současné době neexistuje žádný nádorový marker, který by dosahoval dostačujících specifit a senzitivit pro screening a primární diagnostiku kolorektálního karcinomu. (13) U našeho souboru pacientů se senzitivity pro možnou primární diagnostiku kolorektálního karcinomu pohybovaly u jednotlivých nádorových markerů od 14 % do 37 % (při doporučené specifitě , což jsou hodnoty naprosto nedostačující). Pouze nádorový marker TPA dosahoval senzitivit 62%, ale i tato hodnota je pro primární diagnostiku nízká, navíc je třeba brát v úvahu relativně malý počet

pacientů ve skupině kolorektálního karcinomu pro tuto analýzu. Tyto výsledky jsou zcela v souladu se závěry “ASCO Tumor Panel”, kde autoři provedli metaanalýzu prací zabývajících se problematikou využití nádorových markerů při screeningu kolorektálního karcinomu za několik posledních let. (21) Byli publikovány práce, kde např. v případě použití CEA jako screeningového testu při předpokládané prevalenci 1/1000 a senzitivitě testu 40 % při 90% specificitě (10 % zdravých má zvýšené hodnoty), připadalo u pacientů se stadiem Dukes A, B na 1 zachycený nádor 250 falešně pozitivních testů. (26) U markerů Ca 19-9 a CA 72-4 bylo při podobných studiích dosaženo ještě horších výsledků. (6, 33, 77) Na základě těchto závěrů bylo konstatováno, že nádorové markery nelze použít ani pro screening vysoce rizikových osob (např. u syndromu familiární adenomatózní polypózy apod.).

Stanovení předoperačních hodnot nádorových markerů má svůj význam z několika hledisek. Obecně jsou vysoké předoperační hodnoty považovány za nepříznivý prognostický faktor. (36) Dále má význam stanovení předoperačních hodnot pro posouzení léčebné odpovědi po primární terapii a možnému určení reziduálního nádoru ve srovnání s hladinami pooperačními. Dle literárních údajů se doporučuje vyšetřovat předoperační hladiny CEA, protože předoperační hodnoty tohoto nádorového markeru byly v celé řadě studií hodnoceny jako nezávislý prognostický faktor. (4, 6, 23, 26, 41, 48) Předoperační hodnoty CEA korelují s velikostí primárního nádoru a stadiem onemocnění. Někteří autoři prokázali elevaci CEA u 4 %, 25 %, 44 % a 65 % u pacientů se stadiem Dukes’ A, B, C a D. (36) Studie NSBAP (National Surgical Adjuvant Breast Project) sledovala 945 pacientů se stadiem Dukes B. Pokud byla předoperační hodnota CEA nad 10 ng/ml, bylo riziko recidivy onemocnění u těchto pacientů dvakrát vyšší než u pacientů s normálními předoperačními hodnotami CEA. (38)

Jak již bylo řečeno, vysoké předoperační hladiny jsou sami o sobě nepříznivým prognostickým faktorem. Byla publikována práce, kde se recidiva nádorového onemocnění objevila do jednoho roku po operaci u 30 % pacientů s hladinou CEA nad 20 ng/ml a jen u 15 % těch, kteří měli normální hodnoty (6). Jiní autoři zjistili signifikantní korelaci předoperačních hodnot CEA s délkou přežívání u pacientů s klinickým stadiem II a III, kde u stadia II a III přežívalo 5 let 61 % a 44 % u pacientů, kteří měli normální hladiny CEA a pouze 32 % a 26 % pacientů, kteří měli hladinu CEA nad 20 ng/ml. (16) Byly prezentovány i výsledky prospektivní studie, kde u stadia Dukes C mělo recidivu nádoru v časovém intervalu do jednoho a půl roku 95 % pacientů, kteří měli hodnoty CEA nad 5 ng/ml oproti 39 % pacientů, kteří měli hodnoty pod tuto hraniční mez. Ze studie byli vyloučeni pacienti s hůře diferencovanými nádory (grading III, IV), protože je u nich předpoklad horší korelace s CEA. Prognostický význam CEA byl prokázán u našeho souboru nemocných, kde byl stanoven signifikantní vztah mezi elevací předoperačních hodnot CEA a celkovým přežitím a to jak při použití laboratorní, tak optimalizované cut off. V případě laboratorní cut off bylo pro celkové přežití významné stanovení TPA, v případě optimalizované cut off stanovení CA 19-9, což je opět v souladu s výsledky prací některých autorů. (13, 53, 54) Pro posouzení významu těchto markerů však bude třeba delší follow up. V případě bezpříznakového přežití bylo nejlepšího výsledku opět dosaženo u předoperačních hodnot CEA, jehož signifikance byla při použití laboratorních cut off potvrzena nejen univariační, ale také multivariační analýzou. Pacienti s předoperační elevací CEA měli 11x větší pravděpodobnost progresu, než pacienti s normálními hodnotami. Dle metody Kaplan Meiera byla statistická signifikace dosažena také pro předoperační hodnoty TPA ($p < 0,03$; Log rank test).

Stanovení pooperačních hodnot nádorových markerů má praktický význam především u CEA, kde můžeme dle poklesu hladin tohoto markeru hodnotit úspěšnost resekčního výkonu, popř. mohou elevované hladiny CEA upozornit na reziduální nádorovou masu, pokud jejich hodnoty neklesnou do 4 - 6 týdnů po operaci. (21) V jedné studii, kde bylo sledováno 90 pacientů po resekčním výkonu, došlo u všech k poklesu pooperačních hladin CEA. Pouze u 6 pacientů přetrvávaly zvýšené hladiny CEA a u všech těchto pacientů došlo k recidivě onemocnění. (47) Kim a kol. prezentovali práci, kde 23 ze 33 sledovaných pacientů (70 %) s elevací CEA do 2 týdnů po operaci, mělo později recidivu onemocnění, ve srovnání s 23 ze 113 pacientů (21 %), kteří měli hladinu CEA v normě. (41) Také v našem souboru pacientů nejlépe reagoval na resekční terapii pokles pooperačních hodnot CEA. V případě nádorového markeru CA 19-9 nedošlo k žádné změně mezi hladinami před a pooperačních hodnot, u nádorového markeru TPS, který byl v našem souboru pooperačně sledován došlo naopak k výraznému vzestupu pooperačních hodnot, což bylo nejspíše spjato s reparačními pochody po provedené operaci. Lze konstatovat, že pro kontrolu úspěchu chirurgické léčby je nejvíce vhodné sledovat před- a pooperační hodnoty CEA.

Dlouhodobé sledování hladin nádorových markerů u kolorektálních karcinomů, které jej produkují, je vhodným prostředkem pro sledování účinnosti nejen úspěchu chirurgické léčby ,ale i pooperační radio- či chemoterapie. Sledování nádorových markerů za účelem včasné diagnostiky recidivy či progresu nádorového onemocnění je hlavní doménou indikace těchto vyšetření v průběhu follow up.

Ačkoliv je marker CEA v průběhu follow up považován za časný indikátor recidivy či progresu (4, 6, 60), jsou názory autorů na stanovování dalších nádorových markerů, zejména CA 19-9, který je považován za marker druhé volby (13, 49), značně kontroverzní. Některé práce udávají

zvýšené hladiny CA 19-9 u 80 % pacientů s recidivou nádorového onemocnění. (64) Forslund a kol. prezentuje senzitivity CA 19-9 pro detekci relapsu v průběhu follow up pro stadia Dukes' A - D, kdy ve všech stádiích jsou dosažené senzitivity pro CA 19-9 vyšší než pro CEA. (22) Nicméně tato data jsou v rozporu s výsledky, které publikují jiní autoři (6, 64, 70) Např. Carpelan a kol. uvádí, že senzitivity CA 19-9 byly pro diagnostiku relapsu nádoru v průběhu follow up o mnoho nižší (38 %). (6) Podobné kontroverze jsou uváděny i pro CEA jako hlavní nádorový marker.

Všechny tyto publikované závěry se liší díky několika následujícím skutečnostem:

- Ve studiích jsou rozdílná zastoupení stadií choroby, takže u skupiny pacientů s pokročilými stadii dostáváme vyšší procentuální zastoupení zvýšených hodnot nádorových markerů.
- Porovnávání výsledků nádorových markerů, které jsou stanovovány pomocí diagnostických souprav různých výrobců, může mít zcela jinou výpovědní hodnotu a tak imitovat remisi či progresi onemocnění.
- Faktorem, který se podílí na odlišné interpretaci dat, je různá délka follow up u sledovaných pacientů, takže u pacientů sledovaných delší dobu můžeme mít vyšší záchyt progresu onemocnění než v počátečních stádiích.
- Nepřesná charakteristika kontrolních skupin pacientů, které jsou vůči sobě porovnávány při různých specifitách, čímž se dosažené cut off a senzitivity hodnot nádorových markerů značně liší.

Především posledně zmíněný bod má za následek velkou variabilitu výsledků publikovaných studií. Kromě doporučení 'European Working Group on Tumour Markers' nebyla dosud standardizována kritéria pro

výběr kontrolních skupin pacientů a to především pro retrospektivně získaná data, která jsou v metaanalýzách s výsledky prospektivních studií často srovnávána. (21, 46, 17) Při našem hodnocení jsme se drželi doporučení EGTM, kdy jako remisní hodnoty byly brány v úvahu pouze v případě, že pocházely od žijících nemocných, kteří nikdy neměli progresi a nebyly u nich nalezeny distanční metastázy. Kromě toho byly vyloučeny všechny výsledky v intervalu šesti až dvanácti měsíců po skončení primární terapie (nelze odhadnout vliv terapie, kdy především u adjuvantní léčby může být podáno až 12 cyklů chemoterapie). Zároveň byli vyloučeni pacienti, u kterých se v průběhu dispenzární péče vyskytovalo benigní, či zánětlivé onemocnění, které by mohlo nespecificky ovlivnit hodnoty nádorových markerů (skupina označená jako NED- no evidence of disease). Jako progresní byly brány v úvahu pouze hodnoty, které jako první odpovídali klinické progresi zjištěné pomocí zobrazovacích či endoskopických metod. Při 95% specificitě bylo nejvyšších senzitivit bylo dosaženo u nádorového markeru TPS (83%), senzitivity klasických nádorových markerů CEA a CA 19-9 byly podstatně nižší (41% respektive 25%). Tyto hodnoty jsou poněkud překvapivé, především pro nízkou senzitivitu klasických nádorových markerů. Vysvětlením může být charakteristika souboru, kde do grantové studie vstupovali pacienti s lokálně pokročilým onemocněním střeva (stadia I-III., tzn. maximálně s nádorovým postižením lokoregionálních uzlin), pouze u dvou pacientů byly perioperačně zjištěny distální metastázy do jater. Dále jde i o charakter recidiv, kde se ve více než v 50% jednalo o lokoregionální recidivu. Výsledky je třeba interpretovat opatrně pro malý počet relapsů vzhledem ke krátkému follow up, nicméně se TPS zdá jako slibný marker pro follow up pacientů s kolorektálním karcinomem. Jako ideální se proto zdá kombinace CEA a TPS. Toto zjištění je v souladu se zjištěním některých dalších autorů, kteří potvrzují význam sledování CEA a

cytokeratininových nádorových markerů pro follow up kolorektálního karcinomu. (62)

Z předchozí diskuze vyplývá, že systematická monitorace hladin nádorových markerů pro sledování účinnosti léčby a včasnou diagnostiku recidiv a progresu onemocnění je hlavní doménou indikace tohoto vyšetření. Je třeba ale dodržovat určitá pravidla, bez kterých monitorace nemá smysl.

V první řadě musíme brát v úvahu falešnou pozitivitu výsledků u některých benigních onemocnění, zánětlivých onemocnění, u kuřáků a při léčbě některými cytostatiky (fluorouracyl, levamisol). (21) Lehce či kolísavě zvýšená pooperační hladina CEA může být často způsobena abúzem nikotinu, či v populaci se poměrně často vyskytujícím benigním onemocněním jater. Hodnoty TPS mohou být ovlivněny zánětlivým onemocněním, nebo pochody spojenými s reparací a regenerací tkání, např. po operaci. Pokud je detekována zvýšená hladina nádorového markeru u pacienta, který měl do té doby normální hodnoty, je třeba v první řadě nutno vyšetření zopakovat pokud možno ze stejného séra k vyloučení možné laboratorní chyby. Dále by měly být vzaty v úvahu výsledky jaterních testů a vyšetření ledvin, protože jaterní či renální insuficience mohou být příčinou nespecifického zvýšení nádorových markerů. (21)

Další nespecifické ovlivnění hodnot může být způsobeno celou řadou chyb vznikajících v preanalytické a analytické fázi stanovení nádorových markerů. Ordinující lékař by měl zasílat vzorky k analýze do stejné laboratoře, která stanovuje nádorové markery jednou metodikou. Pouze tak se lze vyhnout nesprávné interpretaci výsledků, u kterých je rozdíl hodnot způsoben volbou metody stanovení. Pro kvalitní klinické zhodnocení vyšetření nádorových markerů je tedy nutná úzká interdisciplinární spolupráce, při které jsou pokud možno vyloučeny nespecifické vlivy, které mohou provedená stanovení ovlivnit.

Další důležitou podmínkou je systematické sledování nádorových markerů. Teprve opakovaně zvýšená hodnota nádorového markeru (alespoň 3x za sebou) dává po vyloučení výše uvedených skutečností podezření na možnou přítomnost reziduální nádorové tkáně či na progresi onemocnění. Protože pro follow up je daleko důležitější dynamika procesu než absolutní hodnota markeru, je zcela nezbytné u nemocných, kde je toto vyšetření indikováno, sledovat hladiny nádorových markerů v pravidelných intervalech. Příležitostné ordinování nádorových markerů není smysluplné a je spíše finanční ztrátou, protože náhodná měření zcela ztrácejí svoji výpovědní hodnotu. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že stanovení nádorových markerů má v diagnostice kolorektálního karcinomu nesporný význam. Je třeba však brát v úvahu, že se jedná o pomocnou diagnostickou metodu a proto je pro optimální klinické využití nezbytná nejen účelná indikace těchto vyšetření, ale i spolupráce mezi klinikem a laboratorními pracovníky. Pouze tak lze zajistit správnou interpretaci výsledků a eliminovat tak celou řadu nespecifických faktorů, které mohou výsledek vyšetření ovlivnit.

6. Souhrn

Hladina exprese mRNA MMP-7, TIMP-1 a MMP-2 byla signifikantně vyšší v nádorové maligním tkáni kolorektálního karcinomu než v normální kolorektální tkáni. Pomocí vhodných protilátek by mohlo být možné aktivitu matrixových metaloproteináz inhibovat, což by mohlo mít na nádorovou tkáň a její okolí léčebný efekt. Klinicky se již některé preparáty testují (Bay 12-9566 /fa Bayer/, BB94 /fa British Biotechnologi/).

Neprokázali jsme korelaci mezi expresí těchto genů a stádiem onemocnění a diagnózou.

Podařilo se nám prokázat, že při dodržování chirurgických pravidel při resekci střeva pro kolorektální karcinom, nemá resekční linie známky přítomnosti nádorových buněk – chybí přítomnost mRNA pro CEA.

Hladina mRNA pro TIMP-1 je v resekční linii přítomna v nižší hladině než v nádorové tkáni, což však souvisí s úlohou, kterou TIMP-1 ve střevě hraje. Její hladina je zvýšená při všech nádorových, ale i zánětlivých onemocněních tlustého střeva. Zda je zvýšená exprese mRNA pro TIMP-1 i mimo resekční linii, jedná-li se tedy o reakci tlustého střeva jako orgánu bude předmětem dalšího výzkumu, stejně tak i možné srovnání se vzorky nádorem a zánětem nepostiženého tlustého střeva. Úloha TIMP-1 jako prognostického markeru je předmětem dalšího zkoumání, ze všech studií však vyplývá, že použití TIMP-1 při screeningu kolorektálního karcinomu je nevhodné vzhledem ke značné nespecifitě tohoto markeru.

Pro stanovení mRNA v periferní krvi jsme použili dvě odlišné metodiky. První metodikou (izolace volné RNA z plazmy) se nám nepodařilo mRNA pro CK 20 ani pro CEA detekovat. Druhou metodikou (izolace RNA z buněk zachycených na membráně Millipore) jsme mRNA CEA nedetekovali, ale podařilo se nám detekovat mRNA CK 20 u 13 vzorků 11 pacientů. Při hodnocení přítomnosti mRNA CK 20 v periferní krvi těchto pacientů a srovnání s vývojem jejich nádorového onemocnění (progresu x remise) ani srovnáním s stadiem a gradingem primárního nádoru jsme žádnou souvislost nezaznamenali. Stanovení mRNA CK 20 a CEA v periferní krvi výše uvedenou metodikou se nám jeví pro klinické účely prakticky nevyužitelné.

Přes veškerý optimismus řešitelského kolektivu stran novým metod se použití stávajících imunoanalytických metod stanovení nádorových markerů jeví jako nezastupitelné.

Porovnali jsme sérové hodnoty nádorových markerů u kontrolní skupiny zdravých osob a nemocných s akutním zánětlivým onemocněním a

dále u nemocných s benigním onemocněním GIT (Crohnova choroba). Především u proliferačního markeru thymidinkinázy (TK) a cytokeratininů TPA a TPS byl zaznamenán statisticky významný rozdíl, u pacientů s benigním onemocněním GIT byly signifikantně vyšší hodnoty TK. Tento výsledek je v souladu s odbornou literaturou.

Prognostický význam CEA byl prokázán u našeho souboru nemocných, kde byl stanoven signifikantní vztah mezi elevací předoperačních hodnot CEA a celkovým přežitím a to jak při použití laboratorní, tak optimalizované cut off. V případě laboratorní cut off bylo pro celkové přežití významné stanovení TPA, v případě optimalizované cut off stanovení CA 19-9, což je opět v souladu s výsledky prací některých autorů. (7, 8, 31) Pro posouzení významu těchto markerů však bude třeba delší follow up. V případě bezpříznakového přežití bylo nejlepšího výsledku opět dosaženo u předoperačních hodnot CEA, jehož signifikance byla při použití laboratorních cut off potvrzena nejen univariační, ale také multivariační analýzou. Pacienti s předoperační elevací CEA měli 11x větší pravděpodobnost progresu, než pacienti s normálními hodnotami.

V našem souboru pacientů nejlépe reagoval na resekční terapii pokles pooperačních hodnot CEA. V případě nádorového markeru CA 19-9 nedošlo k žádné změně mezi hladinami před a pooperačních hodnot, u nádorového markeru TPS, který byl v našem souboru pooperačně sledován došlo naopak k výraznému vzestupu pooperačních hodnot, což bylo nejspíše spjato s reparačními pochody po provedené operaci. Lze konstatovat, že pro kontrolu úspěchu chirurgické léčby je nejvíce vhodné sledovat před- a pooperační hodnoty CEA.

Při 95% specificitě bylo nejvyšších senzitivit dosaženo u nádorového markeru TPS (83%), senzitivity klasických nádorových markerů CEA a CA 19-9 byly podstatně nižší (41% respektive 25%). Tyto hodnoty jsou poněkud překvapivé, především pro nízkou senzitivitu klasických

nádorových markerů. Vysvětlením může být charakteristika souboru, kde do grantové studie vstupovali pacienti s lokálně pokročilým onemocněním střeva (stadia I-III., tzn. maximálně s nádorovým postižením lokoregionálních uzlin), pouze u dvou pacientů byly perioperačně zjištěny distální metastázy do jater. Dále jde i o charakter recidiv, kde se ve více než v 50% jednalo o lokoregionální recidivu. Výsledky je třeba interpretovat opatrně pro malý počet relapsů vzhledem ke krátkému follow up, nicméně se TPS zdá jako slibný marker pro follow up pacientů s kolorektálním karcinomem. Jako ideální se proto zdá kombinace CEA a TPS.

6.1. Summary

The level of MMP-7, TIMP-1 and MMP-2 mRNA expression was significantly higher in the tumour tissue of colorectal carcinoma than in normal colorectal tissue. It could be possible to inhibit matrix metalloproteinases activity using appropriate antibodies, which could have therapeutic effect on tumour tissue and its vicinity. Some of the preparations are being tested (Bay 12-9566 /Bayer/, BB94 /British Biotechnology/).

We have not proved correlation between expression of these genes and disease stage and diagnosis.

We have succeeded to prove that if the surgical principles for colon resection performed due to colorectal carcinoma are observed, the resection line does not show any signs of the presence of tumour cells – mRNA for CEA is not present.

The level of mRNA for TIMP-1 is present in the resection line at lower levels than in tumour tissue, and this is due to the role that TIMP-1 plays in the colon. Its level increases not only in all tumour diseases, but also in inflammatory diseases of the colon. The question whether the

expression of mRNA for TIMP-1 is also increased outside the resection line and therefore it is a reaction of the colon as an organ will be subject to further research, as will be a potential comparison with samples of colon unaffected by tumour or inflammation. Although the role of TIMP-1 as a prognostic marker remains a subject for further studies, all available studies suggest that the use of TIMP-1 in colorectal carcinoma screening is unsuitable due to the significant non-specificity of this marker.

Two different methods for determination of mRNA in peripheral blood were used. We have not succeeded to detect neither mRNA for CK 20 or CEA using first method (isolation of free RNA from plasma). We have not succeeded to detect mRNA for CEA using second method (isolation of RNA from cells attached on Millipore membrane), but we have succeeded to detect mRNA for CK 20 in 13 samples from 11 patients. No correlation has been observed during evaluation of presence of mRNA for CK 20 in peripheral blood of these patients and comparison with development of their tumour disease (progression x remission) or comparison with primary tumour staging and grading. Determination of mRNA for CK 20 and CEA in peripheral blood using the above-mentioned methods appears to us as practically not utilisable for clinical purposes.

In spite of all optimism of the research group concerning new methods, the utilisation of current immunoanalytic methods for determination of tumour markers appears as unsubstitutable.

We have compared serum levels of tumour markers in control group of healthy persons and in patients with acute inflammatory disease and also in patients with benign disease of GIT (Crohn's disease). A statistically significant difference was observed especially in proliferative marker thymidine kinase (TK) and in cytokeratins TPA and TPS, significantly higher values of TK were observed in patients with benign disease of GIT. This result is consistent with scientific literature.

Prognostic relevance of CEA has been proved in our cohort of patients. Significant correlation between elevation of preoperative CEA values and overall survival was determined using both laboratory and optimised cut off. In case of laboratory cut off, the determination of TPA was important for overall survival and in case of optimised cut off the determination of CA 19-9 was important, that is again consistent with results of literature from some authors. (7, 8, 31) However, longer follow up will be necessary for evaluation of relevance of these markers. In case of survival without any signs, the best result was obtained again in preoperative CEA values, which significance was confirmed not only using univariate, but also multivariate analysis while using laboratory cut off. Patients with preoperative CEA elevation had 11 times higher probability of progression than patients with normal values.

In our cohort of patients, the postoperative CEA values reacted best to the resection therapy by decrease. No change between preoperative and postoperative values of CA 19-9 tumour marker has been observed. On the contrary, significant increase in postoperative values of TPS tumour marker, which was followed in our cohort after the surgery, was observed. It was most probably connected with separation processes after performed surgery. It can be concluded that for control of surgical treatment success is most suitable to follow preoperative and postoperative CEA values.

The highest sensitivities have been obtained in tumour marker TPS (83%) with 95% specificity, sensitivities of classic tumour markers CEA and CA 19-9 were significantly lower (41% or 25%, respectively). These numbers are rather surprising mainly because of low sensitivity of classic tumour markers. It can be explained by cohort characteristics, where patients with locally advanced colon disease (grade I-III, it means at the most with locoregional lymph nodes affected with tumour) entered study. Distal metastases into the liver were found only in two patients during

operation. Furthermore it is the character of recurrences, where locoregional recurrence occurred in more than 50%. The results should be carefully interpreted due to the small number of relapses with regard to short follow up. Nevertheless, TPS seems to be promising marker for follow up of patients with colorectal carcinoma. Therefore, the combination of CEA and TPS appears to be ideal.

7. Splnění cílů projektu

Bod 1. – bod 2.

Nepodařilo se nám detekcí mRNA CK20, CEA v periferní krvi pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva získat klinicky využitelné výsledky. Za hlavní příčinu považujeme nízkou koncentraci mRNA výše uvedených genů, která je současnými metodami obtížně stanovitelná. Podařilo se nám však stanovením exprese mRNA výše uvedených genů v tkáňových vzorcích primárního tumoru získat informace o chování tohoto nádorového onemocnění.

Pomocí vhodných protilátek by mohlo být možné aktivitu matrixových metaloproteináz inhibovat, což by mohlo mít na nádorovou tkáň a její okolí léčebný efekt. Klinicky se již některé preparáty testují (Bay 12-9566 /fa Bayer/, BB94 /fa British Biotechnologi/).

Podařilo se nám prokázat, že při dodržování chirurgických pravidel při resekci střeva pro kolorektální karcinom, nemá resekční linie známky přítomnosti nádorových buněk – chybí přítomnost mRNA pro CEA.

Bod 3.

Využití mRNA námi stanovovaných genů v periferní krvi jako screeningové metody se ukázalo jako nevhodné.

Bod 4.

Prognostický význam CEA byl prokázán u našeho souboru nemocných, kde byl stanoven signifikantní vztah mezi elevací předoperačních hodnot CEA a celkovým přežitím. V případě bezpříznakového přežití bylo nejlepšího výsledku opět dosaženo u předoperačních hodnot CEA, jehož signifikance byla při použití laboratorních cut off potvrzena nejen univariační, ale také multivariační

analýzou. Pacienti s předoperační elevací CEA měli 11x větší pravděpodobnost progresu, než pacienti s normálními hodnotami. Lze konstatovat, že pro kontrolu úspěchu chirurgické léčby je nejvíce vhodné sledovat před- a pooperační hodnoty CEA.

Při 95% specificitě bylo nejvyšších senzitivit bylo dosaženo u nádorového markeru TPS (83%), senzitivity klasických nádorových markerů CEA a CA 19-9 byly podstatně nižší (41% respektive 25%). Tyto hodnoty jsou poněkud překvapivé, především pro nízkou senzitivitu klasických nádorových markerů. Vysvětlením může být charakteristika souboru.

Výsledky je třeba interpretovat opatrně pro malý počet relapsů vzhledem ke krátkému follow up, nicméně se TPS zdá jako slibný marker pro follow up pacientů s kolorektálním karcinomem. Jako ideální se proto zdá kombinace CEA a TPS.

III. Literatura

1. Použitá literatura

1. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg.* 2000 Sep;87(9): 1215-21.
2. Baker EA, Leaper DJ. Profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in intraperitoneal drainage fluid: relationship to wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003 Jul-Aug;11(4):268-74.
3. Balch GC, De Meo A, Guillem JG. Modern management of rectal cancer: a 2006 update. *World J Gastroenterol.* 2006 May 28;12(20):3186-95.
4. Becker H.D., Hohenberg W., Junginger T., Schlag P.M. *Chirurgická onkologie.* Grada 2005. p. 3-17, 29-35, 41- 46, 457 – 545.
5. Bleiberg H., Menemy N., Rougier P., Wilke H. Prevention and screening in Colorectal Cancer : A Clinical Guide to Therapy. Martin Dunitz Ltd., UK, 2002, p. 375 – 605.
6. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C. CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2004 Sep-Dec;25(5-6):228-34.

7. Collins HM, Morfia (tm), Watson SA. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitor of metalloproteinases and membráně type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer*. 2001 Jun 15; 84(12): 1664-70.
8. Corbett research: Protocol for DNA Amplification Detection in Real-Time PCR Using Sybr-green I Intercalating Dye, 2004.
9. Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8229-34.
10. Curran S, Murray GI.: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000 Aug;36(13 Spec No):1621-30.
11. Černá M, Holubec L Jr, Pešta M, Kormunda S, Topolčan O, Černý R. Quantitative estimation of CEA and CK20 expression in tumour tissue of colorectal cancer and its liver metastases with reverse transcription and real-time PCR. *Anticancer Res*. 2006 Jan-Feb;26(1B):803-8.
12. Čihák R. *Anatomie 2*. Avicenum 1988, 94 – 114.
13. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003 Apr;39(6):718-27.

14. Duraker N, Celik AN. The prognostic significance of preoperative serum CA 19-9 in patients with resectable gastric carcinoma: comparison with CEA. *J. Surg. Oncol.* 2001 Apr; 76 (4) : 266 - 71.
15. Eche N, Pichon MF, Quillien V, Gory-Delabaere G, Riedinger JM, Basuyau JP, Daver A, Buecher B, Conroy T, Dieu L, Bidart JM, Deneux L; Groupe de travail Nicole Eche (coordonnateur), oncobiologiste. Standards, options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer. *Bull Cancer.* 2001 Dec;88(12):1177-206.
16. Engaras B, Kewenter J, Nilsson O, Wedel H, Hafstrom L. CEA, CA 50 and CA 242 in patients surviving colorectal cancer without recurrent disease. *Eur J Surg Oncol.* 2001 Feb;27(1):43-8.
17. Fakih MG, Padmanabhan A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. *Oncology (Williston Park).* 2006 May;20(6):579-87; discussion 588, 594, 596.
18. Ferko A., Vobořil Z., Šmejkal K., Bedrna J. *Chirurgie v kostce.* Grada publishing 2002, 163 – 170, 295 – 310.
19. Fernandes LC, Kim SB, Matos D. Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging and prognosis of colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 7;11(5):645-8.
20. Fernandes LC, Kim SB, Saad SS, Matos D. Value of carcinoembryonic antigen and cytokeratins for the detection of recurrent disease following curative resection of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 28;12(24):3891-4.

21. Fletcher R.H. Successful colorectal cancer screening starts with primary care. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 2, Suppl. 1, 2002, p. 27 – 34.
22. Forslund A, Engaras B, Lonroth C, Lundholm K. Prediction of postoperative survival by preoperative serum concentrations of anti-p53 compared to CEA, CA 50, CA 242 and conventional blood tests in patients with colorectal carcinoma. *Int J Oncol.* 2002 May;20(5):1013-8.
23. Gasser M, Gerstlauer C, Grimm M, Bueter M, Lebedeva T, Lutz J, Maeder U, Ribas C, Ribas C, Nichiporuk E, Thalheimer A, Heemann U, Thiede A, Meyer D, Waaga-Gasser AM. Comparative analysis of predictive biomarkers for therapeutical strategies in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2007 Apr; 14 (4) : 1272 - 84. Epub 2007 Jan 9.
24. Gebauer G, Muller-Ruchholtz W. Carcinoembryonic antigen and CA19-9: implications of quantitative marker measurement in tissues for prognosis of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2001;25(4):344-51.
25. Giordano P, Efron J, Vernava AM 3rd, Weiss EG, Nogueras JJ, Wexner SD. Strategies of follow-up for colorectal cancer: a survey of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Tech Coloproctol.* 2006 Oct;10(3):199-207. Epub 2006 Sep 20.
26. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2005;23(4):338-51.

27. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeisson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122.
28. Hasholzner U, Stieber P, Zimmermann A, Burges A, Hofmann K, Schmitt UM, Schmeller N, Schalhorn A: Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) in benign and malignant diseases. *Anticancer Res.* 1999 Jul-Aug; 19(4A): 2415-20.
29. Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, Jacobson A, Spencer M, Rothenberger DA, Niehans GA Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 1;10(17):5777-84.
30. Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, Jacobson A, Spencer M, Rothenberger DA, Niehans GA, D'Cunha J, Kratzke RA. Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 1;10(17):5777-84.
31. Holten-Andersen MN, Nielsen HJ, Sorensen S, Jensen V, Brunner N, Christensen IJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the postoperative monitoring of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2006 Aug;42(12):1889-96. Epub 2006 Jun 30.
32. Holten-Andersen MN, Hansen U, Brunner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2005 Jan 10, 113(2):198-206.

33. Holubec L. Jr., Topolčan O., Pikner R., Pecen L., Václavičková J., Wirthová M., Moláček J., Stieber P., Holdenrieder S., Holubec L.Sen., Finek J. The significance of CEA, CA19-9 and CA72-4 in the detection of colorectal carcinoma recurrence. *Anticancer Res.* 2000 Nov-Dec;20(6D):5237-44.
34. Holubec L. Jr., Topolčan O., Pikner R. Biologická aktivita v kolorektálním karcinomu. *Čas. Lék. čes.* 2002, 141 (16), p. 508 – 512.
35. Holubec L jr, Topolcan O, Pikner R, Pecen L, Holubec L sen, Finek J, Rousarova M, Vaclavickova J, Wirthova M, Molacek J: Changes of Tumor Marker Values in Patients with Colorectal Carcinoma, Comparison of the Results on the Basis of Differently Defined Groups of Patients with No Evidence of Disease and with Recurrence of Disease. *Biomarkers and Environment* 2000. 3(1,2): 8-11.
36. Holubec L, et al. Kolorektální karcinom – současné možnosti diagnostiky a léčby. *Grada* 2004, p. 15-23, 15-18, 103-132.
37. Chen CC, Menges M, Orchowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16:133-140.
38. Chen CC, Yang SH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Chang SC. Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res.* 2005 Apr;124(2):169-74.

39. Jablonska M, a kol.: Kolorektální karcinom, časná diagnóza a prevence. Praha, Grada, 2000.
40. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002, 21:2245-52.
41. Kim SB, Fernandes LC, Saad SS, Matos D. Assessment of the value of preoperative serum levels of CA 242 and CEA in the staging and postoperative survival of colorectal adenocarcinoma patients. *Int J Biol Markers*. 2003 Jul-Sep;18(3):182-7.
42. Klener P: Význam angiogeneze i nádorových onemocnění a možnosti jejího ovlivnění. *Forum Medicinae* 1999, 2: 54-61.
43. Klener P: Karcinom tračnicku a konečnicku. V: *Vnitřní lékařství*. Galén 1999, 501-504.
44. Kolcová V, Geryk E, Jechová M: Tlusté střevo. V: *Zhoubné novotvary*. Galén 1999, 18-19.
45. Liu Y, Jiang B, Tong HS, Lai XR: Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in colorectal carcinoma and its clinical implications. *Nan Fang Ke Da Xue Xue Bao*. 2006 May, 26(5): 699-700.
46. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; ASCO. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 20;24(33):5313-27. Epub 2006 Oct 23.

47. Louhimo J, Carpelan-Holmstrom M, Alfthan H, Stenman UH, Jarvinen HJ, Haglund C. Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2002 Oct 20;101(6):545-8.
48. Ma CJ, Hsieh JS, Wang WM, Su YC, Huang CJ, Huang TJ, Wang JY. Multivariate analysis of prognostic determinants for colorectal cancer patients with high preoperative serum CEA levels: prognostic value of postoperative serum CEA levels. *Kaohsiung J Med Sci*. 2006 Dec;22(12):604-9.
49. McWilliams RR, Erlichman C. Novel therapeutics in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2005 Aug;48(8):1632-50.
50. Midgley R, Kerr D: Colorectal cancer. *Lancet* 1999; 353 (9150), January 30, 391-399.
51. Mishaeli M, Klein B, Sadikov E, Bayer I, Koren R, Gal R, Rakowsky E, Levin I, Kfir B, Schachter J, Klein T: Initial TPS serum level as an indicator of relapse and survival in colorectal cancer. *Anticancer Res* 1998 May-Jun; 18(3B): 2101-5.
52. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2005 Jan;13(1):115-20.

53. Morita S, Nomura T, Fukushima Y, Morimoto T, Hiraoka N, Shibata N. Does serum CA19-9 play a practical role in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 2004 Feb;47(2):227-32.
54. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Arisawa K. Preoperative serum level of CA19-9 predicts recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology*. 2003. May-Jun; 50 (51): 696-9.
55. Nekulová M, Šimíčková M, Černoš M: Charakteristika a využití jednotlivých nádorových markerů. V: *Nádorové markery*. Boehringer Mannheim Czech 1996. 15-31.
56. Netter F.H. *Atlas der Anatomie des Menschen*, 3., überarbeitete und erweiterte Auflage, ICON Learning Systems 2003, 263 – 277.
57. Ornstein DL, John KH. Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 is altered in colorectal tumors to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci*. 2002 Aug; 47(8): 1821-30.
58. Pecen L, Topolčan O, Koukalová H, Novák J, Široký P, Roušarová M, Holubec L jr., Pikner R, Svobodová Š: Epidemiology of Colorectal Carcinoma in the Czech Republic. *J Tumor Marker Oncology*. 2000; 15(1): 55-56.

59. Pešta M, Holubec L Jr, Topolčan O, Černá M, Rupert K, Holubec LS, Třeška V, Kormunda S, Elgrová L, Finek J, Černý R. Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res.* 2005 Sep-Oct;25(5):3387-91.
60. Rejthar A, Vojtěšek B.: *Obecná patologie nádorového růstu.* Praha, Grada 2002.
61. Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, Specterman S, de Kier Joffe EB, Pallotta MG, Puricelli LI, Lastiri J. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol.* 2006 Feb 1;93(2):151-60.
62. Sandelewski A , Kokocinska D , Partyka R , Kocot J , Starzewski J , Chanek I , Jalowiecki P. Usefulness of evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) and soluble fragments of cytokeratin 18-th (TPS) in postoperative monitoring of patients with colorectal cancer. *Pol Merkur Lekarski.* 2005 Jun;18(108):647-50.
63. Schwandner O, Schlamp A, Broll R, Bruch HP. Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Feb;22(2):127-36. Epub 2006 Aug 2.
64. Schwartz M: Screening for Colorectal Cancer. In: *Topics in Primary Care.* University Health Care Services. Chicago, 1998, pp 1-5.

65. Spila A, Ferroni P, Cosimelli M, D'Alessandro R, Abbolito MR, Mariotti S, Aloe S, Carone MD, Graziano F, Tedesco M, Martini F, Mancini R, Stigliano V, Roselli M, Guadagni F. Comparative analysis of CA 242 and CA 19-9 serum tumor markers in colorectal cancer patients. A longitudinal evaluation. *Anticancer.Res.*2001.Mar-Apr;21(2B):1263-70.
66. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.
67. Thompson J, Zimmermann W, Osthus-Bugat P, et al.: Long-range chromosomal mapping of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family cluster. *Genomics* 1992;12: 761-772.
68. Třeška V. a kol. Propedeutika vybraných klinických oborů. Grada publishing 2003, 156 – 166.
69. Union Internationale Against Cancer: TNM Classification of malignant tumours. 6. edition. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha 2004, 65-71.
70. Von Kleist S, Hesse Y, Kananeeh H: Comparative evaluation of four tumor markers, CA 242, CA 19-9 TPA and CEA in carcinomas of the colon. *Anticancer Research.* 1996; 16(4B): 2325-31.
71. Vysloužil K. Komplexní léčba nádorů rekta. Grada publishing 2005.
72. Wan Y, Wei Q, Pan Y, Liu Y. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colorectal neoplasm. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2000 Jul;38(7):510-3.

73. Way W.L. a kol: Karcinom tlustého střeva. V: Současná chirurgická diagnostika a léčba. Grada publishing 1998. str. 818-832.
74. Xi L, Gooding W, McCarty K, Godfrey TE, Hughes SJ, D'Cunha J, Kratzke RA. Identification of mRNA markers for molecular staging of lymph nodes in colorectal cancer. Clin Chem. 2006 Mar;52(3):520-3.
75. Zavoral M a kol.: Kolorektální karcinom, screening, diagnostika, léčba. Česká a Slovenská gastroenterologie 2000, 54: A11-A19.
76. Zeman et al. Speciální chirurgie. Galén 2001, 287 – 312.
77. Zheng CX, Zhan WH, Zhao JZ, Zheng D, Wang DP, He YL, Zheng ZQ. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2001 Jun;7(3):431-4.
78. Zorcolo L. Biomolecular prognostic factors in colorectal cancer. Chir. Ital. 2006. Nov-Dec;58(6):733-42.

2. Literatura autora

Rupert K., Pesta M., Holubec L.jr., Nosek J., Novák P., Černý R., Topolčan O., Holubec L., Třeška V.: Verification of biological characteristics of resection lines of colorectal carcinoma by quantitative expression of mRNA CEA and TIMP-1. The Internet Journal of Surgery. 2007. Volume 9 Number 1.

Rupert K., Veselý V., Jambura J., Duras P., Třeška V.: Poranění konečníku a análního kanálu. Úrazová chirurgie 4, 2005: 152-155.

Rupert K., Holubec L.Jr., Pešta M., Topolčan O., Holubec L. Sen., and Třeška V.: Expression of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and a tissue inhibitor of matrix metalloprotenases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma measured by means of quantitative RT-PCR. Hepatogastroenterology. Odesláno do tisku 7/06, IF 1,2.

M. Pesta ,L. Holubec jr. , O. Topolcan , M. Cerna , **K. Rupert** , S Kormunda , J. Finek and R. Cerny : Quantitative Estimation of Matrix Metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in Colorectal Carcinoma Patients. Anticancer Research. Volume 25, Issue No. 5, 2005, IF 1,5.

Svobodova S. , Topolcan O. , Holubec L. , Treska V. , Sutnar A., **Rupert K.**, Kormunda S. , Rousarova M. and Finek J.: Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer. Anticancer Research 2007. Accepted for publication, IF 1,5.

Pesta M., Topolčan O., Holubec L. jr., **Rupert K.**, Cerna M., Holubec L. sen., Treska V., Finek J. and Cerny R.: Clinicopathological assessment & Quantitative Estimation of MMP-2, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 in Colorectal Carcinoma Tissue Samples. *Anticancer Res.* 2007. Accepted for publication, IF 1,5.

Skalický T., Třeška V., Valenta J., Neprašová P., **Rupert K.**: Chirurgická léčba onemocnění štítné žlázy na chirurgické klinice Fakultní nemocnice v Plzni 1994 – 2000. *Rozhledy v chirurgii*, červen (6) 2001, 315-9.

Abstrakta:

Rupert K., Holubec L. Jr., Pesta M., Topolčan O., Holubec L. Sen., Treska V.: Expression of proteases and their inhibitors in colorectal carcinoma. *Hepato-Gastroenterology Supplement I – Abstracts of 14 th International postgraduate course of the International Association of Surgeons, gastroenterologists and Oncologists, Volume 53, December 2006, p. A77. Poster presentation.*

Rupert K., Pešta M., Holubec L. Jr., Holubec L., Topolčan O., Třeška V.: Quantitative Estimation of MMP-2, MMP-7 and TIMP-1, TIMP-2 in Colorectal Carcinoma Tissue Samples. *Abstracts book of XXXIII. Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, September 2005, p. 75. Poster presentation.*

Selected poster to compete for EGTM's (European Group on Tumor Markers) first Poster Award

Holubec L.jr., Pešta M., Fínek J., Topolčan O., Holubec L.sen., **Rupert K.**, Třeška V.: Clinicopathological assessment & quantitative estimation of MMP-2, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Annals of Oncology*, Volume 17, 2006, Supplement 9, p. 255. Abstract of poster presentation, 31st ESMO Congress 29 September – 3 October 2006, Istanbul, Turkey.

Holubec L., Topolčan O., Fínek J., Pešta M., **Rupert K.**, Sutnar A., Liška V., Kormunda S., Vrzalová J., Třeška V.: Prognostický a prediktivní význam nádorových markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem. Sborník abstrakt, str.26, II. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 7.-9. prosince 2006. Oral presentation.

Pešta M, Holubec L. Jr. , Topolčan O., Fínek J., Černá M., **Rupert K.**, Černý R. Detekce mutace kodonu 12 onkogenu K-ras u vzorků kolorektálního karcinomu. Sborník JOD 2004. ISBN 80-238-7485-3. Poster presentation.

Pešta M, Holubec L.jr., Topolčan O., Fínek J., **Rupert K.**, Černá M., Černý R.: Expression of mRNA of MMP-2 and MMP-7 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma patients, *Biomarkers and Environment*, No.3,4, vol.8, 2004, p. 83. Poster presentation.

Pešta M, Holubec L.jr., Topolčan O., Fínek J., **Rupert K.**, Černá M., Černý R.: Codon 12 K-ras mutation in tissue samples from patients with colorectal cancer. *Biomarkers and Environment* , No.3,4, vol.8, 2004,p. 82. Poster presentation.

Topolčan O., Holubec L., Liška V., Svobodová Š., Třeška V., Finek J., **Rupert K.**, Sutnar A. : Prognostic Importance of TPS at Colorectal Carcinoma. Book of abstracts, p.30, 6th Ceftuma 2006, Prague, May 30 – June 1. Oral presentation.

IV. Přílohy

1. Informovaný souhlas pacienta

Jméno pacienta

rodné číslo

oš. číslo

Souhlasím se zařazením do klinické studie :

Stanovení nádorové mRNA u kolorektálního karcinomu jako screeningové a prognostické metody pomocí reverz-transkription polymerase chain reaction RT-PCR a srovnání s klasickými nádorovými markery.

Prohlašuji, že jsem byl svým ošetřujícím lékařem seznámen s protokolem studie a že jsem na své otázky obdržel srozumitelné a jasné odpovědi. Beru na vědomí, že léčebné metody, které jsou mě poskytovány, odpovídají zásadám Správné klinické praxe, že jde o metody zavedené a obecně přijímané a že se nejedná o použití experimentálních metod ani experimentálních léků. Souhlasím s odběry tělesných tekutin (krve a moče) za účelem monitorování průběhu onemocnění. Souhlasím s použitím vyšetřovacích postupů podle protokolu studie.

Ze studie mohu v jejím průběhu kdykoli odstoupit bez udání důvodu.

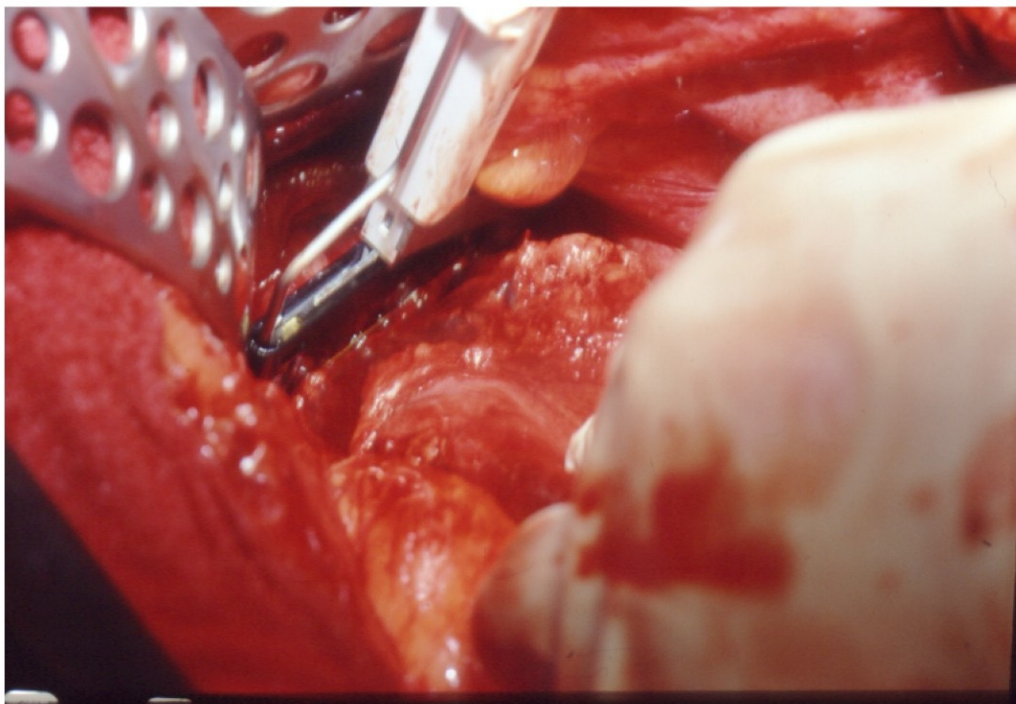
V Plzni dne :

podpis pacienta

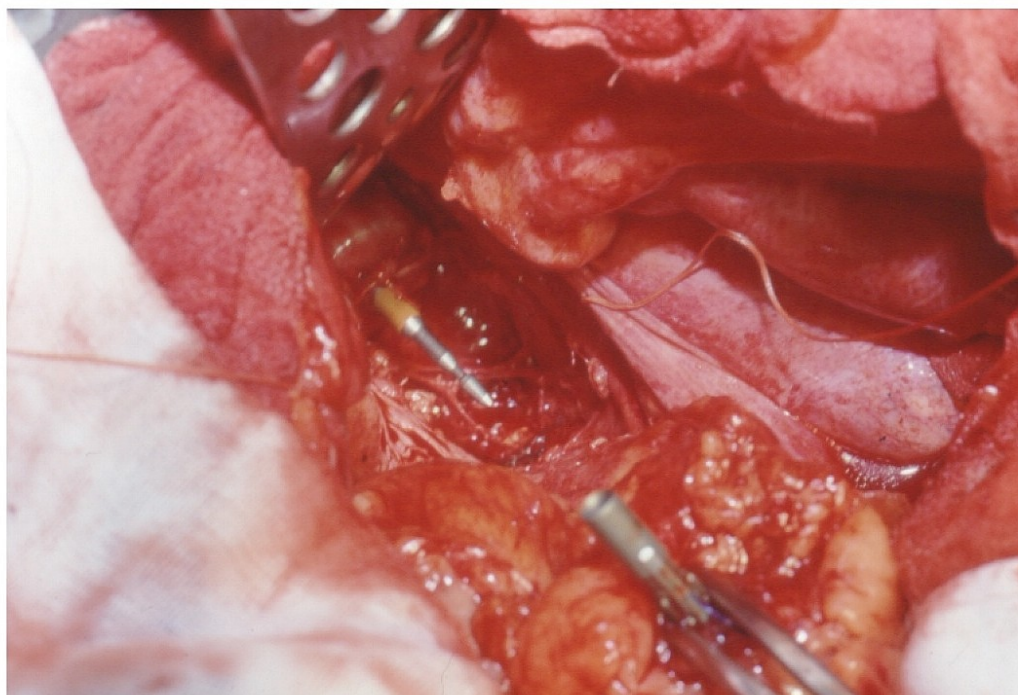
podpis hl. řešitele

podpis oš. Lékaře

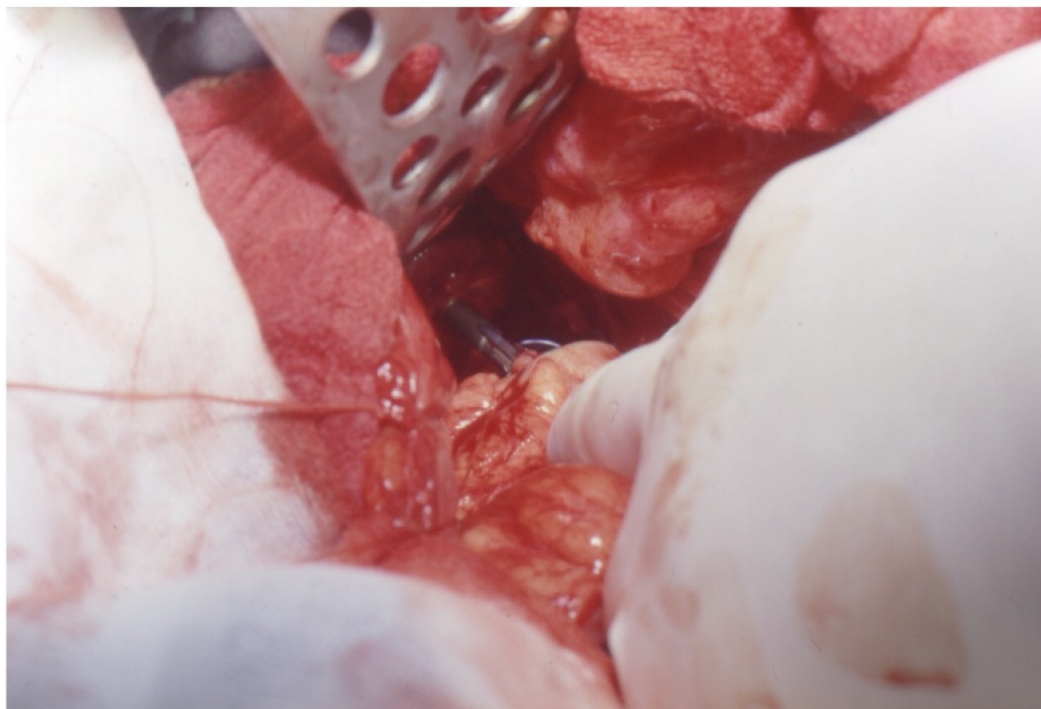
2. Průběh nízké přední resekce rekta – naložení lineárního stapleru pod tumor.



3. Průběh nízké přední resekce rekta – příprava před vytvořením anastomozy pomocí circulačního stapleru



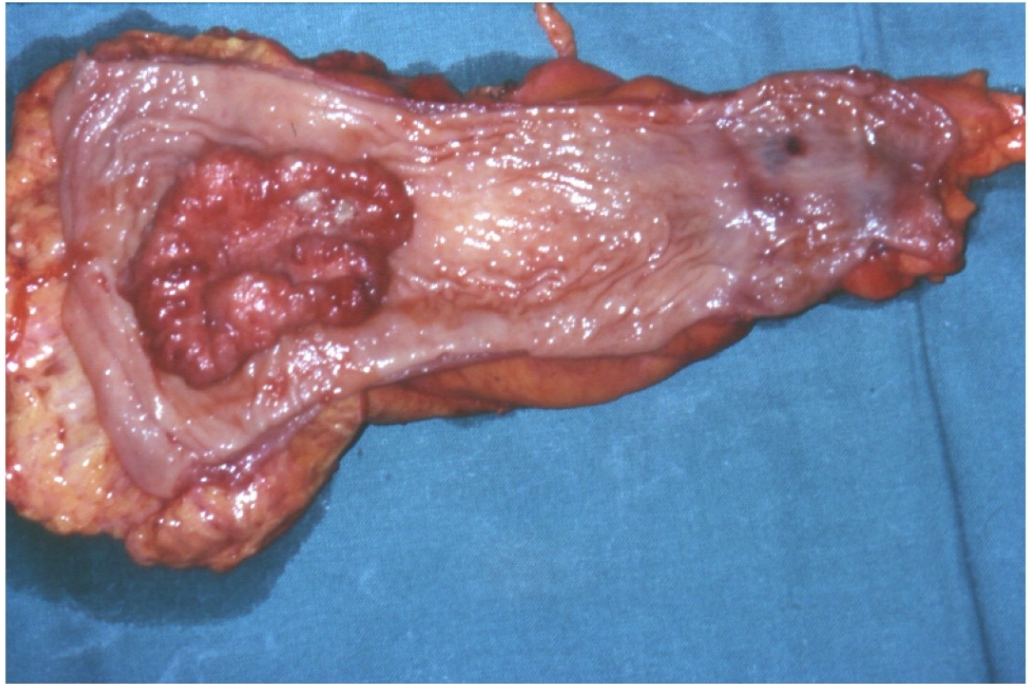
4. Průběh nízké přední resekce rekta – příprava před vytvořením anastomozы pomocí circulařního stepleru



5. Příklad totální mesorektální excize



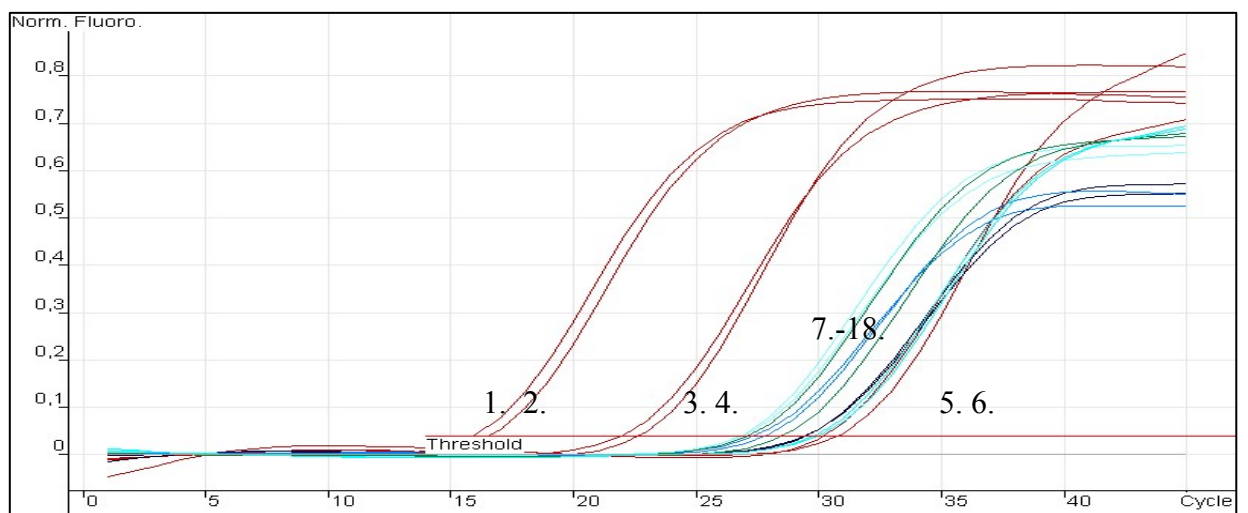
6. Resekát tlustého střeva s adenokarcinomem



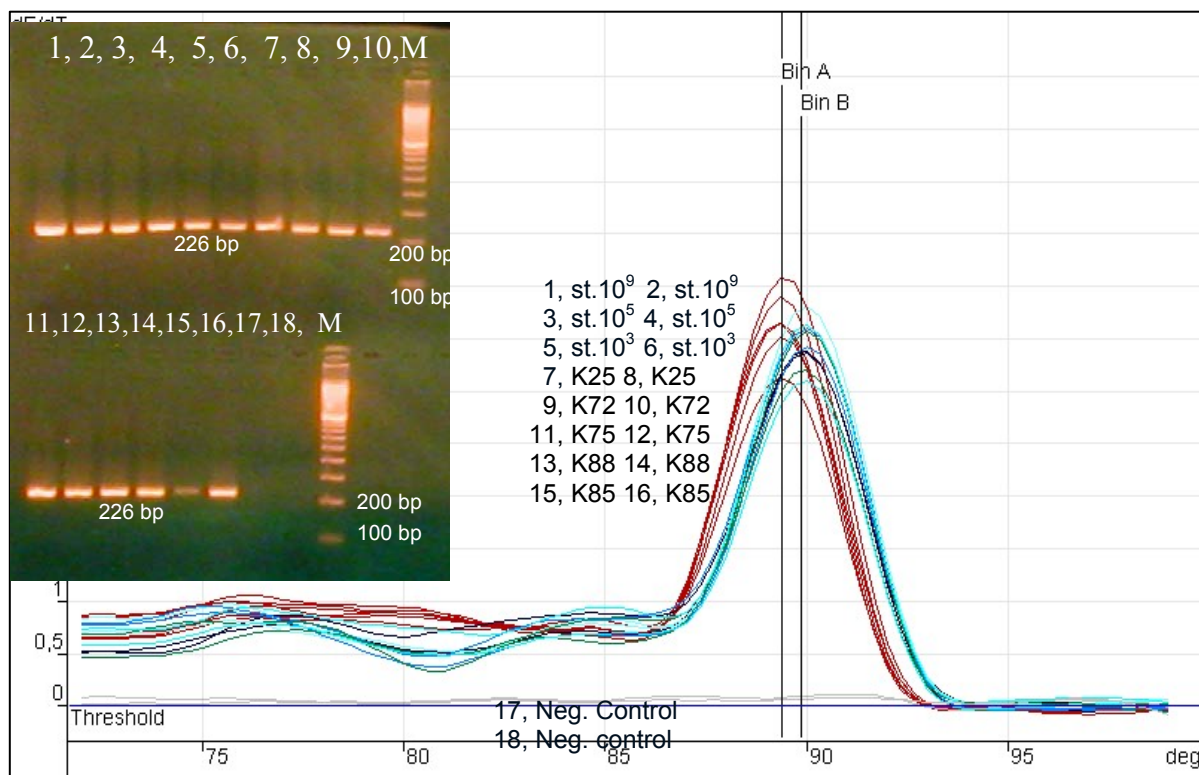
7. Záznamy PCR v reálném čase

Záznamy PCR v reálném čase, stanovení cDNA genu GAPDH, SYBR green I

Graf. 15. PCR v reálném čase

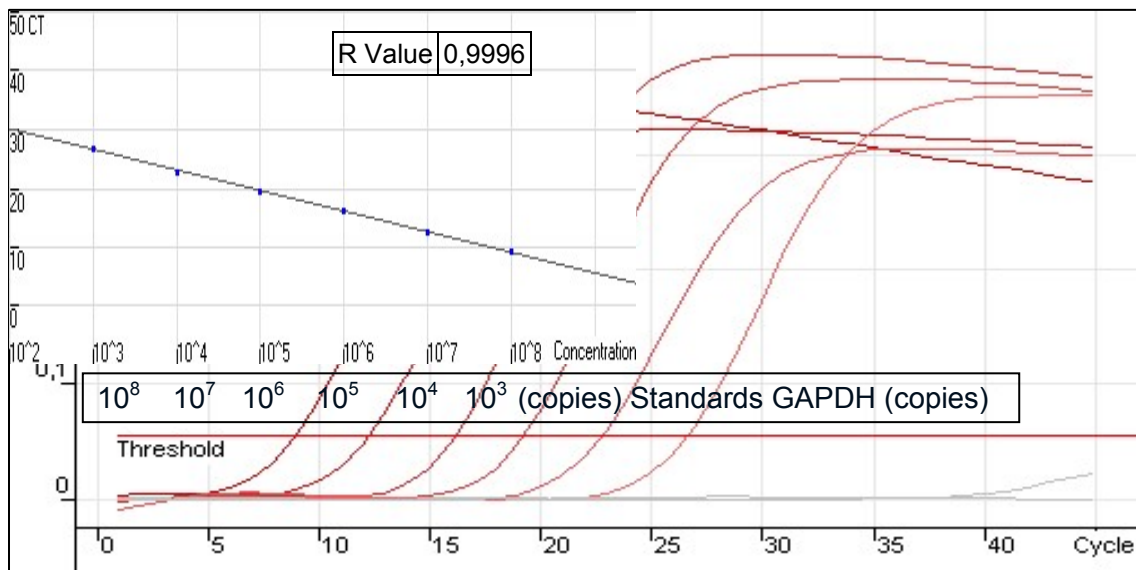


Graf. 16. Teplotní křivka tání stanovení cDNA genu GAPDH, Tm_A=89,1 (standards, 1-6), Tm_B=89,9 (vzorky tkání, 7-16), negativní kontroly (17, 18) zcela mimo Tm_A a Tm_B. Rozdíl Tm_A a Tm_B je dán vyšší koncentrací solí ve vzorkách tkání oproti standardům. V grafu 2 je vložena fotografie



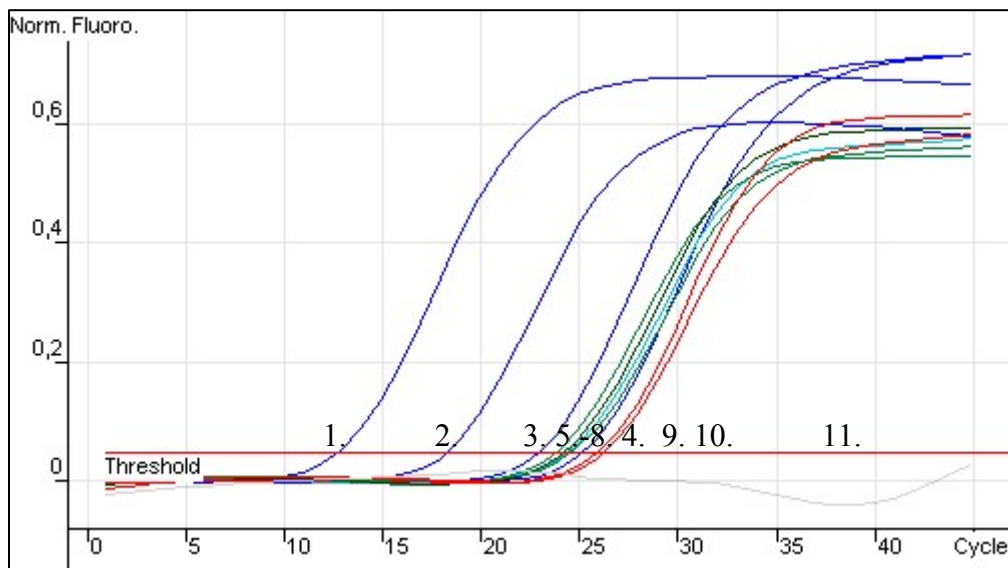
elektroforézy. U standard a vzorků (1-16) je detekován PCR produkt – exprese je přítomna. Negativní kontroly (17 a 18) jsou bez PCR produktu. M- marker velikostí DNA fragmentů, bp-počet párů bazí.

Graf. 17. PCR v reálném čase, zobrazeny jsou standardy o koncentracích $10^3 - 10^8$ kopií, $R=0,9996$

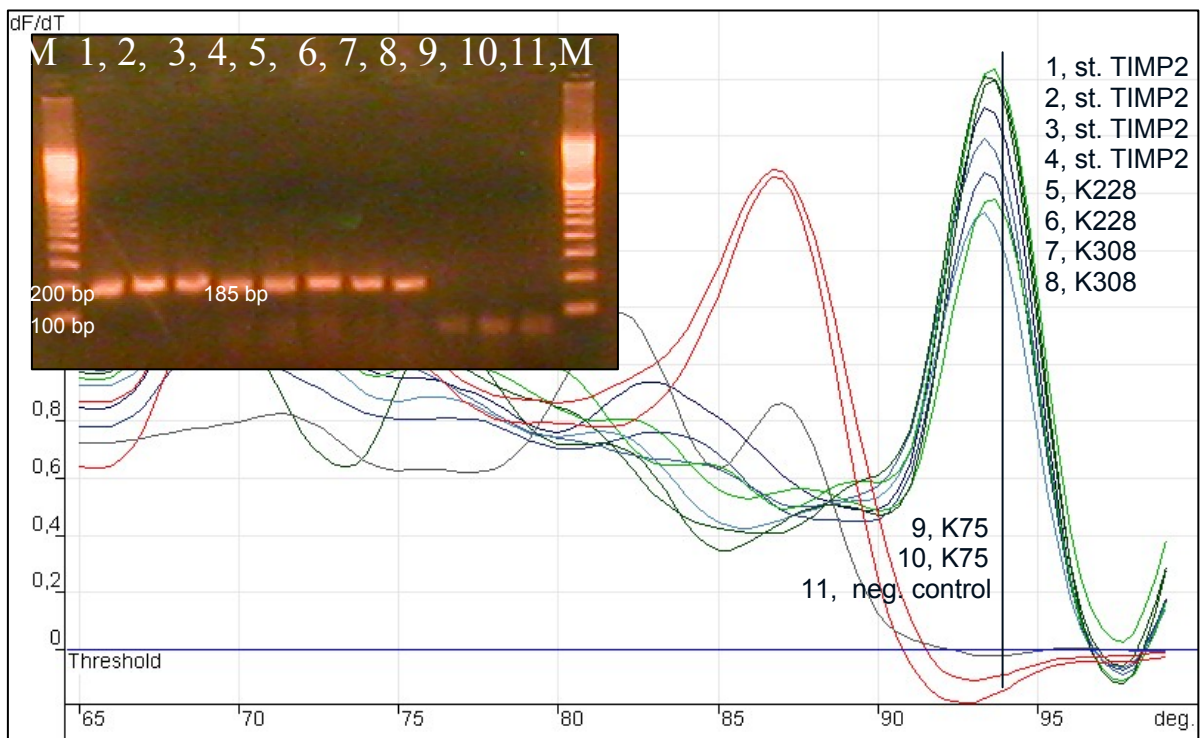


Záznamy PCR v reálném čase, stanovení cDNA genu TIMP-2, SYBR green I

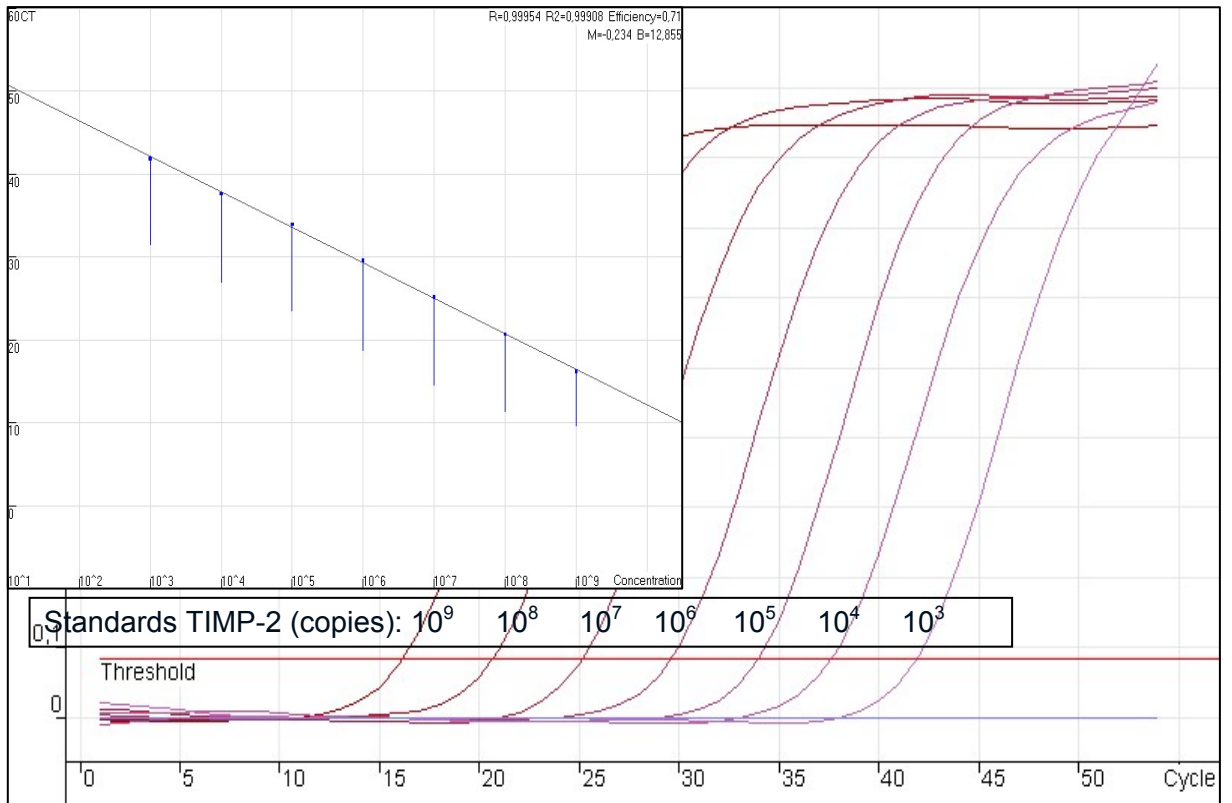
Graf. 18. PCR v reálném čase, stanovení TIMP-2



Graf. 19. Teplotní křivka tání stanovení cDNA genu TIMP-2, $T_m=99,3$, standardy 1-4, vzorky tkání 5, 6, 7, 8 - exprese TIMP-2 byla přítomna, vzorky tkání 9 a 10 - exprese TIMP-2 nebyla přítomna (mimo $T_m=99,3$), negativní kontrola 11 (mimo $T_m=99,3$) V grafu 5 je vložena fotografie elektroforézy. U standard a vzorků (1-8) je detekován PCR produkt – exprese je přítomna. Vzorky 9,10 jsou bez PCR produktu - exprese není přítomna. Negativní kontrola (11) je bez PCR produktu. M- marker velikostí DNA fragmentů, bp-počet párů bází

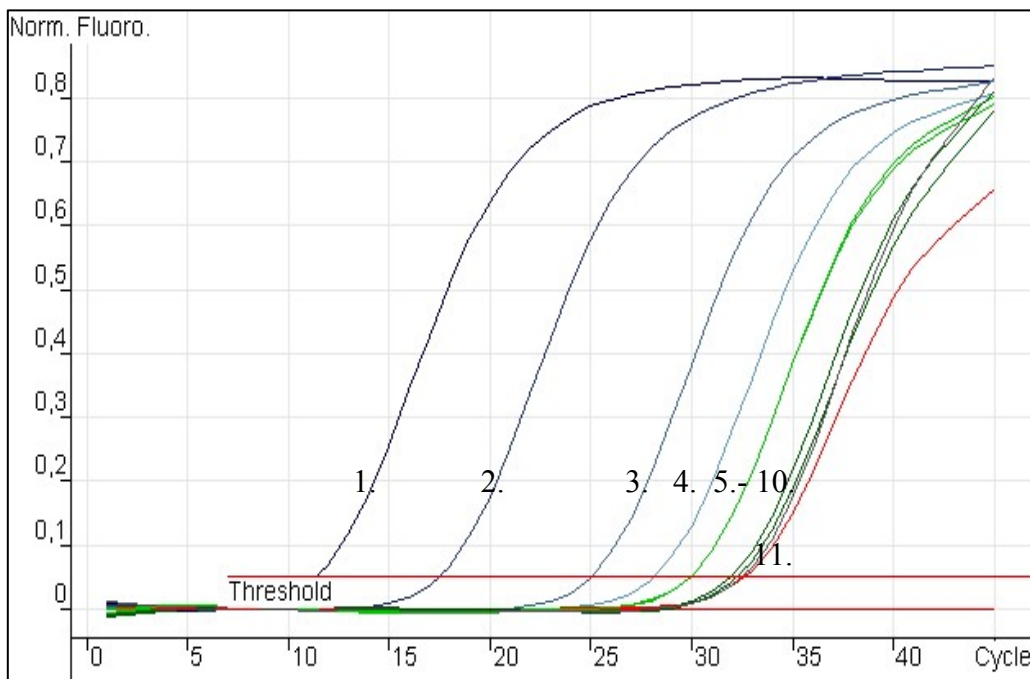


Graf. 20. PCR v reálném čase, zobrazeny jsou standardy o koncentracích $10^3 - 10^9$ kopií, $R=0,99954$

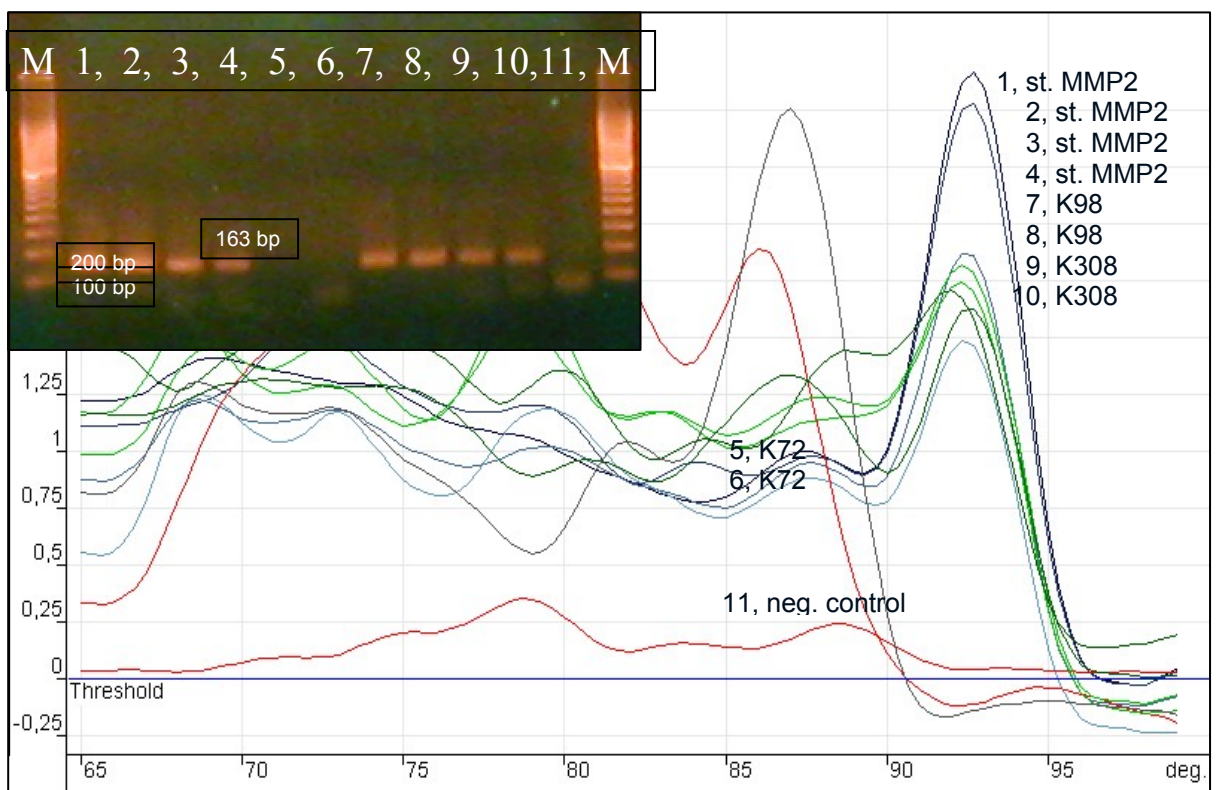


Záznamy PCR v reálném čase, stanovení cDNA genu MMP-2, SYBR green I

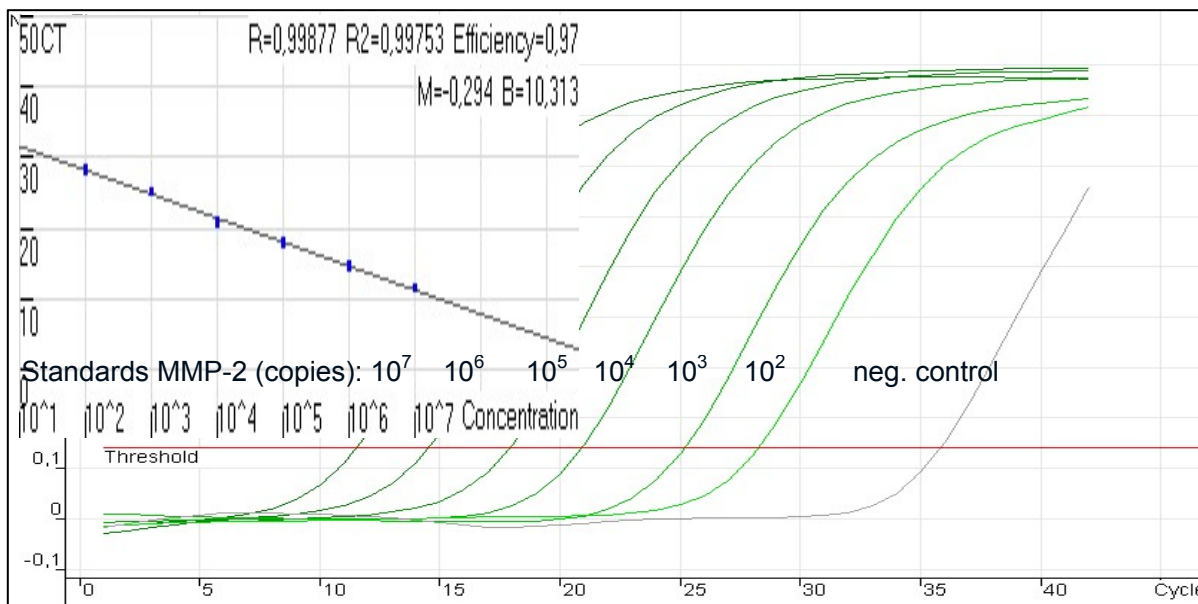
Graf . 21. PCR v reálném čase, stanovení MMP-2



Graf. 22. Teplotní křivka tání stanovení cDNA genu MMP-2, $T_m=92,3$, standardy 1-4, vzorky tkání 7, 8, 9 10 - exprese MMP-2 byla přítomna, vzorky tkání 5 a 6 - exprese MMP-2 nebyla přítomna (mimo $T_m=92,3$), negativní kontrola 11 (mimo $T_m=92,3$). V grafu 8 je vložena fotografie elektroforézy. U standard a vzorků (1-4 a 7-10) je detekován PCR produkt – exprese je přítomna. Vzorky 6,7 jsou bez PCR produktu - exprese není přítomna. Negativní kontrola (11) je bez PCR produktu. M- marker velikostí DNA fragmentů, bp-počet párů bází.



Graf. 23. PCR v reálném čase, zobrazeny jsou standardy o koncentracích $10^2 - 10^7$ kopií, $R=0,99954$



8. CK 20 Quantitation Report

1. (vlastní kvantifikace – přiřazení počtu kopií pozitivním vzorkům identifikovaným pomocí teplotní křivky tání)

1.1.1.1 Experiment Information

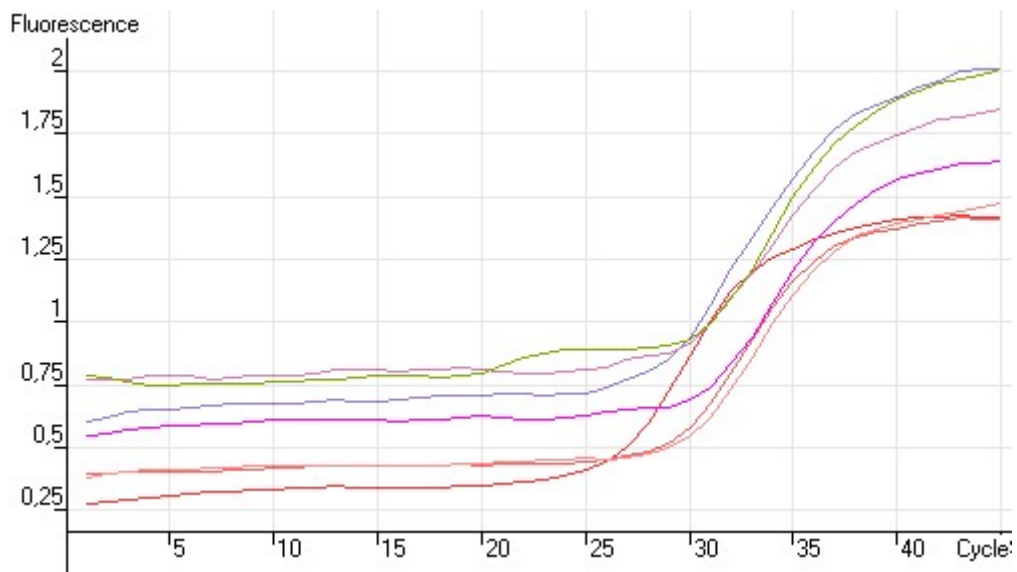
Experiment Name	membrCK20doublevzC1M-vzC22M
Experiment Start	25.10.2006 11:04:18
Experiment Finish	25.10.2006 13:42:15
Operator	Martin
Notes	CK 20
Gain CH1	5
Gain CH2	5

Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Noise Slope Correction	Yes
Start normalising from cycle	1
Digital Filter	Light
Threshold	0,0228
Left Threshold	5
Standard Curve	conc= 10 [^] (-0,467*CT + 17,774)
Reaction efficiency (*)	1,93 (* = 10 [^] (-m) - 1)
R Value	0,9453
No Template Control Threshold	0,0% (0Fl)

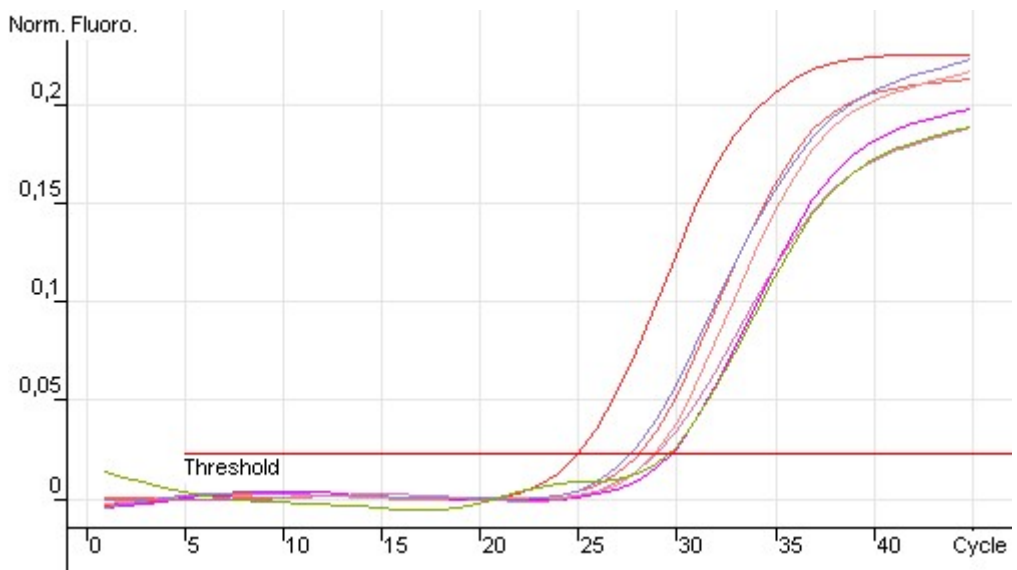
1.1.1.2 Temperature Profile

Cycle	Cycle Point
Denature @ 95 deg., 600 secs	
Hold @ 95 deg., 300 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95 deg., hold 30 secs
	Step 2 @ 58 deg., hold 30 secs
	Step 3 @ 72 deg., hold 35 secs, acquiring to Cycling A(CH1, CH2)
Melt (55-95 deg.) , hold 5 secs, acquiring to Melt A(CH1, CH2)	

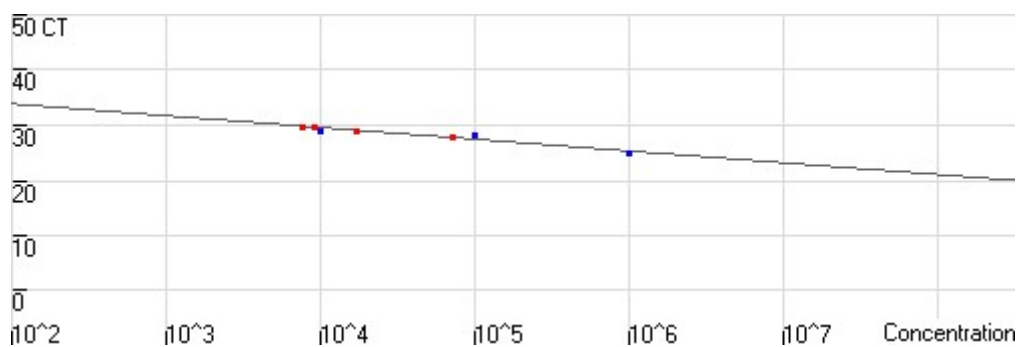
1.1.1.3 Raw data for Cycling A.CH1










1.1.1.4 Quantitation data for Cycling A.CH1



1.1.1.5 Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Given Conc. (Copies)	Calculated Conc. (Copies)	CV	Ct	Ct Std. Dev.
2		CK20	Standard	1 000 000,	1 179 247,	17,92%	25,08	
3		CK20	Standard	100 000,	44 039,	55,96%	28,14	
4		CK20	Standard	10 000,	19 256,	92,56%	28,91	
10		C5M	Sample		7 562,		29,78	
17		C14M	Sample		70 654,		27,7	
19		C16M	Sample		17 294,		29,01	
22		C19M	Sample		8 980,		29,62	

This report generated by Rotor-Gene Real-Time Analysis Software

(C)Corbett Research 2000

(R)All Rights Reserved

9. CK 20 Melt Report

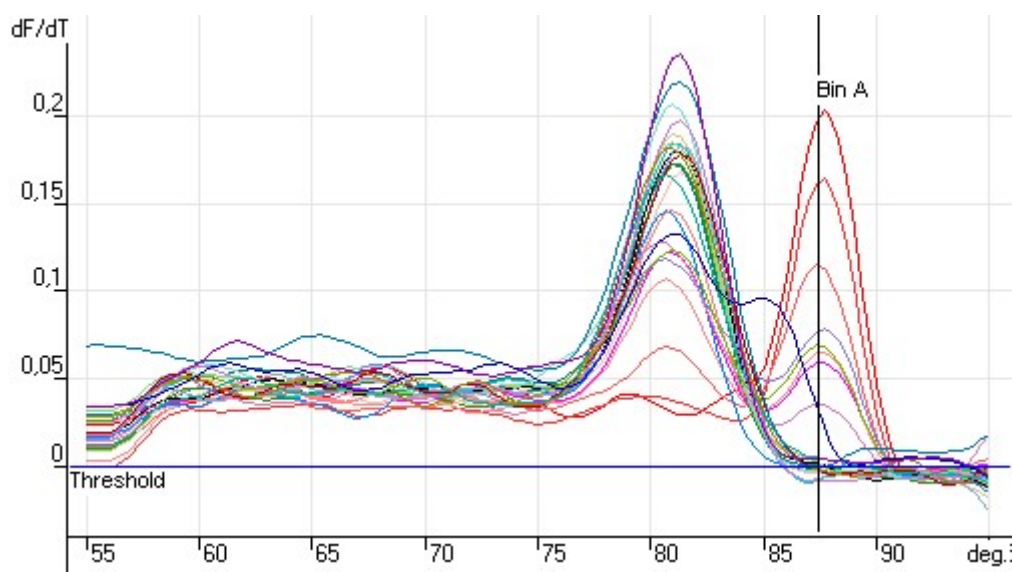
(záznam teplotní křivky tání – rozlišení TIMP-1 pozitivních a negativních vzorku)

Experiment Information


















Experiment Name	membrCK20doublevzC1M-vzC22M
Experiment Start	25.10.2006 11:04:18
Experiment Finish	25.10.2006 13:42:15
Operator	Martin
Notes	CK 20

Gain CH1	5
Gain CH2	5
Digital Filter	Light
Threshold	0
Temp. Threshold	0o

Melt data for Melt A.CH1 (standardy + pozitivní vzorky – peak Bin A)



No.	Colour	Name	Type	Peaks
1	■	CK20	Standard	62,8, 68,3, 73,6, 79,3, 87,8 (Bin A)
2	■	CK20	Standard	59,6, 65,1, 69,6, 79,6, 87,6 (Bin A)
3	■	CK20	Standard	59,4, 62,6, 68,8, 72,6, 80,9, 87,6 (Bin A)
4	■	CK20	Standard	60,1, 63,4, 69,9, 80,8, 87,6 (Bin A)
5	■	CK20	Standard	61,6, 65,6, 70,1, 74,9, 81,4
6	■	C1M	Sample	58,9, 62,1, 70,1, 74,1, 80,8
7	■	C2M	Sample	63,1, 68,3, 73,9, 81,1
8	■	C3M	Sample	60,4, 63,9, 68,1, 72,6, 81,1
9	■	C4M	Sample	59,9, 66,8, 81,3

10		C5M	Sample	61,9, 65,1, 72,3, 81,1, 87,6 (Bin A)
11		C6M	Sample	59,4, 63,4, 70,8, 74,4, 81,3
12		C8M	Sample	60,1, 67,6, 73,9, 81,3, 89,3 (Bin A)
13		C10M	Sample	60,1, 64,6, 67,6, 74,4, 81,1
14		C11M	Sample	59,6, 66,9, 74,6, 81,1
15		C12M	Sample	60,8, 68,1, 81,1
16		C13M	Sample	58,9, 63,4, 66,8, 71,9, 81,6
17		C14M	Sample	59,1, 63,8, 68,1, 72,1, 80,8, 87,8 (Bin A)
18		C15M	Sample	60,1, 65,1, 67,4, 72,3, 81,4
19		C16M	Sample	59,6, 64,4, 67,6, 71,3, 80,6, 87,6 (Bin A)
20		C17M	Sample	59,3, 64,3, 68,1, 72,1, 81,6
21		C18M	Sample	59,6, 67,1, 72,4, 81,1, 91,4 (Bin A)
22		C19M	Sample	60,1, 64,8, 70,1, 81,1, 87,6 (Bin A)
23		C20M	Sample	62,1, 66,4, 70,1, 80,8
24		C21M	Sample	55,6, 65,3, 71,3, 81,3, 90,1 (Bin A)
25		C22M	Sample	61,4, 64,4, 73,3, 81,1, 85,1 (Bin A), 91,9
26		ntc	NTC	61,8, 69,8, 81,3, 87,6 (Bin A), 92,8

This report generated by Rotor-Gene Real-Time Analysis Software
(C)Corbett Research 2000
(R)All Rights Reserved

10. Datasheet AdnaTest ColonCancerSelect

Datasheet AdnaTest ColonCancerSelect



Enrichment of tumor cells from blood of colon cancer patients for gene expression analysis

The kit *AdnaTest ColonCancerSelect* enables the immuno-magnetic enrichment of tumor cells via epithelial and tumor associated antigens.

Antibodies against epithelial and tumor associated antigens are conjugated to magnetic particles for labeling cells from peripheral blood. The labeled cells are extracted by a magnetic particle concentrator (MPC) and are subsequently lysed.

The cell lysate is used for additional analyses (continue with *AdnaTest ColonCancerDetect*).

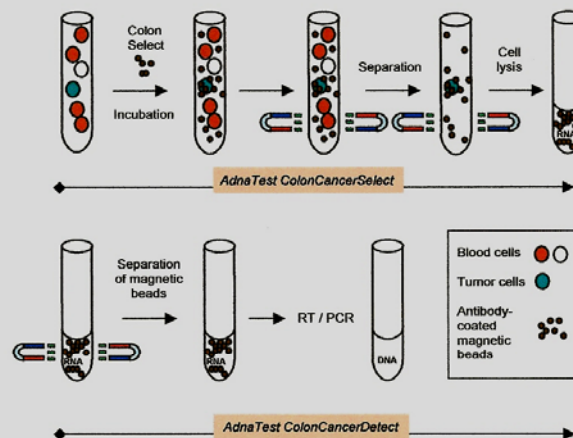


Fig. 1: Schematic overview of the sample preparation.

Kit Components

AdnaTest ColonCancerSelect includes the following components (number of tubes):

Component	T-1-504 (12 tests)	T-1-512 (24 tests)	T-1-514 (36 tests)
<i>ColonSelect</i>	1	2	3
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	1	1	1

Additional Materials Needed

Equipment:

- Tube rotator
- Magnetic particle concentrator MPC-L (Dynal cat no. 120.21) and MPC-S (Dynal cat no. 120.20)

Reagents:

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 (Invitrogen, cat no. 14190-094, D-PBS)

Version 041109