

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Plzni



**VÝZNAM BIOMARKERŮ
U NÁDORŮ GIT**

**IMPORTANCE OF BIOMARKERS
IN GI TUMORS**

Habilitační práce

Šárka Svobodová

Plzeň 2022

Poděkování:

První a hlavní poděkování patří především panu **prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi, CSc.**, který mne jako první do problematiky nádorových markerů zasvětil již před téměř 30 lety – tedy v době, kdy se první nádorové markery začínaly používat v klinické rutinní praxi. V uplynulých letech mi dal mnoho prostoru k prezentaci problematiky nádorových markerů v rámci českých i mezinárodních konferencí. Zvláště bych mu chtěla poděkovat za jeho aktivní podporu během celého období, kdy mi pomohl nasměrovat můj odborný zájem výzkumně i klinicky.

Další poděkování patří **prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., MBA**, který mne jako bývalý přednosta III. Interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze začlenil do obezitologické skupiny v Praze a umožnil mi provádění klinické praxe na pracovišti, kde se zrodil obor obezitologie pod vedením významného průkopníka oboru pana profesora MUDr. Jiřího Šonky, DrSc., jehož 100. výročí narození jsme si v roce 2020 připomněli.

Úspěšná vědecká a výzkumná práce je vždy kolektivním dílem. Ve výzkumných projektech bývá zvykem, že starší a zkušenější spolupracovníci přinášejí do této týmové spolupráce zpočátku své myšlenky a nápady, které mají podpořeny mnohaletými výsledky a zkušenostmi. Začínající výzkumníci se pak zpravidla podílejí na precizní realizaci těchto nápadů. Na tomto projektu bylo zapojeno mnoho dalších spolupracovníků, jejichž kompletní seznam by zabral několik stránek.

Zvláštní poděkování patří jmenovitě níže uvedeným kolegům, kteří se podíleli na tomto projektu nejvýznamněji:

prof. Pharm. Dr. Radek Kučera, Ph.D.

doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.

Úplně na závěr bych chtěla vyjádřit osobní poděkování členům mé rodiny, kteří mi v průběhu celého období byli velkou oporou.

Šárka Šokodová!

Seznam použitých zkratek

| | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| AAT | Alfa-1-antitrypsin (inhibitor serinové proteázy) |
| AFP | alfa-fetoprotein |
| AHA | Americká kardiologická společnost (American Heart Association) |
| AICR | Americký institut pro výzkum rakoviny (American Institute for Cancer Research) |
| AMPL | adenosine monophosphate-activated protein kinase |
| Ang 1 | angiopoetin 1 (angiogenní faktor) |
| APC gen | adenomatous polyposis coli gen |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology |
| ASR | věkově standardizovaná incidence (Age Standardized Rate) |
| ATP | Adult Treatment Panel |
| Bcl 2 | antiapoptotický proto-onkogen, lokalizovaný na chromozomu 18 |
| BMI | Body mass index, index tělesné hmoty (kg/m ²) |
| BRCA 2 | Supresorový gen karcinomu prsu (BRCA2) |
| β hCG | beta podjednotka hCG (humánního choriogonadotropinu) |
| CA 19-9 | Carbohydrate nebo cancer antigen CA 19-9 |
| CA 72-4 | Carbohydrate nebo cancer antigen CA 72-4 |
| CD 31 | adhezivní molekula, umožňuje adhezi mezi leukocyty a endotelem |
| CD 34 | adhezivní molekula, ligand pro selektin L |
| CD 44 | adhezivní molekula, umožňuje adhezi leukocytů |
| CD 45RB | izoforma molekuly CD 45 (společný leukocytární antigen) |
| CDH1 | Gen kadherinu 1 |
| CEA | karcinoembryonální antigen |
| Cut- off | diskriminační hladina |
| DFI | Období bez klinických příznaků onem. (disease free interval) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| e | Eulerovo číslo, základ přirozených logaritmů (e=2,718) |
| EBV | virus Epstein-Barrové |
| ECO | Evropský obezitologický kongres (European Congress on Obesity) |
| EGF | epidermal growth factor |
| EGTM | European Group on Tumour Markers |
| ELAM 1 | selektin E (adhezivní molekula) |

| | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| EMT | epitelomezenchymální tranzice (epithelial–mesenchymal transition) |
| ESMO | European Society for Medical Oncology |
| EUS | endoultrasonografie |
| FAP | familiární adenomatózní polypóza |
| FGF | růstový faktor pro fibroblasty |
| FNA | fine needle aspiration = tenkojehlová aspirační biopsie |
| GIT | Gastrointestinální trakt |
| HBV | Virus hepatitidy B (Hepatitis B Virus) |
| HCC | Hepatocelulární karcinom (Hepatocellular carcinoma) |
| HCV | Virus hepatitidy C (Hepatitis C Virus) |
| HDGC | Hereditární difúzní karcinom žaludku (Hereditary Difuse Gastric Cancer) |
| HP | Helicobacter Pylori |
| HT | Poměr rizik (Hazard ratio) |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule |
| IDF | Mezinárodní diabetologická federace (Internat. Diabetes Federation) |
| IGF-1 | insuline-like growth factor |
| IHC | imunohistochemie |
| IL | interleukin |
| KRK | kolorektální karcinom |
| MAP | multi-analyte profiling, metoda multiplexové analýzy |
| MIB-1 | antigen proliferace |
| MKN-10 | mezinárodní klasifikace nemocí, verze 10 |
| MMP | matrix metaloproteinázy |
| N/A | údaj nebyl k dispozici (not available) |
| NAFLD | Nonalkoholické postižení jater (Non-alcoholic fatty liver diseases) |
| NASH | Non alkoholická steatohepatitis |
| NCA antigen | non specific cross-reacting antigen |
| NHLB | Národní institut srdce, plic a krve (National Institute of Heart, Lung and Blood) |
| NSE | neuron specifická enoláza (nádorový marker) |
| OK | okultní krvácení |

| | |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| OPG | Osteoprotegerin |
| OS | celkové přežití (overall survival) bez ohledu na příčinu úmrtí |
| PALB | gen kódující reparační protein (<u>P</u> Aartner and <u>L</u> ocalizer of <u>B</u> RCA) |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen (faktor buněčné proliferace) |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction) |
| PDGF | plateled derived growth factor |
| PECAM | plateled endothelial cell adhesion molecule |
| PET | pozitronová emisní tomografie |
| PFS | přežívání bez příznaků progresu (progression free survival) |
| PIVKA-II | Protein induced by vitamin K absence |
| REG1A | Regenerating islet-derived protein 1 alpha |
| RFA | radiofrekvenční ablace |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| ROC | <u>ROC křivka</u> (receiver operating characteristic) |
| RT-PCR | polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí |
| TFF 1 | trefoil factor 1 |
| TGF | transforming growth factor |
| TIMP-1 | tissue inhibitor of metalloprotease |
| TK | thymidinkináza |
| TNM | mezinárodní klasifikace zhoubných novotvarů |
| Topo II-α | topoizomeráza II- alfa (antigen proliferace) |
| TPA | tkáňový polypeptidový antigen |
| TPS | tkáňový specifický tkáňový polypeptidový antigen |
| ÚZIS | Ústav zdravotnických informací a statistiky |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule |
| VEGF | vascular endothelial growth factor (angiogenní faktor) |
| xMAP | technologie multiplexové analýzy |
| WCRF | Světový fond pro výzkum rakoviny (World Cancer Research Foundation) |
| ZN | zhoubné nemoci |

Obsah

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Přehled současného stavu problematiky..... | 2 |
| 2.1. Epidemiologie..... | 2 |
| 2.1.1. Epidemiologie metabolického syndromu..... | 2 |
| 2.1.2. Epidemiologie nádorů gastrointestinálního traktu..... | 3 |
| 2.1.2.1. Nádory žaludku..... | 7 |
| 2.1.2.2. Nádory jater..... | 8 |
| 2.1.2.3. Kolorektální karcinom..... | 10 |
| 2.1.2.4. Karcinom pankreatu..... | 12 |
| 2.1.2.5. Faktory podílející se na vzniku nádorů GIT..... | 13 |
| 2.1.2.6. Etiopatogeneze karcinomu žaludku..... | 16 |
| 2.1.2.7. Etiopatogeneze karcinomu pankreatu..... | 17 |
| 2.1.2.8. Etiopatogeneze kolorektálního karcinomu..... | 19 |
| 2.1.2.9. Etiopatogeneze primárního hepatocelulárního karcinomu..... | 20 |
| 2.2. Mechanismus vzniku nádorů u metabolického syndromu..... | 21 |
| 2.2.1. Nádorové biomarkery <i>in vitro</i> | 28 |
| 2.2.1.1. Rozdělení a obecná charakteristika biomarkerů..... | 28 |
| 2.2.1.2. Biomarkery..... | 32 |
| 2.2.1.3. Metody stanovení biomarkerů..... | 46 |
| 2.2.1.4. Multiplexová analýza..... | 47 |
| 3. Část praktická..... | 49 |
| 3.1. Metodika..... | 49 |
| 3.1.1. Návrh studie..... | 49 |
| 3.1.1.1. Pilotní studie s karcinomem žaludku..... | 49 |
| 3.1.1.2. Pilotní studie s karcinomem pankreatu..... | 49 |
| 3.1.1.3. Studie s kolorektálním karcinomem..... | 49 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1.4. | Pilotní studie s nádory jater | 49 |
| 3.1.2. | Laboratorní analýzy | 50 |
| 3.1.2.1. | Preanalytika..... | 50 |
| 3.1.2.2. | Metodika stanovení | 51 |
| 3.1.2.3. | Interpretace výsledků | 53 |
| 3.1.2.4. | Statistické vyhodnocení..... | 54 |
| 3.2. | Výsledky | 56 |
| 3.2.1. | Kolorektální karcinom | 56 |
| 3.2.1.1. | Cíle studie | 56 |
| 3.2.1.2. | Cíle pilotní studie karcinomu pankreatu..... | 64 |
| 3.2.1.3. | Soubory pacientů pilotní studie karcinomu pankreatu | 64 |
| 3.2.1.4. | Metodika pilotní studie karcinomu pankreatu | 64 |
| 3.2.1.5. | Statistické analýzy pilotní studie karcinomu pankreatu..... | 65 |
| 3.2.1.6. | Výsledky pilotní studie karcinomu pankreatu..... | 66 |
| 3.2.1.7. | Diskuse k pilotní studii karcinomu pankreatu..... | 67 |
| 3.2.1.8. | Závěr pilotní studie karcinomu pankreatu..... | 70 |
| 3.2.2. | Hepatocelulární karcinom | 70 |
| 3.2.2.1. | Cíle pilotní studie hepatocelulárního karcinomu | 70 |
| 3.2.2.2. | Soubory pacientů pilotní studie hepatocelulárního karcinomu..... | 70 |
| 3.2.2.3. | Metodika pilotní studie hepatocelulárního karcinomu | 71 |
| 3.2.2.4. | Statistické analýzy pilotní studie hepatocelulárního karcinomu | 72 |
| 3.2.2.5. | Výsledky pilotní studie hepatocelulárního karcinomu | 72 |
| 3.2.2.6. | Diskuse k pilotní studii hepatocelulárního karcinomu | 73 |
| 3.2.2.7. | Závěr pilotní studie hepatocelulárního karcinomu | 75 |
| 3.2.3. | Perspektivy – závěry pro praxi | 76 |
| 4. | Literatura | 77 |

1. ÚVOD

Habilitační práce na téma: „**Význam biomarkerů u nádorů GIT**“ byla řešena v rámci projektů **IGA MZ ČR 6635-3** a v rámci Výzkumného záměru **MŠMT 00669806**, a výzkumných projektů **OPVK CZ.1.07/2.2.00/20.0040** a **OPVK CZ.1.07/2.3.00/09.0142**.

Základním vědeckovýzkumným pracovištěm je Oddělení imunochemické diagnostiky (přednosta: prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.). Klinickým pracovištěm je III. Interní klinika Všeobecné fakultní nemocnice v Praze 2 (přednosta: prof. MUDr. Michal Kršek, CSc., MBA), kde se autorka přes dvacet let zabývá prevencí, diagnostikou a léčbou metabolického syndromu a s ním spojených komorbidit a komplikací. Práce byla vypracována dále ve spolupráci s Onkologickou klinikou Všeobecné fakultní nemocnice v Praze 2 (Přednosta: prof. Luboš Petruželka, CSc.) a s Onkologickou a radioterapeutickou klinikou Fakultní nemocnice Plzeň (Přednosta: prof. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D., MHA).

Práce je rozčleněna do následujících základních kapitol:

V úvodní **teoretické** kapitole je uveden základní přehled epidemiologie a etiopatogeneze jednak metabolického syndromu a základních nádorů gastrointestinálního traktu. Dále je prezentován přehled a využití základních biomarkerů u nádorů GIT a základní princip i přehled laboratorních analýz, které jsou v současné době k dispozici ke stanovení jednotlivých biomarkerů.

Ve vlastní **praktické** části jsou kapitole prezentovány pilotní studie kolorektálního karcinomu, karcinomu pankreatu a hepatocelulárního karcinomu. Jsou zde prezentovány cíle, skupiny pacientů, metodika, výsledky a diskuse. V závěrech jednotlivých pilotních studií je diskutován význam stanovení jednotlivých biomarkerů různých nádorů GIT pro rutinní lékařskou praxi.

V poslední části práce je uveden přehled použité literatury.

2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

2.1. Epidemiologie

2.1.1. Epidemiologie metabolického syndromu

Metabolický syndrom, a ještě výstižněji kardiometabolický syndrom (KMS), je soubor rizikových faktorů, které se často vyskytují společně a vznikají velmi pravděpodobně na podkladě inzulinové rezistence. Souvisí s řadou pozdních komplikací, v poslední době se ukazuje i významná souvislost s vyšším rizikem vzniku nádorových onemocnění.

Podle globálního průzkumu obezity ve 195 zemích provedeného v roce 2015 bylo obézních 604 milionů dospělých a 108 milionů dětí. Od roku 1980 se prevalence obezity zdvojnásobila v 73 zemích a zvýšila se ve většině ostatních zemí. Ještě více alarmující je, že míra nárůstu byla ještě vyšší u dětské obezity. (Obesity collaborators, 2017)

Podle tohoto průzkumu již dávno obezita není chorobou blahobytu. k nejvyššímu nárůstu prevalence obezity u mladých mužů (25–29 let) došlo v zemích s nízkým socioekonomickým indexem. [Saklayen MG, 2018]

Podobné globální údaje o metabolickém syndromu nemáme. Hlavním důvodem je několik zásadních změn definic na základě doporučení odborných společností. Ale protože se odhaduje, že metabolický syndrom se vyskytuje až třikrát častěji než diabetes, lze globální prevalenci odhadnout na přibližně čtvrtinu světové populace. To znamená, že více než miliarda lidí na světě je již nyní postižena metabolickým syndromem.

Odhady prevalence se liší právě v závislosti na kritériích použitých pro definici MS. Například národní průzkum v Íránu v roce 2007 ukázal, že prevalence MS byla asi 34,7 % na základě kritérií ATP III, 37,4 % na základě definice IDF a 41,6 % na základě kritérií ATP III / AHA / NHLBI. V jiné blízkovýchodní zemi, Tunisku, byla prevalence 45,5 % na základě kritérií IDF, ale 24,3 % na základě kritérií ATP III. Ale ve všech zemích Blízkého východu byla prevalence mnohem vyšší u žen než u mužů. (Ogurtsova K, 2017)

Souhrnný trend jednotlivých onkologických diagnóz za období 2009–2018 byl stanoven pomocí průměrné roční procentuální změny (AAPC) určené na základě

metody joinpoint regrese. Pro celkovou incidenci ZN bez nemelanomových kožních byl zaznamenán průměrný roční procentuální nárůst +0,7 % ročně (IS: +0,4 %; +1,1 %). U mužů došlo k nárůstu incidence zhoubných novotvarů bez nemelanomových kožních o +0,6 % ročně (IS: +0,1 %; +1,0 %), u žen o +0,3 % ročně (IS: -0,1 %; +0,8 %), avšak pozorovaný nárůst není u žen statisticky významný. Nejvýraznější nárůst celkové incidence v recentním období 2009–2018 byl pozorován pro zhoubný melanom kůže, u kterého byla zaznamenána průměrná roční procentuální změna +3,5 % (IS: +3,2 %; +3,8 %), a ZN jícnu, pro který došlo k průměrnému nárůstu incidence o +2,5 % ročně (IS: +2,1 %; +2,9 %). Naopak největší pokles v období posledních 10 let byl zaznamenán pro ZN hrdla děložního, u kterého byl patrný průměrný pokles incidence o -3,4 % ročně (IS: -4,4 %; -2,4 %), a ZN žlučníku a žlučových cest, kde bylo pozorováno průměrné snížení o -2,1 % s každým rokem (IS: -2,6 %; -1,7 %). U mužů byl zaznamenán nejvyšší nárůst incidence pro zhoubný melanom kůže (AAPC: +3,3 %; IS: +2,7 %; +3,8 %) a non-Hodgkinův lymfom (AAPC: +2,4 %; IS: +2,2 %; +2,6 %). Nejvýraznější pokles byl pro muže patrný u ZN žaludku (AAPC: -1,8 %; IS: -2,0 %; -1,6 %) a ZN tlustého střeva a konečníku (AAPC: -1,3 %; IS: -2,1 %; -0,6 %). U žen došlo k nejvýraznějšímu nárůstu incidence v období 2009–2018 pro ZN hlavy a krku (AAPC: +3,9 %; IS: +3,5 %; +4,3 %) a ZN jícnu (AAPC: +3,5 %; IS: +2,8 %; +4,2 %). Naopak největší pokles byl zaznamenán pro ZN hrdla děložního (AAPC: -3,4 %; IS: -4,4 %; -2,4 %) a ZN žlučníku a žlučových cest (AAPC: -3,0 %; IS: -3,8 %; -2,3 %). (zdroj NOR, www.uzis.cz)

2.1.2. Epidemiologie nádorů gastrointestinálního traktu

Zhoubné nádory gastrointestinálního traktu zahrnují epidemiologicky heterogenní skupinu, která zahrnuje jak často se vyskytující zhoubné nádory (kolorektální karcinom, nádory pankreatu), tak i nádory, které se v našich oblastech vyskytují relativně zřídka (GIST, nádory jater, tenkého střeva, neuroendokrinní nádory GIT). Obecně však zhoubné nádory GIT velmi významně přispívají k celkové onkologické morbiditě české populace, což potvrzují i mezinárodní srovnání. Česká republika vykazuje třetí nejvyšší incidenci a osmou nejvyšší mortalitu na nádory GIT v Evropě. Podle posledních dostupných dat Národního onkologického registru ČR bylo v roce 2016 nově diagnostikováno 13 679 nádorů GIT a 7 955 pacientů na tato onemocnění zemřelo.

Tabulka č. 1: Vývoj incidence a mortality (Zdroj: ÚZIS, www.svod.cz).

| | | Incidence 1996 | Mortalita 1996 | Inc. Amb. 2006 | Mortalita 2006 | Incidence 2016 | Mortalita 2016 |
|---------------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Jícen | C15 | 415 | 375 | 507 | 623 | 408 | 514 |
| Žaludek | C16 | 2190 | 1871 | 1711 | 1405 | 1322 | 163 |
| Tenké střevo | C17 | 80 | 51 | 156 | 195 | 77 | 71 |
| Tlusté střevo | C18-21 | 7019 | 4385 | 7898 | 4473 | 7796 | 3746 |
| Játra | C22 | 820 | 734 | 850 | 719 | 918 | 730 |
| žluč | C23-24 | 1084 | 932 | 991 | 840 | 850 | 697 |
| Slinivka | C25 | 1570 | 1433 | 1927 | 1693 | 2243 | 1982 |
| Ost. GIT | C26 | 172 | 168 | 111 | 94 | 65 | 52 |
| | | | | | | | |
| | | 13350 | 9949 | 14151 | 10042 | 13679 | 7955 |

Incidence všech nádorů GIT od r. 1999 stoupla, ale trend poslední dekády je mírně sestupný. Totéž se týká i mortality ve stejném období. Tyto trendy především ukazují na prodlužující se přežití českých pacientů; zejména u nádorů jícnu a kolorekta je v období 2005 - 2009 doložitelné zlepšení pětiletého relativního přežití (o 7-10 %) než v období před rokem 1999; k mírnému zlepšení dochází rovněž u ZN žaludku (+5,5 %). Naopak relativní pětileté přežití se za posledních deset let významně neposunulo u nádorů jater, žlučníku a žlučových cest a u nádorů slinivky břišní. Nárůst incidence při stabilizované nebo klesající mortalitě zvyšuje prevalenci nádorů GIT, která v roce 2009 dosáhla hodnoty 58 343 osob. (Dušek 2012)

Tabulka č. 2: Porovnání epidemiologických dat nádorů GIT v ČR se zahraničím z roku 2016 (Zdroj: ÚZIS, www.svod.cz)

| Lokalizace | MKN | Pořadí ve světě | Incidence v ČR (2016) | | | Mortalita v ČR (2016) | | |
|--------------------------|--------|-----------------|-----------------------|-----------|------------------|-----------------------|-----------|------------------|
| | | | ASR-W* | Absolutní | Na 100 000 obyv. | ASR-W* | Absolutní | Na 100 000 obyv. |
| Jícen | C15 | 87. | 3,03 | 623 | 6,13 | 2,39 | 514 | 5,01 |
| Žaludek | C16 | 48. | 5,98 | 1405 | 13,3 | 4,27 | 1063 | 10,06 |
| Tlusté střevo a konečník | C18-20 | 7. | 34,08 | 7796 | 73,79 | 14,19 | 3746 | 3546 |
| Játra | C22 | 106. | 3,87 | 918 | 8,69 | 2,98 | 730 | 6,91 |
| Žlučník | C23 | 3. | 1,68 | 441 | 4,17 | 1,4 | 374 | 3,54 |
| Slinivka | C25 | 2. | 9,55 | 2125 | 21,23 | 8,03 | 1855 | 18,76 |

Pozn.: ASR (Age Standardized Rate) věkově standardizovaná incidence/mortalita – **přímá standardizace, kdy se standardizace přepočítává na rozložení věku a uvádí se na 100 000 obyvatel.*

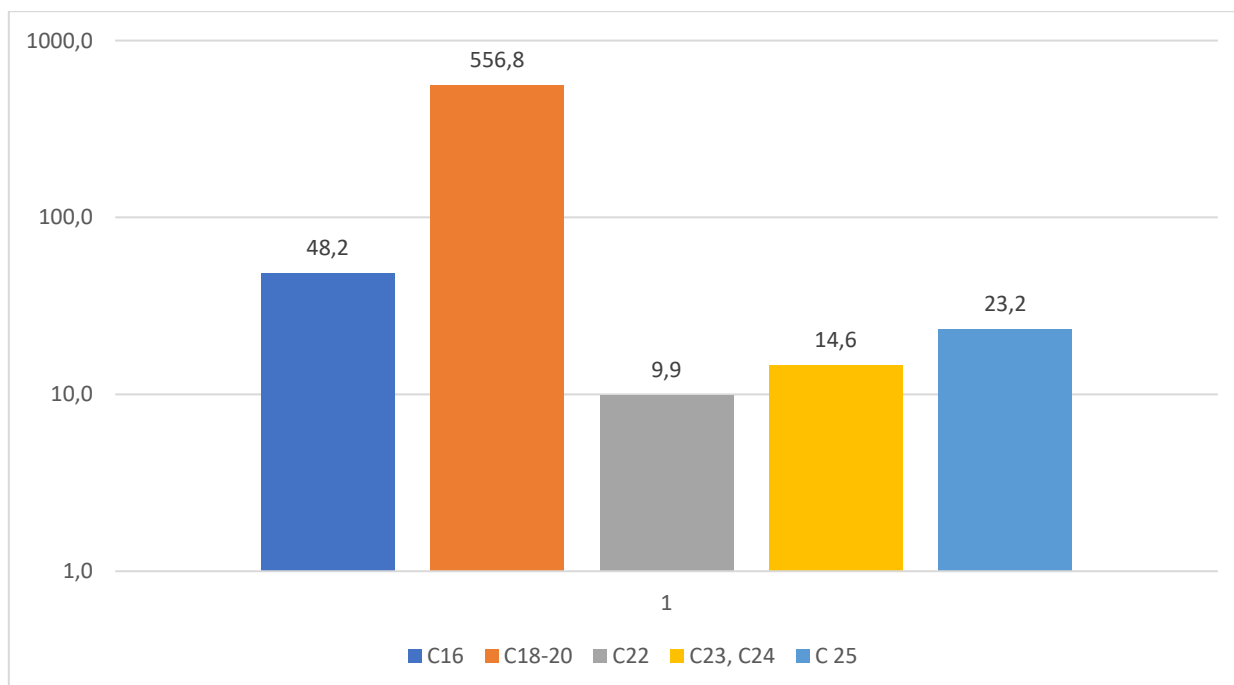
Nejenže v případě kolorektálního karcinomu máme největší incidenci na celém světě (či jednu z 3 nejvyšších dle použitého standardu, jak bylo výše rozebráno), v nádorech žlučníku a žlučových cest, v nádorech pankreatu jsme první v Evropě. U většiny nádorů trávicího ústrojí se setkáváme s nárůstem nových případů. Naproti tomu i u nás došlo pouze k poklesu výskytu karcinomu žaludku v souladu s celosvětovým vývojem (pravděpodobně v souvislosti se zavedením ledniček a snížením rizika požívání zkažených potravin a s postupnou eradikací infekcí *Helicobacter pylori*).

Incidence zhoubných onemocnění v České republice v dlouhodobém trendu stále roste. V roce 2018 bylo v ČR nově diagnostikováno 87 361 onemocnění, tedy 822,1 na 100 000 osob. Incidence těchto onemocnění je dlouhodobě lehce vyšší v populaci mužů než v populaci žen, poměr zastoupení mužů a žen v roce 2018 byl 1,2 : 1. Při mezinárodním srovnání stojí ČR v incidenci zhoubných novotvarů v Evropě na 16.–17. místě. (Ferlay J, 2018)

Přehled současného stavu problematiky

Mezi nejčastější malignity patřily ZN prostaty, ZN tlustého střeva a konečníku, ZN prsu u žen a ZN průdušnice, průdušky a plíce, které dohromady tvořily téměř polovinu (49,0 %) všech zhoubných nádorů diagnostikovaných v ČR v roce 2018 bez dg. C44 – nemelanomových kožních ZN. Každým rokem je nově diagnostikováno přibližně 7 700 onemocnění ZN tlustého střeva a konečníku, 7 500 onemocnění ZN prostaty, 7 200 onemocnění ZN prsu u žen a 6 600 onemocnění ZN průdušnice, průdušky a plíce. Nejčastějším zhoubným novotvarem v roce 2018 u mužů byl ZN prostaty, který tvořil 25,0 % všech nových onemocnění ZN u mužů. Nejčastěji diagnostikovaným novotvarem u žen byl ZN prsu, který představoval 26,5 % všech nových onemocnění ZN u žen. Na druhém místě v nově diagnostikovaných onemocněních ZN byl v roce 2018 u mužů i žen ZN tlustého střeva a konečníku, který celkově tvořil 12,4 % všech nových onemocnění. Na třetí příčce byly u obou pohlaví ZN průdušnice, průdušky a plíce představující 11,0 % všech nových onemocnění v roce 2018. V roce 2018 zemřelo na zhoubné novotvary kromě nemelanomových kožních celkem 27 521 osob, což je 259,0 na 100 000 osob.

Obrázek č. 1: Prevalence novotvarů GIT k 31. 12. 2018 na 100 000 obyvatel.



(C16: Ca žaludku, C18-20: Kolorektální karcinom, C 22: Hepatocelulární karcinom a intrahepatální karcinom žlučových cest, C 23-24: Karcinom žlučníku a žlučových cest, C 25: Karcinom pankreatu)

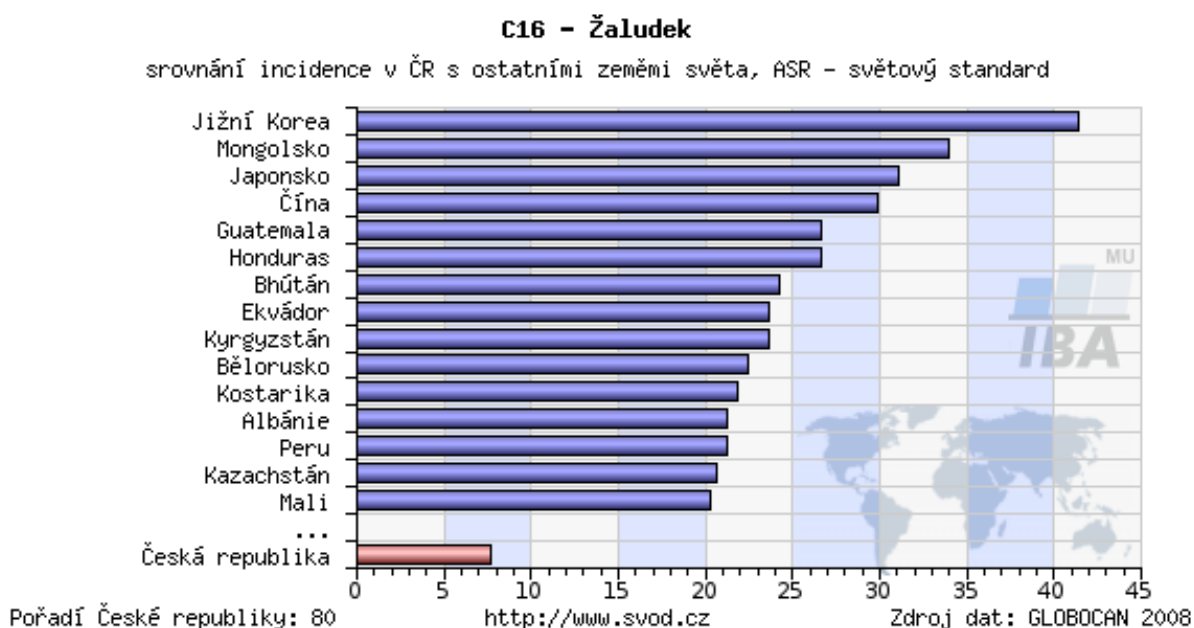
2.1.2.1. Nádory žaludku

Celosvětově je karcinom žaludku diagnostikován asi u 990 000 lidí, z nichž přibližně 738 000 zemře. Karcinom žaludku je čtvrtou nejčastější rakovinou a druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu.

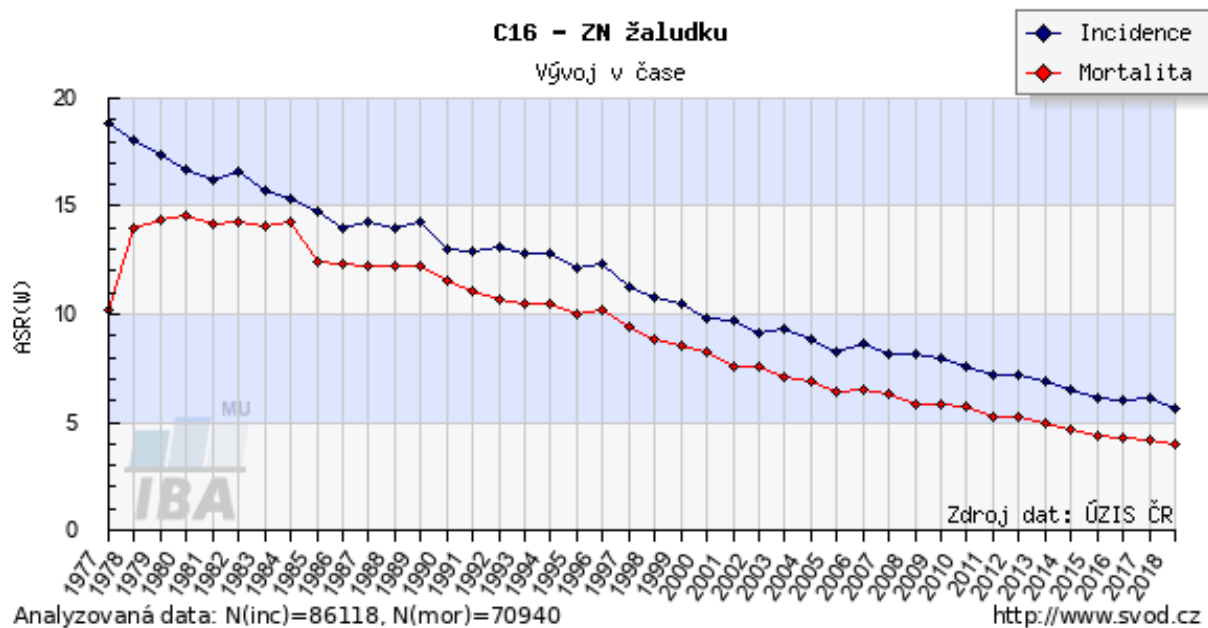
Incidence karcinomu žaludku závisí na pohlaví a demografii. Muži jsou dvakrát až třikrát náchylnější než ženy. Výskyt vykazuje obrovskou geografickou rozmanitost. Byl zjištěn významný nárůst incidence především v rozvojových zemích. Mezi oblasti s nejvyšší pravděpodobností vzniku karcinomu žaludku patří Střední a Jižní Amerika, východní Evropa a východní Asie (Čína a Japonsko). Mezi oblasti s nízkým rizikem patří Austrálie a Nový Zéland, jižní Asie, severní a východní Afrika a Severní Amerika. I přestože incidence karcinomů žaludku má celosvětově, a především ve vyspělé západoevropské civilizaci významně klesající tendenci, patří tyto nádory stále mezi velmi vážná onemocnění s nepříznivou prognózou a vysokou mortalitou.

Hlavními faktory, které se podílí na tomto poklesu, je upřednostňování skladování potravin zamražením nad dříve častějším uzením či prosolováním. Rovněž úspěšná eradikace *Helicobacter pylori* v populaci se významně podílí na tomto klesajícím trendu.^(Machlowska J, 2020) Ve srovnání incidence s ostatními zeměmi zaujímá ČR 80. místo.

Obrázek č. 2: Srovnání incidence karcinomu žaludku (C16) v ČR s ostatními zeměmi.



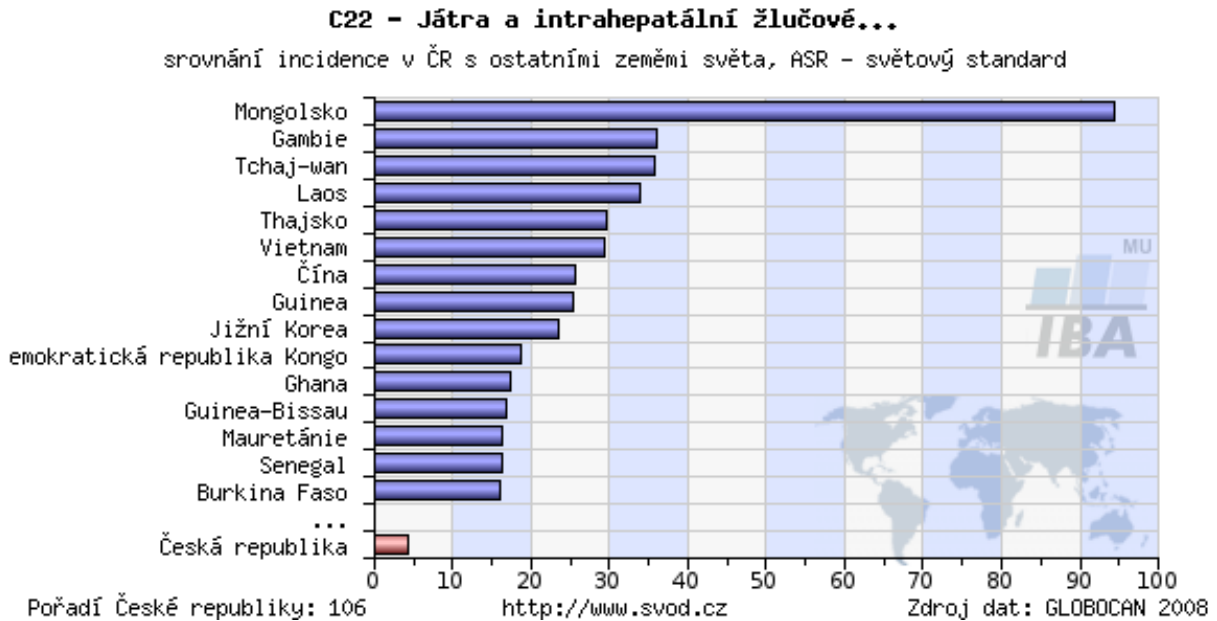
Obrázek č. 3: Vývoj incidence a mortality karcinomu žaludku (C16) v ČR.



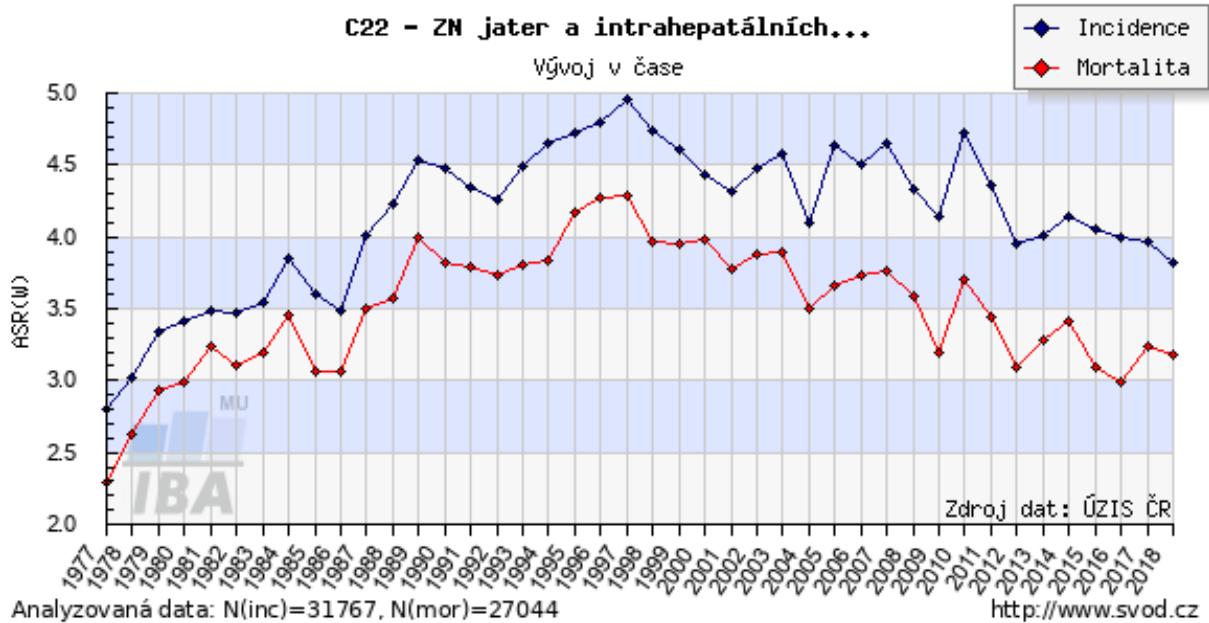
2.1.2.2. Nádory jater

Primární maligní nádory jater znamenají významný celosvětový zdravotní problém. V současné době představuje karcinom jater pátou nejčastější malignitu na světě. Zároveň patří k nejnebezpečnějším nádorům zejména proto, že diagnóza bývá obvykle stanovena pozdě. Odhaduje se, že do roku 2025 bude každoročně postiženo více než milion osob. Nejčastějším typem je hepatocelulární karcinom (HCC), jehož incidence celosvětově roste, většinou v důsledku chronické virové HBV infekce zvláště mezi obyvateli rozvojových zemí.^(Philips CA, 2021) V našich podmínkách se jedná o nádorové onemocnění relativně vzácnější. V ČR se objeví za rok přibližně u 600 obyvatel, ale incidence výrazně narůstá. Vyskytuje se nejčastěji u pacientů s jaterní cirhózou, ale stoupá i výskyt u nealkoholové steatohepatitidy (NASH), která je často diagnostikována právě u pacientů s MS. Ve srovnání incidence s ostatními zeměmi zaujímá ČR 106. místo,

Obrázek č. 4: Srovnání incidence hepatocelulárního karcinomu a intrahepatální karcinomu žlučových cest (C22) v ČR s ostatními zeměmi.



Obrázek č. 5: Vývoj incidence a mortality hepatocelulárního karcinomu a intrahepatální karcinomu žlučových cest (C22) v ČR.



2.1.2.3. Kolorektální karcinom

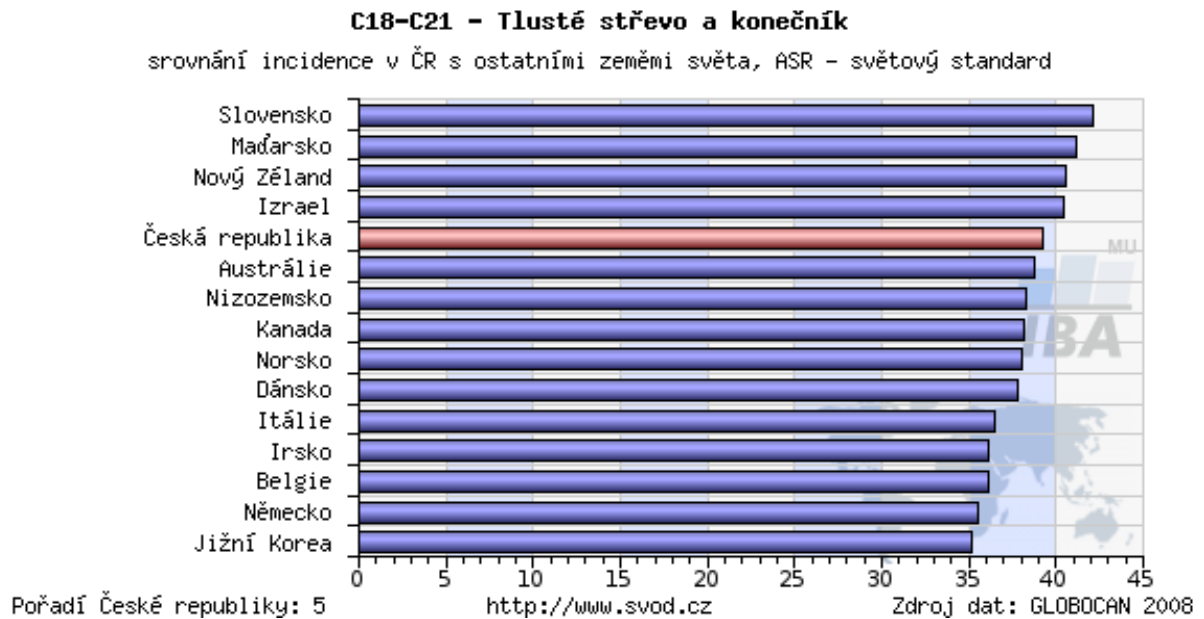
Nádory tlustého střeva a konečníku patří celosvětově frekvencí svého výskytu a celkovou úmrtností mezi tři nejčastěji se vyskytující nádorová onemocnění (Boyle P, 2002, La Vecchia C, 1992). V České republice (ČR) tvoří kolorektální karcinom (KRK) 12,1 % všech nádorů u mužů a 13,7 % všech nádorů u žen, což představuje po karcinomu plic u mužů a karcinomu prsu u žen hlavní nádorovou lokalizaci. Jedná se o dlouhodobý průměr od roku 1977. Ve srovnání incidence s ostatními zeměmi zaujímá ČR 5. místo.

V ČR 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 ČR incidence v této věkové kategorii nejvyšší v Evropě u mužů i žen. V letech 1959-1991 došlo v ČR k nárůstu hrubé incidence o 341 % (muži 343 %, ženy 339 %) u nádorů tlustého střeva a o 164 % (muži 171 %, ženy 158 %) u nádorů rekta. (Pecan L, 2000)

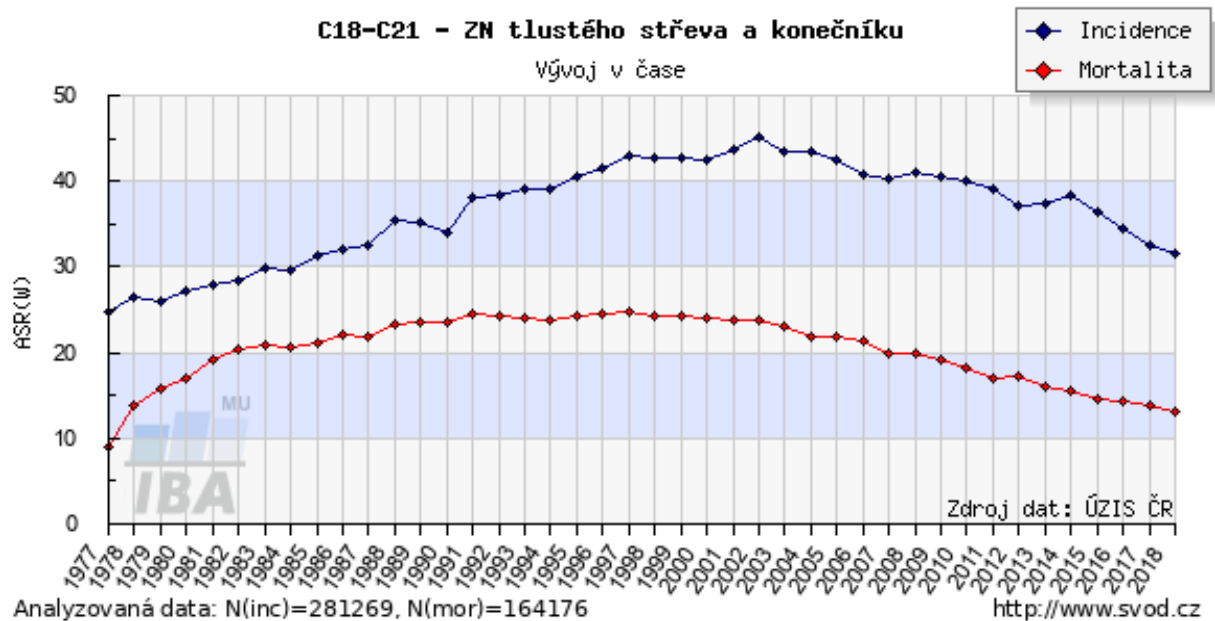
Incidence výrazně narůstá s věkem (ve věku 50 let: 0,39 nemocných na 1000 obyv./rok, ve věku 80 let: 4,5 nemocných na 1000 obyv./rok). Nejvyšší výskyt je v pozdním věku nad 70 let, kde KRK tvoří 21,2 % všech nádorů u žen (je na prvním místě před nádory prsu) a 20,2 % všech nádorů u mužů (kde je na druhém místě po plicních nádorech), (La Vecchia C, 1992; Kaušitz J, 2003; Pecan L, 2000)

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, tzv. 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. Varovný je fakt, že ČR má u kolorektálních nádorů celosvětově nejvyšší mortalitu (52,7/100 000 obyvatel).

Obrázek č. 6: Srovnání incidence kolorektálního karcinomu (C18 – C21) v ČR s ostatními zeměmi.



Obrázek č. 7: Vývoj incidence a mortality kolorektálního karcinomu (C18 – C21) v ČR.

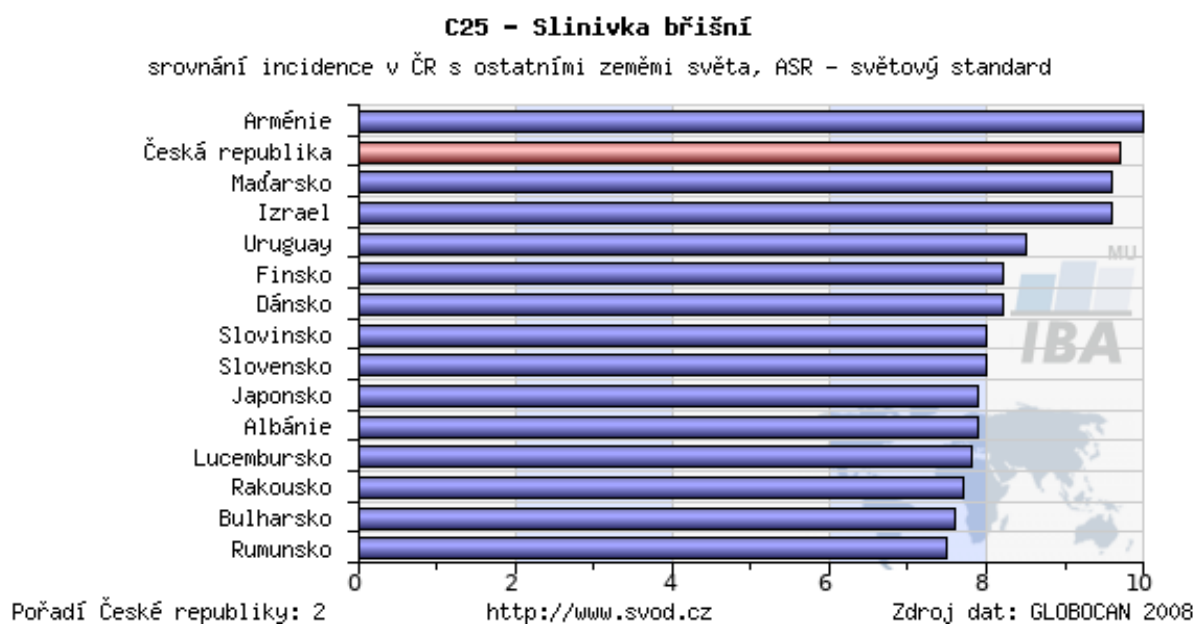


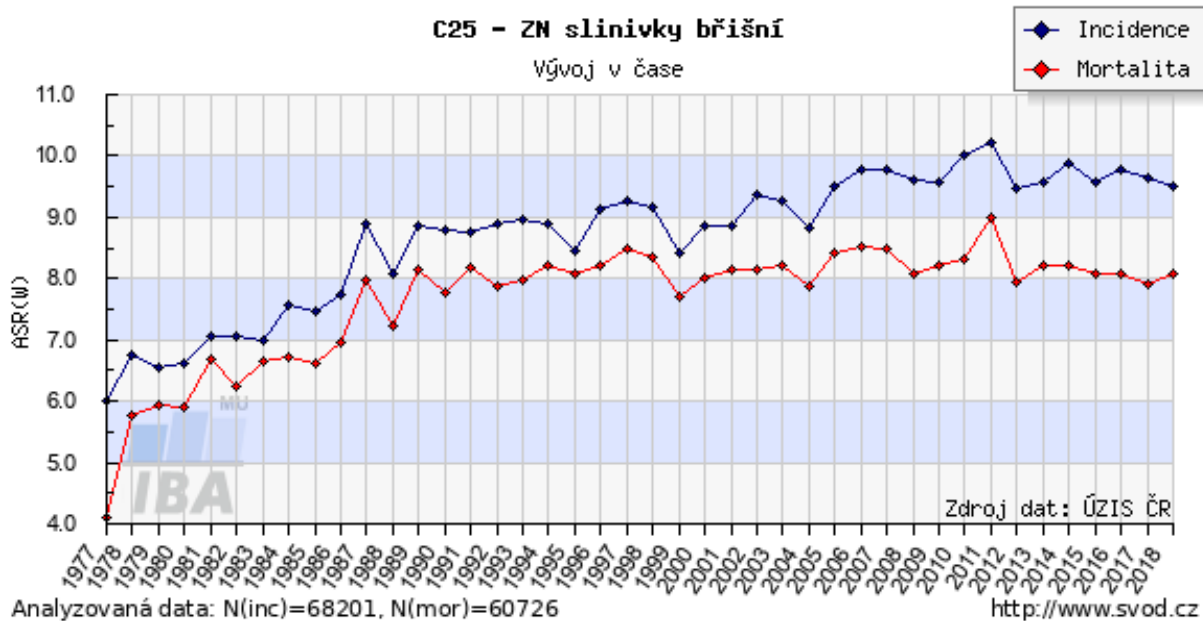
2.1.2.4. Karcinom pankreatu

Karcinom pankreatu je 14. nejčastější malignitou a 7. nejčastější příčinou úmrtnosti na světě. Nejvyšší věkově standardizovaná incidence je zaznamenána v Evropě a Severní Americe a nejnižší v Africe a jižní Střední Asii (Ilic M, 2016). Ve vyspělejších zemích je výskyt karcinomu pankreatu vyšší jak u mužů, tak i u žen. Navíc je v posledních letech ve vyspělých zemích obecný trend vzestupu incidence tohoto závažného maligního onemocnění ve srovnání s rozvojovými zeměmi. (Wong MCS, 2017).

Incidence se za poslední tři desetiletí dokonce zdvojnásobila. Česká republika zaujímá celosvětově velmi smutné druhé místo a první místo v Evropské unii v incidenci karcinomu pankreatu.

Obrázek č. 8: Srovnání incidence karcinomu pankreatu (C25) v ČR s ostatními zeměmi.



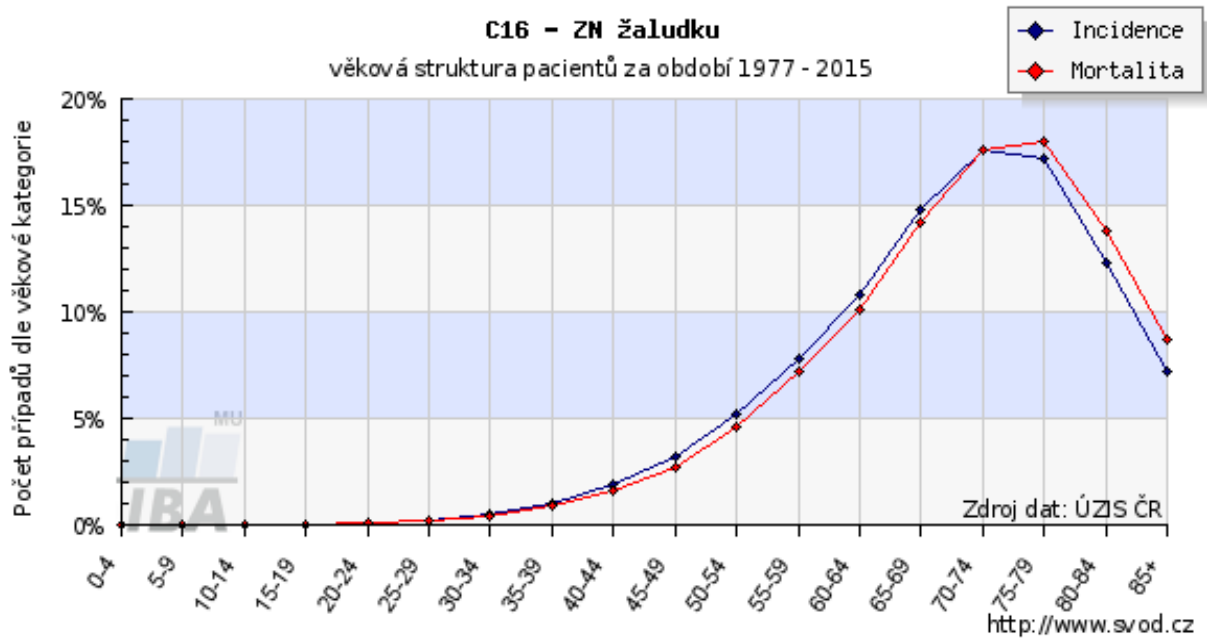
Obrázek č. 9: Vývoj incidence a mortality karcinomu pankreatu (C25) v ČR.

2.1.2.5. Faktory podílející se na vzniku nádorů GIT

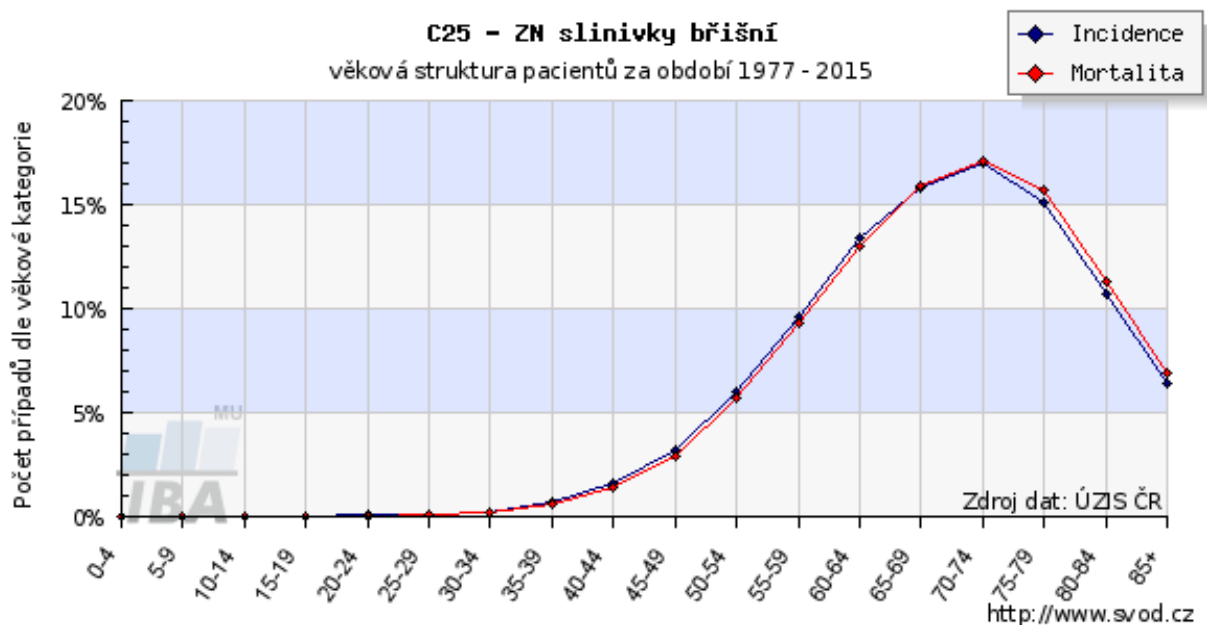
Dle mnoha autorů má na incidenci kolorektálního karcinomu nepříznivý vliv příjem tuků (hlavně živočišných). Též je hypotéza o nepříznivém vlivu příjmu piva – a to hlavně pro výskyt plísní ve sladu nebo chmelu, protože běžnými potravinářskými kontrolami není úplný záchyt. Obecně nádory trávicího ústrojí jsou velice častými nádory s vysokou nemocností i úmrtností. Incidence těchto nádorů v České republice je značně vysoká, a to se netýká jen kolorektálního karcinomu. Nejenže v případě kolorektálního karcinomu máme největší incidenci na celém světě (či jednu z 3 nejvyšších dle použitého standardu) v nádorech žlučníku a žlučových cest, v nádorech pankreatu jsme první v Evropě. u většiny nádorů trávicího ústrojí se setkáváme s nárůstem nových případů. Naproti tomu i u nás došlo pouze k poklesu výskytu karcinomu žaludku v souladu s celosvětovým vývojem (pravděpodobně v souvislosti se zavedením ledniček a snížením rizika požívání zkažených potravin a s postupnou eradikací infekcí *Helicobacter pylori*).

U všech diskutovaných nádorů stoupá incidence i mortalita rovněž v závislosti na vyšším věku, což dokazují obrázky č. 10 - 13.

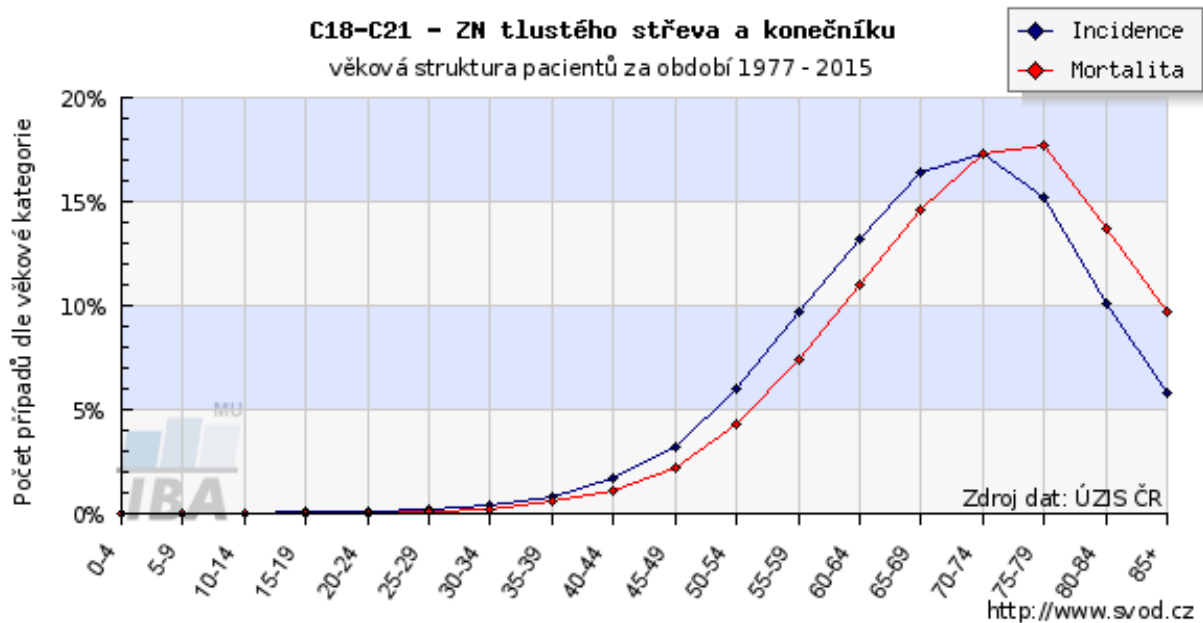
Obrázek č. 10: Věková struktura pacientů s karcinomem žaludku.



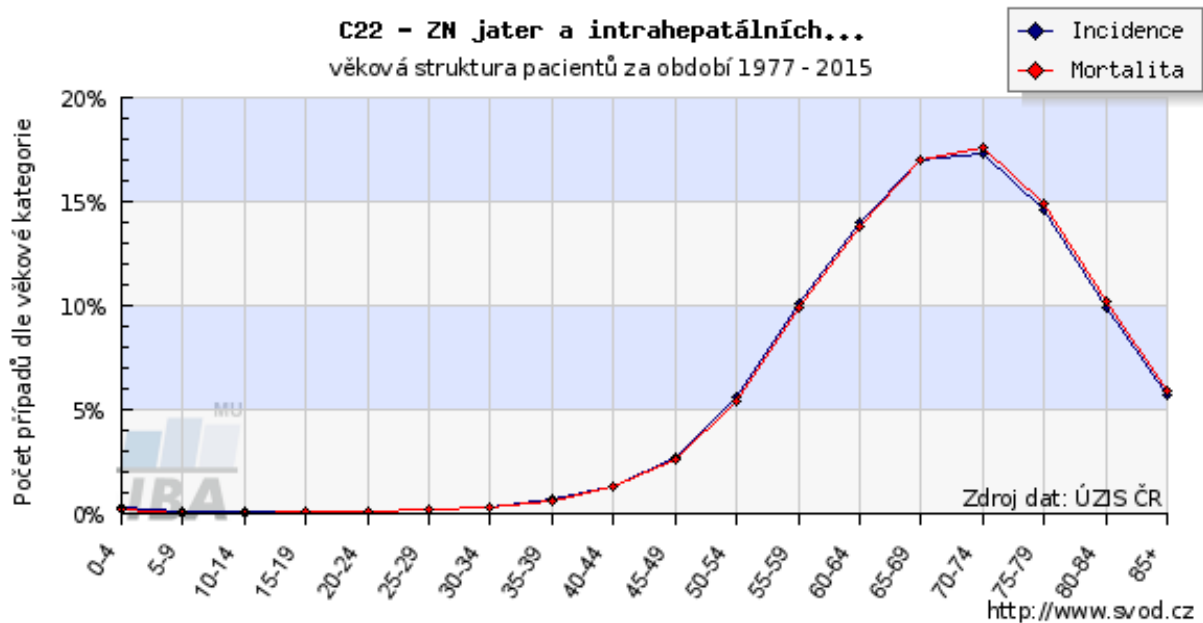
Obrázek č. 11: Věková struktura pacientů s karcinomem pankreatu.



Obrázek č. 12: Věková struktura pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem konečníku.



Obrázek č. 13: Věková struktura pacientů s hepatocelulárním karcinomem a karcinomem intrahepatálních žlučových cest.



2.1.2.6. Etiopatogeneze karcinomu žaludku

Bylo prokázáno několik faktorů, které mají významný vliv na zvýšené riziko vzniku karcinomu žaludku – pozitivní rodinná anamnéza, strava, konzumace alkoholu, kouření, infekce *Helicobacter pylori* a virus Epstein-Barr (EBV).^(Machlowska J., 2020)

Rodinná anamnéza se vyskytuje zhruba u 10 %, neboť výskyt karcinomu žaludku je spíše sporadický.^(Lauwers GY, 2014) Hereditární difúzní karcinom žaludku (HDGC) je nejznámější familiární forma karcinomu žaludku, která je způsobena změnami genu kadherinu 1 (*CDH1*).

Korelace mezi **dietními faktory** a rizikem vývoje karcinomu žaludku je stále předmětem intenzivního výzkumu. Světový fond pro výzkum rakoviny / Americký institut pro výzkum rakoviny (WCRF / AICR) shrnul, že ovoce a zelenina jsou ochránci proti rozvoji karcinomu žaludku, zatímco pečené a spálené živočišné maso, potraviny konzervované v soli a uzené potraviny pravděpodobně progresi karcinomu zvyšují.^(Kim J., 2014) Potravinové karcinogeny mohou interagovat s žaludečními epiteliálními buňkami a vyvolávat změny v genech a jejich expresi. Bylo zjištěno, že vysoký příjem chloridu sodného má devastující účinek na žaludeční sliznici, podporující buněčnou nekrózu. Dietní nebo endogenní úloha N-nitrososloučenin rovněž významně zvyšuje riziko karcinomu gastrointestinálního traktu.^(Keszei AP, 2012)

Mezi různými návyky, které hrají roli ve vývoji karcinomu žaludku, byl zvažován dopad **kouření** a příjmu **alkoholu**. Studie ukazují, že kuřáci vykazují přibližně 80% zvýšení rizika vzniku karcinomu žaludku u jedinců bez konzumace alkoholu. Navíc těžcí alkoholici vykazují vyšší riziko vzniku karcinomu žaludku. U skupiny kuřáků se riziko tohoto karcinomu odhaduje až na 80 %.^(Moy K.A., 2010)

***Helicobacter pylori* (HP)** je gramnegativní bakterie, která byla označena podle Světové zdravotnické organizace (WHO) roku 1994 za karcinogen třídy I pro vznik a vývoj karcinomu žaludku.^(Ishaq S, 2020) Účinek *H. pylori* na proces onkogeneze byl popsán dvěma hlavními mechanismy: nepřímou zánětlivou reakcí žaludeční sliznice na infekci *H. pylori* a přímým epigenetickým působením *H. pylori* na žaludeční epiteliální buňky.^(Khattoon J, 2016) Několik posledních epidemiologických studií ukázalo, že infekce *H. pylori* je jedním z rizikových faktorů vývoje karcinomu žaludku. Kromě infekce a zánětlivé reakce *H. pylori* narušuje mikroprostředí žaludeční tkáně,

podporuje epitelomezenchymální tranzici (EMT) a další progresi vzniku karcinomu žaludku. (Baj J, 2020)

Kromě infekce *H. pylori* se za další rizikový faktor spojený se vznikem karcinomu žaludku považuje i **virus Epstein-Barrové (EBV)**. Asi 10 % karcinomů žaludku bylo popsáno jako EBV-pozitivní, ale zatím neexistuje dostatek důkazů pro zřetelnou etiologickou roli EBV pro vznik karcinomu žaludku. (Fukayama M, 1994)

2.1.2.7. Etiopatogeneze karcinomu pankreatu

Věk patří k významnému neovlivnitelnému rizikovému faktoru pro vznik karcinomu pankreatu, který je typicky onemocněním starších osob. Je extrémně vzácné, aby pacienti byli diagnostikováni před dosažením věku 30 let a 90 % nově diagnostikovaných pacientů je ve věku nad 55 let, přičemž většina z nich je diagnostikována ve věku 70 – 80 let. (Midha S, 2016).

Incidence závisí též na **pohlaví**. Celosvětový výskyt rakoviny pankreatu je vyšší u mužů než u žen (věkově standardizovaná míra 5,5 u mužů ve srovnání s 4,0 u žen) (IARC, 2018)

V několika velkých epidemiologických studiích bylo prokázáno, že riziko vzniku adenokarcinomu pankreatu je spojeno s různými **krevními skupinami AB0**. Bylo zjištěno, že ve srovnání s pacienty s krevní skupinou 0 měli pacienti s krevní skupinou A (HR: 1,32, 95% CI: 1,02-1,72), AB (HR: 1,51, 95% CI: 1,02-2,23) nebo B (HR: 1,72, 95% CI: 1,25-2,38) významně vyšší riziko vzniku adenokarcinomu pankreatu. (Wolpin BM, 2010)

Bylo provedeno několik studií zkoumajících roli **střevní mikroflóry** u karcinomu pankreatu. Bylo prokázáno, že nižší hladiny *Neisseria elongate* a *Streptococcus mitis* a vyšší hladiny *Porphyromonas gingivalis* a *Granulicatella adiacens* souvisí se zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu. K ověření těchto zjištění a také ke zjištění, zda by cílená léčba byla terapeutickou možností, jsou však zapotřebí další studie. (Memba R, 2017)

Karcinom pankreatu je považován za **familiární**, pokud byli dříve diagnostikováni dva nebo více příbuzných prvního stupně a představují 5 - - 10 % nových případů. (Hruban RH, 2010) Pacienti s familiárními rizikovými faktory mají devětkrát vyšší riziko vzniku karcinomu pankreatu než pacienti bez rodinné anamnézy. Toto riziko se zvyšuje až na

Přehled současného stavu problematiky

dvaatřicetkrát vyšší, pokud byli dříve diagnostikováni tři nebo více příbuzných prvního stupně. U familiárního karcinomu pankreatu riziko exponenciálně stoupá s počtem postižených příbuzných prvního stupně a BRCA2 a PALB jsou nejčastěji zastoupenými mutacemi v této kohortě. (Illic M, 2016; Midha S, 2016)

Kouření cigaret je považováno za nejdůležitější modifikovatelný rizikový faktor u karcinomu pankreatu. Metaanalýza 82 publikovaných studií zjistila, že existuje 74% zvýšené riziko karcinomu pankreatu u kuřáků (OR: 1,74, 95% CI: 1,61-1,87) a 20% zvýšené riziko u exkuřáků (OR: 1,20, 95% CI: 1,11-1,29) ve srovnání s nekuřáky. Tato studie také zjistila, že po odvykání kouření přetrvává riziko po dobu nejméně 10 let. (Iodice S, 2008) Nová oblast pro budoucí výzkum zatím zůstává nezodpovězena ve vztahu k e-cigaretám a zdraví pankreatu. E-cigarety dodávají zahřátý nikotin, ale méně dalších škodlivých chemikálií než kouření tabáku, proto bývají obecně propagovány jako bezpečnější alternativy k tradičním cigaretám. K určení poměru rizika a prospěšnosti elektronických cigaret jsou zapotřebí další studie. (Cummings KM, 2008)

Několik studií zkoumalo vliv konzumace **alkoholu** na vznik a rozvoj karcinomu pankreatu, ale výsledky byly dosud nejednoznačné. (Midha S., 2016). Nejnovější metaanalýza zjistila, že nízká a střední konzumace alkoholu nebyla spojena se zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu, avšak u pacientů s vysokou konzumací alkoholu bylo toto riziko 15% zvýšené (RR: 1,15, 95% CI: 1,06-1,25; $p = 0,001$). Toto zvýšené riziko bylo nejsilnější u těžkých mužských pijáků a těžkých pijáků lihovin. (Wang YT, 2016)

Nadměrná konzumace alkoholu je také hlavní příčinou chronické pankreatitidy, která je známým rizikovým faktorem pro vznik karcinomu pankreatu, a proto je alkohol v tomto prostředí rizikovým faktorem tohoto druhu karcinomu. (Samokhvalov AV, 2015)

Chronická pankreatitida je progresivní zánětlivý stav pankreatu vedoucí k fibróze a ztrátě acinárních buněk Langerhansových ostrůvků. Přibližně u 5 % těchto pacientů se během života rozvine karcinom pankreatu. Na základě metaanalýzy výsledků ze sedmi studií zkoumajících chronickou pankreatitidu bylo zjištěno 13krát vyšší riziko vzniku karcinomu pankreatu (RR: 13,3; 95 % CI: 6,1-28,9) u pacientů s anamnézou chronické pankreatitidy ve srovnání s běžnou populací nebo kontrolami. (Raimondi S., 2010)

Byla rovněž prokázána souvislost mezi indexem tělesné hmotnosti (**BMI**) a výskytem rakoviny pankreatu. Zvýšené riziko karcinomu pankreatu u obézních pacientů bylo

o 10 % zvýšené na každých 5 jednotek BMI (RR: 1,10, 95% CI: 1,07-1,14) bez rozdílu ve výsledcích mezi muži a ženami.

Existují důkazy, že konzumace červeného a zpracovaného masa je spojena s rozvojem karcinomu pankreatu. To je biologicky přijatelné vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že nadměrná konzumace červeného a zpracovaného masa potenciálně způsobuje poškození DNA a tvorbu karcinogenů, jako jsou N-nitroso sloučeniny. Další dietní faktory v etiologii vzniku karcinomu pankreatu zahrnují potraviny a nápoje obsahující fruktózu nebo potraviny obsahující nasycené mastné kyseliny.^{(WCRFI, 2015).}

2.1.2.8. Etiopatogeneze kolorektálního karcinomu

Na vzniku kolorektálního karcinomu (KRK) se podílejí jednak faktory hereditární a dále faktory exogenní. Faktory hereditární jsou zodpovědné především za familiární výskyt KRK v oblasti céca a colon ascendens.^(De Vita 1997) U hereditárních forem KRK jsou vysoce riziková všichni jedinci z postižených rodin již od 20. roku věku.

Nejběžnější formou je **adenom** nebo polyp, který pochází z granulovaných buněk, jejichž funkcí je produkovat hlen, který lemuje tlusté střevo. Pouze asi 10 % všech adenomů přejde v invazivní karcinom. Toto riziko je úměrné velikosti polypu. Invazivní karcinom vznikající z těchto polypů – adenokarcinom – představuje 96 % všech KRK.^(Stewart SL, 2006)

Kromě výše uvedených exogenních příčin vzniku KRK se v poslední době často diskutuje o syndromu **inzulínové rezistence**, který se významně podílí na vzniku KRK i dalších nádorů.^(Giovannucci E, 1995) Inzulínová rezistence, která se manifestuje hyperinzulinémií a změnou hladin IGF a IGF-binding proteinů, má v experimentálních studiích stimulační efekt na maligní transformaci buněk (např. maligní transformace adenomu v KRK). Byla prokázána souvislost mezi vysokými hladinami IGF-1 a vyšším rizikem vzniku KRK.^(Jing 1999)

Vyšší výskyt nádorových onemocnění u pacientů s metabolickým syndromem je též vysvětlován teorií **aktivace jaderných receptorů PPAR-γ**, čímž dochází k proliferaci peroxizomů. V současné době je tato problematika předmětem intenzivního zájmu výzkumu. V experimentálních studiích na geneticky modifikovaných myších se podávají extrémně vysoké dávky senzitizerů těchto receptorů, čímž dochází k 5krát vyšší tvorbě adenomů (při dávkách 200krát vyšších, než je terapeutická antidiabetická

dávka). Některé práce však ukazují, že stimulatory PPAR- γ by mohly mít i protektivní charakter.

2.1.2.9. Etiopatogeneze primárního hepatocelulárního karcinomu.

Samotný hepatocelulární karcinom (HCC) představuje 90 % všech případů primárního karcinomu jater, s téměř 800 000 novými případy ročně celosvětově.^(Llovet J.M., 2016) Na rozdíl od jiných druhů rakoviny jsou hlavní rizikové faktory související s HCC dobře definovány a zahrnují virovou hepatitidu (B a/nebo C), zvýšenou konzumaci alkoholu a nealkoholické tukové onemocnění jater (NAFLD) u pacientů s metabolickým syndromem a diabetem. Jiné kofaktory vzniku HCC, jako jsou aflatoxin B1 a tabák, zvyšují rovněž výskyt tohoto onemocnění, pokud jsou přítomny i jiné další běžné rizikové faktory.^(Sia D, 2016)

Nealkoholické tukové onemocnění jater (**NAFLD**) se stalo hlavní příčinou chronického onemocnění jater ve většině regionů světa, s až 30% prevalencí v běžné populaci.^(Williams CD, 2011) Odhaduje se, že u 20 – 30 % pacientů s NAFLD se v 10 – 20 % případů vyvine progresivní onemocnění jater s nekrotizujícím zánětem a fibrózou, které může vést až k cirhóze.^(Ahmed A, 2015) Primární HCC vyskytující se bez přítomnosti cirhózy je neobvyklý a vyskytuje se hlavně v 15 % případů souvisejících s **HBV**. Mezi novými případy HCC bez pokročilé fibrózy nebo cirhózy ve Spojených státech představuje NAFLD největší etiologický podíl případů.^(Mittal S, 2016) Tato entita představuje výzvu pro paradigmatu klinické praxe založená na riziku HCC zprostředkovaném cirhózou. Nižší podíl pacientů s HCC související s NAFLD podstupuje sledování HCC před diagnózou HCC nebo léčbou specifickou pro HCC než pacienti s HCC související s HCV. Dostupné údaje o riziku vzniku HCC podporují provádění screeningu u pacientů s cirhózou na podkladě NAFLD. Tyto programy však mohou být nákladově efektivní jen pro pacienty s pokročilou fibrózou, zejména pro pacienty s více složkami metabolického syndromu a Hispánce.

Bez ohledu na NAFLD, **diabetes a obezita** rovněž zvyšují riziko HCC. Diabetes 2. typu souvisel s 2 až 3násobně vyšším rizikem vzniku HCC^(El-Serag HB, 2006) Podávání metforminu toto zvýšené riziko snižuje, zatímco aplikace inzulínu nebo podávání sulfonylurey může riziko vzniku HCC zvýšit.^(Singh S, 2013) I délka trvání diabetu může souviset se zvýšením rizika vzniku KRK.^(Hassan MM, 2010)

Populační studie nicméně ukazují, že **HCV** zůstává hlavní příčinou vzniku HCC ve Spojených státech. V národní studii mezi příjemci transplantace jater je NAFLD nejrychleji rostoucí příčinou vzniku HCC mezi lety 2002 a 2016 u amerických pacientů indikovaných k transplantaci jater; přesto HCV zůstává hlavní etiologií vzniku HCC. (Younossi Z, 2018)

2.2. Mechanismus vzniku nádorů u metabolického syndromu

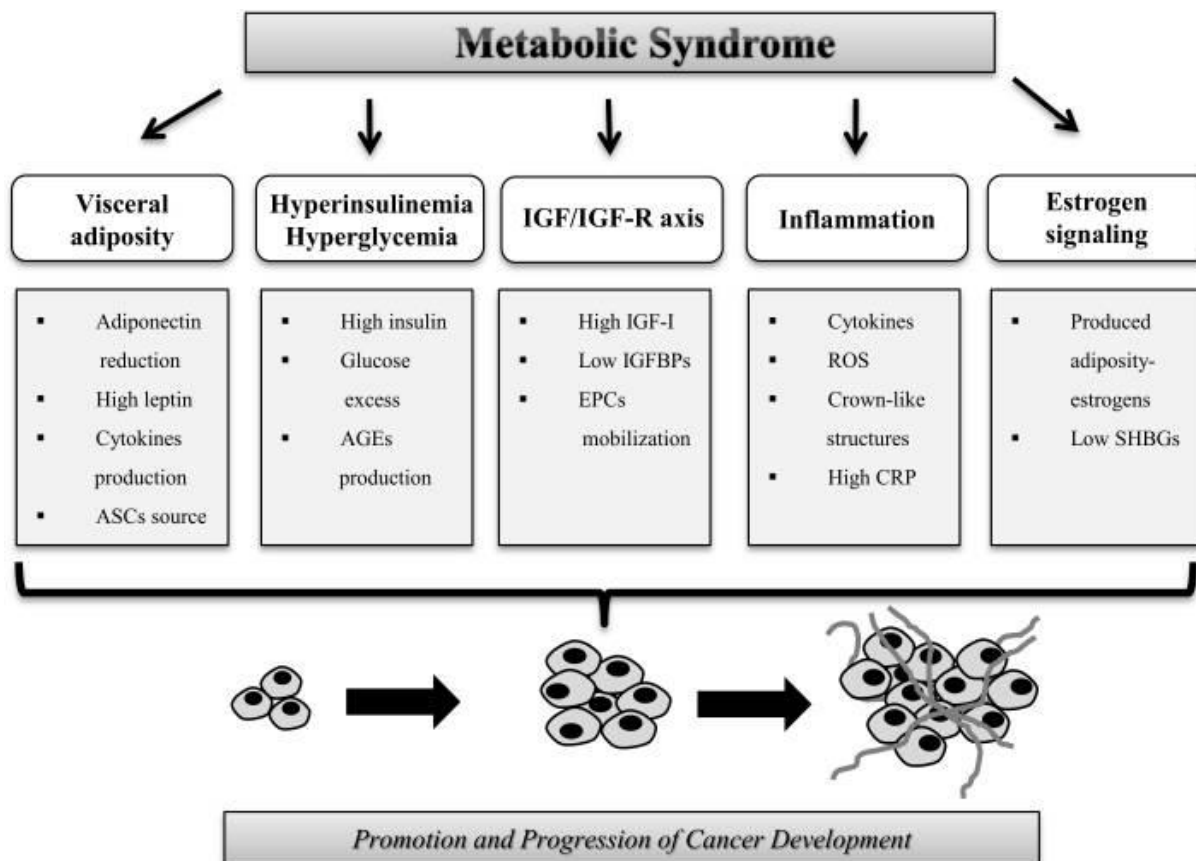
Mechanismus vzniku nádorů je předmětem současného intenzivního výzkumu. Objasnění faktorů vedoucích ke vzniku nádorů patří k prioritám řady klinických studií celosvětově, zvláště pak v České republice, kde výskyt některých druhů karcinomů patří k nejvyšším na světě (karcinom pankreatu, endometria a ovaria u žen, kolorektální karcinom a karcinom ledvin). Předpokládá se, že se na vzniku kromě genetické predispozice podílí i řada dalších faktorů. Jedním z významných faktorů je obezita a další komorbidity v rámci metabolického syndromu (např. diabetes II. typu), což jsou metabolická onemocnění, jejichž prevalence v posledních dekádách významně stoupá a zároveň se stále posouvá do mladších věkových skupin. To znamená, že se dá očekávat v budoucnu ještě mnohem vyšší incidence nádorových onemocnění. Obezita zvyšuje riziko vzniku nádorů 1,5 – 3,5krát a je riziková pro nádory kolorekta, prsu, endometria, ledvin, jícnu aj. (Pischon T, 2008; Key TJ, 2004; Hsu CC, 2007; Gonzales CA, 2006)

Diskutovaných mechanismů, které vedou ke vzniku a vývoji nádorových onemocnění je celá řada. Epidemiologické studie z posledních let prokazují dva základní mechanismy. Jeden z nich zahrnuje inzulín a insulin-like growth factor-1 (IGF-1), steroidní pohlavní hormony, adipokiny a proces chronického mírného (low-grade) zánětu. Tyto mechanismy jsou navzájem velmi úzce propojeny a stupeň obezity ovlivňuje jednotlivé typy nádorů různě. Předpokládá se, že osa inzulín/IGF-1 hraje významnou roli pro vznik kolorektálního karcinomu, karcinomu pankreatu a karcinomu prostaty. Endogenně produkované steroidní pohlavní hormony (estrogeny a androgeny), které nacházíme ve zvýšených koncentracích u obézních jedinců, mají nepochybně významný význam pro vznik a vývoj karcinomu prsu a endometria u postmenopauzálních žen. Adipokiny (adiponektin a leptin) i biomarkery chronického

low-grade zánětu mají souvislost s vyšším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu. (Nimptsch K, 2016)

Jednotlivé mechanismy jsou přehledně uvedeny na obrázku č. 14 – viz níže.

Obrázek č. 14: Mechanismy zvyšující riziko vzniku nádoru u metabolického syndromu. (Micucci C, 2016)



Bílá tuková tkáň je v současné době považována za aktivní endokrinní orgán secernující řadu hormonů s lokálním i celkovým účinkem (např. leptin a adiponektin), cytokinů (např. TNF- α a interleukin-6) reagujících s imunitním systémem a různými růstovými faktory (např. insulin-like growth factor (IGF-1), insulin-like growth factor-binding protein (IGFBPs) a transforming growth factor (TGF- β)). (Wellen KE, 2003)

Adipokiny jsou produkovány adipocyty a jejich funkcí je regulace mnoha fyziologických procesů, jako je například regulace angiogeneze, metabolismu sacharidů a mastných kyselin nebo zánětlivých a imunitních reakcí. (Trayhurn P, 2004) Adiponektin tvoří největší

Přehled současného stavu problematiky

podíl hormonů v cirkulaci (0,05 % sérových proteinů), které jsou secernovány cestou aktivace nukleárního receptoru Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) v tukových buňkách. Ovlivňuje metabolismus glukózy a mastných kyselin (snižuje koncentraci volných mastných kyselin) v jaterní a svalové buňce a zvyšuje inzulínovou senzitivitu.^(Christofides A 2021) Adiponektin vykazuje rovněž protizánětlivé antiangiogenetické účinky, čímž se považuje za hormon s protinádorovým efektem.^(Bråkenhielm E, 2004)

K nízkým sérovým hodnotám adiponektinu dochází v důsledku hypoxie tukové tkáně. Hodnoty sérového adiponektinu negativně korelují s vyšším rizikem vzniku karcinomu prsu, endometria a žaludku.^(Ishikawa M, 2005)

Leptin je znám jako hormon ovlivňující příjem potravy tím, že navozuje pocit sytosti, dále zvyšující inzulínovou senzitivitu a indukující lipolýzu v tukové tkáni. Hlavním zdrojem je bílá tuková tkáň. Proto je u obézních jedinců hladina leptinu vysoká, což vede následně k leptinové rezistenci. Tím se zvyšuje riziko rozvoje metabolického syndromu se všemi důsledky. Bylo prokázáno, že leptin se podílí na neoplastické transformaci buněk, proliferaci a nádorové angiogenezi. Vysoké hladiny leptinu korelují s vyšším rizikem vzniku karcinomu prostaty, tlustého střeva a endometria.^(Micucci C, 2016)

Adipocyty dále secernují řadu dalších proangiogenních faktorů, z nichž Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) je považován za nejdůležitější. VEGF je stimulován hypoxií a je základním induktorem v procesu metastazování nádorů. Bylo prokázáno, že vysoké sérové hladiny VEGF a solubilního receptoru VEGFR-2 pozitivně korelují s akumulací viscerálního tuku.^(Micucci C, 2016)

Bílá tuková tkáň je rovněž zdrojem mobilizujících progenitorových buněk a tukových kmenových buněk – Adipose Stem Cells (ASC), což jsou mezenchymální kmenové buňky pocházející z tukové tkáně, které se potenciálně mohou diferencovat v osteocyty, chondrocyty a adipocyty a mohou se podílet na souvislosti mezi obezitou a vznikem nádoru. Buňky ASC reagují na signál z tukové tkáně v důsledku hypoxie či zánětlivé reakce a podílí se na procesu nádorové neovaskularizace. V dalším procesu se pak integrují do nádorového stromatu a způsobují transformaci buněk ve fibroblasty asociované s nádory – cancer associated fibroblasts (CAFs).

Přehled současného stavu problematiky

Inzulín hormon s potenciálně nejsilnějším anabolickým efektem je produkován β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Významně se podílí na regulaci metabolismu sacharidů, proteinů i lipidů. Inzulín umožňuje jaterním, svalovým a tukovým buňkám vychytávat glukózu z krevního oběhu a podílí se na zvýšené syntéze glykogenu ve svalových i tukových buňkách, esterifikaci volných mastných kyselin (VMK) v adipocytech, inhibici lipolýzy a glukoneogenezi. Dále pak stimuluje růst a diferenciaci nádorových buněk. U zdravých štíhlých jedinců zajišťuje udržování glykémie v rozsahu referenčních mezí. U obézních jedinců dochází ke zvyšování sekrece tak, aby bylo ještě možno udržet glykémie v rozsahu referenčních hodnot. Postupným zvyšováním sérových hladin však dochází k následnému rozvoji inzulínové rezistence. Ta se pak podílí na zvyšování koncentrací dalších látek (např. adhezivních molekul či prozánětlivých cytosinů). Chronická hyperinzulinémie souvisí s vyšším rizikem vzniku různých nádorů – jako např. kolorektální karcinom, karcinom pankreatu, nádory prsu a endometria. Mechanismus spočívá v tom, že potlačuje produkci insulin-like growth factor-binding protein IGFBP-1 and -2, tedy proteinů, které se za normálních podmínek váží na insulin-like growth factor IGF-1 a inhibují jej. To vede ke zvyšování cirkulujících IGF-1, které se podílí na vzniku a vývoji nádorových buněk, zvláště pokud k tomu mají příznivé buněčné prostředí.

Pro metabolický syndrom je typická rovněž porucha metabolismu sacharidů, která vede k chronické hyperglykémii. Nadbytek glukózy se transformuje v acetyl-CoA – makromolekulární prekursor pro vznik mastných kyselin, prekursory neesenciálních aminokyselin a ribózy pro vznik nukleotidů. To je zdrojem značné energie a dalších substrátů, které potřebuje nádorová buňka ke svému životu a k další intenzivní proliferaci. Tyto buňky mají vyšší schopnost vychytávat a využít glukózu.

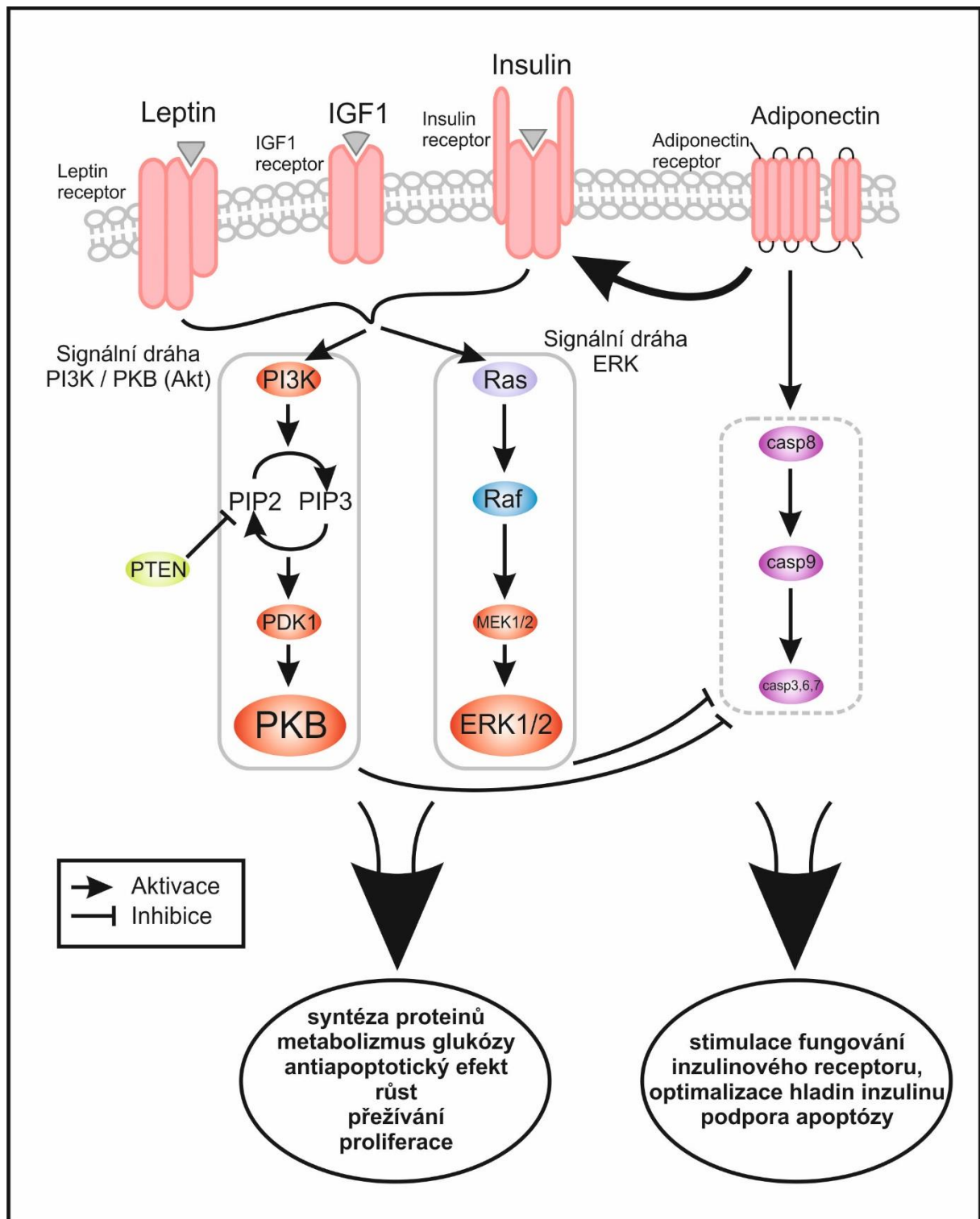
Některé studie potvrdily, že zvýšené vychytávání a akumulace glukózy koreluje s gradíngem tumoru, metastatickým potenciálem i sníženou terapeutickou odpovědí a s horší prognózou. Bylo prokázáno signifikantně vyšší riziko vzniku karcinomu pankreatu, maligního melanomu i urologických nádorů u jedinců s chronicky zvýšenými hladinami lačných glykemií. Souvislost mezi hyperglykemií a zvýšeným rizikem karcinomů platí obecně.^(Stattin P, 2007) Některé studie prokazují významnou souvislost mezi hyperglykemií a nádory plic v případě mutace K-ras onkogenu.^(Micucci C., 2014)

Tabulka č. 3: Základní charakteristika inzulínu, leptinu a adiponektinu.

| Biomarker | Molekulová hmotnost | Počet aminokyselin | Fyziologická funkce |
|-------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Inzulín | 5 800 | 51 | Ve svalech aktivace transportu glukózy do buněk, v játrech podpora tvorby glykogenu, v tukové tkáni podpora tvorby tuků |
| Leptin | 16 200 | 146 | Regulace tukových zásob v organismu, prorůstový, antiapoptotický efekt |
| Adiponektin | 180 000 | 244 | Regulace metabolismu glukózy a procesu oxidace mastných kyselin |

Účinek výše uvedených biomarkerů je zprostředkován receptory. Leptin, IGF-1 a inzulín aktivují dvě hlavní prorůstové signální dráhy. Signální dráhu PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/PKB (proteinkinase B) a signální dráhu ERK (extracellular signal regulated kinases), což je jedna z MAP kinázových drah (MAPK mitogen activated protein kinases). Adiponektin zvyšuje využití inzulínu v buňkách podporou účinnosti inzulínového receptoru.

Obrázek č. 15: Biologický účinek leptinu, IGF1, inzulínu a adiponektinu. (Kučera R.)



Dále je v současné době předmětem výzkumného zájmu souvislost mezi růstovou signální dráhou IGF-1 a zvýšenými hladinami inzulínu. Víme, že inzulín a IGF-1 dokáží navzájem využívat své receptory či dokonce existují hybridní receptory IR/IGF1R. Dá

Přehled současného stavu problematiky

se tedy předpokládat, že zvýšené hladiny inzulínu budou mít vliv na růstové dráhy v buňce podobným mechanismem jako IGF-1. Hodnoty sérových hladin IGF-1 závisí na nutričním stavu i pohlaví jedince. Vyšší hladiny IGF-1 stimulují proliferaci buněk, inhibují apoptózu, interagují s povrchovými membránovými receptory – IGF-IR, a IR.^(Price AJ, 2012) Tyto interakce reguluje IGFBP, který stabilizuje IGF v cirkulaci a reguluje uvolňování a přesun z jaterní buňky do cílových tkání. Vazbou IGF-1 na IGF-IR dochází k aktivaci dvou hlavních signálních drah, které podporují buněčnou proliferaci a tumorigenese. Nádorové buňky vykazují významnou overexpresi of IGF-1 a jeho receptoru. Vysoké hladiny IGF-1 korelují s vyšším rizikem různých typů nádorů – např. karcinomu prsu, prostaty, plic a kolorektálního karcinomu. Naproti tomu vyšší hladiny IGFBP-3, které suprimují mitogenní účinky IGF-I korelují se zvýšeným rizikem výše uvedených nádorů negativně.

Metabolický syndrom často souvisí s vyšším výskytem zánětu. Zánětlivě změněná tuková tkáň hraje významnou roli v patogenezi vzniku a rozvoje některých nádorů - např. karcinomů prsu, pankreatu či ledvin.^(Howe LR, 2013) Viscerální tuková tkáň uvolňuje prozánětlivé cytokiny, jako je např. tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), které velmi úzce souvisí se vznikem nádorů. Je prokázáno, že u obézních žen cirkulují mnohem vyšší hladiny TNF- α a IL-6 a ty se podílí na vzniku karcinomů prsu.^(Hursting SD, 2012) Tyto cytokiny indukují angiogenezi a pozitivně korelují s inzulínovou rezistencí. Parametry metabolického syndromu pozitivně korelují rovněž s hladinami C reaktivního proteinu (CRP) – proteinu akutní fáze zánětu, který je produkován a do krevního oběhu secernován. Hladiny tohoto proteinu korelují s vyšším výskytem kolorektálního karcinomu a karcinomu děložního čípku či ovárií. Proto se CRP může používat jako marker chronického zánětu u pacientů s metabolickým syndromem.

Viscerální tuk reguluje také syntézu endogenních pohlavních steroidů – jako jsou např. estrogeny, androgeny a progesteron. Tuková tkáň je zvláště místem produkce estrogenů u mužů či postmenopauzálních žen. Viscerální tuk má také vliv na redukci jaterní syntézy a snížení koncentrace cirkulujících binding proteinů pohlavních hormonů, čímž dochází ke zvýšení dostupných estradiolů. Epidemiologické studie prokázaly, že v důsledku vyššího podílu viscerální tukové tkáně dochází ke zvýšenému riziku vzniku karcinomu prsu (pouze u postmenopauzálních žen)

a karcinomu endometria (jak u pre- , tak i postmenopauzálních žen. Zvláště estrogeny hrají dominantní roli v regulaci diferenciaci buněk, proliferaci a indukci apoptózy.

2.2.1. Nádorové biomarkery *in vitro*

2.2.1.1. Rozdělení a obecná charakteristika biomarkerů

Nádorové biomarkery lze charakterizovat jako látky produkované maligními buňkami či organismem jako odpověď na nádorové bujení. Může se jednat o antigeny lokalizované na povrchu buněčných membrán, obsažené v cytoplazmě, solubilní antigeny obsažené v biologických tekutinách, enzymy metabolických drah či fragmenty cytoplazmatických struktur uvolňované do okolí při zániku buněk. Celulární nádorové markery lze detekovat imunohistochemicky či v cytosolu nádorové buňky, humorální nádorové markery cirkulující v krvi či v jiných biologických tekutinách lze prokázat pomocí imunoanalytických metod.

Přestože diagnostický práh nádorových markerů umožňuje v příznivých případech detekovat nádor o hmotnosti 1mg (10^6 nádorových buněk), zatímco klinická diagnóza je určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi 10^9 buněk, neexistuje dosud vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění univerzální nádorový marker.

Požadavky kladené na ideální nádorový marker jsou následující:

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- koreluje s velikostí nádoru
- koreluje se stádiem onemocnění
- koreluje s prognózou
- koreluje s účinností terapie

V klinické praxi neexistuje v současné době žádný nádorový marker, který by tato kritéria splňoval. Je proto nutné si vždy uvědomit optimální indikace a současně i limitace těchto vyšetření. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému zachytu recidivy či progresu onemocnění a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který může prodloužit život nemocného. Orgánová specificita při vyšetřování nádorových markerů je nízká, a proto je nezbytné nutné jejich dynamické sledování v pravidelných intervalech.

Přehled současného stavu problematiky

Indikace vyšetření nádorových markerů u karcinomu tlustého střeva mají své limity. Jedná se o doplňkovou diagnostickou metodu. Pro správnou interpretaci výsledků je proto nezbytná nejen správná volba nádorových markerů, ale především způsob jejich klinického vyhodnocení, které vyžaduje úzkou interdisciplinární spolupráci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

V tabulce č. 4 je uveden přehled nádorových biomarkerů nejčastěji vyšetřovaných v klinické praxi.

Tabulka č. 4: Rozdělení nádorových markerů podle funkce.

| Skupina markerů: | | Jednotlivé markery. |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Onkofetální a mucinózní antigeny | Mající funkci u plodu | <ul style="list-style-type: none"> • CEA • AFP • hCG • SP1 |
| | Karbohydrátové(cancer) antigeny | <ul style="list-style-type: none"> • CA 125 • CA 15-3 • CA 19-9 • CA 50 • CA 72-4 |
| Cytokeratinové nádorové markery | | <ul style="list-style-type: none"> • TPA • TPS • CYFRA 21.1 • SCC |
| Enzymy | Proliferační | <ul style="list-style-type: none"> • Neuron specifická enoláza • Thymidinkináza |
| | Ostatní | <ul style="list-style-type: none"> • Prostatický specifický antigen • Kyselá prostatická fosfatáza • Laktátdehydrogenáza |
| Hormony | Ektopická sekrece | <ul style="list-style-type: none"> • Adrenokortikotropní hormon • Antidiuretický hormon • Kortizon • Parathormon • Prolaktin |
| | Produkované nádorem | <ul style="list-style-type: none"> • Placentární laktogen • Kalcitonin • Parathormon • Prolaktin |
| Receptory | | <ul style="list-style-type: none"> • Estrogenové • Progesteronové |
| Ostatní blíže nespecifikované látky | | <ul style="list-style-type: none"> • Feritin • β_2-mikroglobulin • Imunoglobuliny |

Většina nádorových markerů patří mezi **onkofetální antigeny**. Jde o látky, které nacházíme v poměrně vysokých koncentracích u plodu, kde se vyskytují na povrchu diferencujících se buněk (diferenciační antigeny) a hrají významnou roli ve vývoji plodu. U zdravých dospělých osob je jejich hladina velice nízká a přesná biologická funkce není známa. Při většině nádorových onemocnění se jejich aktivita výrazně zvyšuje. Typické pro ně je, že se vyskytují především u dobře diferencovaných nádorů a jejich hladina většinou koreluje s velikostí nádorové masy. Jejich stanovení má význam zejména pro určení prognózy nádorového onemocnění a kontrolu terapie.

Cytokeratinové nádorové markery jsou markery vzniklé narušením nebo nekontrolovaným růstem cytoskeletu buňky. Vyskytují se jako cirkulující fragmenty nebo komplexy fragmentů cytokeratinů 8, 18, 19 normálního epitelu. Souvisejí výrazně s buněčnou proliferací a mnozí autoři je řadí mezi proliferální nádorové markery.

Enzymatické nádorové markery jsou po onkofetálních antigenech druhou nejčastěji užívanou skupinou nádorových markerů. Můžeme je rozdělit na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří enzymy mající biologickou funkci především při buněčném dělení, (např. thymidinkináza a neuron-specifická enoláza). Tyto markery jsou značně zvýšené u všech stavů charakterizovaných především výraznou buněčnou proliferací. Proto se uplatňují při určování prognózy a stadia onemocnění. Markery druhé podskupiny jsou enzymy, které se vyskytují i ve zdravých tkáních, kde plní své biologické funkce. Tyto markery jsou vysoce orgánově či tkáňově specifické, ale neposkytují jakoukoliv informaci o typu poškození daného orgánu či tkáně. Dají se použít k určení primární lokalizace nádoru.

Dalším typem nádorových markerů jsou **hormony**. Jsou produkovány buď přímo samotnými endokrinními buňkami (např. kalcitonin medulárním karcinomem štítné žlázy nebo tyreoglobulin při typu folikulárním) nebo jsou produkovány ektopicky (např. látka podobná ACTH nebo hCG při bronchogenním karcinomu). Tyto nádorové markery jsou nejčastěji využívány ke kontrole efektu ať již operační či medikamentózní léčby.

U nádorů hormonálně aktivních se stanovují i počty **receptorů**. Na rozdíl od předchozích markerů, které se převážně stanovují v séru, jde o markery tkáňové, které se stanovují v bioptickém materiálu. Mají jednak význam pro určení prognózy nádoru, ale rozhodující význam mají pro volbu a kontrolu terapie (jako např. u nádorů prsu).

Poslední skupinu nádorových markerů tvoří nejrůznější tkáněmi produkované **blíže nespecifikované látky**, které se nedají zařadit do žádné z předchozích skupin, ale při nádorovém bujení se jejich hladiny v krvi zvyšují jako nespecifická reakce organismu na přítomnost nádorového onemocnění (ferritin, β_2 -mikroglobulin, imunoglobuliny).

2.2.1.2. Biomarkery

V poslední době se zkoumá v souvislosti s nádorovým procesem mnoho nových látek a parametrů, u kterých je známo, že se vyskytují i u jiných onemocnění, např. u zánětlivých procesů či autoimunitních procesů. Z tohoto důvodu se již nyní tyto nové parametry nemohou nazývat nádorovými markery, ale obecně se nazývají parametry biologické aktivity neboli biomarkery.

2.2.1.2.1. *Nádorové markery onkofetální*

CEA (karcinoembryonální antigen)

Charakteristika: CEA je směsí 36 glykoproteinů s molekulovou hmotností mezi 150 – 300 kDa, které jsou z 55 % tvořeny sacharidy a ze 45 % bílkovinami. Vysoká heterogenita molekuly je dána heterogenitou sacharidové složky, proteinová složka je konstantní. Až dosud je známo 16 kódujících genů.

Výskyt: CEA je onkofetální bílkovinou, kterou lze prokázat na povrchu membrán epitelových buněk především trávicího ústrojí a bronchů. V prvním trimestru je obsažen v buněčné cytoplazmě. V pozdějších fázích vývoje plodu je součástí povrchu buněčných membrán. 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 nacházeny ve vývodech slinných žláz. CEA je především metabolizován v játrech a vylučován ledvinami.

Tabulka č. 5: Zvýšené hodnoty CEA.

| Maligní onemocnění | Benigní onemocnění |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Trávicího ústrojí<ul style="list-style-type: none">○ Ca žaludku○ Ca tračnicku○ Ca rekta | <ul style="list-style-type: none">• u kuřáků (do 5 ng/ml)• při chronickém ledvinovém selhání |

Přehled současného stavu problematiky

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Ca plic • Gynekologických nádorech <ul style="list-style-type: none"> ○ Ca prsu ○ Ca vaječníků ○ Ca dělohy • Ca prostaty • Ca štítné žlázy | <ul style="list-style-type: none"> • u benigních onemocnění GIT a jater • ulcerózní kolitida • Crohnova choroba • Střevní polypózachronické hepatitidy • jaterní cirhóza • chronická pankreatitida • Zánětlivá onemocnění plic • bronchopneumonie • chronická bronchitida • TBC plic • Mukoviscidóza • Autoimunitní choroby • Benigních adenomyh prsu |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tabulka č. 6: Referenční hodnoty CEA.

| | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty: | 0 – 3 | ng/ml |
| Hraniční hodnoty | 3 – 5 | ng/ml |
| Patologické hodnoty | > 5 | ng/ml |

2.2.1.2.2. *Nádorové markery mucinózní*

CA 19-9

Charakteristika: CA 19-9 je monoklonální protilátkou definovaný mucin-sialoglykolipid s molekulovou hmotností více než 1000 kDa s 10 % sacharidů. Patří mezi onkofetální nádorové markery.

Výskyt: Výskyt CA 19-9 úzce souvisí s Lewis(a) determinantou krevní skupiny. U vzácně se vyskytující Lewis(a-/b-) skupiny není tento nádorový marker produkován. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách, především trávicího ústrojí, pankreatu a jater. U dospělých je produkován jen ve velice omezené míře epiteliálními buňkami

Přehled současného stavu problematiky

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 v anaplastických chybí úplně.

Tabulka č. 7: Zvýšené hodnoty CA 19-9.

| Maligní onemocnění | Benigní onemocnění |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Karcinomy trávicího ústrojí<ul style="list-style-type: none">○ Ca pankreatu○ Ca žlučníku a žlučových cest○ primární Ca jater○ Ca žaludku○ kolorektální karcinom• Ca prsu• Ca ovarií (především mucinózního typu)• Ca dělohy• Metastázy výše uvedených karcinomů do jater | <ul style="list-style-type: none">• Onemocnění jater a žlučových cest<ul style="list-style-type: none">○ cirhóza jater○ primární biliární cirhóza○ akutní hepatitida○ toxická hepatitida○ chronická hepatitida○ cholecystitida○ cholangioitida○ choledocholitíáza• Akutní a chronická pankreatitida• Benigní onemocnění žaludku a střeva (především zánětlivá) |

Tabulka č. 8: Referenční hodnoty CA 19-9.

| | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty: | 0 - 30 | IU/ml |
| Hraniční hodnoty | 30 - 40 | IU/ml |
| Patologické hodnoty | > 40 | IU/ml |

2.2.1.2.3. Proliferativní nádorové markery

TK (thymidinkináza)

Charakteristika: Thymidinkináza katalyzuje přeměnu thymidinu na thymidinmonofosfát (TMP) za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP). TMP je převeden

Přehled současného stavu problematiky

v několika krocích na trifosfát, který je zabudován do DNA. Protože lze do DNA zabudovat thymidin jen ve fosforylované formě, hraje thymidinkináza podstatnou roli při zpracování thymidinu v buňce. *De novo* syntéza thymidinofosfátu normálně probíhá za katalýzy thymidylátsyntetázy z deoxyuridinmonofosfátu za přítomnosti kyseliny listové a vitamínu B₁₂. Thymidinkináza na rozdíl od thymidylátsyntetázy používá jako substrát buď exogenní thymidin z potravy nebo endogenní thymidin uvolněný z odbourávacích reakcí. Je označována také jako "salvage enzyme" (záchranný enzym). TK je nespecifický nádorový marker schopný zachytit maligní růst v různých orgánech.

Výskyt: V eukaryotních buňkách se nacházejí dva izoenzymy thymidinkinázy, které se odlišují biochemicky a elektroforeticky. U zdravého dospělého jedince se nacházejí v séru jen nízké koncentrace TK, vyšší hodnoty se mohou vyskytnout u neoplastických onemocnění a některých virových infekcí.

Tabulka č. 9: Zvýšené hodnoty TK.

| Maligní onemocnění | Benigní onemocnění |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• hematologická maligní onemocnění• Při progresi následujících karcinomů<ul style="list-style-type: none">○ bronchogenní karcinom○ Ca prsu○ kolorektální karcinom○ Ca prostaty○ Ca testes○ Ca močového měchýře○ karcinomatóza serózních blan | <ul style="list-style-type: none">• virové infekce• psoriáza• TBC pleuritida• sarkoidóza• revmatická onemocnění• zánětlivá onemocnění plic a trávicího ústrojí• perniciózní a megaloblastické anémie• kolagenózy |

Tabulka č. 10: Referenční hodnoty TK.

| | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty: | 0 – 5 | IU/l |
| Hraniční hodnoty | 5 – 10 | IU/l |
| Patologické hodnoty | > 10 | IU/l |

2.2.1.2.4. *Fragmenty cytokeratinu*

Jde o cirkulující komplexy fragmentů **cytokeratinů 8, 18 a 19**, které se vyskytují jak v normálním epitelu (jednoduchý, žlázo­vý, vývodový, přechodný apod.), tak v nádorových buňkách odvozu­jících se od tohoto epitelu (mléčná žláza, plíce, ovarium, střevo, trachea, močový měchýř, pankreas, většina endokrinních žláz, prostata apod.). Jsou pak prokazovány protilátkami různě označovaných testů.

Cytokeratiny tvoří tzv. *intermediární filamenta* a jsou součástí cytoskeletonu; jsou dva typy: cytokeratinů: typ I - kysel­é cytokeratininy 9 – 19 a cytokeratiny typ II - neutrální a bazické 1 – 8. V buňkách jsou organizovány jako *heterodimery*. V procesu buněčného dělení je jejich zmnožení projevem proliferace buněk. U maligních nádorů v progresi (šíření do okolí, metastázy) dochází k proteolytickému odštěpování solubilních fragmentů, které se dostávají do krevního oběhu, a jsou *tak markery nádorové proliferace*.

Tabulka č. 11: Reaktivita různých testů proti fragmentům cytokeratinu.

| Test | Fragment 8 | Fragment 18 | Dimer 8/19 | Fragment 19 |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| TPA | +++ | + | +++ | +++ |
| TPS | + | +++ | + | + |
| TPA-M | + | + | +++ | +++ |
| TPAcyk | + | +++ | + | - |
| CYFRA 21-1 | - | - | +++ | +++ |

TPA (tkáňový polypeptidický antigen)

Charakteristika: Tkáňový polypeptidický antigen příbuzný s fragmenty *cytokeratinu* 8, 18 a 19. Je tvořen normálními i nádorovými buňkami. K markantnímu zvýšení dochází při výrazném zvýšení proliferační aktivity. V těhotenství stoupá během gestace (k návratu k výchozím hodnotám dochází 5 dní po porodu); zvýšen je též u zánětů.

Výskyt: Fyziologicky je TPA (společně s TPS) produkován trofoblastem placenty, a dále v játrech, plicích, střevě a ledvinách vyvíjejícího se plodu. U zdravých dospělých je možné oba markery zjistit v epiteliální výstelce vývodů mléčné žlázy, močového měchýře, v plicích a v orgánech trávicího traktu.

Tabulka č. 12: Zvýšené hodnoty TPA.

| Maligní onemocnění | Benigní onemocnění |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Ca prsu • nádory orofaciální oblasti • Ca prostaty • Ca štítné žlázy • Ca plic nemalobuněčný • Ca ledvin • Ca močového měchýře • Ca ovaríí • nádory varlat | <ul style="list-style-type: none"> • hepatitida • jaterní cirhóza • diabetes mellitus • infekce respiračního traktu • benigní onemocnění prsu • benigní onemocnění trávicího ústrojí • pooperační stavy • revmatická onemocnění |

Tabulka č. 13: Referenční hodnoty TPA.

| | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty: | 0–120 | IU/ml |
| Hraniční hodnoty | 120–140 | IU/ml |
| Patologické hodnoty | > 140 | IU/ml |

Pozn.: V dlouhodobých studiích je nutné dodržovat používání jednoho typu stanovení (TPA nebo TPS) vzhledem k odlišné specifitě protilátek.

TPS (tkáňový polypeptidický specifický antigen)

Tkáňový polypeptidový antigen – specifický; tvoří se v pozdní S-fázi a G2 fázi buněčného cyklu (uvolňuje se bezprostředně po mitóze). Na rozdíl od TPA je stanovován monoklonální protilátkou (M3) proti jednomu epitopu – CK 18.

Tabulka č. 14: Zvýšené hodnoty TPA.

| Maligní onemocnění | Benigní onemocnění |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Ca prsu • Nádory orofaciální oblasti • Ca jater • Ca pankreatu • Nádory varlat a ca prostaty • Ca štítné žlázy • Ca plic • Ca ledvin • Ca ovarií | <ul style="list-style-type: none"> • Hepatitida • Jaterní cirhóza • Diabetes mellitus • Infekce respiračního traktu • Benigní onemocnění prsu • Benigní onemocnění trávicího ústrojí • Pooperační stavy • Revmatická onemocnění • Imunoalterační onemocnění |

Tabulka č. 15: Referenční hodnoty TPS.

| | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty: | 0 – 90 | IU/ml |
| Hraniční hodnoty | 90 – 120 | IU/ml |
| Patologické hodnoty | > 120 | IU/ml |

2.2.1.2.5. Matrix metaloproteinázy:

Jedná se o skupinu proteolytických enzymů, které působí svým proteolytickým účinkem na bazální membránu endotelií a extracelulární matrix. V současné době je klasifikováno přes 20 matrix metaloproteináz, přehled je uveden v tabulce č. 16.

Tabulka č. 16: Přehled jednotlivých skupin matrix metaloproteináz.

| Skupina | Druh | Zkratka | Molek. hmotn. | Primární substrát (místo působení) |
|------------------------------|---------------------------|---------|---------------|---------------------------------------|
| Kolagenázy | Intersticiální kolagenáza | MMP-1 | 52 kDa | Kolagen typu I. - III., VII. VIII, X. |
| | Neutrofilní kolagenáza | MMP-8 | 75 kDa | |
| | Kolagenáza 3 | MMP-13 | | |
| Gelatinázy | Gelatináza A | MMP-2 | 72 kDa | Kolagen typu IV. - V. |
| | Gelatináza B | MMP-9 | 92 kDa | |
| Stromelysin | Stromelysin-1 | MMP-3 | 55 kDa | Proteoglykany, laminin, fibronektin |
| | Stromelysin-2 | MMP-10 | 55 kDa | Kolagen IV. - V. typu |
| | Stromelysin-3 | MMP-11 | 61 kDa | Serinové proteázy |
| | Metaloelastáza | MMP-12 | 54 kDa | Elastin |
| MMP membránového typu | MT1-MMP | MMP-14 | ~ 63 kDa | Progelatináza A |
| | MT2-MMP | MMP-15 | | |
| | MT3-MMP | MMP-16 | | |
| | MT4-MMP | MMP-17 | | |
| | MT5-MMP | MMP-21 | | |

Dříve byla úloha matrix metaloproteináz spojována pouze s degradací bazální membrány extracelulární matrix. V poslední době se ukazuje, že matrix metaloproteinázy mají v procesu růstu nádoru a metastazování mnohem komplexnější úlohu. Degradací bazálních membrán kompartmentových systémů ovlivňují nejen invazi nádoru do bezprostředního okolí, či intra a extravazaci nádorových buněk, ale ovlivňují také migraci buněk v místě tvorby vzdálených metastáz. Hrají též významnou úlohu v procesu angiogeneze, a to vytvářením prostoru pro nově vznikající cévy, podporou mobility endotelií a invazí buněk nádoru do cév. U pacientů s kolorektálním karcinomem byly patologické hodnoty proteináz MMP-1, MMP-2 a MMP-7 spjaty s výskytem metastáz, v případě MMP-1 korelovaly hodnoty s Dukesovou klasifikací a stupněm postižení lymfatických uzlin. U pacientů se stadiem Dukes C a D se

metaloproteinázy MMP-1 a MMP-7 jeví jako nezávislý prognostický faktor nepříznivé prognózy.

Antagonisticky proti proteolytickému účinku matrix metaloproteináz působí **inhibitory** matrix metaloproteináz TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase). Jejich účinek spočívá ve stabilizaci bazální membrány, která se pod vlivem TIMP stává intaktní vůči účinku proteolytických enzymů a znesnadňuje invazi nádorových buněk a endotelií. Význam intenzivního zkoumání těchto látek spočívá především v možnosti léčebné intervence, kdy stabilizace bazální membrány a inhibice proteolytických enzymů může mít zásadní význam v kauzální léčbě metastáz.

V současné době probíhá několik studií na možný význam stanovení metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitorů z hlediska možné včasné detekce metastatického procesu u pacientů s kolorektálním karcinomem. Kromě pilotních studií, které poukazují na možný klinický význam však doposud nejsou validní výsledky k dispozici.

Nyní je v popředí zájmu klinický výzkum využití těchto inhibitorů ve formě léků. V různých klinických studiích se nyní testuje okolo 20 různých přípravků, některé jsou již ve III. stádiu klinického vyhodnocení. Podrobně byly sledovány např. Bay 12-9566 (fa Bayer), BB94 (fa British Biotechnology), které mají stabilizační účinek na bazální membránu a zamezují tak možnému metastatickému procesu. Některé se dávají do kombinace s inetrferony, bevacizumabem či chemoterapií. (Raia 2005)

2.2.1.2.6. Adhezivní molekuly

Tato skupina zahrnuje asi 70 látek imunoglobulinového typu. Tyto molekuly mají zásadní význam nejen v celé řadě fyziologických procesů (embryogeneze, imunitní reakce, reparace poškozených tkání), ale uplatňují se i v celé řadě procesů patologických. V případě adheze agregátů nádorových buněk s krevními destičkami se uplatňují především selektin E, a dále imunoglobuliny ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1, které se v interakci s cytokiny podílejí na aktivaci endotelu a následné adhezi agregátů destiček a metastatických nádorových buněk k endotelu. Existuje nejméně 5 skupin adhezivních molekul, viz tabulka č. 17.

Tabulka č. 17: Přehled jednotlivých skupin adhezivních molekul.

| Adhezivní molekuly | |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Skupina | Druh |
| Integriny | β_1 - β_8 |
| Selektiny | E-selektin, P-selektin, L-selektin |
| Imunoglobuliny | Intercellular adhesion molecules: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 Vascular cell adhesion molecules: VCAM-1 |
| Kadheriny | E-kadherin, P-kadherin, N-kadherin |
| Ostatní | CD 22, CD 24, CD 44, CEA |

V souvislosti s metastatickým procesem kolorektálního karcinomu v játrech připisují některé experimentální práce významnou úlohu onkofetálnímu antigenu CEA, který se spolu s antigenem NCA (non specific cross-reacting antigen) váže přes peptidovou sekvenci PELPK na receptory Kupfferových buněk v játrech, čímž je stimulována produkce cytokinů (IL-1 β , IL6), regulačního peptidu TNF α a dalších působků, které působí aktivaci endotelu krevních jaterních kapilár, aktivaci adhezivních molekul (selektin E, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) a tím vlastní adhezi agregátů krevních destiček a metastatických nádorových buněk k jaternímu endotelu. Tyto závěry podporují výsledky některých pilotních studií, které popisují patologické hodnoty selektinu E, VCAM-1, ICAM-1 u pacientů s jaterními metastázami, a to především v souvislosti s patologickými hodnotami CEA. V kombinaci s CEA se tedy jeví tyto adhezivní molekuly jako faktor časného záchytu jaterních metastáz.

2.2.1.2.7. Faktory regulující angiogenezi

Angiogeneze je proces, při kterém primitivní vaskulatura expanduje a nemodeluje se. Tím dochází k novotvorbě cév, které se mohou vzájemně propojovat a větvit, čímž dochází ke zralému cévnímu systému. Jedná se o vícestupňový proces (angiogenní kaskáda), který je regulován řadou faktorů. Za fyziologického stavu jsou faktory podporující angiogenezi v dynamické rovnováze s faktory, které ji potlačují (angiogenní a antiangiogenní faktory). Endoteliální buňky tedy samy o sobě pro novotvorbu cév nestačí a pro kompletní novotvorbu je nezbytná jejich součinnost s peri-endoteliálními buňkami a matricí.

Přehled současného stavu problematiky

U dospělého jedince je angiogeneze vysoce potlačena a jen asi u 0,01 % endoteliálních buněk probíhá dělení. Většina nádorů u lidí perzistuje in situ po dlouhé měsíce až roky bez známek cévní novotvorby. Neovaskularizace začne, jakmile nádorové ložisko dosáhne velikosti 1-2 mm³ (asi 10⁶ buněk) a přívod kyslíku a živin prostou difúzí přestává pro výživu buněk a jejich dělení stačit. Limitace zásobení živinami udržuje rovnovážné tempo mezi replikujícími a zanikajícími buňkami, kdy je po určitou dobu proliferace v rovnováze s apoptózou. Hypoxický nádor je však geneticky nestabilní, vznikají v něm četné mutace (např. mutace genu p 53, která vede k potlačení produkce antiangiogenního trombospondinu). Objevuje se nový fenotyp se zvýšenou produkcí VEGF a dalších angiogenních faktorů (tzv. TAF-tumor angiogenesis factors). Tato změna je označovaná též jako „angiogenní switch“. Angiogenní zvrát zahrnuje změnu lokální rovnováhy mezi stimulatory a inhibitory růstu mikrocév. Nádorové buňky mohou vytvářet zvýšené množství jednoho či více stimulatorů, mobilizovat angiogenní faktory z extracelulární matrice, či stimulují k jejich produkci buňky hostitelského organismu jako např. makrofágy, či se jedná o kombinace těchto různých vlivů. Mezi nejčastěji prokázané stimulatory patří bFGF a VEGF, ale v nádorových tkáních byla prokázána celá řada dalších faktorů. Nadprodukce angiogenních faktorů není však dostačující, musí rovněž dojít k supresi inhibitorů, které za normálních okolností brání endotel před mitogenními stimuly. Proliferace je rovněž regulována pericyty (produkce mitogenů, či snížení senzitivity k růstovým faktorům).

Na buněčné úrovni neovaskularizace dochází ke stimulaci nádorového růstu díky zvýšené perfúzi a parakrinním působkům, jako je produkce růstových faktorů (bFGF, IGFs, PDGF, granulocyte colony-stimulating factor) či jejich uvolněním z buněk hostitele a dopravením do nádorové tkáně.

Tabulka č. 18: Přehled angiogenních a antiangiogenních faktorů.

| Angiogenní faktory | |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Faktor | Mechanismus účinku |
| MMP (Metaloproteinázy) | <ul style="list-style-type: none"> • Proteolýza bazální membrány a extracelulární matrix |
| TNF alfa | <ul style="list-style-type: none"> • Aktivace MMP |
| Angiopoetiny | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice exprese adhezivních molekul |
| FGF beta (fibroblast growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice proliferace a migrace endotelových buněk • Stimulace tvorby inhibitorů proteáz |
| VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor) | <ul style="list-style-type: none"> • Zvýšení permeability • Navození proliferace endotelu |
| EGF (epidermal growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> • Stimulace výdeje VEGF |
| PDGF (Růst. f. odvozený od trombocytů) | <ul style="list-style-type: none"> • Stimulace proliferace fibroblastů • Stimulace tvorby kolagenu |
| PAI – 1 (Inhibitor plasminového aktivátoru 1) | <ul style="list-style-type: none"> • Stabilizace matrix kolem nových cév |
| Antiangiogenní faktory | |
| Faktor | Mechanismus účinku |
| FGF beta (fibroblast growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice proliferace a migrace endotelových buněk • Stimulace tvorby inhibitorů proteáz |
| Trombospodin | <ul style="list-style-type: none"> • Univerzální inhibice angiogeneze |
| TGF- beta | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice proliferace • Zvýšení tvorby trombospodinu |
| Angiostatin | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice proliferace endotelií |
| PF-4 (platelet factor 4) | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice proliferace endotelií |
| Interferon alfa, beta | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice proliferace endotelií |
| Antiangiogenní interleukiny (IL-12, IL-18) | <ul style="list-style-type: none"> • Inhibice migrace endotelií |
| Endostatin | <ul style="list-style-type: none"> • Indukce apoptózy endotelií |

Z klinického pohledu neovaskularizace umožňuje nádoru růst a metastazování, což často vede ke klinické symptomatologii nádorového onemocnění. Většinou nádory

Přehled současného stavu problematiky

začínají být klinicky zřejmé až po angiogenním zvratu, ale to rovněž neznamená, že to povede k rychle rostoucímu nádoru. Za určitých okolností mohou být také vzdálené metastázy suprimovány cirkulujícími inhibitory z primárního ložiska a začnou růst až po jeho odstranění. Paradoxně, neovaskularizace snižuje schopnost průniku chemoterapeutik do nádoru. Zatímco nádory menší než 1 cm (v počátečním stadiu neovaskularizace) jsou dobře prokrveny, větší nádory jsou díky útlaku cév prokrveny hůře. Útlak je způsoben zvýšeným intersticiálním tlakem při zvýšené permeabilitě nově tvořených cév a sníženým počtem lymfatické drenáže, což vede často k centrálním nekrotickým. Proto také není překvapující, že antiangiogenní látky snížením intranádorového tlaku zlepšují dostupnost chemoterapie.

Novotvorba cév je tedy procesem, bez kterého nemůže organismus přežít, ale je i základní podmínkou přežití a dalšího progresu a metastazování nádorového onemocnění. Jedná se o komplexní proces řízený celou řadou faktorů a pouze jeden z biologických rysů nádorového onemocnění.

Z předchozího výkladu vyplývá, že existuje úzký vztah mezi angiogenezí a tvorbou metastáz. Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je riziko metastáz větší a prognóza nádorového onemocnění horší. I v případě kolorektálního karcinomu bylo prokázáno, že intenzita angiogeneze v marginálním okraji nádoru koreluje s prognózou nádorového onemocnění. Z angiogenních faktorů je nejintenzivněji studován endoteliální růstový faktor VEGF. Sérové hodnoty VEGF korelují u pacientů s kolorektálním karcinomem s nepříznivou prognózou a tato korelace je nezávislá na výskytu distančních metastáz^(Dirix LY, 1999). Nepodařilo se prokázat, že se jedná o nezávislý prognostický faktor. Z dalších prováděných studií publikoval Shimoyama a kol.⁽¹⁹⁹⁹⁾ signifikantně vyšší hodnoty angiogeninu u pacientů s kolorektálním karcinomem ve stadiu Dukes C ve srovnání se skupinou pacientů ve stadiu Dukes A. Sérové hodnoty signifikantně korelovaly s histologickým průkazem angiogeninu v nádorové tkáni. Různé mechanismy inhibice angiogeneze mohou být v budoucnu přínosem v terapii nádorového onemocnění a výsledky prvních klinických studií jsou povzbudivé. Dle místa účinku se jedná o tři hlavní skupiny terapeutik:

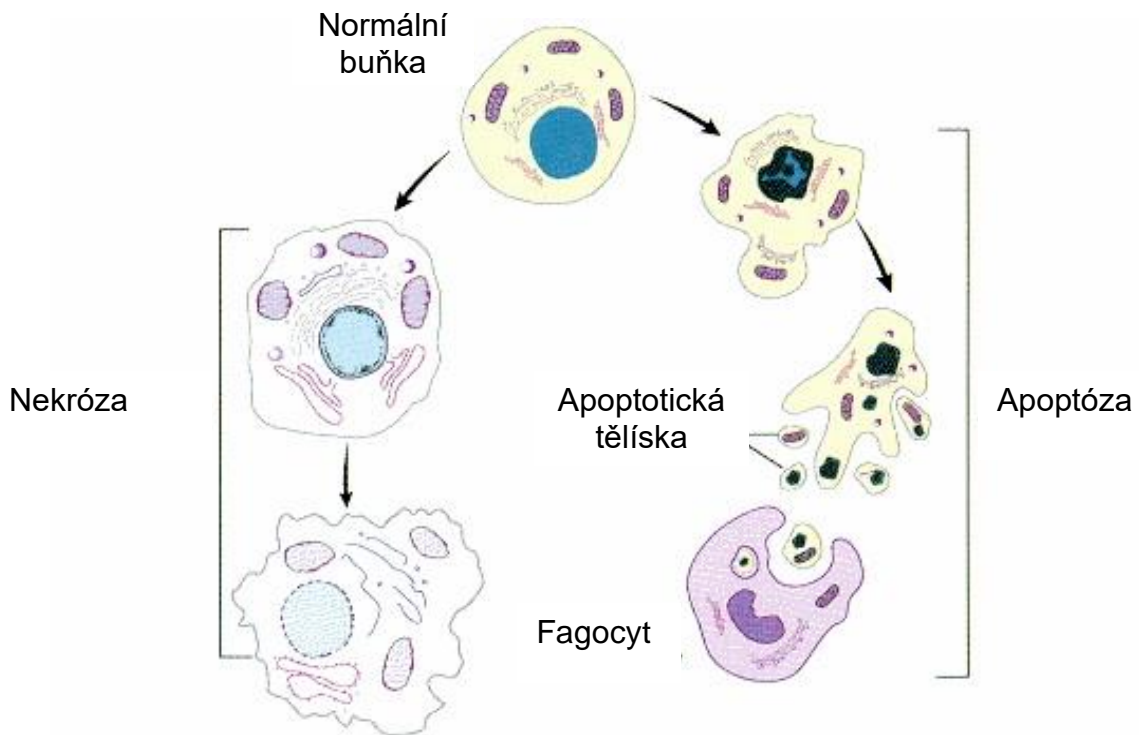
- Inhibitory stimulatorů a přirození antagonisté angiogeneze
- Inhibitory endoteliální proliferace a migrace
- Stabilizátory bazální membrány

2.2.1.2.8. *Faktory apoptózy*

Růst nádorových buněk je podmíněn nejen nekontrolovatelným buněčným dělením, ale také zvýšenou schopností přežít. Většina nádorových buněk získala rezistenci vůči mechanismům vedoucím k jejich programovanému zániku – apoptóze. Narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a rozvoje nádorových buněk. Velmi důležitou úlohu při tomto procesu má pravděpodobně onkogenní potenciál faktoru Bcl2 (B-cell lymphoma gen). Jeho nadměrná exprese má vliv na narušení apoptózy. Tímto mechanismem mají neoplastické buňky selekční výhodu, mohou setrvávat jako ložiska v hostitelské tkáni ochráněné před apoptózou.

Je nutné velice důsledně rozlišovat mezi dvěma ději – nekrózou a apoptózou. Nekróza je patologický proces, kdy dochází k nekontrolovanému, náhlému a chaotickému zániku buněk. Dochází při ní k dilataci endoplazmatického retikula, alteraci mitochondrií, zduření buňky a následně k ruptuře plazmatické membrány. Tím dochází k definitivnímu zániku buňky. Apoptóza je fyziologický proces, kdy dochází ke kondenzaci chromatinu, segmentaci jádra, postupnou tvorbou apoptotických tělísek, které obsahují části cytoplazmy i fragmenty jádra. Tato tělíška jsou postupně fagocytována makrofágy a jinými fagocytujícími buňkami. Rozdíl vyplývá z obrázku č. 16.

Obrázek č. 16: Schéma apoptózy.



2.2.1.3. Metody stanovení biomarkerů

Biomarkery lze detekovat jednak imunohistochemicky či v cytosolu nádorové buňky (celulární markery), nebo cirkulují v krvi či jiných tělních tekutinách (humorální markery) a stanovují se zpravidla pomocí metod imunoanalytické analýzy. Tyto metody získávají postupem času stále větší popularitu. Od čistě klinického použití se dnes rozšiřují do mnoha dalších oblastí, kde je vyžadováno specifické, rychlé a levné stanovení určité látky v přítomnosti dalších komponent.

Tabulka č. 19: Přehled imunoanalytických metod používaných k detekci biomarkerů.

| Typ metody: | Specifický název metody: | Výrobce | Parametr |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| RIA (Radioimunoanalýza) | IRMA (Imunoradiometrická analýza) | IDL Biotech AB | TPA TPS MonoTotal |
| | | Immunotech | CEA CA 19-9 |
| | REA (Radioenzymová analýza) | Immunotech | TK |
| EIA (Enzymoimunoanalýza) | ELISA | CanAg | CEA CA 19-9 CA 242 |
| | | Biomedica | ICAM V-CAM 1 E-selektin |
| | | IDL Biotech AB | TPS TPA |
| | MEIA (Mikročástečková imunoanalýza) | Abbott | CEA CA 19-9 |
| CMIA (Chemoluminiscenční magnetická imunoanalýza) | Chemiluminiscence | Beckman | CEA CA 19-9 |
| | | Roche | CEA CA 19-9 |

2.2.1.4. Multiplexová analýza

Tato nová technologie je založena na principu průtokové cytometrie s fluorometrickou detekcí. Nejmodernější systémy, které využívají této technologie za použití mikrokuliček xMAP, umožňují simultánní analýzu až 100 analytů v jednom vzorku.

V analyzátoru jsou dvě dráhy pro proudění kapalin (fluidní dráhy). První dráha obsahuje dávkovací stříkačkou řízený mechanismus, který reguluje nasátí vzorku. Tento mechanismus umožňuje dávkování malých objemů vzorku z malých reakčních objemů. Systém řízený stříkačkou transportuje specifikovaný objem vzorku z nádoby se vzorkem do kyvety. Vzorek je konstantní rychlostí vstřikován do kyvety a zde analyzován. Po analýze je dráha pro přívod vzorku automaticky proplachována nosnou

Přehled současného stavu problematiky

kapalinou přiváděnou druhou dráhou. Tento proces účinně odstraňuje zbytky vzorku z hadiček, ventilů a sondy. Druhá fluidní dráha přivádí nosnou kapalinu pod tlakem do kyvety a do dráhy pro přívod vzorku.

Nosná kapalina slouží jako prostředník transportu vzorku do optického systému. Vzorek pro analýzu je nabírán pomocí vzorkovací sondy z 96jamkové mikrotitrační destičky v přístrojové části XYP a vstřikován na dno kyvety. Redukovaná rychlost průchodu vzorku s nosnou kapalinou kyvetou způsobí, že mikrokuličky vzorku procházejí kyvetou v řadě za sebou a tím je zajištěno, že každá mikrokulička je ozářena laserem individuálně. Rychlost vstřikování vzorku je tedy taková, aby mikrokuličky byly vnášeny do optického systému jako série jednotlivých impulsů.

Optický systém se skládá ze dvou laserů. Jeden laser excituje směs barviva uvnitř mikrokuliček a druhý laser excituje fluorochromy vázané na povrch mikrokuliček. Lavinové fotodiodové detektory měří intenzity emise po excitaci u směsí barviv klasifikovaných pomocí barevného kódování uvnitř mikrokuliček a trubice fotonásobiče detekuje intenzity emise po excitaci referenční molekuly vázané na povrch mikrokuliček. Vysokorychlostní digitální procesory signálu a rozšířené počítačové algoritmy v analyzátoru analyzují data mikrokuliček. Výsledky analýz jsou zpracovávány a poskytovány ve formátu výstupních protokolů.

Technologie xMAP představuje všestranný systém určený pro stanovení analytů v roztoku. V přístrojích založených na multiplexové analýze se provádí individuální měření četných reakcí na mikrokuličkách, a to v jediném alikvotu vzorku. (Howarda M, 1995)

3. ČÁST PRAKTICKÁ

3.1. Metodika

3.1.1. Návrh studie

3.1.1.1. Pilotní studie s karcinomem žaludku

Studie nakonec nebyla dokončena, neboť v poslední době byl zaznamenán relativně nízký výskyt nádorů žaludku, zřejmě především v důsledku eradikace infekce *Helicobacter pylori* či časté i preventivní léčby H2 blokátory či inhibitory protonové pumpy. Soubor nemocných nebyl dostatečný pro řádnou statistickou analýzu.

3.1.1.2. Pilotní studie s karcinomem pankreatu

Cílem této pilotní studie bylo stanovení velkého množství nových biomarkerů, jejich vyhodnocení u nemocných v době primární diagnostiky tohoto nádoru a porovnání s hodnotami u zdravých jedinců. Hlavním cílem bylo pokusit se navrhnout optimální kombinaci biomarkerů, které by mohly v budoucnu sloužit jako další pomocný a neinvazivní nástroj v procesu primární diagnostiky karcinomu pankreatu.

3.1.1.3. Studie s kolorektálním karcinomem

Cílem této studie bylo vyšetření širokého spektra parametrů, které je možno charakterizovat jako parametry biologické aktivity nádoru nebo u nichž se souvislost s nádorovým procesem předpokládá (C-peptid, inzulin, leptin a adiponektin), stanovení jejich předoperačních hladin, určení diskriminačních hodnot (cut-off), porovnání sérových hladin všech parametrů u pacientů s kolorektálním karcinomem se sérovými hladinami osob kontrolní skupiny a stanovení jejich senzitivit při optimálních specifitách. Dalším cílem bylo stanovení vzájemné korelace jednotlivých parametrů a posouzení jejich potenciálního využití pro rutinní klinickou praxi.

3.1.1.4. Pilotní studie s nádory jater

Cílem této pilotní studie bylo vyhodnocení klinického významu nového biomarkeru PIVKA-II a jeho porovnání s rutinně používaným nádorovým markerem alfa-fetoproteinem, který doposud není ideálním markerem pro primární diagnostiku hepatocelulárního karcinomu.

3.1.2. Laboratorní analýzy

3.1.2.1. Preanalytika

Výsledek vyšetření může ovlivnit řada faktorů již v preanalytické fázi, proto jsme se snažili tyto faktory buď řádně eliminovat, nebo je správně interpretovat ve vztahu k výsledku laboratorní analýzy.

Krev na stanovení základních biochemických parametrů i specifických parametrů biologické aktivity nádorového onemocnění byla odebírána z loketní žíly vždy v ranních hodinách (mezi 6 a 8 hodinou ranní) po minimálně 8hodinovém nočním lačnění), čímž jsme eliminovali potenciální vliv cirkadiálních biologických rytmů. Sérum získané centrifugací bylo rozděleno na minimálně 3 aliquoty a bylo skladováno až do analytického stanovení při teplotě -70°C . Zásadně jsme neprováděli opakované rozmrazování vzorku. Při opakované analýze se použil zásobní aliquot, i když na základě našich zkušeností a v souladu s publikovanými daty je většina rutinně stanovovaných nádorových markerů relativně stabilní i při dlouhodobém uložení.

Dalším faktorem, který výrazně může ovlivnit výsledek stanovení biomarkeru, je správné načasování odběru materiálu v závislosti na biologickém poločasu a klinické situaci, ke které odběr vztahujeme. Např. těsně před zahájením léčby je vhodné provádět odběr ne déle než tři dny. Pokud by toto období bylo delší, mohl by být výsledek falešně nižší, než je skutečně v době zahájení léčby. Po chirurgickém zákroku je naopak nutné s odběrem minimálně týden počkat, aby i u látek s dlouhým biologickým poločasem mohlo dojít skutečně k normalizaci hodnoty. Z tohoto důvodu jsme sbírali vzorky pouze před zahájením léčby.

Pro dosažení správného výsledku je též nutná znalost, jaký druh biologického materiálu se má k analýze odebírat. Zatímco většina parametrů se stanovuje ze séra, u některých parametrů se doporučuje použít plazmy, nejlépe s EDTA. Ostatní protisrážlivá činidla – především heparin – nejsou vhodná, protože nespecificky zvyšují hodnotu výsledku, proto jsme výhradně používali sérum.

Všechny parametry biologické aktivity nádoru byly stanoveny na Oddělení nukleární medicíny, Úsek imunoanalýzy (vedoucí prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.), pomocí komerčních diagnostických souprav dle doporučení jednotlivých výrobců. Přehled jednotlivých použitých laboratorních analýz a jejich charakteristika je uvedena v tabulce č. 20. Kontrola stanovení byla prováděna jednak pomocí kontrolních sér,

kteří jsou součástí diagnostických souprav, a jednak pomocí kontrolních sér určených k externí mezilaboratorní kontrole SEKK (Systém externí kontroly kvality), ČR.

3.1.2.2. Metodika stanovení

Metody pro stanovení parametrů biologické aktivity, které jsou v současné době nejvíce používány, jsou přehledně probrány v teoretické části. Velká část experimentálních parametrů byla stanovována nejmodernější technologií multiplexové analýzy (xMAP), což umožnilo stanovení mnoha parametrů přímo z velmi malého vzorku biologického materiálu. Přehled ostatních použitých metod pro stanovení parametrů biologické aktivity je uveden v následující tabulce č. 20.

Tabulka č. 20: Metody stanovení sledování parametrů biologické aktivity.

| Skupina | Parametr | Výrobce | Metoda | Jednotky: |
|-------------------------------|----------|-----------------|--------|-----------|
| Onkofetální markery | CEA | Beckman Coulter | CLIA | ng/ml |
| | | Abbott | CLIA | IU/ml |
| | AFP | Beckman Coulter | CLIA | ng/ml |
| | | Siemens | CLIA | µg/l |
| Mucinové markery | CA 19-9 | Beckman Coulter | CLIA | IU/ml |
| | | Abbott | CLIA | IU/ml |
| | CA 72-4 | Roche | ECLIA | IU/ml |
| Proliferativní markery | TK | Beckman Coulter | REA | IU/l |
| Cytokeratinové markery | TPA | DiaSorin | IRMA | IU/l |
| | TPS | IDL Sweden | IRMA | IU/l |
| Adhezivní molekuly | CEACAM | Abnova | ELISA | ng/ml |
| | I-CAM | Linco-Millipore | xMAP | ng/ml |
| | | eBiosence | ELISA | ng/ml |

| | | | | |
|-------------------------------|----------|-----------------|--------------|--------|
| | V-CAM | Linco-Millipore | xMAP | ng/ml |
| Interleukiny | IL 6 | Linco-Millipore | xMAP | pg/ml |
| | IL 10 | Linco-Millipore | xMAP | pg/ml |
| Anti-angiogenní faktor | TIMP-1 | R&D Systems | EIA | ng/ml |
| | TIMP-1 | eBiosence | ELISA | ng/ml |
| Metaloprotein | MMP-7 | R&D Systems | ELISA | ng/ml |
| | MMP-9 | Linco-Millipore | xMAP | ng/ml |
| | | BioVendor | ELISA | ng/ml |
| Angiogenní f. | VEGF | Linco-Millipore | xMAP | pg/ml |
| Ostatní biomarkery | PIVKA-II | Abbott | CLIA | mAU/ml |
| | IGF1 | Mediagnost | ELISA | ng/ml |
| | IGFBP2 | Mediagnost | ELISA | ng/ml |
| | IGFBP3 | Mediagnost | ELISA | ng/ml |
| | REG1 | BioVendor | ELISA | ng/ml |
| | REG3A | BioVendor | ELISA | ng/ml |
| | MIC-1 | BioVendor | ELISA | ng/ml |
| | OPG | BioVendor | ELISA | ng/ml |
| | TIFF1 | BioVendor | ELISA | ng/ml |
| | AAT | Beckman Coulter | Nefelometrie | mg/ml |
| Parametry metabolismu | C-peptid | Linco-Millipore | xMAP | pM |
| | Inzulín | Linco-Millipore | xMAP | pM |

| | | | | |
|--|-------------|-----------------|------|-------|
| | Adiponektin | Linco-Millipore | xMAP | Mg/ml |
| | Leptin | Linco-Millipore | xMAP | pM |

Při studiích je nutné používat stále stejný typ soupravy od jednoho výrobce. Výsledky mohou být ovlivněny nejen rozdílem v základním typu metody RIA, ELISA, xMAP, kde se mohou získané výsledky zásadně lišit, ale i při použití jednoho a téhož typu metody, např. ELISA, se mohou soupravy různých výrobců lišit použitými protilátkami. V závislosti na detekovaných epitopech pak opět můžeme získat různé výsledky. I když zde u některých metod uvádíme 2 výrobce, jednalo se o dvě metody ve dvou pilotních studiích. V rámci jedné studie jsme vždy použili jednoho výrobce.

Dále byla provedena základní biochemická a hematologická vyšetření (krevní obraz, jaterní enzymy, parametry renálních funkcí či proteiny aktivní fáze zánětu), abychom nezařazovali do studie pacienty, jejichž klinický stav by mohl ovlivnit v důsledku zhoršených renálních nebo jaterních funkcí či probíhajícího zánětu sérové hladiny některých biomarkerů, a to i u kontrolní skupiny.

3.1.2.3. Interpretace výsledků

Interpretace jednotlivých výsledků nádorových markerů či parametrů biologické aktivity je velmi svízelná, neboť si je nutno uvědomit, že může být ovlivněna řadou faktorů. Tím můžeme dostat výsledek falešně pozitivní i falešně negativní. Nejčastější obecné příčiny těchto falešných výsledků jsou uvedeny v následující tabulce č. 21. Podrobněji jsou tyto příčiny popsány v teoretické části u jednotlivých markerů.

Konečné vyhodnocení výsledku musí být prováděno se znalostí kompletního klinického obrazu pacienta a fáze probíhajícího onemocnění. Například se výsledky interpretují rozdílně v případě primární diagnostiky, při follow-up onemocnění či při monitoraci léčby. Zatímco při primární diagnostice je důležitá pro volbu markeru senzitivita a specifita, při follow-up je důležité sledování dynamiky změn.

Tabulka č. 21: Přehled obecných faktorů, které mohou mít vliv na interpretaci výsledku parametru biologické aktivity nádoru.

| Falešně pozitivní výsledek | Falešně negativní výsledek |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Zánětlivá onemocnění • Autoimunitní onemocnění • Cholestáza • Renální insuficience • Kouření • Zanedbání biologického poločasů nádorového markeru | <ul style="list-style-type: none"> • nesprávně zvolený druh markeru <ul style="list-style-type: none"> • orgán • histologie • stupeň zralosti • opožděný přestup z tkáně do tělních tekutin • málo citlivá metodika |

3.1.2.4. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software S.A.S. (Statistical Analysis Software) release 8.02 a programu STATISTICA release 5.1. Pro měřené parametry v celém souboru byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, minimum a maximum. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do histogramů. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto proměnných, byly použity neparametrické testy, a to dvouvýběrový Wilcoxonův test. Pro zjištění závislostí zkoumaných znaků s ohledem k negaussovskému rozdělení těchto proměnných byl použit Spearmanův pořadový korelační koeficient. Pomocí specificit a senzitivit dané metody byly stanoveny optimální referenční meze (cut-off) mezi skupinami a podskupinami pro danou metodu a dále byla vypočtena celá ROC křivka. Délka přežití a DFI (disease free interval) byly spočteny užitím Kaplan-Meierovy metody odhadu. Pro zjištění vlivu daných proměnných na délku přežívání a (DFI) pak byl užit Coxův regresní model.

Při statistickém vyhodnocení výsledků byly použity následující pojmy:

Cut-off (diskriminační hladina): představuje hranici hodnoty nádorového markeru, která odděluje zdravé jedince od nemocných. Neexistují přesná pravidla, jak se cut-off hodnota vypočítává. Obecně se stanovuje jako průměrná hodnota markeru u kontrolní

skupiny zdravých jedinců zvýšená o dvě standardní odchylky, nebo se používá 95. percentil. Je však velmi důležité správně zařadit jedince do této kontrolní skupiny. Tato skupina může zahrnovat pouze zdravé jedince anebo i jedince s benigním onemocněním. Hodnota cut-off se zvyšuje za účelem odlišení benigního a maligního onemocnění. Naopak nízko stanovená hodnota cut-off znamená vyšší senzitivitu markeru na úkor významně nižší specifity. U nádorových markerů se proto hodnota cut-off určuje v závislosti na tom, za jakým účelem se nádorový marker stanovuje. Při primární diagnostice je definována jako hladina markeru, pod kterou je 95 % hladin zdravých lidí, event. pacientů s benigním onemocněním při follow-up nádoru nebo monitoraci léčby je definována jako hladina markeru, pod kterou leží 95 % hodnot pacientů v kompletní remisi.

Specifita nádorového markeru (SP): pravděpodobnost, s jakou má pacient/subjekt (kontrola) bez diagnostikovaného maligního onemocnění negativní výsledek. Tj. vyjadřuje možnost odlišení benigní léze od maligní.

Senzitivita nádorového markeru (SN): pravděpodobnost, že pacient s hledaným nádorovým onemocněním má pozitivní výsledek. Tj. vyjadřuje možnost časnosti záchytu onemocnění.

Přežití se zabývá časovým intervalem od určitého okamžiku (např. operace/primární terapie) do výskytu očekávané události (úmrtí, progresu apod.). Jednou z nejpoužívanějších metod analýzy přežití je metoda Kaplan-Meierové, jež je maximálně věrohodným bodovým odhadem funkce přežití $S(t)$ definované vztahem $S(t) = P(T \geq t)$, kde t je čas (ve stanovených jednotkách – měsících, letech, atd.), T je délka přežití pacienta, P je označení pro pravděpodobnost. Přežití je nejčastěji popsáno funkcí přežití, tj. pravděpodobnost, že délka života pacienta bude větší nebo rovna času „ t “, tj., že pacient přežije alespoň „ t “ let od stanovení diagnózy.

Absolutní přežití (OS) (absolute, observed, overall survival) se zabývá dobou mezi diagnózou onemocnění a očekávanou událostí, tedy úmrtím na jakékoliv onemocnění.

Bezpriznakový interval (DFI) (disease free interval) se zabývá intervalem od okamžiku dosažení kompletní remise do prvních známek relapsu. Prognóza vyjadřuje odhad perspektivy dalšího průběhu nádorového onemocnění. Nejčastěji je prognóza vyjadřována jako tříleté, pětileté (nejčastěji) a desetileté přežití. To znamená, jaké procento nemocných přežije 3, 5 nebo 10 let od stanovení primární diagnózy. Nebo je

charakterizována dobou do vzniku relapsu, tj pomocí bezpříznakového období (DFI). Prognóza se stanovuje v klinické praxi za pomoci tzv. prognostických parametrů odvozených na základně univariantní, častěji multivariantní analýzy. Prognostické parametry jsou klinicko-patologické faktory, které bezprostředně souvisejí s nádorovým onemocněním. Může jít o parametry klinického stavu, výsledky zobrazovacích technik, parametry určené patologem, laboratorní atd. Určení prognostických markerů je důležité pro individualizaci péče o onkologického nemocného. Lze například optimalizovat dispenzární péči – jak z hlediska frekvence, kontrol, ale i jejich náplně nebo volit a optimalizovat terapii. Mnohdy je prognóza nesprávně jen zužovaná na prognostické markery určované imunoanalytickými metodami, imunohistochemickými metodami nebo pomocí metod molekulární biologie.

ROC křivka (Receiver Operating Characteristic curve) znázorňuje vztah mezi senzitivitou a 1-specificitou (resp. 100-specificita při vyjádření v procentech) u testu, který k diskriminaci souboru s chorobou a souboru kontrolního.

3.2. Výsledky

3.2.1. Kolorektální karcinom

3.2.1.1. Cíle studie

Cílem studie bylo vyšetřit široké spektrum parametrů, které je možno charakterizovat jako parametry biologické aktivity nádoru, nebo u nichž se souvislost s nádorovým procesem předpokládá (C-peptid, inzulin, leptin a adiponektin). Dále bylo cílem provést základní epidemiologické sledování pacientů s metabolickým syndromem a zjistit výskyt KRK, parametry, které se uplatňují v etiopatogenezi a faktory ovlivňující vývoj a prognózu KRK. Dalším cílem bylo stanovit předoperační hladiny následujících parametrů a stanovit jejich diskriminační hodnoty (cut-off), porovnat sérové hladiny všech parametrů u pacientů s kolorektálním karcinomem se sérovými hladinami osob kontrolní skupiny, stanovit jejich senzitivity při optimálních specificitách - Onkofetální: CEA, mucinové: CA 19-9, proliferační a cytokeratinové: TK, TPA a TPS, interleukiny: IL-6 a IL-10, metaloproteinázy a inhibitory: MMP-9 a TIMP-1, adhezivní molekuly a markery angiogeneze: ICAM-1, VCAM-1, VEGF, markery metabolismu: C-peptid a inzulin, adiponektin a leptin. Stanovit vzájemné korelace jednotlivých parametrů a určit senzitivity jednotlivých parametrů při dvou v praxi nejčastěji používaných

specifitách 90% a 95%. V neposlední řadě bylo cílem posoudit možnost využití sledovaných parametrů v rutinní praxi pro screening, primární diagnostiku, pro prognózu, sledování průběhu onemocnění, pro kontrolu efektu a monitoraci léčby.

Problematika studie kolorektálního karcinomu byla předmětem doktorandské práce autorky a byla publikována^(Svobodová Š. 2011)

Parameters of Biological Activity in Colorectal Cancer

SARKA SVOBODOVA^{1,2}, ONDREJ TOPOLCAN², LUBOS HOLUBEC JR.^{2,3},
MIROSLAV LEVY⁴, LADISLAV PECEN⁵ and STEPAN SVACINA¹

¹Third Internal Medicine Department and First Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic;
Departments of ²Nuclear Medicine, ³Oncology and Radiotherapy,

Charles University, Medical Faculty and Teaching Hospital Plzen, Czech Republic;

⁴Surgical Department of Thomayer's Teaching Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague;

⁵Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Abstract. *Background:* The aim of this study was to measure several parameters in patients with early-stage colorectal cancer (CRC) and to evaluate them for their utility in routine clinical practice. *Patients and Methods:* Pre-operative serum levels of the following parameters were measured in 174 patients with CRC (clinical stage I-III): carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen CA 19-9, proliferative marker thymidine kinase (TK), tissue polypeptide antigen (TPA), tissue polypeptide-specific antigen (TPS), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), C-peptide, insulin, adiponectin and leptin. The control group consisted of 50 patients who were undergoing a complete preventive medical examination and in these patients at the time of blood collection there was no evidence of any cancer disease. *Results:* Significant increase of the following parameters was found in patients with CRC: CEA, CA 19-9, TPA, IL-6, IL-10, TIMP-1, C-peptide, insulin and adiponectin. Only two of these, CA 19-9 and adiponectin, represent highly unfavorable prognostic factors. If elevated, they affect both progression-free interval and overall survival. *Conclusion:* Based on our results, we can conclude that none of the measured parameters fulfills the criteria for use for screening nor for primary diagnosis of CRC. Some of the parameters are important for prognosis estimate: Elevated CA 19-9 is related to an unfavorable prognosis, in terms of cancer recurrence and mortality rate. Angiogenetic

factor VEGF represents a prognostic factor important for OS. CEA represents a parameter which is related to disease progression. Interleukins seem to be prospective complementary tumor markers. Adiponectin may be used for estimation of advanced stage of cancer and for estimate of risk of cancer recurrence.

Colorectal cancer (CRC) is considered as the most frequent cancer disease based on prevalence and mortality rates (1, 2). CRC represents 12.1% of all cancer cases in men and 13.7% in woman in the Czech Republic (3).

Most cases of CRC are diagnosed very late in the Czech Republic: 45% of cases in males and 47% in females are diagnosed in clinical stage III or IV. This is a very unsatisfactory situation, as earlier diagnosis allows better therapy outcome. The Czech Republic holds the first position in mortality for CRC worldwide (52.7 deaths per 100,000 inhabitants) (3).

Some experimental studies are involved in understanding the complex characteristics of carcinogenesis and of the metastatic cascade process (4). Detailed description of genes and their protein products (5) that affect the metastatic process are very important, particularly for new drugs and therapy approaches that would result in regulation of different phases of cellular mitosis and growth.

Many new laboratory tests and techniques such as multiplex methods or microarrays for early detection of CRC have been developed recently. Not many of them have been implemented for daily routine clinical practice as yet. The aim of this study was to measure a large spectrum of parameters in patients with non-metastatic CRC and to evaluate their utility for routine practice, as they may eventually play a regulatory role in cancer development. Most of the parameters currently evaluated in relationship to cancer have already been associated with other clinical conditions (e.g. inflammation or autoimmune reactions). Therefore they are generally called parameters of biological activity instead of tumor markers.

Correspondence to: Svobodova Sarka, MD, PhD, Third Internal Medicine Dept., U nemocnice 1, CZ-128 08 Praha 2, Czech Republic. Tel:+420224962921, e-mail: s.svobodova@volny.cz

Key Words: Colorectal cancer, biological activity, tumor markers, angiogenetic factors, metalloproteinases, adhesion molecules.

Patients and Methods

Cancer patient group. A total of 174 patients with CRC operated on at the Surgical Department of Thomayer's Teaching Hospital in Prague and at the Department of Surgery, Teaching Hospital in Pilsen up to 2006 were included in order to obtain a full 2-year follow-up period. Inclusion criteria included clinical stage I-III (according to the UICC criteria) (6) and R0 resection (*i.e.* no residual tumor). Patients were monitored for the follow-up period at the Department of Oncology and Radiotherapy of Thomayer's Teaching Hospital in Prague and Teaching Hospital in Pilsen. Date of progression was established as the date of first clinical examination where relapse or progression was confirmed (using physical examination, laboratory assessment or imaging techniques). All of the patients were assessed for their current clinical status at the termination of the clinical study. Only 36 patients died during the study and only 24 patients had a progression. This can be explained by the fact that patients with clinical stage IV were excluded. All of the patients completed a 2-year follow-up period, some of them have even completed a 5-year period.

All the patients were assessed for medical history of metabolic diseases and cancer and the presence of different risk factors for CRC. Basic descriptive characteristics of the group of patients are shown in Table I. Serum samples were collected prior to surgery.

Control group. The control group consisted of 50 individuals who were undergoing a complete medical examination at the Department of Preventive Cardiology. At the time of blood collection, there was no evidence of any cancer disease. In order to rule out polymorbidity of these individuals, the mean age of this group is lower than the mean age of pathological group, but the body mass index (BMI) and other metabolic conditions were corresponding. Basic descriptive characteristics of the control group are also shown in Table I.

Laboratory analysis. Blood for the laboratory assessment was collected from the cubital vein in the morning after an 8-hour fasting period. Sera were separated by centrifugation at 1700×g 10 min and all specimens were separated into several aliquots, immediately deep frozen and stored at -75°C until laboratory analysis. All the parameters were measured at the Department of Nuclear Medicine in Pilsen, using commercially available immunoassay kits. Most of the tests were also analyzed using multiplex analysis (xMAP technology using a Luminex 100 instrument; Luminex Corp., USA), therefore a large spectrum of tests were performed on every blood sample. The list of measured parameters is shown in Table II.

Additional routine biochemical laboratory tests were performed in order to rule out the presence of clinical conditions that may affect the serum levels of the measured parameters (*i.e.* serious renal or liver failure).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Statistical Analysis Software (S.A.S.) release 8.02 and STATISTICA software, release 5.1. Basic descriptive statistic parameters for the total group of patients were estimated: mean, standard deviation, median, minimum and maximum. Wilcoxon two-sample test was used for comparison of distribution of individual parameters. Spearman's correlation coefficient was used for correlation between individual parameters. Sensitivities and specificities in the control

Table I. Basic descriptive statistics of pathological and control groups.

| | | CRC N=174 | Control N=50 |
|----------------------|----------------------|--------------|-----------------|
| Basic parameters | | | |
| Female | (N/%) | 111/63.8% | 23/46.0% |
| Male | (N/%) | 63/36.2% | 27/54.0% |
| Age (median) | (years) | 66.00 | 50.00 |
| BMI (median) | (kg/m ²) | 27.08 | 28.48 |
| Metabolic status | | | |
| Hyperlipoproteinemia | (N/%) | 50/28.7% | 27/54.0% |
| Diabetes mellitus | (N/%) | 31/17.8% | 0/0.0% |
| Hypertension | (N/%) | 85/48.9% | 19/38.0% |
| CRC location | | | |
| Colon | (N/%) | 81/47.7% | - |
| Rectum and sigmoid | (N/%) | 89/52.4% | - |
| CRC histology | | | |
| Adenocarcinoma | (N/%) | 166/96.4% | - |
| Mucinous | (N/%) | 5/2.9% | - |

group were calculated for optimal reference intervals (cut-off) for individual parameters. Overall survival (OS) and progression-free interval (PFS) were calculated using the Kaplan-Meier method.

Results

Results of all the measured parameters are shown in Table III for both control and CRC patient groups. Correlations between the individual parameters were calculated for both groups separately. Statistically significant correlations are shown in Table IV. For prognosis estimation, the Cox regression model was used and the results for OS are shown in Table V and the results those for PFS is shown in Table VI.

This study was unique based on the number of patients included in this study in early-stage CRC. Most other published data include a high percentage of patients with metastatic CRC. This study is also unique from the point of the large spectrum of the measured parameters. It represents one of the first projects where most of the parameters were measured using multiplexed technology. Most of the data on multiplexed technology are related to ovarian, breast and prostate cancer (21-23). We found a significant increase of CEA in the CRC group. This parameter can be considered as a prognostic factor for PFS but not for OS. CA 19-9 was significantly elevated in the CRC group and is an unfavorable prognostic factor for both PFS and OS. The elevation of TPA may be related to cell mitosis and cytoskeleton disintegration. Elevated levels above cut-off significantly increase the risk for cancer recurrence. It seems that TPA is more specific for CRC than is TPS. Interleukins IL-6 and IL-10 were both significantly elevated in the group of CRC. This supports the theory of their potential inflammatory role in cancer

Svobodova *et al.*: Parameters of Biological Activity in Colorectal Cancer

Table II. Parameters used for laboratory analysis.

| Group | Parameter | Manufacturer | Method | Units |
|----------------------|-------------|-----------------|--------|-------|
| Oncofetal marker | CEA | Beckman Coulter | CLIA | ng/ml |
| Mucinous marker | CA 19-9 | Beckman Coulter | CLIA | IU/ml |
| Cytokeratin marker | TPA | DiaSorin | IRMA | IU/l |
| | TPS | IDL Sweden | IRMA | IU/l |
| Adhesion molecules | I-CAM | Linco-Millipore | xMAP | ng/ml |
| | V-CAM | Linco-Millipore | xMAP | ng/ml |
| Interleukins | IL 6 | Linco-Millipore | xMAP | pg/ml |
| | IL 10 | Linco-Millipore | xMAP | pg/ml |
| MMP inhibitor | TIMP-1 | R&D Systems | EIA | ng/ml |
| Metalloproteinase | MMP-9 | Linco-Millipore | xMAP | ng/ml |
| Angiogenetic factor | VEGF | Linco-Millipore | xMAP | pg/ml |
| Metabolic parameters | C-peptide | Linco-Millipore | xMAP | pM |
| | Insulin | Linco-Millipore | xMAP | pM |
| | Adiponectin | Linco-Millipore | xMAP | µg/ml |
| | Leptin | Linco-Millipore | xMAP | pM |

CLIA: Chemiluminescence immunoassay; EIA: enzyme immunoassay; IRMA: immunoradiometric assay; xMAP: multiplex assay.

Table III. Comparison of parameters of biological activity between colorectal cancer patients (N=174) and control group of healthy individuals (N=50). Wilcoxon test.

| Parameter | Units | Control group N=50 | | | Colorectal cancer group N=174 | | | p-Value |
|-------------|-------|-----------------------|-----------|-----------------|----------------------------------|-----------|-----------------|---------|
| | | Mean | Std. dev. | 95th percentile | Mean | Std. dev. | 95th percentile | |
| CEA | ng/ml | 1.92 | ±1.35 | 4.30 | 5.98 | ±12.58 | 24.10 | 0.0388 |
| CA 19-9 | IU/ml | 8.08 | ±7.72 | 24.90 | 25.03 | ±60.41 | 96.10 | 0.0003 |
| TK | IU/l | 7.22 | ±4.05 | 18.30 | 6.84 | ±9.34 | 22.00 | 0.0021 |
| TPA | IU/l | 24.50 | ±38.37 | 57.00 | 61.87 | ±68.35 | 229.00 | <0.0001 |
| TPS | IU/l | 51.26 | ±52.05 | 172.00 | 82.89 | ±127.14 | 248.00 | 0.0995 |
| I-CAM | ng/ml | 126.88 | ±44.42 | 228.45 | 119.58 | ±49.28 | 219.18 | 0.1566 |
| V-CAM | ng/ml | 1049.25 | ±213.43 | 1463.77 | 1051.65 | ±258.56 | 1504.91 | 0.9944 |
| IL-6 | pg/ml | 3.71 | ±11.69 | 11.52 | 18.14 | ±25.11 | 74.84 | <0.0001 |
| IL-10 | pg/ml | 1.24 | ±1.55 | 3.46 | 10.27 | ±21.02 | 39.21 | <0.0001 |
| TIMP-1 | ng/ml | 145.01 | ±22.79 | 188.20 | 180.16 | ±51.99 | 282.00 | <0.0001 |
| MMP-9 | ng/ml | 468.62 | ±190.12 | 911.67 | 529.10 | ±290.74 | 1033.32 | 0.2646 |
| VEGF | pg/ml | 134.51 | ±83.73 | 324.02 | 209.43 | ±217.19 | 668.61 | 0.1665 |
| C-Peptide | pM | 273.24 | ±167.87 | 546.20 | 590.47 | ±1029.00 | 22.74 | 0.0087 |
| Insulin | pM | 73.55 | ±88.02 | 294.68 | 226.07 | ±625.90 | 1058.40 | 0.0138 |
| Adiponectin | µg/ml | 12.82 | ±4.90 | 25.00 | 17.61 | ±6.51 | 28.87 | <0.0001 |
| Leptin | pM | 509.90 | ±357.73 | 1258.83 | 896.91 | ±1104.00 | 3897.58 | 0.4727 |

development. TIMP-1 was significantly elevated in the CRC group. This is related to its biological proliferative and anti-apoptotic activity. C-Peptide and insulin changes are related to insulin resistance and result in cellular proliferation and apoptosis inhibition. Our results from adiponectin related to the fact that only patients with early stage of CRC were included. Serum levels of adiponectin correlated with prognosis (PFS).

We did not find any significant changes of TPS, adhesion molecules, angiogenetic factors or leptin.

We did find significant differences between the control and CRC groups in correlations between the individual parameters: In the CRC group, there was a correlation between CEA and CA 19-9, TK and CA 19-9, TPA, TPS, TIMP-1 and C-peptide, *i.e.* between all the parameters that play an important role in the process of proliferation. No similar correlation was found in the control group. In the control group, correlations, between cytokeratines and adhesion molecules were found. Correlation between metabolic parameters was found in both groups. There was

Table IV. Statistically significant correlations between individual parameters.

| Correlation | Colorectal cancer | | Control group | |
|-----------------------|-------------------|---------|---------------|---------|
| | r | p-Value | r | p-Value |
| CEA vs. CA 19-9 | 0.33762 | 0.0002 | | NS |
| CEA vs. ICAM | 0.30048 | 0.0009 | | NS |
| CEA vs. C-Peptide | | NS | 0.40191 | 0.0042 |
| TK vs. CA 19-9 | 0.33167 | 0.0032 | | NS |
| TK vs. TPA | 0.62628 | 0.0003 | | NS |
| TK vs. TPS | 0.47800 | 0.0001 | | NS |
| TK vs. TIMP | 0.43420 | 0.0020 | | NS |
| TK vs. IL 10 | | NS | 0.44551 | 0.0012 |
| TK vs. C-Peptide | 0.56949 | 0.0013 | | NS |
| TPA vs. TPS | 0.41444 | 0.0002 | 0.67567 | 0.0001 |
| TPA vs. VCAM | | NS | 0.51118 | 0.0001 |
| TPS vs. VCAM | | NS | 0.61434 | 0.0001 |
| ICAM vs. VCAM | | NS | 0.38724 | 0.0055 |
| TIMP-1 vs. Leptin | 0.40264 | 0.0074 | | NS |
| TIMP-1 vs. Insulin | | NS | 0.36812 | 0.0085 |
| IL6 vs. Adiponectin | 0.41313 | 0.0059 | | NS |
| IL 10 vs. Leptin | | NS | 0.47938 | 0.0004 |
| Leptin vs. BMI | 0.56952 | 0.0001 | 0.53677 | 0.0001 |
| Leptin vs. C-Peptide | 0.54461 | 0.0001 | | NS |
| Leptin vs. Insulin | 0.51235 | 0.0001 | 0.37016 | 0.0081 |
| C-Peptide vs. Insulin | 0.69972 | 0.0001 | 0.54326 | 0.0001 |
| C-Peptide vs. BMI | 0.26885 | 0.0011 | 0.45591 | 0.0009 |
| Insulin vs. BMI | 0.27728 | 0.0007 | 0.49673 | 0.0002 |

Table V. Cox regression model for overall survival (univariate analysis) arranged according to p-value.

| Parameter (unit) | Parameter estimate | Standard error | Hazard ratio | Chi-square | p-Value |
|------------------|--------------------|----------------|--------------|------------|---------|
| N | 0.6774 | 0.2009 | 1.969 | 11.3708 | 0.0007 |
| T | 0.6884 | 0.2416 | 1.991 | 8.1216 | 0.0044 |
| Grading | 0.6408 | 0.2313 | 1.898 | 7.6739 | 0.0056 |
| CA 19-9 (IU/ml) | 0.0037 | 0.0017 | 1.004 | 4.5078 | 0.0337 |
| Age (years) | 0.0422 | 0.0212 | 1.043 | 3.9646 | 0.0465 |

Table VI. Cox regression model for progression-free interval (univariate analysis) arranged according to p-value.

| Parameter (unit) | Parameter estimate | Standard error | Hazard ratio | Chi-square | p-Value |
|---------------------|--------------------|----------------|--------------|------------|---------|
| Age (years) | -0.0681 | 0.2886 | 0.934 | 5.6434 | 0.0183 |
| CA 19-9 (IU/ml) | 0.0046 | 0.0020 | 1.005 | 5.5118 | 0.0189 |
| CEA (ng/ml) | 0.0264 | 0.0120 | 1.027 | 4.8419 | 0.0278 |
| TPA (IU/ml) | 0.0048 | 0.0022 | 1.005 | 4.7413 | 0.0294 |
| Adiponectin (µg/ml) | -0.3561 | 0.1679 | 0.700 | 4.4973 | 0.0339 |
| ICAM (ng/ml) | 0.0095 | 0.0045 | 1.010 | 4.4430 | 0.0350 |

a significant correlation between leptin, C-peptide and insulin in the CRC group. More significant correlations were found between metabolic parameters and BMI in the control group. Based on our results, we can conclude that there are different mechanisms regulating cellular growth between the two groups.

When evaluating the sensitivities and specificities of the individual parameters, we found the best sensitivity to be for IL-10 (higher than 50% at 95% specificity). This could be potentially considered for use as a complementary marker. We found very low sensitivity for CEA and CA 19-9, even at 90% specificity. This fully corresponds to the literature data (19, 20).

Discussion

The article from Hundt *et al.* from 2007 provides a complete review of clinical trials published up to 2007 (7). From this review, it can be seen that there have been many different parameters of biological activity implemented for CRC. Different studies included different sizes of patient groups, different cut-offs of the parameters and different sensitivity and specificity. No official guidelines for the interpretation of such new tests have been issued as yet. Compared to this review article, our clinical study represents one of the largest based on both the size of the patient group and the large spectrum of the parameters. Many discussions have been already published on conventional tumor markers and CRC, therefore we focused on new parameters of the biological activity of tumors.

We found significantly higher serum levels of TIMP-1 in the CRC group. This may be explained by the fact that most of our patients were enrolled in the very early stages of CRC, when TIMP might predominate over the effect of MMP. Data from other clinical studies provide very inconsistent results. Similar results were obtained by Holten-Andersen in 2002 (8). Some authors claim a stimulatory effect of TIMP-1 on cellular growth (9, 10), others describe its inhibitory effects on apoptosis (11, 12).

Metabolic parameters have been studied for many years as risk factors for CRC development (13). The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) has confirmed that insulin resistance (defined by increased C-peptide serum levels) is associated with an increased risk for CRC development (14). Insulin regulates energy metabolism, stimulates cell proliferation and inhibits apoptosis. Elevated circulating serum levels of insulin result in increased bioactivity of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and a decrease in its binding proteins. There have only been few publications about the serum levels of insulin and C-peptide at the time of cancer development. We have found significant differences in the serum levels of insulin and C-peptide between the CRC and control group, but we found no relationship between elevated serum levels and PFS or OS.

Many publications have been dedicated to adiponectin serum level and its relationship to increased risk for CRC. It was proven that the lower the serum level of adiponectin, the higher the risk for CRC development (15). There are only few publications related to the serum level changes in patients with CRC. Our results show that patients with CRC have higher serum levels of adiponectin compared to the healthy control group. This appears to be slightly controversial compared with some literature data. Ferroni *et al.* from 2007 showed that low serum levels are found particularly in advanced CRC and this predicts an increased risk for disease recurrence (16). The median value of our control group corresponds to the median in this publication

(12.4 vs. 13.1 $\mu\text{g/ml}$). Our pathological group of patients with CRC included only patients with early stage CRC; therefore, we also found a low recurrence rate in this group. We also found that the higher the serum level of adiponectin, the better the survival and the lower the risk for disease recurrence. Our finding corresponds to those from another study, where the authors found that adiponectin inhibits growth of cancer cells on tissue cultures *via* AMP-activated protein kinase activation (17). Therefore it seems that serum levels of adiponectin are important for perspective estimate and for estimate of disease stage, although such a test has not been performed routinely. Some publications on the dynamic changes of serum levels in the postoperative period have appeared recently. Low serum levels of adiponectin in the postoperative period increase the risk of postoperative inflammatory complications in CRC (18). There was very low incidence rate of inflammatory complications in own study and no serum levels were measured postoperatively.

Table IV shows all statistically significant correlations, where the *p*-value was lower than 0.01. There was no parameter with a correlation coefficient higher than 0.8000. Based on these results, we can conclude that no parameter could be replaced by another, but the existence of significant correlation supports the theory of a regulatory mechanism between the parameters. Correlation between the parameters of biological activity was found only in the CRC group. In particular, correlation between parameters related to the proliferative activity were found (TK vs. TPA, TK vs. TPS, TPA vs. TPS; see Table IV).

Better correlation between metabolic parameters was found in the healthy control group, but the correlation between leptin and C-peptide or insulin was more significant in the CRC group than in the control group. This is related to the insulin resistance and its potential role in CRC development.

Based on our results, we can conclude that none of the measured parameters fulfills the criteria for use for screening nor for primary diagnosis of CRC. Some of the parameters are important for prognosis estimate: Elevated CA 19-9 is related to an unfavorable prognosis, in terms of cancer recurrence and mortality rate. Angiogenetic factor VEGF represents a prognostic factor important for OS. CEA represents a parameter which is related to disease progression. Interleukins seem to be prospective complementary tumor marker. Adiponectin may be used for estimation of advanced stage of cancer and for estimate of risk of cancer recurrence.

During the past years, many new tests have been developed and introduced for experimental practice for early detection of CRC. But only few have been used for routine clinical practice to date. Knowledge about the biological activity of tumors could potentially help in the whole process from cancer prevention, through primary diagnosis to cancer therapy. It could help to individualize therapy choice at the time of primary diagnosis. This would enable the optimal

health care of the cancer patient. Using the knowledge of the biological activity of tumor in clinical practice should help to restore the natural balance between the stimulatory and inhibitory growth factors.

Acknowledgements

The study was supported by grants MZOVFN2005 and VZ MSM 0021620819.

References

- Boyle P and Leon ME: Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull* 64: 1-25, 2002.
- La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, Maisonneuve P and Levi F: Trends in cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer* 28: 132-235, 1992.
- Pecen L, Topolcan O, Koukalova H, Novak J, Siroky P, Rousarova M, Holubec L Jr., Pikner R, Svobodova S: Epidemiology of colorectal carcinoma in the Czech Republic. *J Tumor Marker Oncol* 15(1): 55-56, 2000.
- Ghesani M, Belgraier A and Hasni S: Carcinoembryonic antigen (CEA) scan in the diagnosis of recurrent colorectal carcinoma in a patient with increasing CEA levels and inconclusive computed tomographic findings. *Clin Nucl Med* 28(7): 608-609, 2003.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Presinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM and Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1988.
- Union Internationale Contre la Cancer: TMN Klassifikation maligner Tumoren. Springer-Verlag, Berlin, pp. 65-69, 1997.
- Hundt S, Haug U and Brenner H: Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systemic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(10): 1935-1953, 2007.
- Holten Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nielsen OW and Soerensen S: Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 8: 156-164, 2002.
- Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G and Reynolds JJ: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to crythroid-potentiating activity. *Nature* 318(6041): 66-69, 1985.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E and Iwata K: Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for wide range of cells. A possible growth factor in serum. *FEBS Lett* 298: 29-32, 1992.
- Gudez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A and Stetler-Stevenson M: *In vitro* suppression of programmed cell death of B-cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Clin Investig* 102: 2002-2010, 1998.
- Li G, Fridman R and Kim HR: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 59: 6267-6275, 1999.
- Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Lukanova A, Biessy C, Dechaud H and Rinaldi S: Serum C-peptide, IGF-1, IGF-binding proteins and colorectal cancer risk in women. *J Natl Cancer Inst* 92(19): 1592-1600, 2000.
- Jenab M, Riboli E, Cleveland RJ, Norat T, Rinaldi S, Nieters A, Biessy C, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Grønbaek H, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Linseisen J, Boeing H, Pischon T, Trichopoulos D, Oikonomou E, Trichopoulou A, Panico S, Vineis P, Berrino F, Tumino R, Masala G, Peters PH, van Gils CH, Bueno-de-Mesquita HB, Ocké MC, Lund E, Mendez MA, Tormo MJ, Barricarte A, Martínez-García C, Dorronsoro M, Quirós JR, Hallmans G, Palmqvist R, Berglund G, Manjer J, Key T, Allen NE, Bingham S, Khaw KT, Cust A and Kaaks R: Serum C-peptide, IGFBP-1 and IGFBP-2 and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 121(2): 368-376, 2007.
- Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC and Mantzoros CS: Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 97(22): 1688-1694, 2005.
- Ferroni P, Palmirotta R, Spila A, Martini F, Raparelli V, Fossile E, Mariotti S, Del Monte G, Buonomo O, Roselli M and Guadagni F: Prognostic significance of adiponectin levels in non-metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 27(1B): 483-489, 2007.
- Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, Endo H, Kato S, Yoneda K and Nozaki Y: Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *Int J Oncol* 34(2): 339-344, 2009.
- Matsuda A, Matsutani Sasajima K, Furukawa K, Tajiri T, Tamura K and Kogo H: Preoperative plasma adiponectin level is a risk factor for postoperative infection following colorectal cancer surgery. *J Surg Res* 157(2): 227-234, 2009.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C and Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 39(6): 718-727, 2003.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C and Topolcan O: Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 43(9): 1348-1360, 2007.
- Vrzalova J, Prazakova M, Novotny Z, Topolcan O, Casova M and Holubec L Jr.: Test of ovarian cancer multiplex xMAP technology panel. *Anticancer Res* 29(2): 573-576, 2009.
- Risk MC and Lin DW: New and novel markers for prostate cancer detection. *Curr Urol Rep* 10(3): 179-186, 2009.
- Kim BK, Lee JW, Park PJ, Shin YS, Lee WY, Lee KA, Ye S, Hyun H, Kang KN, Yeo D, Kim Y, Ohn SY, Noh DY and Kim CW: The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer. *Breast Cancer Res* 11(2): R22, 2009.

Received July 1, 2010

Revised December 21, 2010

Accepted December 22, 2010

3.2.1.2. Cíle pilotní studie karcinomu pankreatu

Cílem této pilotní studie bylo stanovit co nejširší spektrum parametrů u pacientů s karcinomem pankreatu a posoudit eventuální vhodnost některých parametrů pro zavedení do rutinní klinické praxe. V poslední době bylo vyvinuto mnoho různých laboratorních testů a technik, které by měly umožnit časnou detekci nádorového onemocnění. Tato problematika je předmětem intenzivního výzkumu, přesto se však doposud nepodařilo implementovat žádné nové parametry do rutinní klinické praxe.

3.2.1.3. Soubory pacientů pilotní studie karcinomu pankreatu

3.2.1.3.1. Karcinom pankreatu

Do skupiny bylo zařazeno 71 pacientů s karcinomem pankreatu (Medián věku: 63,56±8,88 roků), kterých byl diagnostikován karcinom pankreatu na 1. Chirurgické klinice, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v letech 2010–2012. Vzorky séra byly odebírány před zahájením terapie. Byla odebrána podrobná anamnéza a provedeno klinické vyšetření. U všech byl diagnostikován adenokarcinom pankreatu, bohužel však ve většině případech byl nádor primárně diagnostikován až v pokročilých stádiích – tedy III. a IV. klinické stádium.

3.2.1.3.2. Kontrolní skupina

Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 56 zdravých jedinců (Medián věku: 54,10±8,67). Všichni byli podrobeni podrobnému klinickému vyšetření v Centru preventivní kardiologie, III. Interní kliniky, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. V době odběru vzorku krve u nich nebyla prokázána přítomnost žádného nádorového či zánětlivého onemocnění.

3.2.1.4. Metodika pilotní studie karcinomu pankreatu

Krev pro laboratorní stanovení byla odebírána z v. cubitalis v ranních hodinách po minimálně 8hodinovém lačnění. Získané sérum bylo rozděleno do několika aliquotů a všechny byly ihned hluboce zamrazeny a do doby analýzy uschovány při teplotě -75 °C. Všechny parametry byly stanovovány v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Přehled stanovených parametrů je uveden níže v tabulce č. 22. Byly stanovovány tradiční nádorové markery, které se již dlouhodobě používají v rutinní klinické praxi, dále parametry metabolismu související s inzulínovou rezistencí a další biomarkery, u nichž se předpokládá změny

koncentrace v závislosti na nádorové aktivitě. Metaloproteinázy byly stanovovány za účelem posuzování nádorové agresivity. Některé stanovované parametry souvisejí s genovou expresí. Vzhledem k tomu, že byla většina testů stanovována metodou multiplexové analýzy (technologie xMAP), bylo možné stanovit z každého vzorku séra celou škálu parametrů.

Tabulka č. 22: Přehled parametrů stanovovaných u studie karcinomu pankreatu.

| Biomarker | Unit | Method | Manufacturer |
|-----------|-------|-----------------|---------------------------------|
| CEA | IU/ml | CLIA, Architect | Abbott |
| CA 19-9 | IU/ml | CLIA, Architect | Abbott |
| CA 72-4 | IU/ml | ECLIA, Modular | Roche |
| AFP | μg/l | CLIA, Centaur | Siemens |
| AAT | ng/ml | Nefelometrie | Beckman Coulter |
| IGF1 | ng/ml | ELISA | Mediagnost |
| IGFBP2 | ng/ml | ELISA | Mediagnost |
| IGFBP3 | ng/ml | ELISA | Mediagnost |
| TIMP-1 | ng/ml | ELISA | eBioscience |
| MMP-7 | ng/ml | ELISA | R&D Systems |
| MMP-9 | ng/ml | ELISA | eBioscience |
| MMP-9 BV | ng/ml | ELISA | BioVendor - Labortorni medicína |
| sICAM-1 | ng/ml | ELISA | eBioscience |
| CEACAM | ng/ml | ELISA | Abnova |
| REG1 | ng/ml | ELISA | BioVendor - Labortorni medicína |
| REG3A | ng/ml | ELISA | BioVendor - Labortorni medicína |
| MIC-1 | ng/ml | ELISA | BioVendor - Labortorni medicína |
| OPG | ng/ml | ELISA | BioVendor - Labortorni medicína |
| TFF1 | ng/ml | ELISA | BioVendor - Labortorni medicína |

3.2.1.5. Statistické analýzy pilotní studie karcinomu pankreatu

Statistické analýzy byly hodnoceny pomocí statistického programu S.A.S. software (Statistical Analysis Software) verze 8.02 a programu STATISTICA, verze 5.1. Byly stanoveny základní deskriptivní statistické parametry – průměr, standardní odchylka, medián, minimum a maximum. Pro porovnání distribucí jednotlivých parametrů byl použit párový Wilcoxonův test. Pro korelaci mezi jednotlivými parametry byl použit Spearmanův korelační test. U skupiny zdravých jedinců byly spočítány senzitivity a specificity a pro jednotlivé parametry byly počítány diskriminační meze.

3.2.1.6. Výsledky pilotní studie karcinomu pankreatu

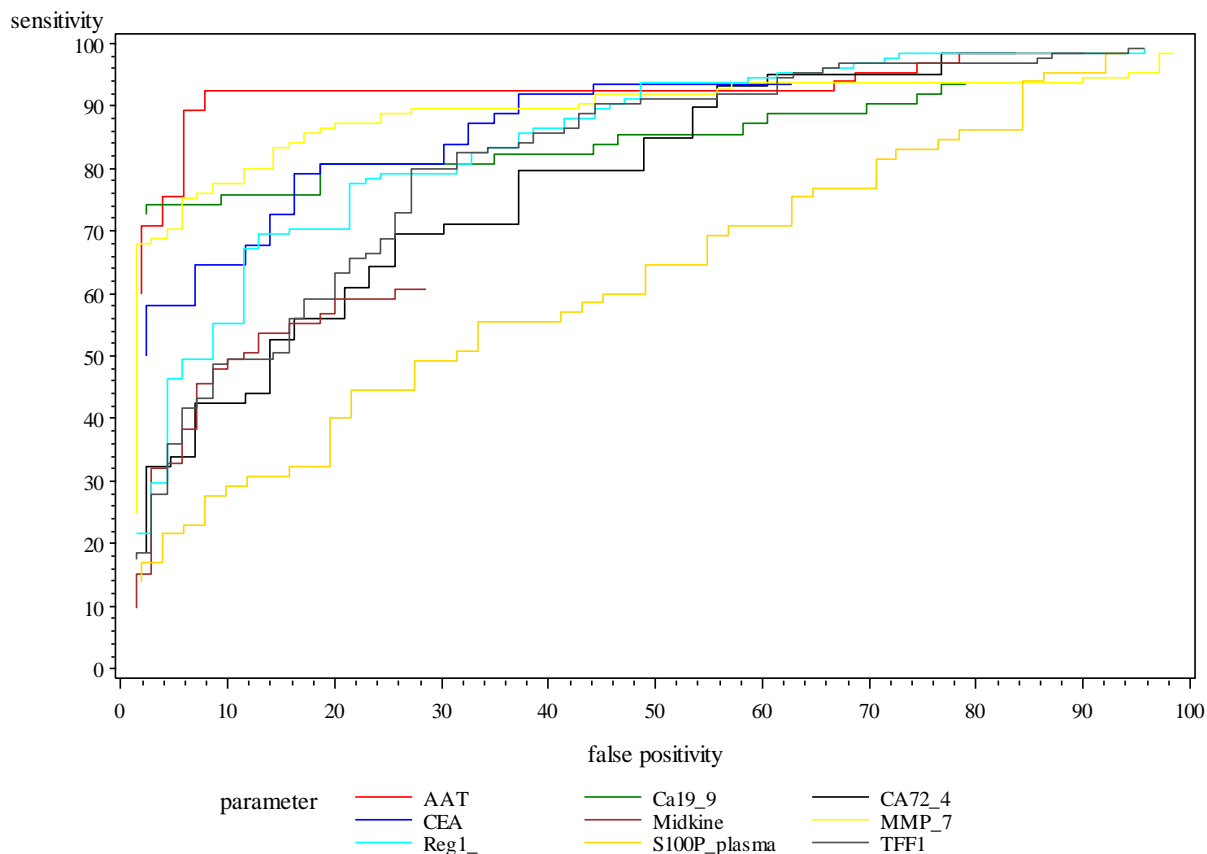
Výsledky všech parametrů jsou přehledně uvedeny níže v tabulce č. 23. Korelace mezi jednotlivými parametry byly u jednotlivých skupiny počítány samostatně.

Tabulka č. 23: Biomarkery u jednotlivých skupin pacientů.

| Parametr | Unit | Karcinom pancreatu N=136 | | | Kontrolní skupina N=71 | | | Z | p-value |
|-------------|-------|-----------------------------|-----------|--------------------------------|---------------------------|-----------|--------------------------------|------------------|-------------------|
| | | Mean | Std. dev. | 95 th percentile | Mean | Std. dev. | 95 th percentile | | |
| CEA | IU/ml | 183,89 | 1 269,61 | 269,90 | 1,01 | 0,61 | 2,27 | -6,46720 | <0,0001 |
| CA 19-9 | IU/ml | 7 956,01 | 26 170,87 | 41 010,00 | 9,38 | 6,08 | 20,60 | -6,21157 | <0,0001 |
| CA 72-4 | IU/ml | 21,87 | 52,14 | 177,30 | 1,91 | 1,94 | 5,66 | -4,78807 | <0,0001 |
| AFP | µg/ | 4,15 | 2,35 | 8,00 | 9,87 | 15,08 | 40,60 | 0,71623 | 0,4769 |
| AAT | ng/ml | 2,21 | 0,53 | 2,95 | 1,41 | 0,23 | 1,86 | -7,86021 | <0,0001 |
| TFF1 | ng/ml | 4,78 | 5,97 | 18,05 | 1,58 | 1,15 | 3,96 | -7,15271 | <0,0001 |
| IGF1 | ng/ml | 133,86 | 70,95 | 261,50 | 184,69 | 46,15 | 257,50 | 4,52779 | <0,0001 |
| IGF2 | ng/ml | 558,08 | 197,91 | 857,80 | 744,72 | 127,62 | 965,70 | 4,967149 | <0,0001 |
| IGFBP1 | ng/ml | 15,11 | 12,35 | 368,00 | 6,67 | 6,58 | 19,50 | -5,32537 | <0,0001 |
| IGFBP2 | ng/ml | 753,82 | 343,09 | 1 356,50 | 330,68 | 142,97 | 569,70 | -6,85454 | <0,0001 |
| IGFBP3 | ng/ml | 2 496,33 | 711,13 | 3 640,50 | 2 695,83 | 411,34 | 3 346,50 | 1,64367 | 0,1030 |
| TIMP-1 | ng/ml | 750,39 | 338,89 | 1 250,00 | 458,13 | 126,64 | 697,90 | -5,21454 | <0,0001 |
| MMP-7 | ng/ml | 2,97 | 2,391 | 9,06 | 0,3914 | 0,341 | 1,39 | -8,936033 | <0,0001 |
| MMP-9 | ng/ml | 243,74 | 278,78 | 668,00 | 140,73 | 124,89 | 301,30 | -2,22771 | 0,0278 |
| MMP-9 | ng/ml | 198,86 | 219,08 | 457,70 | 123,00 | 97,31 | 243,80 | -2,22495 | 0,0280 |
| sICAM | ng/ml | 618,14 | 227,20 | 1 000,00 | 377,07 | 75,93 | 522,30 | -6,02187 | <0,0001 |
| CEACAM | ng/ml | 105,56 | 96,49 | 292,80 | 46,88 | 11,93 | 65,80 | -4,58063 | <0,0001 |
| REG1 | ng/ml | 265,76 | 181,53 | 621,65 | 115,391 | 64,42 | 229,96 | -7,90388 | <0,0001 |
| REG3A | ng/ml | 578,32 | 519,15 | 1 800,00 | 202,83 | 103,51 | 375,70 | -8,21206 | <0,0001 |
| MIC-1 | ng/ml | 5 478,53 | 5 242,33 | 14 784,00 | 1 254,60 | 666,50 | 2 266,00 | -9,99359 | <0,0001 |
| OPG | ng/ml | 8,27 | 2,99 | 13,09 | 4,85 | 1,46 | 8,02 | -6,62203 | <0,0001 |
| TFF1 | ng/ml | 4,78 | 5,97 | 18,05 | 1,58 | 1,15 | 3,96 | -7,15271 | <0,0001 |
| C-peptide | | 0,84 | 0,50 | 1,75 | 0,79 | 0,25 | 1,31 | 0,60378 | 0,5474 |
| Insulin | | 9,10 | 7,120 | 26,359 | 8,70 | 3,81 | 16,04 | 0,65747 | 0,5125 |
| Adiponectin | | 23 824,46 | 12 820,45 | 54 700,00 | 17 303,74 | 7 782,99 | 29 740,00 | -2,97586 | 0,0036 |
| Leptin | | 8,28 | 9,60 | 33,05 | 13,51 | 12,39 | 41,27 | 2,98710 | 0,0034 |
| D vitamin | | 15,86 | 10,14 | 38,75 | 22,46 | 12,22 | 46,50 | 2,68212 | 0,0089 |

Pro vyhodnocení nevhodnějšího parametru k odlišení patologické skupiny byly spočítány ROC křivky – viz níže.

Obrázek č. 17: ROC křivky (Karcinom pankreatu vs, kontrolní skupina).



3.2.1.7. Diskuse k pilotní studii karcinomu pankreatu

Léčba karcinomu pankreatu je úspěšná jedině tehdy, pokud je toto onemocnění primárně diagnostikováno v časných stádiích. U karcinomu pankreatu bylo již zkoušeno mnoho různých parametrů pro primární diagnostiku či pro odhad prognózy, avšak žádný z nich doposud není v rutinní klinické praxi využíván. V mnoha různých pilotních studiích je spousta z nich zkoumána a je snaha najít některé nebo jejich kombinace, které by byly pomocným nástrojem především pro primární diagnostiku časných stádií karcinomu pankreatu.

Zjistili jsme signifikantně zvýšené hodnoty tradičních nádorových markerů (CEA, CA 19-9, CA 72-4 a AFP), což odpovídalo situaci, kdy byli v souboru zařazeni

především pacienti s pokročilým onemocněním a korespondovalo se špatnou prognózou.

V literatuře se dá najít více než 2 500 parametrů, které by se mohly v budoucnu rutinně používat jako biomarkery monitorující průběh onemocnění karcinomem pankreatu.^(Harsha HC, 2009) Některé experimentální studie se zabývají zkoumáním mechanismu karcinogeneze a kaskádového procesu metastazování. Podrobně geny a jejich proteinové produkty popsal Vogelstein již v roce 1988 zejména ve vztahu k metastatickému procesu.^(Vogelstein B, 1998) Podrobné pochopení tohoto složitého procesu má význam nejenom pro zlepšení primární diagnostiky onemocnění, ale především pro vývoj nových terapeutických látek, které by působily na různých úrovních buněčného dělení a růstu nádoru.

Většina námi stanovených parametrů již byla v minulosti sledována ve vztahu k jiným patologickým stavům (například zánětlivé nebo autoimunitní reakce). Proto je též nazýváme spíše jako parametry biologické aktivity či biomarkery.

Regenerating islet-derived protein 1 alpha (REG1A) je protein, který je v literatuře spíše znám pod názvem „islet cells regeneration factor“ (ICRF) nebo „Islet of Langerhans regenerating protein“ (REG). Tento protein patří do skupiny tzv. regenerujících proteinů a je secernován exokrinním pankreatem. Jeho sérové hladiny korelují s regenerací buněk Langerhansových ostrůvků a procesem vzniku diabetu. Mohou se podílet i na vzniku pankreatické litiázy.^(Watanabe T, 1990)

Regenerating islet-derived protein 3 alpha je protein, který je u lidí kódován genem REG3A.^(Dusetti NJ, 1994) Tento gen kóduje proteiny enzymů zevní sekrece pankreatu. Předpokládá se, že se může též podílet na proliferaci a diferenciaci buněk. Zvýšená exprese tohoto genu byla zjištěna u zánětlivých procesů pankreatu či kancerogenního procesu v jaterním parenchymu.

Matrix metalloproteináza 7 (MMP7), známá též pod názvem matrilysin, patří do skupiny Zinek dependentních endopeptidáz MMP7 je primárně exprimován na buňkách žlázoového epitelu na rozdíl od ostatních MMP, které jsou spíše ve stromatu.^(Wilson CL, 1997) Zvýšené sérové hladiny MMP7 korelují s horší prognózou, kratší dobou přežívání a velmi pravděpodobně i velikostí primárního tumoru a výskytem vzdálených metastáz.^(Jones LE, 2004)

Cytokin 14 inhibující makrofágy – Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC1) (Bauskin A.R., 2006) byl určen pomocí genových expresí. Vysoké sérové hladiny v důsledku overexprese příslušného genu byly zjištěny u invazivních typů karcinomu pankreatu. (Ryu B, 2002.)

Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) je jedním ze tří hormonů proteinové povahy, které mají strukturu podobnou inzulinu. Je secernován jaterní buňkou a cirkuluje v krvi. Působí na regulaci buněčného růstu a ovlivňuje mitogenní aktivitu. Růstová aktivita je závislá na somatotropinu. Předpokládá se, že je to hlavní fetální růstový faktor na rozdíl od IGF-1, který je považován za hlavní růstový faktor u dospělých jedinců. (Gallagher EJ, 2010)

TFF1 „trefoil factor“ (TFF) je popisován v souvislosti s epiteliálními buňkami secernujícími muciny. Hraje významnou roli v procesu slizniční obrany a procesu regenerace epitelů poškozených zánětem či iatrogeně léky. Zdá se, že působí jako supresorový faktor u karcinomů žaludku. Overexprese genu pro tento biomarker byla zjištěna i u dalších karcinomů (prsů, kolorektálního karcinomu, prostaty, štítné žlázy i pankreatu). Overexprese genu u karcinomu prsu je příznivým prognostickým faktorem a dá se použít jako prediktivní faktor hormonální terapeutické odpovědi. (Mathelin C, 2005)

Osteoprotegerin (OPG) je rovněž v literatuře znám pod názvem Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) nebo tumour necrosis factor receptor superfamily member 11b (TNFRSF11B). Tento glykoprotein se podílí na regulaci resorpce kostí. (Simonet WS, 1997, Yamaguchi K, 1998)

Metabolické parametry jsou studovány jakožto rizikové faktory pro vznik a vývoj nádorového procesu. (Kaaks R, 2000) Společnost *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)* prokázala, že inzulinová rezistence (na podkladě zvýšených sérových hladin C-peptidu) koreluje se zvýšeným rizikem pro vznik kolorektálního karcinomu. (Jenab M, 2007) Inzulín reguluje energetický metabolismus, stimuluje buněčnou proliferaci a inhibuje apoptózu. Zvýšené hladiny cirkulujícího inzulinu vedou ke zvýšené aktivitě IGF-1 a snižují hladiny vazebných proteinů (binding proteins). Existuje jen pár publikací zabývajících se vztahem mezi sérovými hladinami inzulinu a C-peptidu v době primární diagnostiky nádorového onemocnění. Obdobné mechanismy lze předpokládat i u dalších typů nádorů, včetně karcinomu pankreatu.

Další rutinní parametry byly stanoveny za účelem vyloučení takových klinických stavů, které by mohly ovlivňovat sérové hladiny jednotlivých biomarkerů (například těžká renální insuficience, jaterní selhání či akutní infekce).

3.2.1.8. Závěr pilotní studie karcinomu pankreatu

Na základě našich výsledků musíme konstatovat, že žádný z výše uvedených parametrů nesplňuje kritéria pro použití pro screening či primární diagnostiku karcinomu pankreatu. Avšak výběrem vhodných kombinací jednotlivých parametrů lze docílit významně lepší senzitivity i specifity. Tím by se některá z kombinací mohla stát pomocným nástrojem pro screening ve skupinách populace vysoce rizikových pro vznik karcinomu pankreatu. Dále by použití některých parametrů mohlo přispět k procesu individualizace stanovení prognózy či by mohla sloužit jako pomocný nástroj pro výběr optimální terapie již v době primární diagnostiky, což by umožnilo optimalizaci léčebného procesu. Využití dosavadních znalostí o biologické aktivitě nádoru by mohlo v budoucnu pomoci podpořit znovunastolení přirozeně rovnovážného stavu mezi inhibičními a stimulačními růstovými faktory – tedy postupný přechod od empirické terapie k terapii kauzální.

Tato pilotní studie byla jedinečná z pohledu počtu zařazených pacientů všech zlických stádií karcinomu pankreatu, tak z hlediska široké škály parametrů, což umožnilo především použití moderní technologie multiplexor analýzy. Většina doposud publikovaných obdobných studií, které tuto metodu multiplexor analýzy používala, se týkala spíše nádorů vaječníků, prsu či prostaty.

3.2.2. Hepatocelulární karcinom

3.2.2.1. Cíle pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

Cílem této pilotní studie bylo zhodnotit klinický přínos parametru PIVKA-II jako nového biomarkeru pro diagnostiku hepatocelulárního karcinomu a porovnat ho s AFP, nádorovým markerem, který se běžně používá v rutinní klinické praxi.

3.2.2.2. Soubory pacientů pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

3.2.2.2.1. Jaterní onemocnění

Do této studie bylo zařazeno celkem 332 účastníků. Kritéria vyloučení ze studie zahrnovala následující: hemokoagulační poruchy, poruchy příjmu vitamínu K,

podávání blokátorů vitamínu K, jiný druh nádorového onemocnění, akutní zánětlivé onemocnění, selhání ledvin a jater. Do hlavní skupiny pacientů s hepatocelulárním karcinomem bylo zařazeno 64 pacientů. Ve skupině byla zahrnuta všechna klinická stádia, ale pokročilá stadia byla častější, jak je uvedeno v tabulce č. 24. Do druhé skupiny bylo zařazeno 48 pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. Do třetí skupiny pacientů s benigním onemocněním jater bylo zařazeno 42 pacientů s jaterní cirhózou většinou ethylické etiologie.

3.2.2.2. Kontrolní skupina pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

Kontrolní skupinu tvořilo 178 zdravých jedinců, kteří podstoupili kompletní lékařské vyšetření na Klinice preventivní kardiologie; v době odběru krve nebyly žádné známky rakoviny nebo zánětlivého onemocnění. Seznam skupin pacientů s věkovými charakteristikami je uveden v tabulce č. 24.

Tabulka č. 24: Charakteristika skupin pacientů.

| | Počet | Věk – průměr (min-max) roky |
|--------------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| Hepatocelulární karcinom | 64 | 68,5 (31–83) |
| Stádium I | 6 (9,34 %) | |
| Stádium II | 13 (20,3 %) | |
| Stádium III | 17 (26,6 %) | |
| Stádium IV | 28 (43,8 %) | |
| Metastatický kolorektální karcinom | 48 | 62,5 (34–78) |
| Benigní jaterní onemocnění – cirhóza | 42 | 61,5 (34–80) |
| Kontrolní skupina | 178 | 60,0 (24–86) |
| Celkem | 332 | |

3.2.2.3. Metodika pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

Vzorky krve byly odebrány v době diagnózy před zahájením jakéhokoliv druhu léčby. Vzorky periferní žilní krve byly odebrány pomocí systému odběru krve VACUETTE

(Greiner Bio-one Company, Kremsmünster, Rakousko). Sérum bylo separováno 10minutovou centrifugací při $1\,300 \times g$ a okamžitě zmrazeno na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly rozmrazeny pouze jednou, bezprostředně před analýzami.

Sérové hladiny PIVKA-II byly měřeny pomocí chemiluminiscenčního testu na přístroji Architect 1000i (Abbott, Libertyville, IL, USA) s mezemi detekce a kvantifikace 1,45 a 5,06 mAU/ml; sérové hladiny AFP byly měřeny pomocí chemiluminiscenčního testu Dxl 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Zároveň byly provedeny další laboratorní testy, aby se vyloučila přítomnost klinických stavů, které mohou ovlivnit sérovou hladinu měřených parametrů (například závažné selhání ledvin nebo jater, zánět apod.).

3.2.2.4. Statistické analýzy pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru S.A.S. (Statistical Analysis Software verze 9.2; SAS Institute Inc., Carry, NC, USA). Jsou uvedeny základní popisné statistické parametry (medián, minimum a maximum). Mezní hodnoty byly vypočteny na 95% úrovni specifity, Wilcoxonův dvouvýběrový test byl použit pro porovnání jednotlivých parametrů a hodnota p menší než 0,05 stanovena jako statistická významnost.

3.2.2.5. Výsledky pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

Naměřené výsledky PIVKA-II a AFP jsou uvedeny v tabulce č. 25. Oba biomarkery byly nalezeny při nejvyšších sérových hladinách ve skupině pacientů s hepatocelulárním karcinomem a nejnižší hladiny byly zjištěny v kontrolní skupině.

Tabulka č. 25: Výsledky biomarkerů PIVKA-II a AFP.

| Skupina | N | PIVKA-II (mIA/ml) | | | AFP (IU/ml) | | |
|----------------------------|-----|-------------------|-------|--------|-------------|------|--------|
| | | Medián | Min. | Max. | Medián | Min. | Max. |
| HCC | 64 | 7,727 | 23,23 | 300,00 | 6,50 | 1,00 | 118,14 |
| Metastatický KRK | 48 | 33,75 | 12,51 | 325,50 | 2,00 | 1,00 | 6,00 |
| Benigní jaterní onemocnění | 42 | 121,17 | 20,07 | 563,00 | 8,50 | 1,00 | 25,00 |
| Kontrolní skupina | 178 | 30,09 | 8,15 | 88,50 | 3,00 | 1,00 | 10,00 |

Optimální mezní hodnoty při 95% specifitě jsou uvedeny v tabulce č. 26 pro oba biomarkery. Pro každou posuzovanou skupinu byly stanoveny individuální cut-off hodnoty. Obecně u biomarkeru PIVKA-II byla získána mnohem lepší senzitivita než u AFP a rozdíl byl statisticky významný ve všech srovnáních. Senzitivita PIVKA-II se pohybovala v rozmezí 89,1-96,9 %. PIVKA-II dosáhla nejlepší senzitivity (96,9 %) při odlišení mezi hepatocelulárním karcinomem a kontrolní skupinou s navrhovanou cut-off hodnotou 60 mAU/ml. Senzitivita AFP se pohybovala v rozmezí 34,3-50,0 %. AFP dosáhla nejlepší senzitivity (50,0 %) při porovnání mezi skupinou s hepatocelulárním karcinomem a skupinou s metastazujícím kolorektálním karcinomem s navrhovanou cut-off hodnotou 6 IU/ml.

Tabulka č. 26: Výsledky biomarkerů PIVKA-II a AFP.

| | PIVKA-II | | AFP | | p-Value (Wilcoxonův test) |
|------------------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| | Cut-off (mAU/ml) | Senzitivita (%) | Cut-off (IU/ml) | Senzitivita (%) | |
| HCC vs. kontrolní skupina | 60 | 96,9 | 14 | 37,5 | <0,0001 |
| HCC vs. metastatický KRK | 130 | 95,3 | 6 | 50,0 | <0,0237 |
| HCC vs. benigní jaterní onemocnění | 250 | 89,1 | 21 | 34,4 | <0,0001 |
| HCC vs. všechny skupiny | 290 | 93,8 | 15 | 34,3 | <0,0001 |

3.2.2.6. Diskuse k pilotní studii hepatocelulárního karcinomu

PIVKA-II byla poprvé popsána jako nový biomarker v roce 1996 a používá se od počátku 21. století. Tato pilotní studie představuje první pilotní studii provedenou v České republice v souvislosti s PIVKA-II, která odráží nízkou incidenci tohoto typu

nádorového onemocnění jak v České republice, tak v Evropě jako celku. Proto jsou studie týkající se tohoto biomarkeru velmi vzácné. V letech 2015–2018^(Sultanik P, 2017; Jang ES, 2016; Poté N, 2015; Caviglia GP, 2017; Viggiani V, 2016) bylo v Evropě publikováno jen několik článků. Naše vlastní výsledky velmi dobře korespondují s výsledky francouzských^(Yang JD, 2010; Sultanik P, 2017) a italských studií^(Caviglia GP, 2017). Autoři podobně popisují, že senzitivita a specificita PIVKA-II dosáhla velmi vysokých hodnot a byla významně vyšší než u AFP. Zcela odlišná situace je popsána v asijských populacích. Někteří asijské autoři vykazují buď vyšší senzitivitu a specificitu AFP, nebo velmi podobnou citlivost a specifickou. Tito autoři doporučují použití biomarkeru PIVKA-II pouze pro optimalizaci časných diagnostických procesů. Rozdíl mezi evropskou a asijskou populací může odrážet odlišnou etiopatogenezi karcinomu jater. V asijské populaci se zdá, že virová hepatitida B nebo C je dominantním rizikovým faktorem^(Wang X, 2017; Nguyen-Dinh SH, 2018), ale u evropské populace se karcinom jater vyvine většinou ze steatohepatitidy různé etiologie (alkohol, metabolický syndrom atd.).^(Asrih M, 2015)

V naší pilotní studii jsme pozorovali, že sérové hladiny PIVKA-II ve skupině s hepatocelulárním karcinomem byly významně vyšší než hladiny u kontrolní skupiny, skupiny s benigním onemocněním jater a skupiny metastazujícího kolorektálního karcinomu. Sérové hladiny u pacientů s benigním onemocněním jater byly signifikantně nižší než u pacientů s hepatocelulárním karcinomem – viz tabulka č. 26.

Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanými studiemi.^(Abd EGI, 2014; Ertle JM, 2013) Naše údaje vykazují ještě vyšší citlivost a specificitu ve srovnání s dříve publikovanými údaji.^(Zakhary NI, 2013) Sérové hladiny markeru PIVKA-II ve skupině pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem byly velmi podobné hladinám v kontrolní skupině, AFP dosáhl maximální hladiny 6 IU/ml, a pokud by byl použit společně s PIVKA-II a potenciálně ještě s nějakým dalším biomarkerem, jako je cytokeratin, umožnil by buď potvrzení, nebo vyloučení metastazujícího původu jaterního nádoru. Medián hladiny AFP u hepatocelulárního karcinomu byl nižší než u benigních onemocnění jater. Na základě těchto skutečností předpokládáme, že PIVKA-II může být použita pro primární diagnostiku hepatocelulárního karcinomu, stejně jako pro diferenciální diagnostiku jaterních metastáz. Včasná diagnóza je velmi důležitá v dnešní době, kdy byly do rutinní praxe zavedeny pokročilé chirurgické techniky.^(Třeška V, 2017; Kučera R, 2016; Ludvík J, 2017) Výsledky této pilotní studie prokázaly, že použití tohoto nového biomarkeru by mohlo poskytnout informace o pravděpodobnosti

maligního onemocnění jater s vysokou pravděpodobností. Následné nákladné zobrazovací metody by dále poskytly informace o místě nádoru a rozsahu onemocnění před operací.

3.2.2.7. Závěr pilotní studie hepatocelulárního karcinomu

Na základě výsledků této pilotní studie bylo zjištěno, že ani jeden z biomarkerů nesplňuje potřebná kritéria pro použití při screeningu. Vysoká senzitivita a specificita PIVKA-II by však mohla být přínosná jako další nástroj pro primární diagnostiku hepatocelulárního karcinomu. Další potenciál lze očekávat v diferenciální diagnostice mezi hepatocelulárním karcinomem a jinými benigními onemocněními jater, stejně jako v diferenciální diagnostice mezi primárním hepatocelulárním karcinomem a jaterními metastázami. Mechanismus produkce PIVKA-II u hepatocelulárního karcinomu a dalších typů maligních onemocnění zatím nebyl objasněn.

Tato pilotní studie bude pokračovat zaměřením na počáteční fáze (I a II) hepatocelulárního karcinomu s cílem vyhodnotit jeho potenciální využití při včasné detekci hepatocelulárního karcinomu. Plánuje se též vyhodnocení korelace mezi sérovými hladinami biomarkerů a histologickými nálezy, eventuálně i s výsledky zobrazovacích metod (např. ultrazvuk, PET/CT).

Závěrem lze říci, že nově stanovovaný marker PIVKA-II dosáhl v naší pilotní studii lepší senzitivity než AFP, tradičně používaný marker hepatocelulárního karcinomu, proto by mohlo být vhodné přidat marker PIVKA-II do rutinního panelu nádorových markerů hepatocelulárního karcinomu.

3.2.3. Perspektivy – závěry pro praxi

Na perspektivy využití nádorových biomarkerů je možno se dívat především ze dvou zorných úhlů. Prvním a nejdůležitějším je začít využívat nádorové biomarkery v každodenní rutinní praxi. Nádorové markery by měly být využívány především pro odhalování rizikových faktorů, které vedou ke vzniku komorbidit provázejících metabolický syndrom. Jedná se například u žen o problematiku polycystických ovarií, u obou pohlaví se týká problematiky velice závažné komplikace metabolického syndromu, kterou je nealkoholická jaterní steatóza (NASH). V současné době je alarmující nejen její výskyt. Prevalence se odhaduje až na 25 % u dospělé populace. Závažné jsou především její důsledky, tj. vznik fibrózy s eventuálním následným přechodem v cirhózu a konečné fázi vyústění do nádoru jater. Zde optimální kombinace biomarkerů nejen umožní monitorovat průběh onemocnění, ale monitorovat i efekt terapie. Hlavním cílem léčby tohoto onemocnění je zastavit progresi onemocnění v časně fázi a předejít tak zcela agresivním formám. Podobně by se do běžné rutinní praxe měly dostat biomarkery za účelem časně diagnostiky hepatocelulárního karcinomu a karcinomu pankreatu, jako je např. PIVKA, eventuálně markery chronického zánětu.

Druhou oblastí samozřejmě zůstává využití ve výzkumné praxi. Zde by sledování nádorových markerů mělo především umožnit hlubší pochopení etiopatogeneze nádorového onemocnění, zlepšení znalostí o etiopatogenezi onemocnění a nalezení příčinných vztahů mezi metabolickými změnami v organismu, především metabolismu glycidovém a lipidovém s chronickým zánětem a rozvojem angiogeneze. Nové poznatky v této oblasti výrazně umožní diagnostikovat nádory v časném stadiu současně s odhadem agresivity nádoru a určení prognózy nemocného. Dalším cílem by mělo být souběžně s existujícím rozvojem nových metod molekulární biologie pokračování v nalezení nových indikačních oblastí i pro klasické sérové nádorové markery tak aby bylo možno optimalizovat volbu léčby a optimálně predikovat efekt vysoce nákladné biologické léčby. Navíc tato léčba vede, pokud není cíleně indikována, i k závažným nežádoucím komplikacím s následným významným zhoršením kvality života.

Celkovým obecným smyslem celé naší práce by mělo být to, že veškeré naše snažení musí vést nejenom k celkovému prodloužení života, ale především ke zlepšení jeho kvality.

4. LITERATURA

1. **Abd EGI**, Mossallam GI, Radwan NH, Elzawahry HM, Elhifnawy NM Comparing prothrombin induced by vitamin k absence-II (PIVKA-II) with the oncofetal proteins glypican-3. Alpha fetoprotein and carcinoembryonic antigen in diagnosing hepatocellular carcinoma among Egyptian patients. *J Egypt Natl Canc Inst* 26: 79-85, 2014.
2. **Ahmed A**, Wong RJ, Harrison SA, Nonalcoholic fatty liver disease review: diagnosis, treatment, and outcomes. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015;13(12):2062–70.
3. **Asrih M**, Jornayvaz FR: Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol* 1: 55-65, 2015.
4. **Baj J.**, Brzozowska K., Forma A., Maani A., Sitarz E., Portincasa P, Immunological Aspects of the Tumor Microenvironment and Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:2544.
5. **Baj J.**, Korona-Glowniak I., Forma A., Maani A., Sitarz E., Rahnama-Hezavah M., Radzikowska E., Portincasa P, Mechanisms of the Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumor Microenvironment in Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer, *Cells*, 2020;9:1055,
6. **Bauskin AR**, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, et al, Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer, *Cancer Res*, 2006;66:4983–86
7. **Bergstöm A**, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO, Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe, *Int J Cancer*, 2001 Feb 1;91(3):421-30
8. **Boyle, P.**, Leon, ME, Epidemiology of colorectal cancer, *Br Med Bull*, 2002, 64, p. 1-25
9. **Bråkenhielm E**, Veitonmäki N, Cao R, et al, Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis, *Proc Natl Acad Sci u S A*, 2004;101(8):2476-2481, doi:10.1073/pnas.0308671100
10. **Caviglia GP**, Abate ML, Gaia S, Petrini E, Bosco C, Olivero A, Rosso C, Ciancio A, Pellcano R, Saracco GM, Rizzetto M, Smedile A: Risk of hepatocellular

- carcinoma in HBV cirrhotic patients assessed by the combination of miR-122, AFP and PIVKA-II, *Panminerva Med* 59: 283-289, 2017,
11. **Cummings KM**, Dresler CM, Field JK, Fox J, Gritz ER, Hanna NH, Ikeda N, Jassem J, Mulshine JL, Peters MJ, et al, E-cigarettes and cancer patients, *J Thorac Oncol*, 2014;**9**:438–441,
 12. **De Vita VT**, Vincent T, Hellman S, Rosenberg A: Cancer of the Colon, In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Lippincott - Raven Publishers 1997, 1144-1182,
 13. **Dirix, L, Y.**, Vermeulen, p, b., Hubens, G, et al, Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetic in advanced colorectal cancer, *Ann, Oncol.*, 1999, 7, p, 843-848,
 14. **Duseti NJ**, Frigerio JM, Fox MF, Swallow DM, Dagorn JC, Iovanna JL (Jun 1994), "Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the human pancreatitis-associated protein (PAP) gene", *Genomics* 19 (1): 108–14,
 15. **Dušek L**, Mužík J, Gelnarová E, Fínek J, Vyzula R, Abrahámová J, Cancer incidence and mortality in the Czech Republic, *Klin Onkol*, 2010;**23**(5):311-24
 16. **Dušek L.**, Mužík J., Pavlík T., Májek O., Koptíková J,: Epidemiologie zhoubných nádorů trávicího traktu v České republice - současný stav a predikce, *Gastroent Hepatol* 2012; 66(5): 331-339,
 17. **El-Serag HB**, Hampel H, Javadi F, The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006;**4**(3):369–80,
 18. **Ertle JM**, Heider D, Wichert M, Keller B, Kuper R, Hilgard P, Gerken G, Schlaak JF: a combination of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma, *Digestion* 87: 121-31, 2013,
 19. **Ferlay J**, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2018), *Global Cancer Observatory: Cancer Today*, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [cit, 29, 11, 2019],
 20. **Fernandez E**, La Vecchia C, Porta M, Negri E, Lucchini F, Levi F, Trends in pancreatic cancer mortality in Europe, 1955-1989, *Int J Cancer*, 1994;**57**(6):786-92,

21. **Fukayama M.**, Hayashi Y., Iwasaki Y., Chong J., Ooba T., Takizawa T., Koike M., Mizutani S., Miyaki M., Hirai K, Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach, *Lab Invest*, 1994;71:73–81,
22. **Gallagher EJ**, LeRoith D, The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer, *Trends Endocrinol Metab*, 2010;21:610–618,
23. **Giovannucci E**, Insulin and colon cancer, *Cancer Causes Control*, 1995; 6: 164-79,
24. **Gonzales CA**, Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence, *Br J Nutr*, 2006 Aug;96 Suppl 1:S42-5,
25. **Harsha H, C.**, Kandasamy K., Ranganathan P., Rani S., Ramabadrán S., Gollapudi S., Balakrishnan L., B, Dwivedi S,B., Telikicherla D., ,Selvan L, D, N., Goel R., Mathivanan S., Marimuthu A., Kashyap M., Vizza R,F., Mayer R,J., DeCaprio J,A., Srivastava S., Hanash S,M., Hruban R,H, and Pandey A, a Compendium of Potential Biomarkers of Pancreatic Cancer, *PLoS Med*, 2009 Apr; 6(4): e1000046
26. **Hassan MM**, Curley SA, Li D, Kaseb A, Davila M, Abdalla EK, et al, Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma, *Cancer*, 2010;116(8):1938–46,
27. **Howarda M**, Shapiro, M,D, *Practical Flow Cytometry*, 3, vydání (New York, Wiley-Liss Inc., 1995
28. **Howe LR**, Subbaramaiah K, Hudis CA, Dannenberg AJ, Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer, *Clin, Cancer Res*, 2013;19:6074–83,
29. **Hruban RH**, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP, Update on familial pancreatic cancer, *Adv Surg*, 2010;**44**:293–311,
30. **Hruban RH**, Yeo CJ, Kern SE, The genetic basis of human cancer, In: Vogelstein B, Kinzler KW, eds, *Pancreatic Cancer*, New York, USA: McGraw-Hill;1996: 603-613,
31. **Hsu CC**, Chow WH, Boffetta P, Moore L, Zaridze D, Moukeria A, et al, Dietary risk factors for kidney cancer in Eastern and Central Europe, *Am J Epidemiol*, 2007 Jul 1;166(1):62- 70,

32. **Hursting SD**, Digiovanni J, Dannenberg AJ, Azrad M, Leroith D, Demark-Wahnefried W, Kakarala M, Brodie A, Berger NA, Obesity, energy balance, and cancer: new opportunities for prevention, *Cancer Prev Res*, 2012;5:1260–72,
33. **Christofides A**, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA, The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses, *Metabolism*, 2021;114:154338, doi:10.1016/j.metabol.2020.154338
34. **Ilic M**, Ilic I, Epidemiology of pancreatic cancer, *World J Gastroenterol*, 2016 Nov 28;22(44):9694-9705, doi: 10.3748/wjg.v22,i44,9694, PMID: 27956793; PMCID: PMC5124974,
35. **International Agency for Research on Cancer**, World Health Organization, Global Cancer Observatory 2018; Available from: URL: <http://gco.iarc.fr/>
36. **Iodice S**, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis, *Langenbecks Arch Surg*, 2008;**393**:535–545
37. **Ishaq S.**, Nunn L, Helicobacter pylori and gastric cancer: a state of the art review, *Gastroenterol, Hepatol, Bed Bench*, 2015;8:S6–S14,
38. **Ishikawa M**, Kitayama J, Kazama S, Hiramatsu T, Hatano K, Nagawa H, Plasma adiponectin and gastric cancer, *Clin Cancer Res*, 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):466-72, PMID: 15701829,
39. **Jafri H**, Alsheikh-Ali AA, Karas RH, Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy, *J Am Coll Cardiol*, 2010;55:2846-2854,
40. **Jang ES**, Jeong SH, Kim JW, Choi YS, Leissner P, Brechot C, Diagnostic Performance of Alpha-Fetoprotein, Protein Induced by Vitamin k Absence, Osteopontin, Dickkopf-1 and Its Combinations for Hepatocellular Carcinoma, *PLoS One*, 2016;11(3):e0151069, Published 2016 Mar 17, doi:10.1371/journal.pone.0151069
41. **Jenab M.**, Riboli E., Cleveland RJ., Norat T et al.: Serum C-peptide, IGFBP-1 and IGFBP-2 and Risk of Colon and Rectal Cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, *Cancer* 2007, Jul 15; 121 (2): 368-76

42. **Jones LE**, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT, Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival, *Clin Cancer Res*, 2004;10:2832–2845,
43. **Kaaks R.**, Toniolo P., Akhmedkhanov A, Lukanova A., Biessy C, Dechaud H., Rinaldi S, et al.: Serum C-peptide, IGF-1, IGF-binding proteins and colorectal cancer Risk in Women, *J, Natl, Cancer Inst*, 2000 Oct 4; 92 (19): 1592-600,
44. **Kaušitz, J**, et al.: *Onkológia, Veda*, 2003,
45. **Key TJ**, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC, Diet, nutrition and the prevention of cancer, *Public Health Nutr*, 2004 Feb;7(1A):187-200,
46. **Khatoon J.**, Rai R,P., Prasad K,N, Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: Updates, *World J, Gastrointest, Oncol*, 2016;8:147–158,
47. **Kim J.**, Cho Y,A., Choi W,J., Jeong S,H, Gene-diet interactions in gastric cancer risk: a systematic review, *World J, Gastroenterol*, 2014;20:9600–9610,
48. **Keszei A,P.**, Goldbohm R,A., Schouten L,J., Jakszyn P., Brandt P,A,V,D, Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study, *Am, J, Clin, Nutr*, 2012;97:135–146,
49. **Kucera R**, Topolcan O, Fiala O, Kinkorova J, Treska V, Zedníková I, Slouka D , Simanek V, Safanda M, Babuska V: The Role of TPS and TPA in the diagnostics of distant metastases, *Anticancer Res* 36: 773-777, 2016,
50. **La Vecchia, C.**, Lluccchini, F., Negri, E., Boyle, P., Maisonneuve, P., Levi, F, Trends in Cancer mortality in Europe, *Eur, J, Cancer*, 1992, 28, p, 132-235,
51. **Lauwers G,Y.**, Mullen J,T., Schreiber K,E,C., Chung D,C, Familial Gastric Cancers, *Pathol, Case Rev*, 2014;19:66–73,
52. **Llovet J,M.**, Zucman-Rossi J., Pikarsky E., et al.: Hepatocellular carcinoma, *Nat Rev Dis Primers*, 2016; 2: 16018
53. **Ludvík J**, Duras P, Třeška V, Matoušková T, Brůha J, Fichtl J, Lysák D, Ferda J, Baxa J: Portal vein embolization with contralateral application of stem cells facilitates increase of future liver remnant volume in patients with liver metastases, *Cardiovasc Intervent Radiol* 40: 690-696, 2017,

54. **Machlowska J**, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R, Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies, *Int J Mol Sci*, 2020 Jun 4;21(11):4012, doi: 10.3390/ijms21114012, PMID: 32512697; PMCID: PMC7312039,
55. **Mathelin C**, Tomasetto C, Rio MC, Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions, *Bull Cancer*, 2005 Sep;92(9):773-81, Review, French,
56. **Memba R**, Duggan SN, Ni Chonchubhair HM, Griffin OM, Bashir Y, O'Connor DB, Murphy A, McMahon J, Volcov Y, Ryan BM, et al, The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: a systematic review, *Pancreatology*, 2017;**17**:867–874,
57. **Micucci C**, Orciari S, Catalano A, Hyperglycemia promotes K-Ras-induced lung tumorigenesis through BASCs amplification, *PLoS One*, 2014;9:e105550,
58. **Micucci C**, Valli D, Matakchione G, Catalano A, Current perspectives between metabolic syndrome and cancer, *Oncotarget*, 2016;7(25):38959-38972, doi:10.18632/oncotarget,8341
59. **Midha S**, Chawla S, Garg PK, Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: a review, *Cancer Lett*, 2016;381:269–277,
60. **Mittal S**, El-Serag HB, Sada YH, et al, Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016;14(1):124-31,e1, doi:10.1016/j.cgh,2015,07,019
61. **Moy K,A.**, Fan Y., Wang R., Gao Y,-T., Yu M,C., Yuan J,-M, Alcohol and tobacco use in relation to gastric cancer: a prospective study of men in Shanghai, China, *Cancer Epidemiol, Biomark, Prev*, 2010;19:2287–2297,
62. **Nguyen-Dinh SH**, Do A, Pham TND, Dao DY, Nguy TN, Chen MS Jr.,: High burden of hepatocellular carcinoma and viral hepatitis in Southern and Central Vietnam: Experience of a large tertiary referral center, 2010 to 2016, *World J Hepatol* 10: 116-123, 2018,
63. **Nimptsch K**, Pischon T, Obesity Biomarkers, Metabolism and Risk of Cancer: An Epidemiological Perspective, *Recent Results Cancer Res*, 2016;208:199-217,

64. **Ogurtsova K**, Fernandes JD, Huang Y, et al, IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040, *Diabetes research and clinical practice*, 2017;128:40–50
65. **Pecen, L.**, Topolčan, O., Koukalová, H., Novák, J., Šíroký, 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), p, 55-56,
66. **Philips CA**, Rajesh S, Nair DC, Ahamed R, Abduljaleel JK, Augustine P, Hepatocellular Carcinoma in 2021: An Exhaustive Update, *Cureus*, 2021 Nov 5;13(11):e19274, doi: 10,7759/cureus,19274, PMID: 34754704; PMCID: PMC8569837
67. **Pischon T**, Nöthlings U, Boeing H, Obesity and cancer, *Proc Nutr Soc*, 2008 May;67(2):128-45,
68. **Poté N**, Cauchy F, Albuquerque M, Voitot H, Belghiti J, Castera L, Puy H, Bedossa P,Paradis V: Performance of PIVKA-II for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion, *J Hepatol* 62: 848-854, 2015,
69. **Price AJ**, Allen NE, Appleby PN, Crowe FL, Travis RC, Tipper SJ, Overvad K, Grønbaek H, Tjønneland A, Johnsen NF, Rinaldi S, Kaaks R, Lukanova A, et al, Insulin-like growth factor-I concentration and risk of prostate cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012;21:1531–41
70. **Raimondi S**, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R, Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010;24:349–358,
71. **Ryu B**, Jones J, Blades NJ, Parmigiani G, Hollingsworth MA, Hruban RH, Kern SE, Relationships and differentially expressed genes among pancreatic cancers examined by large-scale serial analysis of gene expression, *Cancer Res*, 2002;62:819–26
72. **Saif MW**, Pancreatic neoplasm in 2011: an update, *JOP*, 2011;12(4):316-21,
73. **Saklayen MG**, The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome, *Curr Hypertens Rep*, 2018 Feb 26;20(2):12, doi: 10,1007/s11906-018-0812-z, PMID: 29480368; PMCID: PMC5866840,

74. **Samokhvalov AV**, Rehm J, Roerecke M, Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: a Systematic Review and a Series of Meta-analyses, *EBioMedicine*, 2015;**2**:1996–2002,
75. **Sia D**, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM, Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis, *Gastroenterology*, 2017 Mar;**152**(4):745-761, doi: 10,1053/j,gastro,2016,11,048, Epub 2016 Dec 30, PMID: 28043904,
76. **Siegel RL**, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics, 2016, *CA Cancer J Clin*, 2016;**66**:7–30,
77. **Simonet WS**, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell*, 1997;**89**(2):309–319, doi: 10,1016/S0092-8674(00)80209-3,
78. **Singh S**, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W, Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis, *The American journal of gastroenterology*, 2013;**108**(6):881,
79. **Stattin P**, Björ O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B, Hallmans G, Kaaks R, Prospective study of hyperglycemia and cancer risk, *Diabetes Care*, 2007 Mar;**30**(3):561-7, doi: 10,2337/dc06-0922, PMID: 17327321,
80. **Stewart SL**, Wike JM, Kato I, et al, , authors, a population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001, *Cancer*, 2006, **107**:p, 1128–41
81. **Sultanik P**, Ginguay A, Vandame J, Popovici T, Meritet JF, Cynober L, Pol S, Bories PN: Diagnostic accuracy of des-gamma-carboxy prothrombin for hepatocellular carcinoma in a French cohort using the Lumipulse(®) G600 analyzer, *J Viral Hepat* **24**: 80-85, 2017,
82. **Svobodova S**, Topolcan O, Holubec L Jr, Levy M, Pecen L, Svacina S, Parameters of biological activity in colorectal cancer, *Anticancer Res*, 2011 Jan;**31**(1):373-8.,

83. **Trayhurn P**, Wood IS, Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue, *Br J Nutr*, 2004 Sep;92(3):347-55, doi: 10,1079/bjn20041213, PMID: 15469638,
84. **Treska V**, Fichtl J, Bruha J, Liska V, Kormunda S, Finek J: Liver resections for colorectal metastases in patients aged over 75 years, *Anticancer Res* 37: 1529-1533, 2017,
85. **Yachida, S.**, Jones, S., Bozic, I., et al, Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer, *Nature*, 2010, 467, p, 1114–1117
86. **Yadav D**, Lowenfels AB, The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer, *Gastroenterology*, 2013;144(6):1252-61
87. **Yamaguchi K**, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor, *J Biol Chem*, 1998;273(9):5117–5123, doi: 10,1074/jbc,273,9,5117
88. **Youn Nam S**, Park BJ, Nam JH, Ryu KH, Kook MC, Kim J, Lee WK, Association of current *Helicobacter pylori* infection and metabolic factors with gastric cancer in 35,519 subjects: a cross-sectional study, *United European Gastroenterol J*, 2019 Mar;7(2):287-296, doi: 10,1177/2050640618819402, Epub 2018 Dec 12, PMID: 31080613; PMCID: PMC6498802,
89. **Younossi Z**, Stepanova M, Ong JP, Jacobson IM, Bugianesi E, Duseja A, et al, Non-alcoholic Steatohepatitis is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2018,
90. **Viggiani V**, Palombi S, Gennarini G, D'Ettorre G, De Vito C, Angeloni A, Frati L, Anastasi E: Protein induced by vitamin k absence or antagonist-II (PIVKA-II) specifically increased in Italian hepatocellular carcinoma patients, *Scand J Gastroenterol* 51: 1257-1262, 2016,
91. **Vogelstein, B.**, Fearon, ER , Hamilton:, Genetic alterations during colorectal-tumor development, *Engl J Med* 1988, 319, p, 525-32,
92. **Wang X**, Zhang W, Liu Y, Gong W, Sun P, Kong X, Yang M, Wang Z: Diagnostic value of prothrombin induced by the absence of vitamin k or antagonist-II (PIVKA-II) for early stage HBV-related hepatocellular carcinoma, *Infect Agent Cancer* 12: 47, 2017,

93. **Wang YT**, Gou YW, Jin WW, Xiao M, Fang HY, Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies, *BMC Cancer*, 2016 Mar 12;16:212, doi: 10,1186/s12885-016-2241-1, PMID: 26968702; PMCID: PMC4788838,
94. **Watanabe T**, Yonekura H, Terazono K, Yamamoto H, Okamoto H (Jun 1990), "Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissues, The gene encode protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene", *J Biol Chem* 265 (13): 7432–9,
95. **Wellen KE**, Hotamisligil GS, Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue, *J Clin Invest*, 2003;112(12):1785-1788, doi:10,1172/JCI20514
96. **WCRFI** 2015, Pancreatic cancer statistics | World Cancer Research Fund International, Available from: URL: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/pancreatic-cancer-statistics>,
97. **Williams CD**, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al, Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study, *Gastroenterology*, 2011;140(1):124–31,
98. **Wolpin BM**, Kraft P, Gross M, Helzlsouer K, Bueno-de-Mesquita HB, Steplowski E, Stolzenberg-Solomon RZ, Arslan AA, Jacobs EJ, Lacroix A, et al, Pancreatic cancer risk and ABO blood group alleles: results from the pancreatic cancer cohort consortium, *Cancer Res*, 2010;**70**:1015–1023,
99. **Wong MCS**, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JJY, Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development, *Sci Rep*, 2017 Jun 9;7(1):3165, doi: 10,1038/s41598-017-02997-2, PMID: 28600530; PMCID: PMC5466634
100. **Zakhary NI**, Khodeer SM, Shafik HE, Abdel Malak CA: Impact of PIVKA-II in diagnosis of hepatocellular carcinoma, *J Adv Res* 4: 539-546, 2013,
101. **Zavoral M**, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M, Molecular biology of pancreatic cancer, *World J Gastroenterol*, 2011;17(24):2897-908,
102. **Zhou JR**, Blackburn GL, Walker WA, Symposium introduction: metabolic syndrome and the onset of cancer, *Am J Clin Nutr*, 2007;86:s817-s819,

103. **Obesity collaborators** GBD, Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years, N Engl J Med, 2017