

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Centrální Isotopová Laboratoř



**KLINICKÝ VÝZNAM BIOMARKERŮ PRO
POSOUZENÍ AGRESIVITY A PROGNOZU
NEMALOBUNĚČNÉHO KARCINOMU PLIC**

Autoreferát disertační práce

Plzeň, 2011

MUDr. Markéta Pražáková

Doktorský studijní program na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Plzni

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorandského studia v imunoanalytických laboratořích na II. interní klinice LF UK v Plzni a ONM-OID FN Plzeň.

Forma studia: kombinovaná

Obor: vnitřní nemoci

Předseda komise pro obhajobu disertačních prací v oboru vnitřní nemoci:
prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Uchazeč: MUDr. Markéta Pražáková

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.
II. interní klinika LF UK v Plzni a ONM-OID FN Plzeň
Dr. E.Beneše 13
30599 Plzeň

Oponenti: Dr. Rafael Molina Porto
Servicio de Bioquímica y Genética Molecular
Hospital Clínic de Barcelona
C/ Villarroel 170
08036 Barcelona
Spain

Doc. MUDr. Ludvíková Marie Ph.D.
Ústav biologie LF UK v Plzni
Karlovarská 48
30166 Plzeň

Autoreferát byl odeslán dne.....

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací v oboru vnitřní lékařství se koná.....

Místo obhajoby: Šafránkův pavilon, LF v Plzni UK, Alej Svobody 31, Plzeň

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova, Husova 3, Plzeň

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 3 -
1. ÚVOD	- 4 -
1.1 STANOVENÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ	- 5 -
2. CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE	- 7 -
3. MATERIÁL A METODIKA	- 8 -
3.1 SOUBORY PACIENTŮ	- 8 -
3.2 METODIKA	- 9 -
3.2.1 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	- 9 -
3.2.2 METODIKA STANOVENÍ	- 10 -
3.2.3 STATISTICKÁ ANALÝZA	- 11 -
4. VÝSLEDKY	- 12 -
5. DISKUZE	- 31 -
6. ZÁVĚRY	- 34 -
7. SUMMARY	- 37 -
8. LITERATURA	- 38 -
9. PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	- 41 -

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ASCO	American Society of Clinical Oncology
AUC	Area under the curve, plocha pod ROC křivkou
CA 125	Carbohydrate antigen 125
CEA	Karcinoembryonální antigen
CK	Cytokeratin
CLIA	Chemiluminescent Immunoassay
CgA	Chromogranin A
Cut off	diskriminační hladina, referenční interval
CT	Počítačová tomografie
CYFRA 21-1	Cytokeratin-19 fragment
DFS	Disease free survival, období bez příznaků onemocnění
EGTM	European Group on Tumor Markers
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IRMA	Immunoradiometric assay
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MEIA	Microparticle enzyme immunoassay
MMP	Matrix metalloproteinase
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry
MT	MonoTotal
NPV	Negative predictive value
NSCLC	Non small cell lung cancer
NSE	Neuron specifická enoláza
OS	Overall survival, celkové přežití bez ohledu na příčinu úmrtí
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PET	Positronová emisní tomografie
PPV	Positive predictive value
ProGRP	Progastrin–releasing peptide
REA	Radioenzymatic assay
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiving operating curve
SCC	Squamous cell carcinoma antigen
SCLC	Small cell lung cancer
SD	Standard deviation, směrodatná odchylka
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2
TK	Thymidinkinasa
TNM	Tumor Node Metastases, klasifikace zhoubných nádorů
TPA	Tkáňový polypeptidový antigen
TPS	Tkáňový specifický polypeptidový antigen
TRACE	Time Resolved Amplified Cryptate Emission
TU M2-PK	Tumor M2 pyruvate kinase
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health organization, Světová zdravotnická organizace
xMAP	Multi-analyte profiling technology, metoda multiplexové analýzy

Disertační práce na téma „Klinický význam biomarkerů pro posouzení agresivity a prognózu nemalobuněčného karcinomu plic“ vznikla díky dlouhodobé spolupráci Imunodiagnostické laboratoře, Chirurgické kliniky, Onkologické kliniky a Plicní kliniky Fakultní nemocnice v Plzni. Studie byla řešena v rámci Výzkumného záměru VZ MSM 0021620819 a v rámci grantu IGA MZ ČR 9343-3.

1. ÚVOD

Karcinom plic je v současnosti nejčastějším zhoubným nádorem u mužů a jeho incidence trvale narůstá u žen. Nově diagnostikované případy karcinomů plic tvoří podle aktuálních údajů celosvětově 13%, v Evropském společenství 29% ze všech maligních nádorů¹. Karcinom plic je agresivní onemocnění, které se odráží v úrovni úmrtnosti, jejíž křivka kopíruje vývoj incidence. Přestože došlo ke zlepšení diagnostických a léčebných postupů, plicní karcinom je stále nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu u mužů a druhou nejčastější příčinou úmrtí u žen po karcinomu prsu. Epidemiologické údaje v České republice (ČR) vykazují podobné trendy jako ve většině rozvinutých zemích, kde dlouhodobě dochází k poklesu incidence i mortality u mužů, zatímco u žen je patrný nárůst obou parametrů. Agresivita karcinomu plic je ještě umocněna tím, že velké množství případů je diagnostikováno až v pokročilém stadiu onemocnění díky chybění klinických symptomů v časných stadiích. V ČR v době stanovení diagnózy má téměř 50% nemocných vzdálené metastázy (klinické stadium IV) a 35% pacientů nádorové postižení uzlin mezihrudí (klinické stadium III). Tomu odpovídá i pětileté přežití, které se pohybuje mírně nad 10%. Alarmující je fakt, že 80% pacientů zemře do roka od primární diagnózy².

Karcinomy plic tvoří dvě významné skupiny nádorů s odlišným biologickým chováním, které je možno definovat pomocí histologické charakterizace: malobuněčné karcinomy plic (small cell lung cancer, SCLC) a nemalobuněčné (non-small cell lung cancer, NSCLC). Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) představuje téměř 80% všech případů karcinomu plic a histologicky se dělí na adenokarcinom, epidermoidní karcinom, velkobuněčný karcinom a malé procento dalších histologických podtypů. Chirurgická resekce nabízí nejlepší šanci na vyléčení, ale pouze 20-30% pacientů (stadium I, II) jsou kandidáty pro chirurgickou intervenci, vykazující 5-leté přežití v časných stadiích přibližně 50-70%³. Nedávné studie ukázaly, že přežití po chirurgické resekcii u pacientů s NSCLC může být zvýšeno systémovou adjuvantní chemoterapií platinovými deriváty, zejména v počátečních stadiích onemocnění, ale kteří pacienti mohou mít prospěch z této léčby není možné přesně určit^{4,5}. Proto je rostoucí potřeba diagnostických nástrojů pro odhad prognózy pacienta, pro sledování průběhu léčby a hodnocení odpovědi na léčbu, které by pomohlo optimalizovat pooperační péči na individuální bázi. Včasná změna léčebné strategie by pak mohla ušetřit čas a náklady, a zabránit, aby byl pacient vystaven zbytečným vedlejším účinkům.

Některé sérové nádorové markery ukázaly značný diagnostický a prognostický potenciál nebo se ukázaly jako užitečné pro sledování systémové léčby a následné pooperační péče u pacientů s NSCLC⁶⁻¹⁰. Sérum pacientů s karcinomem plic s největší pravděpodobností odhalí mnoho dalších proteinů, které mohou být použity jako biomarkery. Bílkoviny, které jsou vylučovány z maligních buněk do

extracelulárního mikroprostředí, jejichž hladiny v séru korelují s proliferací nádorových buněk a / nebo expresí proteinů a zvyšují se v relativně časných stadiích vývoje nádoru, lze považovat za potenciální sérové biomarkery a nové molekulární cíle pro terapeutickou intervenci. Biomarkery zvláštního zájmu jsou ty, které hrají klíčovou roli v progresi nádorového procesu, především pro-angiogenní cytokiny, jako je VEGF, matrix metaloproteinasy a jejich tkáňové inhibitory, růstové faktory, jako je IGF, adhezivní molekuly a další¹¹. Význam mnoha kandidátských biomarkerů v péči o pacienty s NSCLC zůstává nepotvrzený a kontroverzní, a proto některé z těchto nových biomarkerů s nejslibnější profily jsou předmětem této práce.

Cílem dizertační práce bylo sledování biologické aktivity nemalobuněčného plicního karcinomu pomocí širokého spektra parametrů: klasických nádorových markerů, matrix metaloproteináz (MMPs) a jejich tkáňových inhibitorů (TIMPs), pro-zánětlivých a pro-angiogenních cytokinů, růstových faktorů a adhezivních molekul, a stanovit biomarkery, které mohou zlepšit diagnostiku a prognózu nemocných s NSCLC. To by mělo umožnit optimalizovat a individualizovat volbu terapie a schéma dispenzarizace pacientů. Ve svém důsledku by měla tato práce přispět ke zkvalitnění léčebného algoritmu nemocných s NSCLC a zlepšit jejich dlouhodobé přežití.

1.1 Stanovení nádorových markerů a interpretace výsledků

Měření nádorových markerů je v současnosti jednou z nejrychleji rostoucích oblastí v laboratorní medicíně. Nádorový marker může být definován jako molekula označující pravděpodobný výskyt rakoviny nebo poskytující informace o pravděpodobném budoucím chování karcinomu (např. schopnost metastazovat)¹².

Nádorové markery lze charakterizovat jako látky produkované maligními buňkami či organizmem 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 cytozolu nádorové buňky, humorální nádorové markery cirkulující v krvi či v jiných biologických tekutinách lze prokázat pomocí imunoanalytických metod¹³.

Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění neexistuje univerzální nádorový marker. Obdobně senzitivita (správný záchyt nemocných) při dostatečné specificitě (správná negativita u lidí bez nádorového onemocnění) nedosahuje ideálních 100 %. Nezvýšená koncentrace nádorového markeru není tedy ještě důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění, naopak pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat přítomnost zhoubného nádoru. Vztah senzitivity a specificity markerů vyjadřuje ROC křivka (Receiver Operating Characteristics)^{8;13}.

Indikace vyšetření nádorových markerů u karcinomu plic mají své limity. Je třeba brát v úvahu, že se jedná o pomocnou diagnostickou metodu. Pro optimální klinické využití je nezbytná nejen správná volba nádorových markerů, ale především způsob jejich klinického vyhodnocení, které vyžaduje úzkou interdisciplinární spolupráci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem. Pouze tak lze zajistit správnou interpretaci výsledků a eliminovat tak celou řadu nespecifických faktorů, které mohou výsledek vyšetření ovlivnit. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému záchytu recidivy či progresu onemocnění a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který může prodloužit život nemocného. Při dlouhodobém sledování nemocných je nutné vyšetřovat nádorové markery

v pravidelných intervalech, protože nejdůležitějším faktorem, který nás může upozornit na možnou recidivu onemocnění, je dynamika vzestupu nádorových markerů. Z jednoho vyšetření, které je provedeno náhodně, nelze dělat diagnostické závěry, i když se jedná o patologickou hodnotu. I opakovaný vzestup nádorového markeru v rámci referenčního intervalu může znamenat podezření na progresi onemocnění, na rozdíl od hladin, které se nemění, byť jsou již nad rámec referenčních hodnot.

Často opomíjeným faktorem je stanovení předoperačních hodnot nádorových markerů, které může přispět ke stanovení prognosy vývoje nemoci a je nezbytným předpokladem pro kontrolu efektu terapie. Obecně jsou vysoké předoperační hodnoty považovány za nepříznivý prognostický faktor. Ve většině případů s příznivou prognózou dochází po operaci k normalizaci hladin nádorových markerů a naopak při přetrvávajících elevacích je riziko recidivy vyšší než u nemocných s normálními pooperačními hladinami. Odhad prognosy je důležitý z hlediska dalšího sledování pacientů v průběhu follow-up a volby léčebné strategie. Pokud je u pacientů vysoká pravděpodobnost progresu nemoci, měli by být tito pacienti sledováni v průběhu follow-up v kratších časových intervalech a měla by u nich být individuálně volena agresivnější terapie v případě recidivy onemocnění.

Během posledních dvou až tří desetiletí bylo publikováno mnoho prací zabývajících se významem stanovení nádorových markerů u pacientů s karcinomem plic. Pro klinickou praxi má největší význam stanovení CEA (karcinoembryonální antigen), cytokeratinový marker CYFRA 21-1, SCC (antigen skvamozních buněk), NSE (neuron specifická enolasa) a ProGRP (progastrin uvolňující peptid). K dalším markerům, které jsou studovány v souvislosti s plicním karcinomem patří CgA (chromogranin A), markery proliferace, včetně TK (thymidinkinaza) a cytokeratinových markerů MonoTotal, TPA (tkánový polypeptidový antigen) a TPS (tkáňový polypeptidový specifický antigen), CA 125, TU M2-PK (tumor M2- pyruvát kináza), a další.

Jednotlivé histologické typy plicního karcinomu vykazují různou expresi nádorových markerů. Podle doporučení EGTM a NACB jsou vhodnými markery pro malobuněčný karcinom plic NSE a ProGRP a pro nemalobuněčný karcinom plic především CYFRA 21-1, CEA a SCC. Jako doplňkové markery jsou v praxi využívány proliferační markery TPA, TPS, popř. TK a chromogranin A⁷. V řadě publikovaných studií žádný z těchto jmenovaných markerů v porovnání s doporučenými markery nedosahoval lepších výsledků ani v případě předoperačních hodnot, ani v případě stanovení těchto doplňkových markerů v průběhu follow-up.

2. CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE

1. Stanovit široké spektrum biomarkerů v séru nebo plazmě u pacientů s operabilním NSCLC a vyhodnotit a porovnat klinické využití těchto biomarkerů ve třech nejdůležitějších klinických aplikacích u NSCLC:

- diagnostika a posouzení rozsahu onemocnění
- odhad prognózy
- monitorace průběhu onemocnění pro včasný záchyt recidivy a progresu (follow up)

2. Vyhodnotit optimální kombinace biomarkerů pro diagnostiku a prognózu NSCLC.

3. Stanovit vzájemné korelace jednotlivých biomarkerů.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Soubory pacientů

Soubor pacientů s NSCLC. Do studie bylo zařazeno celkem 106 pacientů, u kterých byla provedena radikální operace plic (kompletní R0 resekce) v letech 2004-2007 na Chirurgické klinice FN v Plzni. Z této skupiny bylo pro další analýzu vyřazeno 13 pacientů: 2 nemocní se vzdálenými metastázami (stadium IV.), dále 12 nemocných s jinou nádorovou diagnózou, než NSCLC (2x karcinoid, 4x malobuněčný karcinom plic, 2x sarkom, 2x kombinace malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic, 3x se jednalo o metastázu jiného typu karcinomu do plic). Do vlastní studie bylo zařazeno 93 nemocných s diagnózou NSCLC, stadium I – IIIa. Pacienti byli sledováni na onkologickém pracovišti do prosince 2009 a v případě zjištění progresu, bylo jako datum progresu uvedeno datum prvního klinického vyšetření, kdy byla progresu objektivně prokázána na základě fyzikálního a laboratorního vyšetření a na základě výsledků zobrazovacích metod. Průměrná doba sledování byla 28,2 měsíce (rozmezí 1 až 60 měsíců). U všech pacientů byly sledovány tyto klinické parametry: histologický typ nádoru, TNM klasifikace, stadium tumoru, druh léčby, klinický stav (remise, progresu, stabilizace onemocnění) při sledování a při posledním vyšetření pacienta, a příčina úmrtí. Klinické a laboratorní vyšetření a zobrazovací metody (RTG hrudníku, bronchoskopie, CT, PET / CT, ultrasonografie, event. kostní scan) byly provedeny u všech pacientů před zahájením léčby a během sledování alespoň v půlročních intervalech. Před ukončením vyhodnocení bylo ověřeno, v jakém stádiu onemocnění se pacienti právě nacházejí, či zda-li ještě žijí.

Kontrolní skupina pacientů. Kontrolní skupinu tvořilo 20 nemocných, kteří byli operováni pro benigní onemocnění plic, nejčastěji se jednalo o benigní nádory (hamartom apod.), TBC a pozánětlivé změny (tab.). Jejich průměrný věk (58 let, rozmezí 39 až 68 let) odpovídal průměrnému věku nemocných s NSCLC (62 let , rozmezí 43 až 77 let). Při zařazení žádný z těchto nemocných neměl selhání ledvin, onemocnění jater nebo nezhoubné kožní onemocnění, známé příčiny falešně pozitivních výsledků nádorových markerů.

Základní charakteristika obou souborů pacientů je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 1- Benigní onemocnění plic u kontrolní skupiny pacientů (n= 20)

Benigní onemocnění plic	n
Pozánětlivá fibrosa	5
Tuberculosa	4
Chondrohamartom	4
Interstitiální fibrosa	2
Plicní fibrom	2
Plicní granulom	1
Bronchiální cysta	1
Aspergilom	1

Tabulka 2 – Základní klinickopatologická charakteristika souboru pacientů s NSCLC (n=93) a kontrolní skupiny (n=20)

		Nádorová skupina	Kontrolní skupina
		NSCLC	Benigní onem.
		n (%)	n (%)
Celkem		93 (100)	20 (100)
Věk, roky, median (rozsah)		62 (43-77)	58 (39-68)
Pohlaví	Muži	71 (76.4)	9 (45)
	Ženy	22 (23.6)	11 (55)
Kuřáci	Ano	86 (92.5)	13 (65)
	Ne	7 (7.5)	7 (35)
Histologie	Adenocarcinom	34 (36.6)	
	Epidermoidní karcinom	59 (63.4)	
Stadium	Ia	19 (20.4)	
	Ib	30 (32.3)	
	IIa	4 (4.3)	
	IIb	15 (16.1)	
	IIIa	25 (26.9)	
Follow-up	Disease-free survival Mean (rozsah) měsíce	34.1 (28.5-39.7)	
	Overall survival Mean (rozsah) měsíce	41.4 (36.2-46.5)	
Pooperační léčba	Bez léčby	23 (24.7)	
	Adjuvantní	56 (60.2)	
	Paliativní	14 (15.1)	
Odpověď na léčbu	Remise	45 (48.4)	
	Stable disease	5 (5.4)	
	Progrese	43 (46.2)	
Přežití (prosinec, 2009)	Žijící pacient	48 (51.6)	
	Úmrtí	45 (48.4)	

3.2 Metodika

3.2.1 Odběr a zpracování biologického materiálu

Krev na stanovení sledovaných biomarkerů a doplňujících biochemických parametrů byla odebírána standardně z loketní žíly v ranních hodinách. Sérum a plasma získané z krve centrifugací 1300g 10 min byli skladovány až do analytického stanovení při teplotě -20°C pro stanovení rutinních nádorových markerů, pro stanovení dalších parametrů biologické aktivity nádoru pomocí ELISA metod a metod multiplexové analýzy byla provedena aliquotace vzorků po 500 ul, tento biologický materiál byl pak zamražen k dlouhodobému skladování na -80°C. Vzorky žilní krve byly získány od pacientů před operací, 1-2 týdny po operaci a dále v intervalu 6, 12, 18 a 24 měsíců po operaci (pokud nemocní nezemřeli na progresi onemocnění dříve).

3.2.2 Metodika stanovení

Všechny sledované biomarkery byly stanoveny na Oddělení nukleární medicíny, Úsek Imunoanalýzy FN Plzeň. Pro stanovení biomarkerů v séru nebo plazmě byly použity konvenční immunoanalytické metody (IRMA, REA, CLIA, MEIA, TRACE, ELISA) a moderní metoda multiplexové imunoanalýzy.

Principem multiplexové imunoanalýzy založené na xMAP technologii je vazba antigenu na protilátku navázanou na povrch spektrálně kódovaných mikrokuliček. Množství navázané látky je stanoveno díky druhé protilátce spojené s fluorescenční molekulou. Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru, který určuje jedním laserem spektrální kód kuličky (druh analytu) a druhým laserem množství navázané druhé protilátky (kvantitu analytu). Koncentrace jednotlivých analytů jsou vypočteny na základě standardních kalibračních křivek. Tento postup kombinující imunoanalýzu a průtokovou cytometrii umožňuje simultánní stanovení až 100 analytů v jediném alikvotu vzorku o velmi malém objemu 10–50 mikrolitrů. Tato technologie je dnes využívána v celosvětovém měřítku v projektech zaměřených na studium biomarkerů v onkologii¹⁴. Výhodami této technologie tak je především redukce nákladů na laboratorní stanovení. Určitou nevýhodou je, že současně stanovované analyty se v séru či plasmě musí vyskytovat v podobné koncentraci. Proto některé parametry (např. metaloproteinázy či jejich inhibitory) nemohly být stanoveny současně a bylo nutné je stanovit pomocí metody ELISA. Pomocí metody multiplexové imunoanalýzy byly stanoveny hladiny IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF, ICAM-1, VCAM-1, MMP-9, PAI-1 a MMP-1 v plazmě nebo v séru užitím komerčních diagnostických souprav: Human Cytokine/chemokine Milliplex MAP kit, Human Cardiovascular Disease Panel 1 (obě soupravy od výrobce Linco-Millipore, USA), and Fluorokine MAP Human MMP kit (R&D Systems, USA).

Přehled sledovaných biomarkerů a metod použitých k jejich stanovení je uveden v tabulce 3.

Tab. 3 – Přehled biomarkerů a metod použitých k jejich stanovení

Parametr	Zkratka	Material	Metoda	Výrobce	Jednotky
Thymidine kinase	TK	Serum	REA	Immunotech	IU/L
Carcinoembryonic antigen	CEA	Serum	CLIA	Beckman	ng/ml
Insulin-like growth factor 1	IGF-1	Serum	IRMA	Biosource	ng/ml
Cytokeratin-19 fragment	CYFRA 21-1	Serum	TRACE	Brahms	ng/ml
MonoTotal	MT	Serum	IRMA	IDL	U/L
Tissue polypeptide-specific antigen	TPS	Serum	IRMA	IDL	IU/L
Tissue polypeptide antigen	TPA	Serum	IRMA	DiaSorin	IU/L
Squamous cell carcinoma antigen	SCC	Serum	MEIA	ABBOTT	ng/ml
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	TIMP-1	Plasma	ELISA	R&D Systems	ng/ml
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP-2	Plasma	ELISA	R&D Systems	ng/ml
Matrix metalloproteinase 1	MMP-1	Plasma	LUMINEX	R&D Systems	pg/ml
Matrix metalloproteinase 2	MMP-2	Serum	ELISA	R&D Systems	ng/ml
Matrix metalloproteinase 7	MMP-7	Serum	ELISA	R&D Systems	ng/ml
Matrix metalloproteinase 9	MMP-9	Plasma	LUMINEX	Linco-Millipore	ng/ml
Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1	Serum	LUMINEX	Linco-Millipore	pg/ml
Interleukin 6	IL-6	Serum	LUMINEX	Linco-Millipore	pg/ml
Interleukin 8	IL-8	Serum	LUMINEX	Linco-Millipore	pg/ml
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Serum	LUMINEX	Linco-Millipore	pg/ml
Intracellular adhesion molecule 1	ICAM-1	Plasma	LUMINEX	Linco-Millipore	ng/ml
Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM-1	Plasma	LUMINEX	Linco-Millipore	ng/ml
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI-1	Plasma	LUMINEX	Linco-Millipore	pg/ml
Chromogranin A	CgA	Serum	IRMA	Cisbio	ng/ml

Rovněž byly stanoveny u obou skupin pacientů základní biochemické parametry, aby bylo vyloučeno zařazení pacientů s těžkou jaterní či renální insuficiencí, která má dle literatury významný vliv na zvýšení sérových hladin řady biomarkerů.

3.2.3 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického softwaru SPSS pro Windows (verze 15.0, 2006; Chicago SPSS Inc, USA) a SAS (verze 9.1; SAS Institute, USA). Deskriptivní statistika (průměr, medián, směrodatná odchylka, maximum, minimum) byla počítána u celého souboru pacientů a dále v jednotlivých podskupinách. Vybrané základní statistické údaje byly též zpracovány graficky do grafů typu Box-plot. Porovnání srovnávaných skupin dle různých kritérií (rozlišení mezi remisí a progresí skupinou, mezi NSCLC a benigní kontrolní skupinou, mezi histologickými podtypy) bylo provedeno pomocí Wilcoxonova nepárového testu a Log-rank testu. Byly vypočteny sensitivity (správný záchyt nemocných) při 95% specificitě (správná negativita u lidí bez nádorového onemocnění) pro jednotlivé biomarkery. S cílem určit nejlepší cut-off pro rozlišení mezi benigním plicním onemocněním a NSCLC a mezi progresí a remisí, byly vypočteny ROC křivky (Receiver Operating Characteristics, vyjadřující vztah senzitivity a specificity markerů) a odpovídající plochy pod křivkou (AUC). Pro zjištění závislosti zkoumaných parametrů s ohledem k negausovskému rozdělení těchto proměnných byl použit Spearmanův pořadový korelační koeficient. Pro zjištění vlivu jednotlivých parametrů na délku celkového přežití (overall survival, OS) a bezpříznakového přežití (disease free survival, DFS) byl použit Coxův regresní model a Kaplan-Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití. Byla použita úroveň statistické významnosti 5% (0,05).

4. VÝSLEDKY

Předoperační hladiny biomarkerů u pacientů s NSCLC a u kontrolní skupiny

V tabulce č. 4 je popsána základní deskriptivní charakteristika předoperačních hladin biomarkerů a rozdíly mezi kontrolní skupinou (pacientů s benigním plicním onemocněním) a skupinou pacientů s NSCLC. Pozorovali jsme statisticky významně vyšší hladiny biomarkerů Cyfra 21-1, TPA, TPS, MonoTotal, SCC a TIMP-1 ve skupině pacientů s NSCLC oproti kontrolní skupině.

Předoperační hladiny markerů ve vztahu k histologickému typu NSCLC

V rámci skupiny NSCLC jsme zjistili rozdíly ve vztahu k histologii s výrazně vyššími hladinami nádorových markerů Cyfra 21-1, TK, MonoTotal a SCC u epidermoidního karcinomu v porovnání s adenokarcinomem. Výrazně vyšší hladiny CEA a Cyfra 21-1 byly pozorovány u adenokarcinomu ve srovnání s benigní skupinou. Pacienti s epidermoidním karcinomem měli výrazně vyšší hladiny Cyfra 21-1, TPA, TPS, MonoTotal, SCC, TIMP-1 a IL-6 ve srovnání s benigní skupinou.

Předoperační hladiny markerů ve vztahu ke stadiu NSCLC

Tabulky 5,6 ukazují korelaci předoperačních hladin nádorových markerů se stadiem onemocnění. Je zajímavé podotknout, že podstatně vyšší předterapeutické hladiny markerů TPA a MonoTotal byly stanoveny u pokročilejších stádií onemocnění u pacientů s epidermoidním karcinomem, III vs I, TPA ($p = 0,0404$), MonoTotal ($p = 0,0140$). U pacientů s pokročilou fází adenokarcinomu byly pozorovány významně vyšší hladiny CEA (III vs I, $p = 0,0474$).

Předoperační hladiny markerů ve vztahu k velikosti nádoru (T)

Předoperační hladiny CEA, Cyfra 21-1, TPA, TK, MonoTotal, MMP-9 a MCP-1 byly signifikantně vyšší u větších nádorů (T4) v porovnání s menšími (T1), T4 vs. T1, $p = 0,0414$, $p = 0,0156$, $p = 0,0057$, $p = 0,0370$, $p = 0,0077$, $p = 0,0156$, $p = 0,0379$, resp. Tyto rozdíly byly zjištěny u pacientů s NSCLC a kromě TK a MMP-9 u pacientů s epidermoidním karcinomem, T4 vs T1, CEA ($p = 0,0351$), Cyfra 21-1 ($p = 0,0291$), TPA ($p = 0,0128$), MonoTotal ($p = 0,0240$) a MCP-1 ($p = 0,0196$). Nebylo možné zjistit statisticky významné rozdíly u pacientů s adenokarcinomem, vzhledem k nízkému počtu pacientů s adenokarcinomem a velkou velikostí nádoru (T3, T4).

Předoperační hladiny biomarkerů u pacientů s NSCLC ve srovnání s kontrolní skupinou: hodnocení sensitivity a specificity

Tabulka 7 ukazuje hodnoty cut off (hraniční hodnoty nádorového markeru) a sensitivity biomarkerů při 95% specificitě pro primární diagnostiku NSCLC získané porovnáním pacientů s benigním onemocněním plic a NSCLC. Na obrázcích 1,2 jsou zobrazeny ROC křivky biomarkerů s nejvyšší sensitivitou (Cyfra 21-1, TPA, MonoTotal, IL-6 a CEA) pro rozlišení mezi NSCLC diagnózou a benigním onemocněním plic. Plocha pod ROC křivkou (AUC) vyšší než 0,70 byla stanovena u cytokeratinových markerů Cyfra 21-1, TPA a MonoTotal.

Tabulka 8 ukazuje hodnoty cut off, sensitivity biomarkerů při 95% specificitě pro histologickou diagnózu NSCLC získané porovnáním pacientů s benigním onemocněním plic a histologických podtypů NSCLC. Nejvyšší sensitivity při 95% specificitě pro diagnózu epidermoidního karcinomu byla pozorována u markerů Cyfra 21-1, TPA a IL-6 (63,6%, 42,6% a 41,8%, v uvedeném pořadí). Nejvyšší sensitivity

při 95% specifitě pro diagnózu adenokarcinomu byla pozorována u markerů CEA a Cyfra 21-1 (46,7% a 36,7%, v uvedeném pořadí).

Kombinace biomarkerů pro zvýšení sensitivity pro diagnosu NSCLC

V naší studii jsme zjistili, že nejlepší kombinace biomarkerů pro rozlišení mezi benigním plicním onemocněním a NSCLC bylo dosaženo použitím CEA, Cyfra 21-1, IL-6 a VEGF, s 75,6% senzitivitou, specifitou 86,7%, a s vysokou pozitivní prediktivní hodnotou 97%. Po vyloučení CEA sensitivity byla snížena na 65,9% s 93% specifitou a pozitivní prediktivní hodnotou 98,2%.

CYFRA (>2,0 ng/mL) + CEA (>3,7 ng/mL) + IL6 (>9,8 pg/mL) + VEGF (>405 pg/mL)

- Sensitivity (One or more positive):	76,5%
- Specificity (All negative):	86,7%
- PPV:	97,0%
- NPV:	37,5%

CYFRA (>2,0 ng/mL) + IL6 (>9,8 pg/mL) + VEGF (>405 pg/mL)

- Sensitivity (One or more positive):	65,9%
- Specificity (All negative):	93,0%
- PPV:	98,2%
- NPV:	31,0%

Hladiny biomarkerů v průběhu follow-up

Cílem sledování nádorových markerů v průběhu dispenzární péče (follow-up) je včasná diagnostika recidivy nebo progresse onemocnění. Hodnoty biomarkerů získané při sledování pacientů s NSCLC byly rozděleny do remisní a progresní skupiny podle klinického stavu pacienta v době odběru krve.

V tabulce 9 je popsána základní deskriptivní charakteristika remisních a progresních hodnot a rozdíly mezi remisními a progresními hodnotami. Hladiny markerů CEA, Cyfra 21-1, TPA, TPS, TK, MonoTotal, SCC, Chromogranin, TIMP-1, MMP-1, MMP-7, MCP-1, IL-6, VEGF, a ICAM-1 byly významně vyšší u pacientů s progresí onemocnění. V době progresse byly signifikantně vyšší hladiny CEA nalezené u adenokarcinomu a signifikantně vyšší hladiny SCC u epidermoidního karcinomu (Tabulka 10))

Tabulka 11 obsahuje ROC analýzy hladin biomarkerů stanovených během follow up. Tato tabulka ukazuje hodnoty cut off a sensitivity biomarkerů při 95% specifitě pro diagnózu progresse u pacientů s NSCLC. Na obrázku 2 jsou zobrazeny ROC křivky biomarkerů s nejvyšší senzitivitou (MonoTotal, Cyfra 21-1, CEA a TPA) pro detekci progresse. Plocha pod ROC křivkou (AUC), vyšší než 0,70 byla zjištěna u všech rutinních markerů a TIMP-1, MMP-1, MMP-7, MCP-1, IL-6 a VEGF.

Vzájemné korelace biomarkerů

Byly vypočítány vzájemné korelace mezi jednotlivými biomarkery u pacientů s NSCLC, u kontrolní skupiny a v průběhu follow-up. V tabulce 12 jsou uvedeny pouze statisticky významné korelace včetně Spearmanova korelačního koeficientu (r), podrobný komentář je v kapitole „Závěry“.

Prognostický význam biomarkerů ve vztahu k bezpříznakovému (DFS) a celkovému (OS) přežití u nemocných s NSCLC

Tabulky 13-17 zobrazují univariační a multivariační analýzu předoperačních hodnot biomarkerů a hlavních klinických a patologických parametrů (stadium a velikost nádoru, nádorové postižení lymfatických uzlin, histologický typ nádoru) týkající se doby dogrese (DFS) a celkového přežití (OS). Proměnné, které byly významnými prediktory přežití ($p < 0,05$) v univariační analýze byly hodnoceny v multivariační analýze s cílem určit vliv těchto proměnných na přežití. Obrázky 3,4 zobrazují Kaplan Meierovy křivky pro biomarkery a klinickopatologické parametry, které byly vyhodnoceny jako významné prediktory pro bezpříznakové (DFS) a celkové (OS) přežití.

Významný vztah s DFS prostřednictvím univariační analýzy ukázali MonoTotal, TPA, MMP-2, MMP-7, CEA, TPS a MMP-1. Také stadium tumoru a velikost nádoru (T), byly významně spojené s DFS. Stepwise varianta Coxova multivariačního modelu vybrala MonoTotal a MMP-2 jako nezávislé prediktory DFS. Multivariační analýza DFS podle histologie: u adenokarcinomu pouze MMP-2, u epidermoidního karcinomu pouze MonoTotal jsou nezávislými prediktory pro DFS. Cox multivariační model s použitím cut off ukázal sdružení jednoho cytokeratinu (TPA nebo MonoTotal) jedné MMP (MMP-1 a MMP-7) a stadia tumoru jako nezávislé prognostické faktory pro bezpříznakové přežití.

Významný vztah s OS prostřednictvím univariační analýzy ukázali MonoTotal, CEA, TPA, TPS, Chromogranin A, MMP-7 a MCP-1. Také stadium tumoru, velikost nádoru (T) a šíření do lymfatických uzlin (N) byly významně spojené s OS. Stepwise varianta Coxova multivariačního modelu vybrala MonoTotal, N a MMP-7 jako nezávislé prediktory OS. Multivariační analýza OS podle histologie: u adenokarcinomu pouze CEA, u epidermoidního karcinomu pouze MonoTotal jsou nezávislými prediktory pro OS. Cox multivariační model s použitím cut off ukázal sdružení jednoho cytokeratinu (TPA nebo MonoTotal), MMP-7, MCP-1, chromograninu A a stadia tumoru jako nezávislé prognostické faktory pro celkové přežití.

	Control group (n=20)				NSCLC (presurgery) (n=93)				p value		
	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median		Minimum	Maximum
CEA	2,2	1,2	1,9	1,0	6,4	22,7	120,2	2,4	0,8	1.072,0	nss
CYFRA 21-1*	1,0	0,6	0,9	0,1	2,5	5,6	10,3	2,2	0,4	64,6	<0,0001
TPA*	36,2	21,5	29,0	10,0	71,0	82,4	72,8	61,5	10,0	409,0	0,0017
TPS*	58,6	34,8	62,0	10,0	138,0	106,2	108,4	91,0	10,0	768,0	0,0318
TK	7,9	4,3	7,3	1,5	16,1	8,5	7,9	6,2	1,8	50,2	nss
MonoTotal*	98,8	56,0	93,0	22,3	218,3	261,2	361,1	155,2	10,4	2.167,8	0,0028
SCC*	0,8	1,1	0,2	0,2	4,8	1,7	4,5	0,7	0,1	38,2	0,0427
Chromogranin A	87,8	176,8	37,3	12,5	754,7	74,2	91,2	49,6	10,6	563,7	nss
IGF-I	369,7	138,6	324,8	131,9	591,2	343,6	124,9	328,4	137,9	686,7	nss
TIMP-1*	116,3	38,0	106,5	74,1	208,2	138,3	41,2	134,2	59,1	267,8	0,0255
TIMP-2	74,6	20,6	74,7	46,7	113,1	72,2	19,9	68,6	40,1	123,9	nss
MMP-1	506,8	309,5	520,1	35,7	1.285,0	714,1	803,9	415,6	35,7	3.629,8	nss
MMP-2	174,6	38,5	168,8	111,0	275,8	177,3	43,7	177,2	106,5	296,1	nss
MMP-7	5,0	1,7	4,6	2,6	9,2	5,9	2,5	5,2	2,5	16,8	nss
MMP-9	134,2	83,5	100,4	43,7	364,8	188,3	152,5	144,8	29,3	848,5	nss
MCP-1	445,5	506,1	204,5	77,0	1.760,1	329,3	354,2	207,0	39,5	2.188,1	nss
IL-6	75,1	272,6	3,5	3,2	1.060,6	48,0	128,8	5,5	3,2	765,0	nss
IL-8	91,2	208,7	21,0	3,2	828,8	166,2	559,3	14,7	3,2	4.078,8	nss
VEGF	357,2	812,9	135,3	26,4	3.482,2	280,8	308,8	168,6	16,0	1.595,5	nss
ICAM-1	137,4	93,6	111,5	55,1	459,3	133,8	55,3	121,8	54,7	327,2	nss
VCAM-1	1.141,9	248,0	1.155,7	662,1	1.538,4	1.038,9	319,2	1.029,6	244,9	1.694,9	nss
PAI-1	44.533,0	19.884,2	42.858,3	15.318,9	82.614,9	44.660,8	23.424,6	41.893,7	10.386,1	126.892,4	nss

Tabulka 4- Základní deskriptivní charakteristika biomarkerů u NSCLC pacientů a kontrolní skupiny – předoperační hodnoty .

	Stage I. (n=27)					Stage II. (n=13)					Stage III. (n=19)				
	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum
CEA	4,5	7,8	2,3	1,0	41,3	3,6	4,6	2,3	0,8	16,4	70,7	252,7	1,9	0,8	1.072,0
CYFRA 21-1	5,2	9,2	2,3	0,5	40,1	5,6	5,3	4,7	0,8	18,5	10,0	17,0	3,2	1,0	64,6
TPA*	63,3	45,7	56,0	10,0	190,0	106,4	75,5	74,0	10,0	239,0	110,7	83,0	85,0	27,0	290,0
TPS	81,3	45,1	86,0	10,0	166,0	184,1	228,0	118,0	10,0	768,0	116,9	65,8	102,5	41,0	277,0
TK	8,4	8,9	7,0	2,5	50,2	8,6	6,0	6,5	3,7	21,8	11,4	10,7	8,6	2,8	49,4
MonoTotal*	242,8	408,7	132,1	60,0	2.167,8	295,1	249,3	191,5	23,6	859,0	400,8	464,0	200,7	59,8	1.861,8
SCC	2,8	7,2	1,1	0,1	38,2	2,0	3,4	1,0	0,1	11,6	1,9	3,0	0,8	0,2	12,2
Chromogranin A	56,0	45,8	42,6	16,2	248,9	83,9	85,0	61,9	10,6	306,9	79,4	124,5	51,5	22,1	563,7
IGF-1	354,9	116,5	350,3	137,9	605,2	376,9	148,3	339,4	209,4	686,7	341,9	152,5	282,9	185,9	670,9
TIMP-1	134,3	39,1	134,3	72,6	227,3	161,0	45,5	150,2	99,3	245,0	148,2	38,9	137,0	112,0	267,8
TIMP-2	72,6	19,6	68,4	40,1	123,9	71,1	16,9	68,1	48,5	102,5	73,1	22,1	73,1	40,5	118,2
MMP-1	748,5	987,8	409,2	35,7	3.629,8	838,7	1.018,0	368,5	70,4	3.173,0	863,2	770,1	609,1	54,2	2.659,8
MMP-2	175,3	33,5	177,8	106,5	243,8	165,6	35,3	167,3	119,5	223,2	190,6	59,6	187,3	114,0	296,1
MMP-7	5,7	2,2	5,2	2,6	12,2	5,2	2,2	5,4	2,6	9,1	7,0	3,5	5,3	3,9	16,8
MMP-9	211,0	173,6	173,4	40,5	739,0	173,2	119,6	137,3	29,3	405,6	155,8	97,8	134,0	47,2	383,8
MCP-1	347,6	388,2	187,8	39,5	2.000,0	223,4	163,3	177,5	64,8	620,8	403,3	494,8	211,4	76,5	2.188,1
IL-6	67,7	166,6	7,3	3,2	765,0	12,9	18,5	5,6	3,2	62,6	28,3	41,4	12,1	3,2	141,8
IL-8	147,5	415,8	14,2	3,2	1.750,9	301,1	624,7	10,7	3,2	2.000,0	108,9	352,5	18,4	3,2	1.513,2
VEGF	326,8	365,3	189,7	16,0	1.595,5	153,5	116,1	115,6	74,8	470,8	223,7	170,8	163,2	16,0	748,3
ICAM-1	135,0	50,1	127,3	54,7	257,3	136,6	54,1	113,7	61,9	225,5	148,8	73,3	147,7	64,9	327,2
VCAM-1	1.049,8	303,8	986,4	662,8	1.694,9	1.005,9	305,8	1.053,8	550,5	1.502,6	999,3	348,2	1.018,8	244,9	1.634,0
PAI-1	45.666,1	20.319,7	43.267,9	16.357,0	90.351,1	34.897,1	16.848,6	34.850,0	12.000,2	70.347,7	47.812,4	21.369,1	48.316,5	16.990,8	80.810,7

Tabulka 5- Základní deskriptivní charakteristika biomarkerů ve vztahu ke stadiu onemocnění u epidermoidního karcinomu (n= 59)

	Stage I (n=22)					Stage II (n=6)					Stage III (n=6)				
	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum
CEA*	6,1	11,0	3,1	0,8	47,8	16,4	30,7	4,7	0,9	78,8	57,8	115,6	5,0	2,4	284,4
CYFRA 21-1	2,6	2,3	1,7	0,4	7,9	6,8	13,5	1,4	0,5	34,3	1,4	0,5	1,5	0,8	2,1
TPA	78,3	58,9	63,0	13,0	228,0	93,7	155,5	36,0	11,0	409,0	44,0	30,7	38,0	14,0	86,0
TPS	99,3	54,3	103,0	11,0	174,0	133,3	212,2	32,0	10,0	550,0	39,6	44,2	21,0	10,0	117,0
TK	6,5	5,3	5,3	1,8	25,1	7,0	3,9	5,8	2,8	13,9	7,0	6,0	3,5	3,2	17,2
MonoTotal	159,0	93,6	130,9	10,4	384,7	310,3	553,6	108,1	19,8	1.435,0	119,5	66,4	84,9	66,0	219,1
SCC	0,6	0,5	0,5	0,1	2,0	0,5	0,3	0,5	0,2	0,9	0,5	0,5	0,2	0,2	1,2
Chromogranin A	93,9	117,3	49,4	16,6	405,9	90,0	98,4	53,9	38,2	289,7	44,2	17,9	41,6	24,2	71,6
IGF-1	341,1	83,5	326,3	211,6	459,1	279,7	157,7	269,8	141,2	438,1	303,0	162,8	276,0	160,7	499,2
TIMP-1	128,8	42,2	117,1	73,0	239,7	141,4	39,7	157,1	71,0	173,4	109,2	36,7	113,1	59,1	159,8
TIMP-2	67,1	16,0	67,2	46,0	102,5	82,8	22,2	88,5	47,5	103,6	75,4	30,8	76,0	42,2	122,9
MMP-1	470,7	338,4	316,8	84,6	1.056,3	1.020,6	805,0	856,1	62,7	2.333,3	250,5	305,9	101,9	35,7	776,5
MMP-2	176,3	40,7	171,8	115,3	278,4	164,8	35,7	168,1	115,3	216,0	182,9	66,3	159,8	113,0	290,1
MMP-7	5,8	2,2	4,8	2,9	11,4	5,5	1,5	5,9	2,5	6,8	4,4	2,3	3,2	2,5	7,7
MMP-9	201,4	201,0	147,0	33,3	848,5	209,4	137,2	160,3	84,6	391,9	140,6	73,5	118,3	62,8	259,7
MCP-1	321,9	263,3	217,7	47,9	941,9	372,0	329,7	250,2	94,3	956,2	152,3	100,7	105,8	46,1	283,9
IL-6	41,4	106,9	3,6	3,2	415,0	130,5	265,9	4,3	3,2	667,5	7,7	9,0	3,2	3,2	23,7
IL-8	245,0	929,8	8,9	3,2	4.078,8	31,3	35,2	17,7	4,3	100,0	65,7	122,3	5,1	4,1	283,4
VEGF	326,0	378,5	168,6	39,6	1.551,2	413,9	393,8	287,3	130,0	1.199,1	161,4	134,7	86,3	58,4	357,8
ICAM-1	119,1	47,0	102,2	55,1	200,2	130,1	50,9	126,4	61,2	207,7	125,8	53,7	136,3	58,0	186,1
VCAM-1	1.063,6	305,7	1.097,0	533,6	1.627,6	921,7	383,9	984,3	263,2	1.394,9	1.239,8	349,7	1.408,5	841,1	1.541,3
PAI-1	48.128,8	26.174,7	42.586,8	10.386,1	126.892,4	57.473,2	37.736,6	48.685,1	20.705,9	124.547,7	19.553,7	7.251,4	17.672,0	12.778,4	29.891,6

Tabulka 6- Základní deskriptivní charakteristika biomarkerů ve vztahu ke stadiu onemocnění u adenokarcinomu (n= 34)

	Sensitivity 95% specificity (%)	95% CI (%)	AUC	Cut off	PPV (%)	NPV (%)	RR
CEA	34,1	21,7	0,607	3,7	96,7	24,3	1,27
CYFRA 21-1	54,1	38,5	0,800	2,0	97,9	29,1	1,38
TPA	39,3	27,9	0,732	69,0	97,1	26,1	1,31
TPS	30,6	18,8	0,665	121,0	96,3	21,3	1,22
TK	11,8	4,5	0,459	13,8	76,9	17,6	1,12
MonoTotal	32,9	20,7	0,730	200,7	96,6	21,9	1,23
SCC	16,5	8,2	0,655	1,8	93,3	18,4	1,08
Chromogranin A	8,3	2,2	0,614	225,9	87,5	17,2	1,05
IGF-I	5,2	1,5	0,437	565,3	75,0	16,7	0,90
TIMP-1	13,1	5,4	0,668	183,3	91,7	18,9	1,13
TIMP-2 ^a	11,9	4,5	0,531	48,6	75,0	17,3	0,90
MMP-1	22,6	12,5	0,497	917,3	95,0	20,7	1,19
MMP-2	14,1	6,1	0,522	222,5	91,7	17,8	1,12
MMP-7	15,3	7,0	0,619	8,3	92,9	18,2	1,13
MMP-9	23,8	13,4	0,612	244,3	95,2	21,0	1,20
MCP-1	2,4	1,7	0,452	1.545,9	66,7	16,2	0,79
IL-6	35,3	22,7	0,627	9,8	96,8	20,3	1,24
IL-8	12,9	5,3	0,465	143,1	91,7	15,9	1,11
VEGF	20,0	10,5	0,561	404,9	94,4	19,0	1,16
ICAM-1	3,6	1,5	0,559	255,8	75,0	17,3	0,90
VCAM-1	11,9	4,5	0,395	1.502,4	83,3	17,8	1,11
PAI-1	8,3	2,2	0,485	79.177,1	87,5	18,1	1,06

^a Negative association

Tabulka 7- Senzitivity markerů při 95% specificitě pro předoperační hodnoty u nemocných s NSCLC (n=93)

	Adenocarcinoma (n=34)			Squamous cell carcinoma (n=59)		
	Sensitivity 95% specificity (%)	AUC	Cut off	Sensitivity 95% specificity (%)	AUC	Cut off
CEA	46,7	0,680	3,7	27,3	0,564	3,8
CYFRA 21-1	36,7	0,720	2,0	63,6	0,840	2,0
TPA	33,3	0,660	69,0	42,6	0,769	69,5
TPS	30,0	0,590	126,0	30,9	0,703	121,0
TK	10,0	0,390	13,8	12,7	0,499	13,9
MonoTotal	26,7	0,650	206,0	36,4	0,780	200,7
SCC	3,3	0,545	1,8	23,6	0,720	1,9
Chromogranin A	13,8	0,650	227,0	5,5	0,594	225,9
IGF-I	1,5	0,400	555,1	8,1	0,460	565,3
TIMP-1	6,9	0,590	183,5	16,4	0,710	183,3
TIMP-2 ^a	13,8	0,546	48,5	10,9	0,520	48,6
MMP-1	17,2	0,480	917,3	25,5	0,508	986,6
MMP-2	13,3	0,500	227,0	14,5	0,534	222,5
MMP-7	10,0	0,580	8,4	18,2	0,534	8,3
MMP-9	27,6	0,610	244,3	21,8	0,610	267,7
MCP-1	1,7	0,440	1.545,9	3,6	0,460	1.545,9
IL-6	23,3	0,530	16,7	41,8	0,677	9,8
IL-8	10,0	0,440	170,84	14,5	0,477	143,1
VEGF	23,3	0,580	457,2	18,2	0,548	404,93
ICAM-1	1,5	0,480	356,7	5,5	0,601	255,8
VCAM-1	10,3	0,430	1.514,5	12,7	0,376	1.502,4
PAI-1	6,9	0,470	80.774,5	9,1	0,490	79.177,1

^a Negative association

Tabulka 8- Senzitivity markerů při 95% specificitě pro předoperační hodnoty u nemocných s adenokarcinomem (n=34) a epiderm.karcinomem (n=59)

	NSCLC (Remission) (n=117 samples)				NSCLC (Progression) (n=21 samples)				p value		
	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median		Minimum	Maximum
CEA*	2,2	1,5	1,7	0,5	10,6	13,6	25,4	5,2	0,6	110,8	0,0004
CYFRA 21-1*	1,0	1,0	0,8	0,0	7,0	33,8	96,3	2,2	0,3	404,0	0,0001
TPA*	29,0	21,5	25,0	6,3	105,0	135,2	164,2	65,0	10,0	656,0	<0,0001
TPS*	58,9	56,5	43,0	10,0	421,0	300,0	492,3	63,5	19,0	1.718,0	0,0180
TK*	6,8	3,7	6,0	2,3	23,1	23,2	40,8	12,5	2,4	193,5	0,0004
MonoTotal*	77,1	61,1	63,7	0,0	383,3	399,3	656,2	141,8	39,4	2.632,0	0,0001
SCC*	0,5	0,4	0,4	0,0	1,9	1,6	2,7	0,6	0,0	11,9	0,0262
Chromogranin A*	63,1	78,6	42,1	14,3	571,2	160,9	223,5	67,2	25,4	748,1	0,0057
IGF-I	291,3	87,1	300,5	112,1	489,1	305,1	74,2	303,3	183,3	421,8	nss
TIMP-1*	120,1	35,0	114,6	67,7	282,6	145,5	45,7	131,0	85,6	271,0	0,0054
TIMP-2	78,8	21,9	75,7	37,6	149,0	78,9	24,8	72,2	47,0	132,0	nss
MMP-1*	449,1	548,5	285,6	35,7	3.944,0	801,7	814,8	578,0	41,8	2.827,6	0,0180
MMP-2	212,4	45,4	203,0	137,0	353,2	213,4	51,7	204,0	127,1	342,1	nss
MMP-7*	5,6	2,2	5,3	2,4	15,2	7,7	4,2	6,6	2,8	19,9	0,0122
MMP-9	136,4	66,2	122,7	28,0	379,4	168,1	120,1	141,2	18,0	427,6	nss
MCP-1*	329,4	322,3	196,6	67,2	2.000,0	654,2	687,2	397,2	132,6	2.661,5	0,0059
IL-6*	73,1	227,6	3,6	3,2	1.600,7	117,8	303,1	15,5	3,2	1.223,7	0,0100
IL-8	122,2	557,9	11,0	3,2	4.398,1	72,5	126,3	18,0	3,4	451,3	nss
VEGF*	269,6	402,4	151,3	16,0	2.915,2	472,7	558,1	291,8	72,6	2.123,0	0,0062
ICAM*	129,6	53,2	123,7	54,0	322,0	164,0	93,1	142,7	43,2	462,9	0,0357
VCAM	1.184,1	296,2	1.126,9	244,9	2.075,9	1.059,3	372,7	1.012,0	263,2	1.880,9	nss
PAI-1	43.629,3	24.479,9	37.550,3	10.340,2	125.070,4	50.574,3	23.763,0	46.368,7	12.428,2	91.233,1	nss

Tabulka 9- Základní deskriptivní charakteristika remisních a progresních hodnot nádorových markerů u pacientů s NSCLC během follow-up

	Squamous (n=13)				Adenocarcinoma (n=8)				p value		
	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	Mean	SD	Median		Minimum	Maximum
CEA*	4,0	4,3	2,5	0,6	15,2	31,3	38,0	14,5	6,1	110,8	0,0008
CYFRA 21-1	53,2	120,0	3,7	0,3	404,0	2,3	2,0	1,5	0,7	6,0	nss
TPA	171,8	196,9	92,5	13,0	656,0	80,3	80,7	47,5	10,0	239,0	nss
TPS	397,3	607,4	116,5	21,0	1.718,0	154,1	193,7	62,5	19,0	480,0	nss
TK	26,0	51,1	12,5	2,4	193,5	18,8	15,9	11,2	5,9	48,6	nss
MonoTotal	518,9	805,5	191,5	43,6	2.632,0	205,1	220,4	98,5	39,4	683,6	nss
SCC*	2,3	3,2	1,0	0,4	11,9	0,3	0,2	0,3	0,0	0,7	0,0006
Chromogranin A	124,6	160,7	67,6	25,4	633,8	228,1	313,6	46,9	34,3	748,1	nss
IGF-I	263,9	56,9	283,8	183,3	304,7	360,1	61,1	358,9	299,7	421,8	nss
TIMP-1	154,3	54,0	139,7	85,6	271,0	131,3	24,5	120,1	106,4	177,0	nss
TIMP-2	78,0	27,6	69,7	47,0	132,0	80,5	21,1	75,1	57,5	115,8	nss
MMP-1	931,8	846,5	751,3	41,8	2.827,6	590,2	765,6	295,9	151,2	2.441,6	nss
MMP-2	210,1	58,6	194,0	127,1	342,1	218,7	41,4	224,3	150,5	274,6	nss
MMP-7	8,3	4,9	6,6	3,8	19,9	6,7	3,0	6,1	2,8	12,3	nss
MMP-9	154,2	107,2	140,1	18,0	427,6	190,7	143,5	144,2	44,7	418,6	nss
MCP-1	671,1	790,9	377,6	132,6	2.661,5	626,7	524,9	546,2	150,9	1.756,7	nss
IL-6	171,5	379,8	19,2	3,2	1.223,7	30,6	35,7	13,1	3,2	90,9	nss
IL-8	74,8	139,0	21,7	5,1	451,3	68,7	111,3	13,1	3,4	328,0	nss
VEGF	517,1	707,2	230,0	72,6	2.123,0	400,7	151,5	380,5	138,2	584,2	nss
ICAM-1	174,4	108,5	144,7	61,2	462,9	147,2	63,9	135,7	43,2	273,6	nss
VCAM-1	944,8	314,7	926,1	263,2	1.481,2	1.245,4	403,9	1.181,0	764,0	1.880,9	nss
PAI-1	47.306,5	24.671,2	46.070,9	12.428,2	91.233,1	55.884,6	22.757,1	56.650,2	23.188,8	88.180,0	nss

Tabulka 10 - Základní deskriptivní charakteristika progresních hodnot markerů u pacientů s adenokarcinomem a epiderm.karcinomem

	Sensitivity 95% specificity	95% CI		AUC	Cut off	PPV (%)	NPV (%)	RR
CEA	50,0	17,3	82,7	0,7	4,8	64,7	90,9	7,93
CYFRA 21-1	52,0	20,0	85,3	0,8	2,6	64,7	90,1	9,19
TPA	50,0	17,3	82,7	0,8	77,0	62,5	89,9	8,35
TPS	44,0	13,6	75,2	0,7	153,5	57,1	88,4	7,26
TK	52,0	20,0	85,3	0,7	12,7	60,0	88,9	8,40
MonoTotal	52,0	20,0	85,3	0,8	161,0	64,7	90,2	8,33
SCC	19,0	0,0	33,7	0,7	1,6	44,4	85,6	4,73
Chromogranin A	20,0	0,0	35,5	0,7	169,3	40,0	87,2	2,77
IGF-I	14,3	0,0	33,7	0,5	413,4	33,3	84,6	2,16
TIMP-1	19,0	0,4	41,7	0,7	180,0	37,5	86,6	3,36
TIMP-2 ^a	14,3	0,0	25,1	0,5	53,5	25,0	85,3	1,88
MMP-1	14,3	0,0	33,7	0,7	1.481,5	33,3	85,9	2,64
MMP-2	4,8	0,0	15,6	0,5	295,2	14,3	84,5	1,19
MMP-7	14,3	0,0	33,7	0,7	10,5	33,3	85,8	2,62
MMP-9	19,0	0,0	33,7	0,5	258,4	40,0	86,6	2,64
MCP-1	23,8	3,3	49,4	0,7	876,6	45,5	87,2	3,33
IL-6	9,5	0,0	25,1	0,7	391,6	25,0	85,2	1,87
IL-8	14,3	0,0	33,7	0,6	252,8	33,3	85,8	2,97
VEGF	9,5	0,0	25,1	0,7	912,4	25,0	85,2	1,86
ICAM-1	14,3	0,0	33,7	0,6	251,4	33,3	85,9	3,00
VCAM-1	8,7	0,0	25,1	0,4	1.767,5	28,6	85,4	1,88
PAI-1	4,8	0,0	15,6	0,6	90.021,5	14,3	84,6	1,02

^a Negative association

Tabulka 11- Senzitivity markerů při 95% specificitě pro detekci progresse NSCLC v průběhu follow-up

Correlation	Control group	NSCLC group	NSCLC group Pre-surgery and Follow up				
			Pre-surgery	6 month	12 month	18 month	24 month
CYFRA / MT	r value 0,78 p value 0,0003	0,76 <0,0001	0,80 <0,0001	0,76 <0,0001	0,66 <0,0001	0,58 0,0018	0,60 0,0018
CYFRA / TPA	r value 0,51 p value 0,0354	0,73 <0,0001	0,82 <0,0001	0,46 0,0008	0,62 <0,0001	0,60 0,0014	0,64 0,0025
TIMP-2 / MMP-2	r value 0,66 p value 0,0040	0,68 <0,0001	0,67 <0,0001	0,87 <0,0001	0,84 <0,0001		
TPS / MT	r value 0,73 p value 0,0002	0,73 <0,0001	0,76 <0,0001	0,50 0,0002	0,61 <0,0001	0,62 0,0008	0,58 0,0069
TPA / MT	r value 0,78 p value 0,0001	0,78 <0,0001	0,84 <0,0001	0,48 0,0004	0,59 0,0001	0,65 0,0003	0,62 0,0037
TPA / TPS	r value 0,68 p value 0,0001	0,68 <0,0001	0,68 <0,0001	0,42 0,0019	0,75 <0,0001	0,63 0,0006	
CYFRA / TPS	r value 0,54 p value 0,0001	0,54 <0,0001	0,57 <0,0001		0,60		
TIMP-1 / MMP-1	r value 0,50 p value 0,0001	0,50 <0,0001			0,49		
PAI-1 / TIMP-1	r value 0,40 p value 0,0001	0,40 <0,0001		0,63 <0,0001	0,47 0,0036		
IL-6 / IL-8	r value 0,40 p value 0,0001	0,40 <0,0001		0,57 <0,0001	0,53 0,0008		
IL-6 / VEGF	r value 0,47 p value 0,0001	0,47 <0,0001			0,53 0,0008		0,65 0,0006
IL-8 / MCP-1	r value 0,72 p value 0,0011						
TPS / PAI-1	r value 0,70 p value 0,0018						
PAI-1 / VEGF	r value 0,68 p value 0,0025						
MT / MMP-2	r value 0,66 p value 0,0036						
TPA / VCAM-1	r value 0,63 p value 0,0050						
CYFRA / MMP-2	r value 0,56 p value 0,0235						
TK / MMP-7	r value 0,59 p value 0,0136						
TPS / MMP-7	r value 0,52 p value 0,0374						
TK / IL-6	r value 0,50 p value 0,0415						

Tabulka 12 - Statisticky významné korelace hodnot biomarkerů v kontrolní skupině, u NSCLC pacientů a v průběhu follow-up

	Cut off	p value Univariate Kaplan Meier	p value Univariate Cox regression
CEA*	4,8	nss	0.0021
CYFRA 21-1	2,6	nss	nss
TPA*	77,0	0,0081	0.0007
TPS*	153,5	nss	0.0228
TK	12,7	nss	nss
MonoTotal*	200,0	0,0113	<0.0001
SCC	1,6	nss	nss
Chromogranin A	169,3	nss	nss
IGF-I	413,4	nss	nss
TIMP-1	180,0	nss	nss
TIMP-2	126,9	nss	nss
MMP-1*	1.481,5	0,0225	nss
MMP-2*	295,2	0,0022	0.0201
MMP-7*	10,5	0,0340	0.0427
MMP-9	258,4	nss	nss
MCP-1	876,6	nss	nss
IL-6	391,6	nss	nss
IL-8	252,8	nss	nss
VEGF	912,4	nss	nss
ICAM-1	251,4	nss	nss
VCAM-1	1.767,5	nss	nss
PAI-1	90.021,5	nss	nss
T*		0,0002	0.0113
N		nss	nss
Stage*		0,0003	0,0002
Histology		nss	nss

Tabulka 13.- Univariační DFS analýza

	p value	Hazard ratio	95,0% CI	
Stage	0,0006			
Stage I		1,00		
Stage II	0,4050	1,47	0,59	3,68
Stage III	0,0001	4,89	2,25	10,59
MonoTotal	0,0203	0,43	0,21	0,88
MMP1	0,0098	0,31	0,13	0,75

	p value	Hazard ratio	95,0% CI	
Stage	0,0004			
Stage I		1,00		
Stage II	0,2380	1,75	0,69	4,43
Stage III	0,0001	4,86	2,21	10,70
TPA	0,0229	2,36	1,13	4,94
MMP1	0,0188	2,93	1,20	7,20

	p value	Hazard ratio	95,0% CI	
Stage	0,0007			
Stage I		1,00		
Stage II	0,2562	1,71	0,68	4,29
Stage III	0,0002	4,15	1,98	8,73
MonoTotal	0,0222	2,25	1,12	4,51
MMP7	0,0210	4,50	1,25	16,17

	p value	Hazard ratio	95,0% CI	
Stage	0,0010			
Stage I		1,00		
Stage II	0,1358	2,04	0,80	5,18
Stage III	0,0002	4,20	1,97	8,94
TPA	0,0123	2,53	1,22	5,22
MMP7	0,0167	4,83	1,33	17,51

Tabulka 14- Multivariační DFS analýza (Multivariační Cox model s užitím cut-offs)

	Cut off	p value Univariate Kaplan Meier	p value Univariate Cox regression
CEA*	4,8	0,0457	0.0009
CYFRA 21-1	2,6	nss	nss
TPA*	77,0	0,0020	0.0044
TPS*	153,5	0,0116	0.0315
TK	12,7	nss	nss
MonoTotal*	200,0	0,0018	<0.0001
SCC	1,6	nss	nss
Chromogranin A*	169,3	nss	0.0070
IGF-I	413,4	nss	nss
TIMP-1	180,0	nss	nss
TIMP-2	126,9	nss	nss
MMP-1	1.481,5	nss	nss
MMP-2	295,2	nss	nss
MMP-7	10,5	nss	0.0177
MMP-9	258,4	nss	nss
MCP-1*	876,6	0,0042	nss
IL-6	391,6	nss	nss
IL-8	252,8	nss	nss
VEGF	912,4	nss	nss
ICAM-1	251,4	nss	nss
VCAM-1	1.767,5	nss	nss
PAI-1	90.021,5	nss	nss
T*		0,0013	0.0195
N*		0,019	0.0322
Stage*		<0,0001	<0,0001
Histology		nss	nss

Tabulka 15- Univariační OS analýza

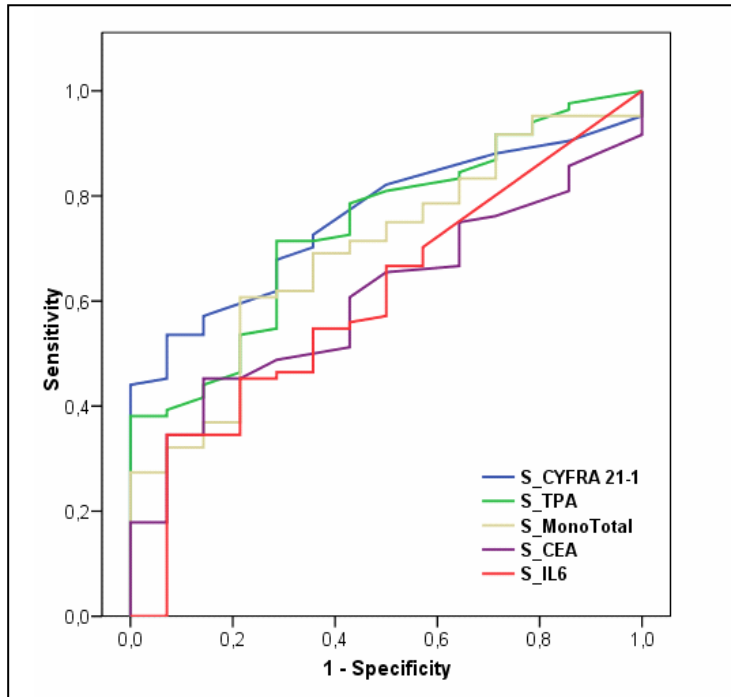
	p value	Hazard ratio	95,0% CI	
Stage	<0,0001			
Stage I		1,00		
Stage II	0,0222	3,59	1,20	10,76
Stage III	<0,0001	10,69	3,82	29,97
Chromogranin	0,0283	3,93	1,16	13,33
MMP7	0,0330	4,82	1,14	20,46
MCP1	0,0437	3,23	1,03	10,11
MonoTotal	0,0080	2,91	1,32	6,39

	p value	Hazard ratio	95,0% CI	
Stage	<0,0001			
Stage I		1,00		
Stage II	0,0063	4,79	1,56	14,73
Stage III	<0,0001	11,29	4,00	31,89
Chromogranin	0,0626	3,12	0,94	10,36
MMP7	0,0202	5,43	1,30	22,68
MCP1	0,0945	2,66	0,81	8,68
TPA	0,0072	3,07	1,36	6,94

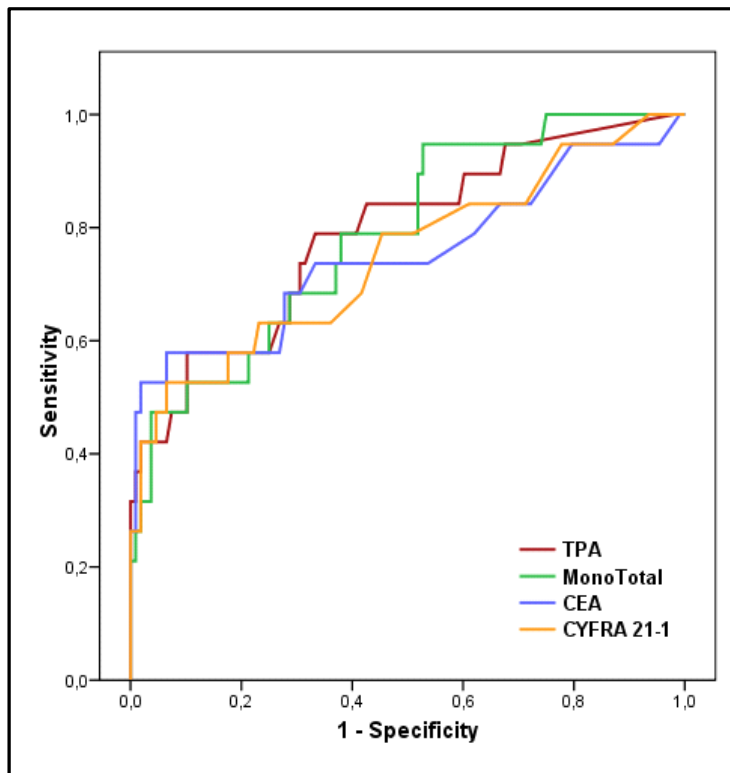
Tabulka 16- Multivariační DFS analýza (Multivariační Cox model s užitím cut-offs)

	Adenocarcinoma		Squamous	
	p value DFS	p value OS	p value DFS	p value OS
CEA*	nss	0,0146	nss	nss
CYFRA 21-1*	0,0378	nss	nss	nss
TPA*	0,0148	nss	0,0231	0,0124
TPS	nss	nss	nss	nss
TK	nss	nss	nss	nss
MonoTotal*	0,0317	nss	<0,0001	<0,0001
SCC	nss	nss	nss	nss
Chromogranin A*	nss	nss	nss	0,0086
IGF-I	nss	nss	nss	nss
TIMP-1	nss	nss	nss	nss
TIMP-2*	0,025	0,0029	nss	nss
MMP-1*	nss	0,0131	nss	nss
MMP-2*	0,0013	0,0011	nss	nss
MMP-7*	0,0164	nss	nss	0,0144
MMP-9	nss	nss	nss	nss
MCP-1	nss	nss	nss	nss
IL-6	nss	nss	nss	nss
IL-8	nss	nss	nss	nss
VEGF	nss	nss	nss	nss
ICAM-1	nss	nss	nss	nss
VCAM-1	nss	nss	nss	nss
PAI-1	nss	nss	nss	nss

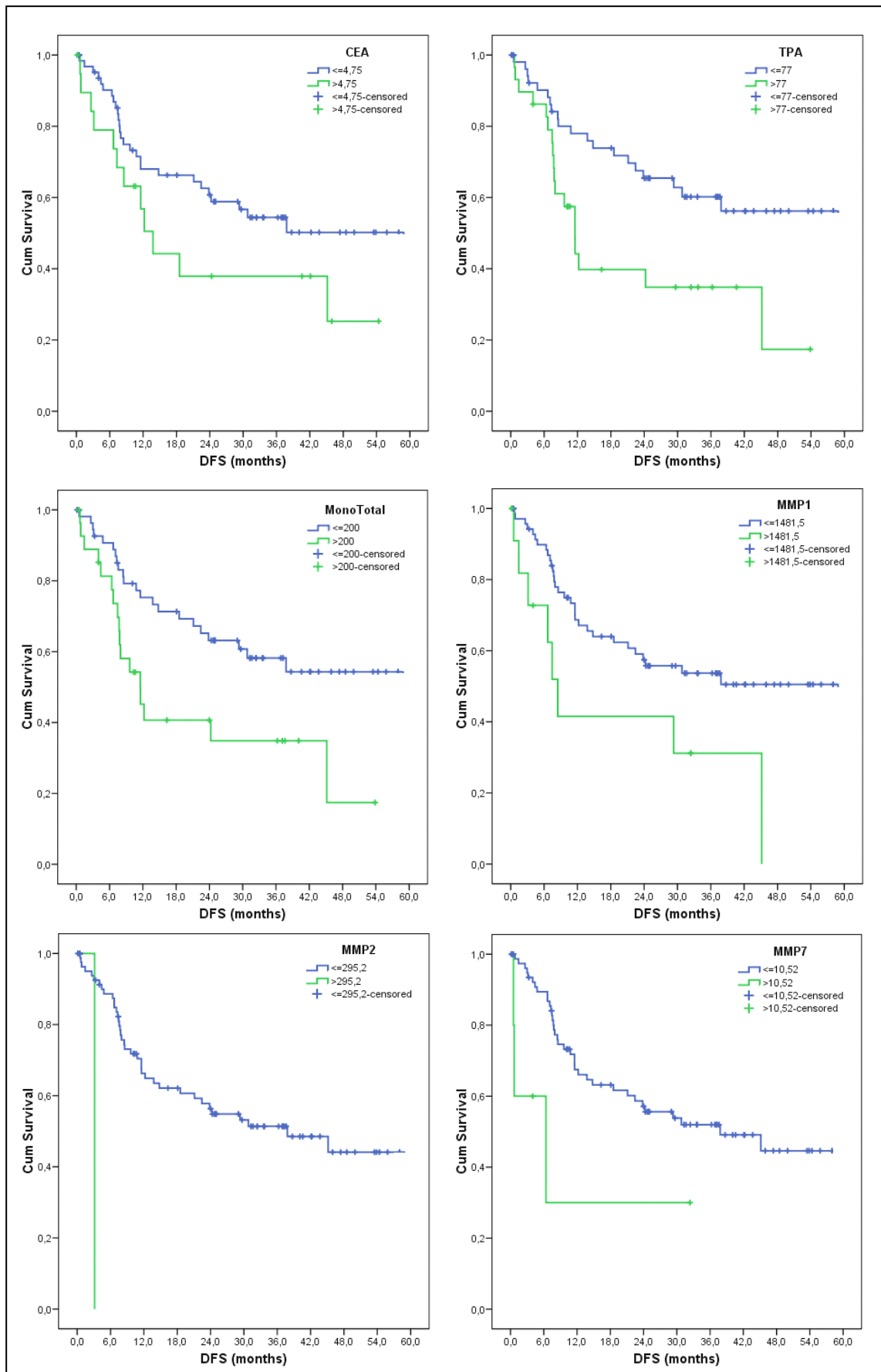
Tabula 17- Univariační DFS/OS analýza pro adenokarcinom a epidermoidní karcinom



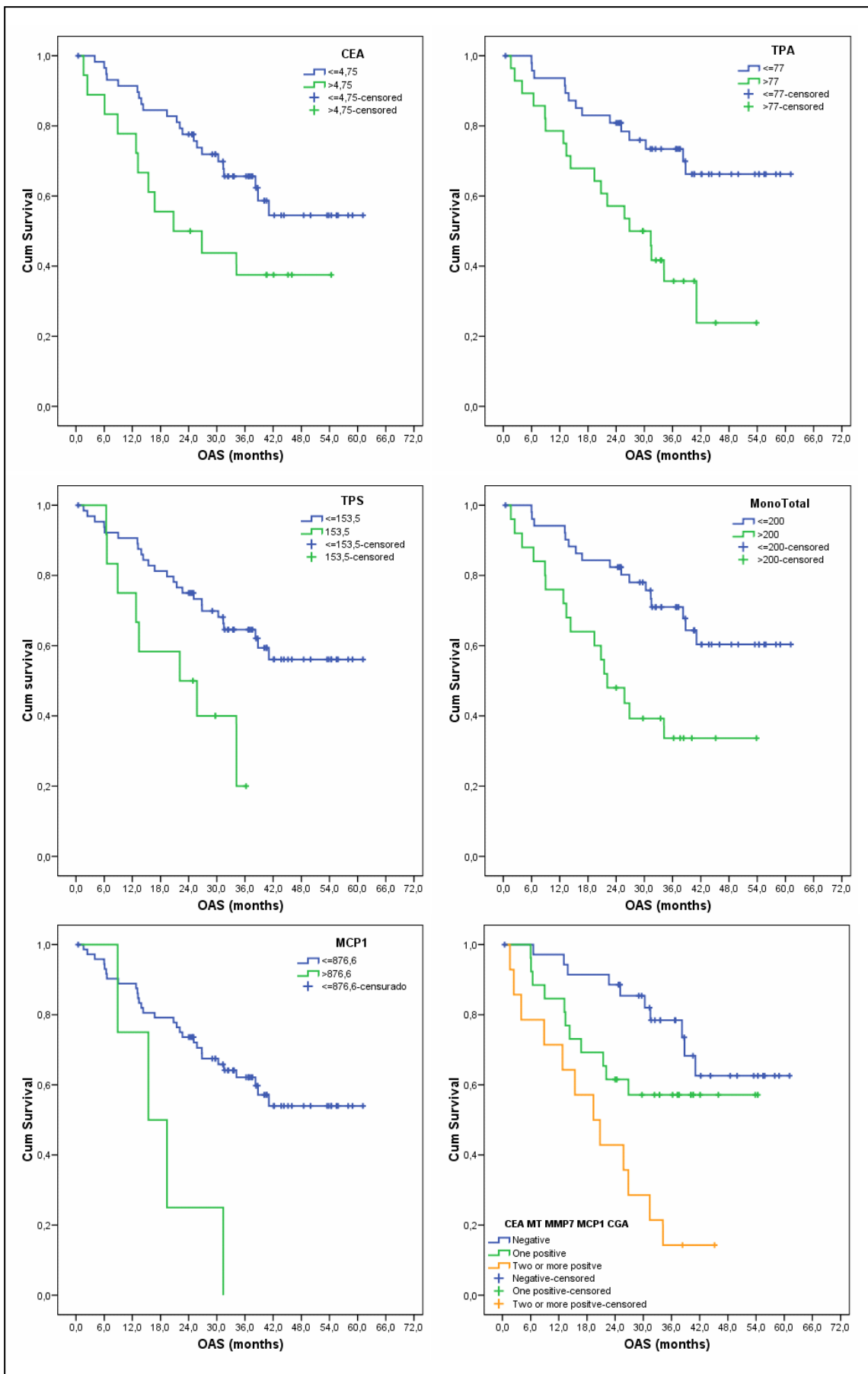
Obrázek 1- ROC křivky pro biomarkery s nejvyšší sensitivitou pro primární diagnózu NSCLC



Obrázek 2- ROC křivky pro biomarkery s nejvyšší sensitivitou pro záchyt progresse onemocnění v průběhu follow-up



Obrázek 3- Odhad bezpříznakového přežití u pacientů s NSCLC v závislosti na předoperačních hladinách sérových biomarkerů (zobrazeny jen prognosticky významné markery)



Obrázek 4- Odhad celkového přežití u pacientů s NSCLC v závislosti na předoperačních hladinách sérových biomarkerů (zobrazeny jen prognosticky významné markery)

5. DISKUZE

S rozvojem molekulárně biologických metod, kdy je stanovení genetických mutací jako prediktivních faktorů nutnou podmínkou k zahájení biologické léčby, je stále častěji diskutována otázka využití sérových nádorových markerů v rutinní klinické praxi. Tato práce je prvním pokusem o komplexní srovnání sérových nádorových markerů rutinně používaných u NSCLC s novými perspektivními biomarkery a prověřit využitelnost těchto biomarkerů pro diagnostiku NSCLC, odhad prognózy a monitoraci průběhu nádorového onemocnění. Nejedná se jen o klinickou validaci nových biomarkerů, ale i ověření významu již stanovovaných nádorových markerů.

Celkem bylo sledováno 22 biomarkerů: 8 standardních nádorových markerů (cytokeratiny Cyfra 21-1, TPA, TPS a MonoTotal, CEA, SCC, TK, Chromogranin A) a 14 potenciálně klinicky užitečných biomarkerů, vhodných pro sledování biologické aktivity nádoru - pro-zánětlivé cytokiny IL-6, IL-8, MCP-1, pro-angiogenní cytokiny VEGF, matrix metaloproteinasy MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 a jejich inhibitory TIMP-1 a TIMP-2, adhezivní molekuly ICAM-1, VCAM-1, růstový faktor IGF-1 a PAI-1 stimulující růst nádoru a angiogenezi. S ohledem na hodnocení klinického významu těchto markerů u NSCLC byly systematicky sledovány jejich hladiny v séru nebo plazmě ve skupině 93 pacientů s NSCLC v době primární diagnózy před zahájením léčby a dále v průběhu follow up. V kontrolní skupině bylo 20 pacientů s benigním onemocněním plic. U nemocných s NSCLC v okamžiku stanovení diagnózy nebo v průběhu follow up bylo prokázáno signifikantní zvýšení hladin většiny sledovaných biomarkerů než u pacientů s benigním onemocněním plic. Hladiny MMP-2, MMP-9, TIMP-2, IL-8, PAI-1, IGF-1 a VCAM-1 se nelišily u pacientů s NSCLC ve srovnání s kontrolami.

Vzhledem k počtu a různorodosti analyzovaných markerů jsou možnosti jejich klinického využití u nemocných s NSCLC rozsáhle komentovány v kapitole „Diskuze“ a zde je podrobně diskutována otázka optimální kombinace biomarkerů pro primární diagnózu a pro prognózu NSCLC, která je jedním z cílů této práce.

Kombinace biomarkerů pro zvýšení sensitivity pro diagnózu NSCLC

Řada studií prokázala, že kombinace dvou nebo více biomarkerů zvýšilo senzitivitu pro diagnózu NSCLC a zlepšilo časnou detekci progresu, ačkoliv nejvhodnější kombinace zůstává nejasná¹⁵⁻¹⁸. V naší studii jsme analyzovali vhodnost několika markerů s různou charakteristikou a odlišnými senzitivitami. Některé z nich jsou ve vzájemném vztahu a jejich kombinace nezlepšuje senzitivitu. Některé markery s dobrou senzitivitou, pokud byly použity v kombinaci s ostatními, specifita se snížila. Navrhli jsme, že kombinace markerů s dobrou senzitivitou bez vzájemného vztahu ve Spearmanově pořadovém korelačním testu by mohla být užitečná pro zvýšení sensitivity pro diagnózu NSCLC. Zjistili jsme, že v našem souboru pacientů nejlepší kombinace biomarkerů pro diferenciální diagnózu mezi benigním onemocněním plic a NSCLC bylo dosaženo pomocí kombinace CEA (>3,7 ng/ml), Cyfra 21-1 (>2,0 ng/ml), IL-6 (>9,8 pg/ml) a VEGF (>405 pg/ml) při 75,6% senzitivitě, 86,7% specifitě a s vysokou pozitivní prediktivní hodnotou 97%. Po vyloučení CEA senzitivita se snížila na 65,9% při 93% specifitě a pozitivní prediktivní hodnotě 98,2%. Myslíme si, že by mohlo být přínosné použití IL-6 a VEGF jako doplňkových markerů k běžně používaným nádorovým markerům u NSCLC.

Tamura a kol.¹⁹ prokázal, že kombinace plasmatického VEGF a sérového CEA byla přínosná při časně diagnostice NSCLC (senzitivita 75% a specifita 60%). Autoři došli k závěru, že kombinace VEGF a CEA byla nadřazená samostatnému CEA v

časné diagnostice u adenokarcinomu plic. Molina a kol.¹⁰ uvádí lepší senzitivitu (81,3% u adenokarcinomu, 79,3% u epidermoidního karcinomu, ve stádiích I-III), podobnou specificitu (85%) a pozitivní prediktivní hodnotu (98,5%) při použití kombinace tří nádorových markerů: CEA, Cyfra 21-1 u všech histologií a SCC u epidermoidního karcinomu nebo CA 15-3 u adenokarcinomu. Nedostatečná senzitivita při použití námi navržené kombinace biomarkerů může souviset s velikostí sledovaných skupin, vysokým podílem pacientů s časnými stádii NSCLC a zastoupením jednotlivých histologických podtypů NSCLC.

Kombinace biomarkerů pro odhad prognózy NSCLC

Ve vztahu k prognóze a časné detekci recidivy či progrese onemocnění jsme studovali biomarkery, které byly nezávislé prognostické faktory pro celkové přežití (OS) a bezpříznakové přežití (DFS) v multivariační Coxově regresní analýze. Podle výsledků naší studie vyvozujeme, že kombinace jednoho cytokeratinu, chromograninu A, MMP-7 a MCP-1 dává dobrou prediktivní hodnotu pro odhad celkového přežití, pro odhad návratu onemocnění jsme našli kombinaci jednoho cytokeratinu a jedné MMP (MMP-1 nebo MMP-7). Cytokeratiny, které vykazují nejlepší spojení jako nezávislé prognostické faktory pro OS a DFS jsou MonoTotal a TPA. Několik studií prokázalo spojení vysokých předterapeutických hladin TPA v séru se špatnou prognózou²⁰⁻²². Eriksson a kol.²³ uvádí, že MonoTotal se zdá být slibným sérovým markerem pro odhad prognózy a může být využíván pro sledování pacientů s NSCLC.

Prací o prognostickém významu hladin chromograninu A, MMP-7 a MCP-1 u pacientů s NSCLC je poměrně málo a některé z nich jsou kontroverzní. Chromogranin A (CgA) je často používán jako diagnostický a prognostický sérový marker pro řadu neuroendokrinních nádorů. Cirkulující CgA je také zvýšený u pacientů s dalšími onemocněními včetně subpopulace pacientů s non neuroendokrinními nádory a má důležitý prognostický dopad²⁴. V souladu s naší studií Nisman a kol.²⁵ a Gregorc a kol.²⁶ zjistili, že zvýšené předterapeutické hladiny CgA v séru fungují jako nezávislý indikátor špatné prognózy u pacientů s NSCLC. Je zajímavé, že CgA byl spojován s horším stavem pacienta a pokročilejším NSCLC. Zhang a kol.²⁷ uvádí CgA jako silný a nezávislý indikátor prognózy u kriticky nemocných pacientů. Existuje možná hypotéza, že sérové hladiny CgA u pacientů s NSCLC odráží se stresem spojenou systémovou neuroendokrinní aktivací spojenou se zhoršením stavu pacienta.

Několik prací ukázalo, že matrix metaloproteinázy (MMPs) se mohou využívat v klinické praxi u pacientů s NSCLC a jsou také spojeny s agresivitou nádoru plic²⁸⁻³⁰. V naší studii jsme analyzovali klinické využití MMP-1, MMP-2, MMP-7 a MMP-9. Pozorovali jsme, že hladiny MMP-1, MMP-2 a MMP-7 v séru/plazmě byly spolehlivými prediktory recidivy; pouze zvýšení MMP-7 bylo nezávislým prognostickým biomarkerem pro recidivu onemocnění i celkovou dobu přežití. Naše studie se zdá být první, která popsala korelaci mezi sérovými hladinami MMP-7 a prognózou pacientů s NSCLC. Existující práce analyzují hladiny nebo exprese tohoto markeru v plicní nádorové tkáni²⁹⁻³². Na rozdíl od ostatních členů skupiny metaloproteináz, MMP-7 je vylučována samotnými nádorovými buňkami, ale ne peritumorálními stromálními buňkami, což indikuje, že MMP-7 by mohla být použita jako biomarker spojený s nádory. Tato zjištění svědčí, že tkáňové exprese MMP-7 a sérové hladiny MMP-7 u pacientů s NSCLC mohou být významnými prognostickými faktory.

Poslední marker, který jsme zahrnuli do tohoto panelu je monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1), prozánětlivý cytokin, který indukuje angiogenezi a hraje roli při růstu nádoru a progresi^{33;34}. Zajímavým novým zjištěním v naší studii je, že vysoké předterapeutické hladiny MCP-1 jsou spojeny se sníženým celkovým přežitím pacientů s NSCLC. Pokud víme, naše studie jako první popsala korelaci mezi vysokými sérovými hladinami MCP-1 a špatnou prognózou pacientů s NSCLC. Existuje pouze jedna publikovaná práce od Cai a kol.³⁵, která studuje vztahy mezi sérovými hladinami MCP-1 a nádory plic. Bylo zjištěno, že sérové hladiny MCP-1 byly zvýšeny u pacientů s nádory plic a kostními metastázemi ve srovnání s pacienty s lokalizovanými nádory. Tato zjištění poukazují, že MCP-1 mohou potenciálně sloužit jako prognostický nádorový marker pro predikci agresivního chování NSCLC. Tyto výsledky je potřeba potvrdit dalšími prospektivními studiemi. Závěrem, tyto výsledky otevírají nový úhel pohledu na použití tradičních nádorových markerů v kombinaci s novými biomarkery u pacientů s NSCLC. Jak jsme ukázali, je možné zvýšit hodnotu tumorových markerů jako CEA nebo cytokeratinů, když jsou použity v kombinaci s novými markery..

6. ZÁVĚRY

U nemocných s operabilním stadiem NSCLC byly systematicky sledovány hladiny 22 biomarkerů v séru nebo plazmě v době primární diagnózy před zahájením léčby a dále v průběhu follow up. Předkládaná práce měla za cíl vyhodnotit výsledky získané z uvedené široké skupiny hodnot biomarkerů a porovnat klinické využití těchto biomarkerů ve třech nejdůležitějších klinických aplikacích u NSCLC:

1. diagnóza a posouzení rozsahu onemocnění (stadium a velikost nádoru)
2. odhad prognozy
3. monitorace průběhu onemocnění pro včasný záchyt recidivy a progresu (follow up)

V následujícím souhrnu jsou uvedeny výsledky a závěry podle výše uvedených klinických aplikací:

1. Diagnóza a posouzení rozsahu onemocnění

- Předoperační hladiny cytokeratinových markerů (Cyfra 21-1, TPA, TPS, a MonoTotal), SCC a TIMP-1 byly signifikantně zvýšeny u pacientů s NSCLC ve srovnání s kontrolní skupinou.
- Výrazně vyšší hladiny CEA a Cyfra 21-1 byly pozorovány u adenokarcinomu ve srovnání s benigní skupinou.
- Pacienti s epidermoidním karcinomem měli výrazně vyšší hladiny Cyfra 21-1, TPA, TPS, MonoTotal, SCC, TIMP-1 a IL-6 ve srovnání s benigní skupinou.
- Výrazně vyšší hladiny nádorových markerů Cyfra 21-1, TK, MonoTotal a SCC byly prokázány u epidermoidního karcinomu v porovnání s adenokarcinomem.
- Sensitivity biomarkerů při 95% specifitě pro primární diagnostiku NSCLC byly v širokém rozmezí od 2,4% do 54,1%. Nejvyšší sensitivity pro rozlišení mezi NSCLC diagnózou a benigním onemocněním plic byla prokázána u cytokeratinů (Cyfra 21-1, TPA a MonoTotal), IL-6 a CEA. Nejnižší diagnostická sensitivity byla zjištěna u Chromograninu A, PAI-1, IGF-I, ICAM-1 a MCP-1.
- Nejvyšší sensitivity při 95% specifitě pro diagnózu epidermoidního karcinomu byla pozorována u markerů Cyfra 21-1, TPA a IL-6 (63,6%, 42,6% a 41,8%, v uvedeném pořadí).
- Nejvyšší sensitivity při 95% specifitě pro diagnózu adenokarcinomu byla pozorována u markerů CEA a Cyfra 21-1 (46,7% a 36,7%, v uvedeném pořadí).
- Nejlepší kombinace biomarkerů pro rozlišení mezi benigním plicním onemocněním a NSCLC bylo dosaženo použitím CEA (>3,7 ng/ml), Cyfra 21-1 (>2,0 ng/ml), IL-6 (>9,8 pg/ml) a VEGF (>405 pg/ml), s 75,6% senzitivitou, specifitou 86,7%, a s vysokou pozitivní prediktivní hodnotou 97%. Po vyloučení CEA sensitivity byla snížena na 65,9% s 93% specifitou a pozitivní prediktivní hodnotou 98,2%.
- Žádný ze sledovaných biomarkerů ani jejich kombinace nedosahuje dostatečných sensitivit a specifit pro primární diagnostiku NSCLC. Dle EGTM kritérií pro primární diagnostiku musí nádorový marker dosahovat buď sensitivity 75% při 95% specifitě nebo sensitivity 85% při 90% specifitě.
- Signifikantně vyšší předoperační hladiny markerů TPA a MonoTotal byly stanoveny u pokročilejších stádií onemocnění u pacientů s epidermoidním karcinomem, (stadium III vs I). U pacientů s pokročilou fází adenokarcinomu byly pozorovány významně vyšší hladiny CEA (stadium III vs I).

- Předoperační hladiny CEA, Cyfra 21-1, TPA, TK, MonoTotal, MMP-9 a MCP-1 byly signifikantně vyšší u větších nádorů (T4) v porovnání s menšími (T1). Tyto rozdíly byly zjištěny u pacientů s NSCLC a kromě TK a MMP-9 i u pacientů s epidermoidním karcinomem.

2. Monitorace hladin biomarkerů v průběhu follow-up

- Hladiny markerů CEA, cytokeratinů (Cyfra 21-1, TPA, TPS, MonoTotal), TK, SCC, Chromogranin, metaloproteináz (MMP-1, MMP-7), TIMP-1, cytokinů (MCP-1, IL-6, VEGF), a ICAM-1 byly významně vyšší u pacientů s progresí onemocnění. V době progresu byly signifikantně vyšší hladiny CEA nalezené u adenokarcinomu a signifikantně vyšší hladiny SCC u epidermoidního karcinomu.
- Sensitivity biomarkerů při 95% specifitě pro včasný záchyt recidivy či progresu onemocnění byly v širokém rozmezí od 4,8% do 52%. Nejvyšší sensitivity pro rozlišení mezi remisí a progresí byla prokázána u cytokeratinů (Cyfra 21-1, TPA a MonoTotal), thymidinkinázy a CEA. Nejnižší sensitivity byla zjištěna u IL-6, VEGF, VCAM-1, MMP-2, and PAI-1.

3. Odhad prognózy onemocnění

- Předoperační hladiny cytokeratinových markerů (TPA, TPS, a MonoTotal), MMP (MMP-1, MMP-2, a MMP7), CEA a také stadium a velikost nádoru byly významné prognostické faktory v univariační analýze pro bezpříznakové přežití (DFS)
- Univariační DFS analýza podle histologie ukázala cytokeratiny (Cyfra 21-1, TPA a MonoTotal), MMP (MMP-2 a MMP-7), a TIMP-2 jako významné prognostické faktory časně recidivy adenokarcinomu a TPA a MonoTotal u epidermoidního karcinomu.
- Multivariační Cox model s použitím cut off ukázal sdružení jednoho cytokeratinu (TPA nebo MonoTotal) jedné MMP (MMP-1 a MMP-7) a stadia tumoru jako nezávislé prognostické faktory pro bezpříznakové přežití (DFS).
- Předoperační hladiny cytokeratinových markerů (TPA, TPS, a MonoTotal), CEA, Chromograninu A a MCP-1 byly významné prognostické faktory v univariační analýze pro celkové přežití (OS). Také stadium onemocnění, velikost nádoru (T) a stupeň postižení regionálních lymfatických uzlin (N) korelovali s celkovou dobou přežití.
- Univariační OS analýza podle histologie ukázala CEA, MMPs (MMP-1, and MMP-2), and TIMP-2 jako nepříznivé prognostické faktory pro celkové přežití u adenokarcinomu a TPA, MonoTotal, Chromogranin A, MMP-7 u epidermoidního karcinomu.
- Multivariační Cox model s použitím cut off ukázal jeden cytokeratin (TPA nebo MonoTotal), MMP-7, MCP-1, Chromogranin A a stadium tumoru jako nezávislé prognostické faktory pro celkové přežití pacientů s NSCLC.
- Podle výsledků výše uvedených výsledků vyvozujeme, že kombinace jednoho cytokeratinu, chromograninu A, MMP-7 a MCP-1 dává dobrou prediktivní hodnotu pro odhad celkového přežití, pro odhad návratu onemocnění jsme našli kombinaci jednoho cytokeratinu a jedné MMP (MMP-1 nebo MMP-7). Cytokeratiny, které vykazují nejlepší spojení jako nezávislé prognostické faktory pro OS a DFS jsou MonoTotal a TPA.

Vzájemné korelace biomarkerů

Pozorovali jsme významné korelace mezi cytokeratinovými nádorovými markery, matrix metaloproteinázami a jejich inhibitory, jako TIMP-1 / MMP-1 a TIMP-2 / MMP-2, prozánětlivými a proangiogenními cytokiny, IL-6/IL-8 a IL-6/VEGF a mezi PAI-1/TIMP-1 ve skupině pacientů s NSCLC. Základem pro tyto korelace mohou být patofyziologické vztahy mezi těmito markery v biologickém procesu rozvoje onemocnění. Žádná významná korelace nebyla zjištěna mezi CEA, SCC, Chromograninem A, IGF-1, MMP-9, ICAM-1 a s ostatními biomarkery.

Využití nádorových markerů u nádorů plic není v běžné klinické praxi příliš rozšířeno, neboť jejich přínos je doposud spíše diskutabilní. V této práci jsme prokázali, že nádorové markery mohou být užitečným pomocným nástrojem jak pro primární diagnostiku, prognózu i časnou detekci recidivy NSCLC, zvláště pokud jsou indikovány a kombinovány uvážlivě.

Významným závěrem plynoucí z naší práce je zjištění, že nově sledované biomarkery by se neměly používat jednotlivě z důvodu velmi nízké senzitivity při přijatelné hodnotě specifity. Přesto jsme prokázali že i kombinování známých nádorových markerů, např. CEA a cytokeratinů s dalšími markery, jako je např. chromogranin A a nové biomarkery: ze skupiny matrix metalloproteináz - MMP-1 nebo MMP-7, MCP-1, VEGF a IL-6, má svůj význam. Tyto parametry významně zvyšují u pacientů s NSCLC přínos tradičních markerů v diagnostickém procesu a v odhadech průběhu onemocnění v období follow-up. Přesto je třeba ještě provést rozsáhlejší multicentrické studie na širší populaci, které by význam těchto markerů pro rutinní klinickou praxi potvrdily a kde by bylo provedeno řádné vyhodnocení různých kombinací jednotlivých markerů a byly stanoveny příčiny falešně pozitivních výsledků. Na základě výsledků této práce je vhodné k zefektivnění odhadu prognózy a monitorování pacientů s NSCLC doporučit používání celých panelů markerů.

Závěrem je třeba konstatovat, že nízká senzitivita i specifita sledovaných parametrů prozatím neumožňuje jejich využití pro screening ani pro primární diagnostiku NSCLC. Některé biomarkery se však jeví jako užitečné pro posuzování závažnosti onemocnění, hodnocení efektu léčby či odhad prognózy onemocnění.

Věříme, že objasnění klinicko-patologických vlastností bude mít především význam u pacientů s NSCLC s nepříznivou prognózou a s vysokými předoperačními hladinami těchto markerů, která vyžaduje další léčbu a odlišnou strategii v období follow-up na rozdíl od pacientů s normálními předoperačními hladinami. Tato skutečnost umožňuje detailnější stratifikaci pacientů a individualizovaný návrh léčebné strategie. Na základě určení biologické povahy nádoru by se jednoduché stanovení nádorových markerů mělo zařadit mezi další prognostické ukazatele, jako jsou např. patologické faktory či genetické změny. Je však zapotřebí, aby byly sledovány a vyhodnocovány systematicky se znalostí veškerých omezení, která mohou interpretaci těchto markerů ovlivnit.

7. SUMMARY

Lung cancer is the most frequently diagnosed type of cancer in the world and the most common cause of cancer mortality worldwide, in the European Community lung cancer accounting for 29% of all cancer, and 21% of all male cancer. Therefore, there is growing need for diagnostic tools to estimate the prognosis of the patient, to monitor the treatment course, and to detect the response to therapy early, which would help to optimize the disease management on an individual basis. The aim of this thesis was to measure a large spectrum of biomarkers in serum or plasma of patients with operable stage of NSCLC and to evaluate and compare the clinical utility of these biomarkers in the three most important clinical applications for NSCLC: diagnosis, prognosis and postsurgery follow up care.

Total 22 biomarkers with the most promising profiles were monitored: 8 standard tumor markers (cytokeratines Cyfra 21-1, TPA, TPS, and MonoTotal, CEA, SCC, TK, Chromogranin A) and 14 potential useful biomarkers including pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, MCP-1, pro-angiogenic cytokine VEGF, matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2, adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, growth factor IGF-1, and PAI-1 stimulating tumor growth and angiogenesis. With a view of evaluating the clinical relevance of these markers for NSCLC we measured serum or plasma levels of these 22 markers in group of 93 patients with NSCLC undergoing radical surgery and in group of 20 patients with benign lung disease. Based on means of Wilcoxon Rank Sum test, Cyfra 21-1, MonoTotal, TPA, TPS, CEA, SCC, Chromogranin A, TIMP-1, MMP-1, MMP-7, IL-6, MCP-1, VEGF, TK, and ICAM-1 were found to be significantly higher in patients with NSCLC in the moment of diagnosis or during follow up than in control individuals with benign lung disease. The mean serum levels of MMP-2, IL-8, TIMP-2, MMP-9, PAI-1, IGF-1 and VCAM-1 did not differ in the sera of NSCLC patients as compared with controls. The sensitivities for NSCLC diagnosis were in a wide range from 54,1% to 2,4% at 95% specificity. The highest sensitivity to distinguish between benign lung disease and NSCLC diagnosis was showed by cytokeratin markers (Cyfra 21-1, TPA, and MonoTotal), IL-6, and CEA. The best combination to distinguish between benign disease and NSCLC was achieved using CEA (>3,7 ng/m), Cyfra 21-1 (>2,0 ng/ml), IL-6 (>9,8 pg/m) and VEGF (>405 pg/ml), with a 75,6% sensitivity and 86,7% specificity, with a high predictive positive value of 97%. The sensitivities at 95% specificity for detection of disease progression during follow up were in a wide range from 52% to 4,8%. The highest sensitivity to distinguish between progression and remission status was showed by cytokeratin markers (Cyfra 21-1, TPA, and MonoTotal), TK, and CEA. We suggest that the combination of one cytokeratin (TPA or MonoTotal), Chromogranin A, MMP-7, and MCP-1 offers a good predictive value as survival predictors in NSCLC patients and for prediction of disease recurrence we found a valuable combination of one cytokeratin (TPA or MonoTotal) and one MMP (MMP-1 or MMP-7).

We can conclude that there has been no either appropriate parameter nor any combination of them currently usable for screening or early diagnosis of NSCLC. But some of the biomarkers could be very helpful in consideration of disease severity, treatment efficacy and prognosis estimation. As a result, this work should contribute to improve the therapeutic algorithm of patients with NSCLC and improve their long-term survival.

8. LITERATURA

- (1) Youlten DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol* 2008; 3(8):819-831.
- (2) Cancer incidence 2008 in the Czech Republic. Prague: The Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic (UZIS CR), The National Oncological Registry of the Czech Republic(NOR CR); 2011.
- (3) Sherwood JT, Brock MV. Lung cancer: new surgical approaches. *Respirology* 2007; 12(3):326-332.
- (4) Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le CT, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(4):351-360.
- (5) Pisters KM, Le CT. Adjuvant chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(14):3270-3278.
- (6) Molina R, Filella X, Auge JM, Fuentes R, Bover I, Rifa J et al. Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumour Biol* 2003; 24(4):209-218.
- (7) Petra Stieber, Rudolf Hatz, Stefan Holdenrieder, Rafael Molina, Marius Nap, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Lung Cancer. AACC press 2006, published online at <http://www.nacb.org>; 2006.
- (8) Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Adv Clin Chem* 2006; 42:1-41.
- (9) Holdenrieder S, von PJ, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, Markus A et al. Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(23):7813-7821.
- (10) Molina R, Auge JM, Bosch X, Escudero JM, Vinolas N, Marrades R et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology. *Tumour Biol* 2009; 30(3):121-129.
- (11) Voorzanger-Rousselot N, Garnero P. Biochemical markers in oncology. Part I: molecular basis. Part II: clinical uses. *Cancer Treat Rev* 2007; 33(3):230-283.
- (12) Duffy MJ. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *Eur J Intern Med* 2007; 18(3):175-184.

- (13) Diamandis E.P., et al. Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications. Washington: AACCC Press; 2002.
- (14) Vrzalova J, Prazakova M, Novotny Z, Topolcan O, Casova M, Holubec L, Jr. Test of ovarian cancer multiplex xMAP technology panel. *Anticancer Res* 2009; 29(2):573-576.
- (15) Molina R, Auge JM, Escudero JM, Marrades R, Vinolas N, Carcereny E et al. Mucins CA 125, CA 19.9, CA 15.3 and TAG-72.3 as tumor markers in patients with lung cancer: comparison with CYFRA 21-1, CEA, SCC and NSE. *Tumour Biol* 2008; 29(6):371-380.
- (16) Plebani M, Basso D, Navaglia F, De PM, Tommasini A, Cipriani A. Clinical evaluation of seven tumour markers in lung cancer diagnosis: can any combination improve the results? *Br J Cancer* 1995; 72(1):170-173.
- (17) Pujol JL, Grenier J, Parrat E, Lehmann M, Lafontaine T, Quantin X et al. Cytokeratins as serum markers in lung cancer: a comparison of CYFRA 21-1 and TPS. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3 Pt 1):725-733.
- (18) Schneider J, Bitterlich N, Velcovsky HG, Morr H, Katz N, Eigenbrodt E. Fuzzy logic-based tumor-marker profiles improved sensitivity in the diagnosis of lung cancer. *Int J Clin Oncol* 2002; 7(3):145-151.
- (19) Tamura M, Ohta Y, Nakamura H, Oda M, Watanabe G. Diagnostic value of plasma vascular endothelial growth factor as a tumor marker in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2002; 17(4):275-279.
- (20) Buccheri G, Ferrigno D. Usefulness of tissue polypeptide antigen in staging, monitoring, and prognosis of lung cancer. *Chest* 1988; 93(3):565-570.
- (21) Foa P, Fornier M, Miceli R, Seregini E, Santambrogio L, Nosotti M et al. Preoperative CEA, NSE, SCC, TPA and CYFRA 21.1 serum levels as prognostic indicators in resected non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 1999; 14(2):92-98.
- (22) Hatzakis KD, Froudarakis ME, Bouros D, Tzanakis N, Karkavitsas N, Siafakas NM. Prognostic value of serum tumor markers in patients with lung cancer. *Respiration* 2002; 69(1):25-29.
- (23) Eriksson P, Brattstrom D, Hesselius P, Larsson A, Bergstrom S, Ekman S et al. Role of circulating cytokeratin fragments and angiogenic factors in NSCLC patients stage IIIa-IIIb receiving curatively intended treatment. *Neoplasma* 2006; 53(4):285-290.
- (24) Corti A. Chromogranin A and the tumor microenvironment. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30(8):1163-1170.
- (25) Nisman B, Heching N, Biran H, Barak V, Peretz T. The prognostic significance of circulating neuroendocrine markers chromogranin a, pro-gastrin-releasing peptide and neuron-specific enolase in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol* 2006; 27(1):8-16.

- (26) Gregorc V, Spreafico A, Floriani I, Colombo B, Ludovini V, Pistola L et al. Prognostic value of circulating chromogranin A and soluble tumor necrosis factor receptors in advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2007; 110(4):845-853.
- (27) Zhang D, Lavaux T, Voegeli AC, Lavigne T, Castelain V, Meyer N et al. Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clin Chem* 2008; 54(9):1497-1503.
- (28) Li M, Xiao T, Zhang Y, Feng L, Lin D, Liu Y et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 levels in peripheral plasma and tumour tissues of lung cancer patients. *Lung Cancer* 2010.
- (29) Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 58(3):384-391.
- (30) Safranek J, Pesta M, Holubec L, Kulda V, Dreslerova J, Vrzalova J et al. Expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in lung tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and benign pulmonary disease. *Anticancer Res* 2009; 29(7):2513-2517.
- (31) Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, Johansson R, Kosma VM. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. *Histol Histopathol* 2008; 23(6):693-700.
- (32) Shah SA, Spinale FG, Ikonomidis JS, Stroud RE, Chang EI, Reed CE. Differential matrix metalloproteinase levels in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139(4):984-990.
- (33) Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A et al. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods* 2003; 273(1-2):83-101.
- (34) Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96(1):34-40.
- (35) Cai Z, Chen Q, Chen J, Lu Y, Xiao G, Wu Z et al. Monocyte chemotactic protein 1 promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in vivo. *Neoplasia* 2009; 11(3):228-236.

9. PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Publikace v impaktovaných časopisech

- Vrzalova J, Prazakova M, Novotny Z, Topolcan O, Casova M, Holubec L, Jr. Test of ovarian cancer multiplex xMAP technology panel. *Anticancer Res* 2009; 29(2):573-576. IF 1,428
- Pesta M., Topolcan O., Kulda V., Pesek M., Vrzalova J., Treska L., Safránek J., Prazakova M., Vycital O., Bruha J., Holubec L., Liska V. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer. Article in press, *Lung Cancer*, Manuscript vLUNGCANCER-D-11-00173.
- Prazakova M., Vrzalova J., Auge JM., Safránek J., Topolcan O., Fuchsova R., Spisakova M., Holubec L. jr, Pesta M. The role of MonoTotal in the primary diagnosis, prognosis and follow up of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Anticancer Research*, Volume 31, Issue No. 9, 2011.

Abstrakta přednášek a posterů

- Topolčan. O., Holubec L.jr., Svobodová Š., Třeška V., Liška V., Pražáková M. The importance TPS and TK for surgical oncology. XI. International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona, Spain, 21th – 24th February 2007, Abstract book p. 66.
- M. Pražáková, O. Topolčan, M. Časová, J. Šafránek, L. Holubec jr. Monototal – new marker for NSCLC. The 35th Meeting of the International society for oncodevelopmental biology and medicine (ISOBM), Prague, September 15th – 19th, 2007, *Tumour Biol.* 2007;28 (suppl.1), IF 2,407
- Holubec L., Topolčan O., Pražáková M. , PET/CT and tumor markers in gynecological cancer. The 35th Meeting of the ISOBM society, Prague, September 15th – 19th, 2007, *Tumour Biol.* 2007;28 (suppl.1), IF 2,407
- Topolčan O., Pražáková M., Holubec L., Casová M., Šafránek J., Vrzalová J. Cytokeratins in lung cancer. 23rd IATMO conference, Trieste – Italy, October 2007.
- Vrzalová J., Topolčan O., Holubec L jr, Pražáková M., Pešek M. Chromogranin A XV. Západočeské pneumoonkologické dny, Plzeň, 8. -9.11.2007
- Pražáková M., Topolčan O., Časová M., Holubec L. jr., Šafránek J., Monototal. XV. Západočeské pneumoonkologické dny, Plzeň, 8. -9.11.2007
- Pražáková M., Topolčan O., Holubec L. Jr., Mrázková P., Časová M., Vrzalová J., Novotný Z., PET/CT and tumor markers in cancer diseases – case reports. CECHTUMA 2008, Plzeň, March 30 – April 1, 2008. Book of abstracts p.15.
- Pešek M., Topolčan O., Holubec L., Vrzalová J., Krákorová G., Pražáková M., Šafránek J., Assessment of Chromogranin A in lung cancer patients. CECHTUMA 2008, Plzeň, March 30 – April 1, 2008. Book of abstracts p.22.
- Topolčan O., Holubec L., Šafránek J., Pešek M., Pražáková M., Třeška V., Monototal and other cytokeratines in patients with NSCLC. CECHTUMA 2008, Plzeň, March 30 – April 1, 2008. Book of abstracts p.22.
- Holubec L., Topolčan O., Šafránek J., Pražáková M. at al., The role of Monototal in relation to other cytokeratins for primary diagnosis of patients with non small cell lung cancer (NSCLC). 1st European Lung Cancer Conference Geneva,

Switzerland 23-26 April 2008. Journal of Thoracic Oncology, 2008, Vol. 3, No.4, S38-S39. IF 3,5

- Pražáková M., Topolčan O., Pešek M., Holubec L., Vrzalová J., Krákorová G., Šafránek J., Chromogranin A u nádorů plic. XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11 – 13.5. 2008.
- Vrzalová J., Topolčan O., Pražáková M., Časová M., Novotný Z., Možnosti využití multiplexového panelu pro ovariální karcinom – pilotní studie. XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11 – 13.5. 2008.
- Pražáková M., Novotný Z., Holubec L.jr., Topolčan O., Mrázová P., Fínek J., Záhlava J., PET/CT a nádorové markery u gynekologických nádorů. XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11 – 13.5. 2008.
- Krákorová G., Pražáková M., Holubec L., Topolčan O., Mrázová P., Mrázová P., Pešek M., PET/CT a nádorové markery u nádorů plic. XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11 – 13.5. 2008.
- Auge JM., Molina R., Pražáková M., MIA in benign and malignant diseases. XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11 – 13.5. 2008.
- Šafránek J., Topolčan O., Pražáková M., Holubec L., Pešek M., Třeška V., Monototal a diagnostika nemalobuněčného plicního karcinomu. XXIX. Imunoanalytické dny, Špindlerův Mlýn, 11 – 13.5. 2008.
- Topolčan O., Holubec L., Šafránek J., Pešek M., Třeška V., Vrzalová J., Pražáková M. et al., The importance of Monototal for primary diagnosis of patients with non small cell lung. CLAS 34th International Meeting, Coral Springs, FL, US, June 2008. Journal of Clinical Ligand Assay, 2008, vol. 30, no 1-2, p. 65,IF 0,265
- Holubec L., Topolčan O., Vrzalová J., Pražáková M., Pešek M., Šafránek J. et al., The importance of chromogranin A in lung cancer patients. 11th Central European Lung Cancer Conference, June 12 – 14, 2008 , Ljubljana, Slovenia. Endoscopic Review, Vol. 13, No. 29, June 2008.
- Topolčan O., Vrzalová J., Holubec L., Pražáková M., Šafránek J., Pešek M., The role of Monototal in relation to other cytokeratins in primary diagnosis and follow-up. 11th Central European Lung Cancer Conference, June 12 – 14, 2008 , Ljubljana, Slovenia. Endoscopic Review, Vol. 13, No. 29, p. 59, June 2008.
- Časová M., Novotný Z., Vrzalová J., Topolčan O., Roušarová M., Holubec L., Pražáková M. HE4 marker pro ovariální karcinom v rutíně. XXX.Imunoanalytické dny, Jihlava 5.-7.dubna 2009, sborník abstrakt a přednášek, str. 55-58.
- Pražáková M., Topolčan O., Vrzalová J., Holubec L. Biologická aktivita nádorů plic. XXX.Imunoanalytické dny, Jihlava 5.-7.dubna 2009, sborník abstrakt a přednášek, str. 158-161.
- Topolčan O., Svobodová Š., Pražáková M., Holubec L., Šafránek J., Vrzalová J., Časová M., Třeška V., Fínek J. Tumor markers and colorectal cancer. XII.International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona 4th-7th February 2009, Abstract book p. 13.
- Vrzalová J., Topolčan O., Pražáková M., Časová M., Novotný Z. The test of multiplex panel for ovarian carcinoma- a pilot study. XII.International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona 4th-7th February 2009, Abstract book p. 55.
- Vrzalová J., Pražáková M., Topolčan O., Holubec L. Novel markers of bone metastatic process- use of multiplex assay- a pilot study. XII.International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona 4th-7th February 2009, Abstract book p. 72

- Topolčan O., Krákorová G., Pražáková M., Svobodová Š, Holubec L., Šafránek J., Vrzalová J., Časová M., Třeška V., Pešek M., Fínek J. Monototal-prognosis and therapy control in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). XII.International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona 4th-7th February 2009, Abstract book p. 74.
- Pražáková M., Topolčan O., Novotný Z., Holubec L., Vrzalová J., Mrázková P., Časová M., Fínek J., Záhlava J. PET/CT and tumor markers. XII.International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona 4th-7th February 2009, Abstract book p.77.
- Prazakova M., Novotny Z., Topolcan O., Holubec L., Vrzalova J, Mrazkova P, Casova M, Finek J. and Zahlava J. PET/CT and tumor markers for primary diagnostics, therapy monitoring and follow-up of patients with various malignancies. 14th International Hamburg Symposium on Tumor Markers, 7-9 Dezember Hamburg, 2008. Anticancer Res. 2008; 28(6B): 4046. IF 1,604
- Vrzalová J, Pražáková M, Topolčan O, Holubec L. Novel markers of bone metastatic process- use of multiplex assay: a pilot study. 14th International Hamburg Symposium on Tumor Markers, 7-9 Dezember Hamburg, 2008. Anticancer Res. 2008; 28(6B): 4069. IF 1,604
- Topolcan O., Holubec L., Šafránek J., Pražáková M., et al., The Importance of MonoTotal for Primary Diagnosis of Patients with Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC). 14th International Hamburg Symposium on Tumor Markers, 7-9 Dezember Hamburg, 2008. Anticancer Res. 2008; 28(6B): 4038-39. IF 1,604
- Pražáková M., Topolčan O., Holubec L., Vrzalová J., Pešek M., Časová M., Holubec L. Chromogranin A. 8th International conference of Anticancer Research, Kos, Greece, 17. -22.10.2008. Anticancer Res. 2008; 28(5C): 3232. IF 1,604
- Vrzalová J, Topolčan O, Pražáková M. . Multiple markers in the follow up ovarian cancer. 8th International conference of Anticancer Research, Kos, Greece, 17. -22.10.2008. Anticancer Res. 2008; 28(5C): 3232. IF 1,604
- Topolcan O, Holubec L, Vrzalova J, Safranek J, Pešek M, Třeška V, Pražáková M, Časová M, Polívková V. The role of MonoTotal in relation to other cytokeratins in the primary diagnosis and follow up of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC). 11th Central European Lung Cancer Conference, June 12-14, Ljubljana, Slovenia. Endoscopic Review 2008; 29(13): 58.
- Holubec L., Topolcan O., Vrzalova J., Polivkova V., Pesek M., Safranek J., Treska V., Prazakova M., Spisakova M., Finek J. The importance of Chromogranin A in lung cancer patients. 11th Central European Lung Cancer Conference, June 12-14, Ljubljana, Slovenia. Endoscopic Review 2008; 29(13): 58.
- Havel D, Topolčan O, Holubec L, Polívková V, Pražáková M, Bartůněk L, Časová M, Spišáková M, Hájek T. Can tumor markers improve the diagnostic accuracy of differential diagnostics of pleural effusions? 11th Central European Lung Cancer Conference, June 12-14, Ljubljana, Slovenia. Endoscopic Review 2008; 29(13): 58.
- Pražáková M, Topolčan O., Spišáková M., Holubec L., Vrzalová J. : PET/CT and tumor markers, The 37th Meeting of the ISOBM society, September 27-30, 2009, Amsterdam, The Netherlands, Abstract book p. 128.
- Vrzalová J., Pražáková M., Topolčan O., Časová M., Novotný Z. : The test of multiplex panel for ovarian cancer, The 35th CLAS Annual meeting, September 9-12, 2009, Boston, USA, abstract book p. 8.

- Holubec L., Pražáková M., Vrzalová J., Pešek M. a Topolčan O., Sérové markery u karcinomu plic- mají nám v dnešní době co nabídnout?, XVII. západočeské pneumoonkologické dny; Plzeň, 12. - 13. 11. 2009, Sborník abstrakt .
- Pražáková M., Krákorová G., Topolčan O., Vrzalová J., Pešek M. : Význam nádorových markerů pro diagnostiku a kontrolu léčby plicního karcinomu, Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 9.– 11. února 2010, Sborník abstrakt .
- Pazdiora P., Topolčan O., Pražáková M., Vrzalová J., Třešková I. : Hypovitaminóza D - rizikový faktor vzniku a rozvoje nádorů, Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 9.– 11. února 2010. Sborník abstrakt s.21-22.
- Pražáková M., Topolčan O., Vrzalová J., Holubec L.: MonoTotal – marker for non-small cell lung cancer, X. International conference on tumor markers, Cehtuma 2010, May 16-18, 2010, Mikulov, Czech rep., Conference book p.15.
- Pražáková M., Topolčan O., Svobodová S., Vrzalová J., Pecen L., Krákorová G., Třeška V., Holubec L., Pešek M., MonoTotal- marker for non-small cell lung carcinoma (NSCLC). The 38th Meeting of the International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM), 3th – 8th September, 2010, Munchen. Tumour Biol. 2010;31 (suppl.1). IF 2,407
- Holubec L., Topolčan O., Vrzalová J., Dreslerová J., Pražáková M., Pešek M., Fínek J. Deficit vitamínu D u nemocných s nemalobuněčným karcinomem plic. XVI. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov 22.- 24.10. 2010. Sborník abstrakt, s. 147-148.
- Dreslerová J., Pešta M., Kulda V., Šafránek J., Pražáková M., Fínek J., Topolčan O., Pešek M., Třeška V., Holubec L. Expresse mRNA MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 v plicní tkáni pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic a benigním plicním onemocněním. XVI. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov 22.- 24.10. 2010. Sborník abstrakt, s. 135.
- Pražáková M., Topolčan O., Pazdiora P., Svobodová S., Fuchsová R., Vrzalová J., et al., Cancer diseases and vitamin D., XIII. International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona, Spain, 23th – 26th February 2011, Abstract book p. 22.