

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Oddělení imunochemické diagnostiky



Dizertační práce

**Využití nových biomarkerů pro zefektivnění
diagnostiky a optimalizaci léčby nádorů trávicího
traktu**

MUDr. Martin Šafanda

Školitel: doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

Plzeň 2017

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE IN PILSEN

Department of Immunochemistry



Doctoral thesis

**Utilisation of new biomarkers for the
optimalization of diagnostics and therapy of
tumors of the gastrointestinal tract**

MUDr. Martin Šafanda

Supervisor: doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

Plzeň 2017

Děkuji mému školiteli doc.PharmDr. Radku Kučerovi, Ph.D. za jeho užitečné rady a vedení a všem kolegům za jejich ochotnou spolupráci a pomoc s laboratorními i klinickými problémy. Zvláštní poděkování patří mé rodině a přátelům za jejich trpělivou podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto předkládanou disertační práci vypracoval samostatně a všechny použité informační zdroje jsem řádně uvedl v příloženém seznamu literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni, červen 2017

MUDr. Martin Šafanda

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Přehled současných znalostí o dané problematice.....	9
2.1	Epidemiologie nádorů žaludku a kolorekta.....	9
2.1.1	Dědičně podmíněné onemocnění.....	12
2.2	Histologická charakteristika karcinomu žaludku	16
2.3	Histologická charakteristika kolorektálního karcinomu.....	18
2.3.1	Imunohistochemická fenotypizace.....	19
2.3.2	Patogenetická a molekulární charakteristika.....	19
2.4	Diagnostika a léčba nádorů žaludku a kolorekta.....	22
2.4.1	Endoskopické metody.....	22
2.4.2	Zobrazovací metody.....	23
2.4.2	Laboratorní diagnostika.....	24
2.5	Léčba nádorů žaludku a kolorekta.....	26
2.5.1	Léčba operabilních stádií.....	26
2.5.2	Léčba pooperační - adjuvatní.....	28
2.5.3	Léčba pokročilého a metastatického karcinomu žaludku.....	29
2.5.4	Léčba metastatického kolorektálního karcinomu.....	31
2.6	Resekabilní a potenciálně resekabilní jaterní postižení.....	34
2.7	Klasifikace nádorů žaludku a kolorekta.....	37
3	Cíle práce.....	37
4	Metodika.....	38
4.1	Odběry vzorů.....	38

4.2	Principy použitých imunoanalytických metod.....	38
4.2.1	Imunoradiometrická analýza (IRMA).....	38
4.2.2	Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA).....	39
4.2.3	Chemiluminiscenční analýza (CLIA).....	40
4.2.4	Multiplexová analýza (CLIA).....	41
4.3	Sledované biomarkery a jejich charakteristika.....	42
4.3.1	Karcinoembryonální antigen (CEA).....	43
4.3.2	Cancer antigen 19-9 (CA 19-9).....	44
4.3.3	Cancer antigen 72-4 (CA 72-4).....	44
4.3.4	Tkáňový polypeptidický antigen (TPA).....	44
4.3.5	Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS).....	45
4.3.6	Prothrombin induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II).....	45
4.4	Parametry kostního metabolismu a nádory.....	46
4.4.1	Osteoprotegerin (OPG).....	46
4.4.2	Osteopontin (OPN).....	47
4.4.3	Fibroblast growth factor 23 (FGF23).....	47
4.5	Matrix metaloproteinázy (MMP).....	48
4.6	Biomarkery rizika vzniku karcinomu žaludku.....	51
4.6.1	Pepsinogen I a pepsinogen II.....	52
4.6.2	Poměr pepsinogen I / pepsinogen II.....	52
4.6.3	Gastrin.....	52
4.6.4	Helicobacter pylori.....	52
4.7	Vybrané parametry statistického hodnocení významu biomarkerů.....	53
4.7.1	Senzitivita.....	53
4.7.2	Specifická.....	53

4.7.3	Pozitivní prediktivní hodnota.....	53
4.7.4	Negativní prediktivní hodnota.....	53
4.7.5	Relativní riziko.....	54
4.7.6	Receiver Operating Characteristic (ROC) křivka.....	54
4.7.7	Area Under the Curve (AUC, plocha pod křivkou).....	54
4.8	Statistické zpracování dat.....	54
4.9	Soubory nemocných a použité analytické metody.....	55
4.9.1	Karcinom žaludku.....	55
4.9.2	Metastázy kolorektálního karcinomu do jater.....	57
4.9.3	Různá stádia kolorektálního karcinomu jako pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu.....	59
5	Výsledky a diskuze.....	60
5.1	Výsledky a hodnocení souboru karcinomu žaludku.....	60
5.2	Výsledky a hodnocení metastáz kolorektálního karcinomu do jater.....	65
5.3	Výsledky a hodnocení pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu.....	76
6	Závěry pro klinickou praxi.....	80
7	Perspektivy.....	82
8	Literatura.....	82
9	Přílohy.....	122

1 Úvod

Během posledních 10 let došlo k výraznému pokroku v diagnostice a zejména léčebných možnostech nádorových onemocnění. Přestože incidence nádorových onemocnění stoupá meziročně v průměru o 4%, u některých lokalizací se úspěšnost léčby promítá do setrvalého poklesu úmrtnosti. Typickým příkladem je kolorektální karcinom. Podle dat z Národního onkologického registru (NOR) bylo v roce 2004 hlášeno 8064 nových onemocnění. V roce 2014 to bylo již 8160 nových onemocnění, ale pokud srovnáme mortalitu ve stejných letech, došlo k poklesu úmrtnosti z 4556 na 3434 případů. Zároveň došlo k prodloužení celkového přežití u metastatické nemoci z 10 na 30 měsíců [Ferlay, 2015]. Zcela jedinečnou kapitolou jsou nemocní s izolovaným jaterním postižením, kde není výjimkou i trvalé vyléčení. Úspěšnost léčby by jistě byla lepší, pokud bychom dokázali diagnostikovat více případů v nižších klinických stádiích, které jsou vyléčitelné bez nutnosti onkologické léčby. Jiná situace je u druhého sledovaného onemocnění, karcinomu žaludku. V roce 2004 bylo v NOR hlášeno 1696 nádorů žaludku. V roce 2014 to bylo 1454. Je zřejmé, že dochází k postupnému poklesu incidence, nicméně mortalita je i nadále vysoká, ve sledovaných letech zemřelo 1409 resp. 1099 nemocných. Jedná se o nádory s nepříznivým biologickým chováním, které jsou již v době diagnózy lokálně pokročilé, nebo generalizované. 5 leté přežití v závislosti na stádiu: St.I 70%, St.II 32%, St.III 10%, St.IV 3% [Wagner, 2010].

Nádorové markery dnes patří ke standardním diagnostickým prostředkům. Uplatňují se především v monitorování průběhu onemocnění a ke kontrole úspěšnosti léčby. Ve snaze zvýšit sensitivitu současně používaných nádorových markerů se často analyzuje panel několika markerů současně. Markery jsou kontrolovány opakovaně a sleduje se jejich dynamika. Poslední dobou se setkáváme s řadou diagnostických algoritmů, kdy se za pomoci statistických metod navrhuje algoritmy výpočtů odhadu rizika přítomnosti nádoru v organismu, či rizika progresu nádorového onemocnění. Identifikace biomarkeru časného relapsu může vést k prodloužení přežití nemocných. Práce je členěna na následující části:

Přehled současných znalostí o dané problematice

Cíle práce

Metodická část

Výsledky a diskuze

Závěry pro praxi

Perspektivy

V přehledu současných znalostí jsem se podrobně věnoval klíčovým diagnózám této práce: kolorektálnímu karcinomu a karcinomu žaludku. Zpracoval jsem zde epidemiologii, rizikové faktory, histologické i molekulární charakteristiky obou nádorů a aktuální léčebnou strategii jednotlivých stádií nemoci na základě mých klinických zkušeností.

V souladu s cíli práce je i členění metodiky, výsledkové části a závěry. V každé části jsem hodnotil odlišnou skupinu nemocných. V první části se věnuji zhodnocení nemocných s karcinomem žaludku. Ve druhé části jsem se věnoval souboru nemocných s metastázami kolorektálního karcinomu do jater. Ve třetí části, vyhodnocení pilotní studie využití FGF23 v diagnostice kolorektálního karcinomu. Závěr práce je věnován zhodnocení včetně perspektiv využití výsledků výzkumu v klinické praxi.

2 Přehled současných znalostí o dané problematice

Incidence nádorových onemocnění celosvětově vzrůstá, a to zvláště ve vyspělých zemích. V České republice je situace podobná, u některých typů nádorových onemocnění jsou statistická čísla alarmující. Nádorová onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT) tvoří celou čtvrtinu všech nádorů v České republice.

2.1 Epidemiologie nádorů žaludku a kolorekta

Karcinom žaludku je celosvětově onemocněním s mírně klesající incidencí, je však pátým nejčastějším nádorovým onemocněním. Jsou rozlišovány dvě lokalizace; kardiální a nekardiální, které se od sebe liší nejen lokalizací, ale především epidemiologicky, rizikovými faktory a klinickým obrazem. U evropské populace se vyskytuje nejčastěji forma kardiální [Ferlay, 2015] s převahou výskytu u mužů. V centrální Asii rovněž převažuje nádor kardiie [Kamangar, 2006], ale v jihovýchodní Asii dominuje nekardiální lokalizace karcinomu žaludku [Ang, 2014]. V některých zemích, například v Austrálii, USA a Velké Británii, nacházíme srovnatelnou incidenci obou typů nádorů [Colquhoun, 2012]. V České republice se nejčastěji, obdobně jako ve většině Evropy, vyskytuje karcinom žaludku v kardiální lokalizaci. Incidence karcinomu žaludku byla v roce 2014 16,27 mužů/11,45 žen na 100 000 obyvatel. To je

v absolutních číslech 1454 nově diagnostikovaných nádorů [ÚZIS ČR, 2016]. Přehled nejdůležitějších rizikových faktorů pro kardiální i nekardiální lokalizaci je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled rizikových faktorů pro karcinom žaludku [Kamiri, 2014]

Kardiální lokalizace	Nekardiální lokalizace
Věk	Věk
Mužské pohlaví	Mužské pohlaví
Kouření	Kouření
Rasa	Rasa
Rodinná zátěž	Rodinná zátěž
Nedostatek fyzické aktivity	Nedostatek fyzické aktivity
Malé množství vlákniny ve stravě	Malé množství vlákniny ve stravě
Ozařování v anamnéze	Ozařování v anamnéze
	Alkohol
Obezita	Helicobacter Pylori
Gastroesofageální reflux	Nízký socioekonomický status
	Vysoký příjem slaného a uzeného jídla
	Nízký příjem ovoce a zeleniny

K faktorům spojeným se zvýšeným rizikem rozvoje karcinomu žaludku se dále řadí: prodělané infekce virem Epstein-Barrové [Takada, 2000; Cho, 2016], krevní skupina A [Crew, 2004], perniciosní anémie [Vannella, 2013] a předcházející chirurgické výkony na žaludku pro jiná, benigní onemocnění [Fischer, 1983]. Důležitým faktorem jsou chronické zánětlivé změny žaludeční sliznice s následnou slizniční metaplazií a dysplazií a déle trvající infekce *Helicobacter pylori* [Parsonnet, 1991]. Diskutován je často i vliv pití alkoholu na zvýšení rizika rakoviny žaludku. Statisticky významný vliv na vznik karcinomu žaludku byl však pouze prokázán u tzv. těžkých pijanů [Tramacere, 2012].

Zatímco většina nádorů žaludku vzniká sporadicky, odhaduje se, že 5 až 10% může mít familiární komponentu a 3 až 5% nádorů vzniká na základě vrozených predispozičních syndromů [Lindor, 2008].

Kolorektální karcinom (KRK) je třetí nejčastější nádor mezi muži a druhý mezi ženami, což představuje 10% všech nádorů po celém světě [Siegel, 2011]. KRK je jednou z nejčastějších

onkologických diagnóz a ve všech vyspělých státech jeho incidence setrvale narůstá. Česká republika navíc obsazuje přední místa v mezinárodním srovnání. Podle nejnovějších dat GLOBOCAN z roku 2012 [Ferlay, 2013], stojí česká populace mužů v evropském přehledu na 3. místě za Slovenskem a Maďarskem, u žen potom obsazujeme 10. nejvyšší pozici v Evropě. Incidence je vyšší 1,4x u mužů než u žen. V roce 2014 byla incidence KRK v ČR 79,09/100 000 obyvatel a mortalita 38,15/ 100 000 obyvatel. V absolutních číslech bylo v roce 2014 diagnostikováno 8160 nových nemocných. Ačkoliv incidence mírně stoupá, mortalita pozvolna klesá [ÚZIS ČR, 2016]. Riziko vzniku rakoviny tlustého střeva závisí na různých faktorech, které lze rozdělit na vlivy životního stylu (ovlivnitelné) a faktory genetické (neovlivnitelné). Relativní riziko nejdůležitějších rizikových faktorů je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2. Relativní riziko nejběžnějších rizikových faktorů [Johnson, 2013]

Rizikové faktory	Hodnocené parametry	RR(95% CI)
BMI	30 vs 22kg/m ²	1.10 (1.08-1.12)
Fyzická aktivita (FA)	Zvýšení FA o 2 stupně dle stupnice	0.88 (0.86-0.91)
Kouření	5 vs. 0 krabiček/rok	1.06 (1.03-1.08)
	30 vs. 0 krabiček/rok	1.26 (1.17-1.36)
Alkohol	5 vs. 0 nápojů týdně	1.06 (0.91-1.23)
	20 vs. 0 nápojů týdně	1.26 (0.68-2.32)
KRK v rodinné anamnéze	Ano vs. Ne	1.80 (1.61-2.02)
Zánětlivé střevní nemoci	Ano vs. Ne	2.93 (1.79-4.81)
HRT současná	5 vs. 0 let	0.65 (0.26-1.68)
	10 vs. 0 let	0.61 (0.10-3.96)
HRT v minulosti	5 vs. 0 let	0.96 (0.91-1.02)
	10 vs.0 let	0.84 (0.70-1.02)
Aspirin/NSAR	5 vs. 0 let	0.76 (0.50-1.15)
Uzené/zpracované maso	5 vs. 0 porcí týdně	1.09 (0.93-1.25)
Červené maso	5 vs. 0 porcí týdně	1.13 (1.09-1.16)
Ovoce	3 vs. 0 porcí týdně	0.84 (0.75-0.96)
Zelenina	5 vs.0 porcí týdně	0.86 (0.78-0.94)

Věk je považován za hlavní neměnný rizikový faktor pro nejčastější, sporadický KRK. Téměř 70% pacientů s karcinomem tlustého střeva jsou starší než 65 let, naproti tomu před 40 rokem je toto onemocnění vzácné [Davis, 2011]. Přibližně 20% případů KRK je spojeno s rodinou zátěží v pokrevním příbuzenstvu 1. stupně, tedy u rodičů, sourozenců a dětí [Quintero, 2016].

Dalším predispozičním faktorem ke vzniku KRC jsou idiopatické střevní záněty: ulcerózní kolitida a Crohnova nemoc. Ve vyšším riziku gastrointestinálních malignit a především KRC jsou pacienti po prodělané radioterapii na oblast dutiny břišní pro malignitu v dětském věku. V dospělosti se zvyšuje riziko karcinomu rekta po radioterapii pro karcinom prostaty [Rapiti, 2008].

Na základě mezinárodních doporučení byla, podle přítomnosti zmíněných rizikových faktorů, definována skupina osob se zvýšeným rizikem vzniku KRC a tyto osoby byly pak zařazeny do pravidelného skríninkového programu. Patří sem skupiny nemocných, u kterých jsou popsány: adenomové polypy v osobní anamnéze, kolorektální karcinom v osobní anamnéze, zánětlivé onemocnění střev, rodinná anamnéza KRC nebo polypů, dědičné syndromy [Balmaña, 2013].

Asi 10% případů KRC jsou hereditárně podmíněné.

2.1.1 Dědičně podmíněné onemocnění

Hereditární difuzní karcinom žaludku (HDGC) je autozomálně dominantně dědičný nádorový syndrom s vysokým celoživotním rizikem karcinomu žaludku difuzního typu, zvýšené je i riziko nádorů prsu, především lobulárního typu. Mnoho rodin s HDGC (cca 50%) má prokázanou germinální mutaci tumor supresorového genu CDH1 pro adhezni protein E-cadherin. Odhadované celoživotní riziko rozvoje karcinomu žaludku do 80 let je u mužů 67% a u žen 83%. Nosiči mají současně i zvýšené riziko karcinomu prsu (42%). Průměrný věk manifestace HDGC je 37 let, s rozpětím 14–69 let [Fitzgerald, 2010]. Z dalších rizikových genů uvádím CTNNA1 gen (alpha-catenin) [Peltomaki, 2004]. HDGC je charakterizován pozdní diagnózou a špatnou prognózou. Profylaktická gastrektomie (bez D2 lymfadenektomie) se doporučuje mezi 18 a 40 rokem pro asymptomatické nosiče zárodečné mutace CDH1. Profylaktická gastrektomie před 18. rokem věku není doporučena, ale lze o ni uvažovat u některých pacientů, zvláště v rodinách s diagnózou rakoviny žaludku před 25 rokem života [Hebbard, 2009]. Tyto preventivní operace se v ČR a v Evropě provádějí velice zřídka. Ženy s CDH1 mutací mají zvýšené riziko rakoviny prsu a je třeba dodržovat podobné sledování jako u nosiček mutace BRCA1 / BRCA2 [Fitzgerald, 2004].

Lynchův syndrom (HNPCC) - dědičný nepolypózní kolorektální karcinom je autozomálně dominantně dědičný nádorový syndrom charakterizovaný časným nástupem kolorektálního

karcinomu, nádorů děložní sliznice, jakož i dalších typů nádorů, včetně nádorů žaludku. Lynchův syndrom vzniká ze zárodečné mutace některého ze čtyř reparačních genů DNA tzv. Mismatch repair genes (MMR geny: MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2). V poslední době se delece genu pro epiteliální buněčnou adhezni molekulu (EPCAM) považuje za součást Lynchova syndromu [Gayther, 1998]. Představuje 2 - 4% všech kolorektálních nádorů [Lynch, 2003]. Nádory žaludku jsou druhým nejčastějším extrakolonickým nádorem (po karcinomu endometria) s rizikem 1% až 13%, a jedná se převážně o nádory intestinálního typu. Vzhledem k nižšímu očekávanému riziku karcinomu žaludku u nosiče mutace MSH6a a PMS2 se skrínink doporučuje pouze nosičům mutace MLH1, MSH2 a EPCAM.

Syndrom juvenilní polypózy (JPS) je vzácný autozomálně dominantní syndrom charakterizovaný přítomností více stopkatých polypů s obsahem primitivní vazivové tkáně podél gastrointestinálního traktu a je spojen se zvýšeným rizikem vzniku GI nádorů [Howe, 1998]. Ve většině případů jsou polypy solitární s nejčastější lokalizací v rektosigmatu, vzácněji v tenkém střevě nebo žaludku. Generalizovaná juvenilní polypóza však postihuje celý průběh trávicí trubice. JPS vzniká ze zárodečných mutací v Smad4 nebo BMPR1A genů. Celoživotní riziko vzniku nádoru u nemocných s JPS se pohybuje od 9% do 50% a mění se podle typu mutace [Hennink, 2015]. U pacientů s žaludečními polypy, JPS nese celoživotní riziko 21% pro vzniku nádoru žaludku.

Familiární adenomatosní polypóza (FAP) je autozomálně dominantní onemocnění s vysokou penetrancí způsobené vrozenou mutací tumor-supresorového genu APC (Adenomatous Polyposis Coli) na dlouhém raménku 5. chromozomu (5q21). Jeho produkt fyziologicky degraduje transkripční faktor β -katenin, který stimuluje buněčnou proliferaci. Mutace genu vede nejčastěji ke vzniku dysfunkčního zkráceného proteinu „truncated APC protein“. V případě FAP každá buňka obsahuje jednu mutovanou alelu. Pokud následuje poškození druhé alely, dojde k úplnému vyřazení tumor-supresorového efektu APC proteinu a ke vzniku mnohočetných adenomů. Sporadické adenomy vznikají obdobně následnými mutacemi obou alel APC genu v jednotlivých somatických buňkách. Mutace v N-terminální části APC genu mohou způsobit atenuovanou formu FAP (AFAP = Attenuated Familial Adenomatous Polyposis) s opožděným nástupem vzniku menšího množství polypů (<100) s převahou výskytu v pravé části tračníku. Asi třetina pacientů s klinickou diagnózou AFAP však vykazuje intaktní APC gen a bialelickou mutaci MYH (Myosin Heavy Chains) genu [Pezzi, 2009; Claes, 2011]. Až 75% nemocných s FAP udává výskyt polypů nebo nádorů tlustého střeva u

příbuzných před 40. rokem života [Lynch, 2010]. Polypy v horní části zažívacího traktu; v žaludku, dvanáctníku a periampulární jsou nejčastějším extrakolonickým projevem FAP. Většina (přibližně 90%) žaludečních polypů je neadenomatózních (benigních), zatímco žaludeční adenomatózní polypy představují jen 10% polypů, které mohou vést k malignizaci. Prevalence se odhaduje na 1:10 000. FAP je odpovědná asi za 1% výskytu KRK. Postižení obou pohlaví je stejné. Vzhledem k prakticky 100% riziku maligního zvratu některého z adenomů je neléčená FAP prognosticky velmi závažné onemocnění [Hirota, 2006]

Gardnerův syndrom je autozomálně dominantní dědičná choroba charakterizovaná výskytem mnohočetných kožních infundibulárních (epidermoidních) cyst a typickými povrchovými měkkotkáňovými lézemi, tzv. fibromy nuchálního typu. Jedná se o fenotypickou variantu familiární adenomatózní polypózy, při které se vyskytují desítky až stovky adenomatózních polypů v tlustém střevě a konečníku. Molekulárně genetická podstata je zárodečná mutace v genu APC, která vede k produkci zkráceného (nefunkčního) proteinu. Tento abnormální protein nemůže tlumit aktivitu β -catenin, dochází k poruchám buněčného cyklu prostřednictvím deregulace Wnt/Wingless signální dráhy [Aoki, 2007]. Prevalence není známá.

Turcotův syndrom je vzácné autozomálně dominantní onemocnění charakterizované tvorbou mnohočetných adenomových polypů v tlustém střevě a zvýšeným výskytem nádorů mozku, glioblastomu a meduloblastomu. Byl definován ve 2 formách. Lynchově syndromu podobný s mutací MLH1 a PMS2 genu a FAP podobný s mutací APC genu [Hennink, 2015].

Peutz-Jeghersův syndrom (PJS) je autosomálně dominantní syndrom způsobený zárodečnými mutacemi v STK11 / LKB1 tumor supresorového genu, které byly prokázány u 30% až 80% pacientů [Hemminki, 1998]. Onemocnění je asi desetinásobně méně časté než FAP. Tento syndrom je charakterizovaný kombinací mukokutánních melaninových pigmentací a gastrointestinální hamartomatózní polypózy. Četné pigmentové skvrny velikosti do 5 mm (lentiginosy) jsou přítomny u 95% pacientů a bývají v typických lokalizacích – na bukální sliznici, červeni rtů, periorálně, na nosních křídlech, víčkách, dlaních, ploskách nohou a v anogenitální oblasti [Viktorinová, 2005]. Zatímco kožní skvrny v období puberty blednou a mohou zcela vymizet, nález na bukální sliznici přetrvává do dospělosti. Různě velké polypy se mohou nacházet v průběhu celé trávicí trubice (dominantně v tenkém a tlustém střevě) a vzácněji i v jiných orgánech (nosní sliznice, bronchiální strom, močový měchýř, žlučník). Častou komplikací bývají obstrukce tenkého střeva provázené kolikovitými bolestmi břicha,

enteroragií a chronickou anemizací. Malignizace samotných polypů je relativně vzácná. Nemocní však mají výrazně zvýšené riziko jiných neoplazií (jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva, pankreatu, prsu, vaječníku, dělohy, varlat, štítné žlázy, plic a kůže). Celoživotní riziko asociovaného nádorového onemocnění je přes 90%, celoživotní riziko vzniku nádoru žaludku je 29%. Pacienti v průběhu života obvykle podstupují četné chirurgické zákroky pro intestinální komplikace a jiné nádory.

Li-Fraumeni syndrom (LFS) je vzácný autozomálně dominantně dědičný syndrom s vysokou predispozicí k časným mnohočetným nádorům, který je způsoben zárodečnou mutací tumor supresorovém genu TP53. LFS byl klinicky popsán již v 60. letech minulého století a je spojen se sarkomy kostí a měkkých tkání, karcinomy nadledvin, nádory mozku, časnými nádory prsu, leukemiemi a lymfomy [Masciari, 2011].

Kromě výše popsaných i hereditární nádory jiných orgánů mají úzkou souvislost s nádory GIT. Jedná se především o **Hereditární nádory prsu a vaječníků**. Jde se o autozomálně dominantní syndrom způsobený zárodečnou mutací BRCA 1/2 genu. Vztah zárodečné mutace BRCA1/2 (BRCA1/2 Cancer susceptibility gene 1/2) s vývojem nádoru prsu a nádoru vaječníků byl široce zkoumán a rozpoznán. Je známo, že tyto geny fungují na více místech v těle. Bylo prokázáno spojení BRCA 1/2 mutací s nádory v jiných lokalizacích jako prostata, slinivka břišní a žaludek. Riziko vzniku nádoru žaludku je popsáno 4x vyšší u nosičů BRCA1 mutace a 2x vyšší u nosičů BRCA2 mutace. Onemocnění začínají v časném věku, predominantně u mužů a mají agresivnější průběh [Jakubowska, 2002; Cavanagh, 2015; Merch, 2015].

Tabulka 3. Souhrn familiárních typů nádorů GIT

Název	Genetická mutace	Nádorová manifestace v GIT	Nádorová manifestace mimo GIT
Hereditární difúzní karcinom žaludku	CDH1	žaludek	prs
Lynchův syndrom	MLH1, MLH2, MSH6, PMS2	Tlusté střevo, žaludek, tenké střevo, játra	Děloha, vaječníky, močový trakt, mozek
Juvenilní polypóza	Smad4, BMPR1A	Žaludek, tenké střevo, rektum	-
Familiární		Tlusté střevo,	Papilární nádor štítné žlázy,

adenomová polypóza (FAP)	APC	žaludek, tenké střevo, játra, pankreas	adrenální nádory, meduloblastom
Gardnerův syndrom	APC	Tlusté střevo, játra	Osteomy, štítná žláza, ledvina
Turcotův syndrom	MLH1, PMS2, APC	Tlusté střevo	Glioblastom, meduloblastom
Peutz-Jeghersův syndrom	STK11/LKB1	Žaludek, jícn, tlusté i tenké střevo, pankreas	Prs, vaječníky, děloha, varlata, štítná žláza, plíce
Li-Fraumeni	TP53	Žaludek, tlusté střevo, jícn, pankreas	Sarkomy měkkých tkání, adrenální nádory, prs, leukémie, plíce
Hereditární nádory prsu a vaječníků	BRCA1/2	Žaludek, pankreas	Prs, vaječníky, prostata

2.2 Histologická charakteristika karcinomu žaludku

Histologicky vykazuje karcinom žaludku výraznou heterogenitu jak v architektonické úrovni, tak i cytologické úrovni, často s koexistencí několika histologických prvků. V průběhu uplynulého půlstoletí byla histologická klasifikace karcinomu žaludku založena na **Laurenových kritériích**, ve kterých byly střevní (intestinální) typ a difúzní typ adenokarcinomu považovány za dva hlavní histologické podtypy, plus neobvyklé varianty (neurčitý typ) [Hwang, 2010]. Relativní frekvence jsou přibližně 54% pro střevní typ, 32% v případě difúzního typu a 15% pro neurčitý typ [Polkowski, 1999]. Existují náznaky, že karcinom žaludku difúzního typu je častěji vidět u žen a mladých jedinců [Lauren, 1965; Caldas, 1999], zatímco střevní typ adenokarcinomu je více spojován se střevní metaplazií a infekcí *Helicobacterem pylori* [Kaneko, 2001; Parsonnet, 1991]. V roce 2010 WHO klasifikace stanovila čtyři hlavní histologické typy karcinomů žaludku: tubulární, papilární, mucinózní a difúzní (včetně karcinomu z buněk pečetního prstenu), plus neobvyklé histologické varianty [Lauwers, 2010]. Tato klasifikace je založena na převládajícím histologickém typu karcinomu, který často koexistuje s méně dominantními rysy jiných histologických typů.

Tubulární adenokarcinom je nejběžnější histologický typ časného karcinomu žaludku. Má tendenci tvořit polypoidní nebo houbovitě masy, histologicky charakterizované

nepravidelnými nafouklými, kondenzovanými nebo různě rozvětvenými tubuly. Ty jsou různých velikostí, často s intraluminálním hlenem, jadernými a zánětlivými úločky.

Papilární adenokarcinom je další běžná histologická varianta, která je často vidět u časného karcinomu žaludku. Obvykle postihuje starší nemocné, vyskytuje se v proximální části žaludku, a je často spojen s jaterním postižením a vyšší mírou postižení lymfatických uzlin. Histologicky je charakterizován epiteliálními výstupky s centrálními fibrovaskulárními jádry.

Mucinózní adenokarcinom představuje 10% karcinomů žaludku. Histologicky je charakterizován extracelulárními prostory s jezírky mucinózního hlenu, které tvoří alespoň 50% objemu nádoru. Nádorové buňky mohou tvořit žlázovou architekturu s nepravidelnými shluky buněk, ve kterých mohou být rozptýleny buňky typu pečetního prstenu.

Difuzní infiltrující adenokarcinom včetně karcinomu buněk pečetního prstenu je tvořen mixem buněk bez vzájemné soudržnosti. Nádorové buňky se mohou podobat lymfocytům, histiocytům a plazmatickým buňkám. Distribuce buněk je obvykle difuzní, mohou tvořit malé skupiny s okrsky žlázových struktur a nápadnou desmoplastickou reakcí stromatu. Často je v kombinaci s tubulárním nebo mikropapilárním typem nádorové tkáně. Kromě výše uvedených čtyř hlavních histologických podtypů, klasifikace WHO rovněž podporuje další neobvyklé histologické varianty [Hu, 2012]. Viz Tabulka 4.

Tabulka 4. Klasifikační systém adenokarcinomů žaludku

WHO (2010)	Lauren (1965)
Papilární karcinom Tubulární karcinom Mucinózní karcinom	Střevní (intestinální) Typ
Karcinom z buněk tvaru pečetního prstene a jemu podobné	Difuzní typ
Adenosquamózní karcinom Skvamózní karcinom Hepatoidní adenokarcinom Karcinom s lymphoidním stromatem (medulární) Choriokarcinom Karcinosarkom Karcinom z parietálních buněk	Neurčitý typ

WHO (2010)	Lauren (1965)
Maligní rhabdoidní nádor	
Mukoepidermoidní karcinom	
Karcinom z Panethových buněk	
Nediferencovaný karcinom	
Směšený adeno-neuroendokrinní karcinom	
Nádor z endodermálního sinu	
Embryonální karcinom	
Čistý nádor ze žloutkového váčku	
Onkocytární adenokarcinom	

2.3 Histologická charakteristika kolorektálního karcinomu

Základní morfologickou změnou při vzniku karcinomu je dysplastická léze epitelu tlustého střeva (aberantní kryptový fokus, plochý, polypózní adenom, neadenomový polyp jakékoli etiologie). Riziko jejich malignizace závisí na histologické stavbě a velikosti léze. Histologicky více než 90% kolorektálních karcinomů jsou adenokarcinomy pocházející z epitelových buněk sliznice tlustého střeva [Hamilton, 2010]. Jiné vzácné druhy kolorektálních karcinomů zahrnují neuroendokrinní, z dlaždicových buněk, adenoskvamózní, vřetenobuněčný a nediferencovaný. Konvenční adenokarcinom se vyznačuje přítomností žlázových struktur, které jsou základem pro stanovení nádorového gradingu [Fleming, 2012]. U dobře diferencovaného adenokarcinomu má více než 95% nádoru přítomnou žlázovou strukturu. Středně diferencovaný adenokarcinom vykazuje 50-95% žlázové struktury. Špatně diferencovaný adenokarcinom obsahuje většinou méně než 50% žlázové struktury. V praxi je přibližně 70% kolorektálních adenokarcinomů diagnostikováno jako středně diferencovaných. Dobře a špatně diferencované karcinomy tvoří 10% a 20%, respektive. Je zřejmé, že stanovení gradingu nádoru je subjektivní záležitostí. Mnohé studie prokázaly, že 2 stupňový třídící systém, který v sobě spojuje dobře a středně diferencovaný adenokarcinom do nízkého stupně (50% žlázy) a definuje špatně diferencovaný adenokarcinom jako vysokého stupně (méně než 50% žlázy), snižuje observační variaci a zlepšuje prognostický význam [Compton, 2000]. Ačkoliv je grading nádoru obecně považován za stádium nezávislou

prognostickou proměnnou, nádory s vysokým gradingem a špatně diferencované histologie jsou spojeny se špatným přežitím pacientů [Blenkinsopp, 1981; Jass, 1986; Comptom, 1999]. Je třeba zdůraznit, že uvedené histologické třídění, se vztahuje pouze na konvenční adenokarcinom. Některé z histologických variant, mohou vykazovat vysoký stupeň gradingu, ale budou se chovat jako low grade nádory, v závislosti na jejich mikrosatelitním stavu.

2.3.1 Imunohistochemická fenotypizace

Nejrozšířenější imunohistochemické markery pro kolorektální adenokarcinom jsou cytokeratiny (CK) 20, CK7 a CDX2. Nejběžnější imunofenotyp kolorektálního adenokarcinomu je pozitivita CK20 a negativita CK7, což je relativně specifický výsledek barvení kolorektálního původu [Chu, 2002]. Avšak až 20% nádorů může vykazovat CK7-pozitivní / negativní CK20 nebo CK7-negativní / CK20-negativní výsledek barvení. Bylo zjištěno, že snížená, nebo chybějící exprese CK20 u kolorektálního karcinomu je spojena s MSI-H [McGregor, 2004]. CDX2 je markerem enterické diferenciaci a je pozitivní u více než 90% kolorektálních adenokarcinomů [Werling, 2003; Kaimaktchiev, 2004]. Nicméně, CDX2 může být pozitivní v každém karcinomu, který vykazuje enterickou diferenciaci, a tak není zcela entero-specifický. Je zajímavé, že medulární karcinomy kolorekta jsou často CK20-negativní a CDX2-negativní.

2.3.2 Patogenetická a molekulární charakteristika

Kolorektální karcinom je heterogenní skupina onemocnění s výrazným genetickým a epigenetickým pozadím [Ogino, 2008]. Již v roce 1980 bylo zjištěno, že nádory vznikající v proximálním tračníku a distální části tlustého střeva mohou vznikat různými genetickými mechanismy [Bufill, 1990; Beart, 1983]. Díky rychlému pokroku v chápání vzniku kolorektálních nádorů a jejich farmakogenetiky, je vyžadováno stále více molekulárních a genetických testů sloužících k optimálnímu navrhnutí individuální terapie pro jednotlivé pacienty a zároveň lépe předpovídat jejich prognózu. V současné době jsou nejčastěji prováděné testy v patologických laboratořích MSI, KRAS a BRAF [Lanza, 2011].

Stanovení MSI

Mikrosatelitně nestabilní nádory (MSI) tvoří méně než 10% kolorektálních adenokarcinomů. Tyto nádory mají tendenci vykazovat specifické klinické vlastnosti. Zásadní je, že mají lepší prognózu v závislosti na stádiu ve srovnání s nádory mikrosatelitně stabilními (MSS). Tyto nádory jsou obvykle rezistentní na léčbu 5-fluorouracilem [Sinicrope, 2012]. Mikrosatelity jsou opakující se sekvence DNA, které jsou náchylné k chybám během replikace DNA, v případě, že systém MMR je vadný. MSI je definována jako změna v délce mikrosatelitních sekvencí. Nádor je klasifikován jako MSI-H (vysoké úrovně), pokud dva nebo více (> 40%) z pěti mikrosatelitních markerů ukazují nestabilitu, MSI-L (nízké úrovně), pokud pouze jeden marker označuje nestabilitu a MSI-S (stabilní), jestliže žádný z markerů neukazuje nestabilitu. Klinický přínos MSI-L zůstává nejasný [Schneider, 2012]. Specifičnost MSI testu je přibližně 90% a to jak imunohistochemicky (IHC) tak stanovením PCR-MSI testem. Ideálně však oběma technikami [Weissman, 2012].

Stanovení KRAS

Mutace KRAS (Kirsten rat sarkom virového onkogenu) genu vede k expresi konstitučně aktivovaného KRAS proteinu, která je detekována přibližně u 40% kolorektálních karcinomů [Brink, 2003]. Výsledkem je stimulace buňky k proliferaci a odolnost na cílenou terapii proti epidermálnímu růstovému faktoru (EGFR) [Wang, 2010; Lièvre, 2006; Khambata-Ford, 2007; Amado, 2008]. V důsledku toho Americká společnost klinické onkologie (ASCO) a National Comprehensive Cancer Network (NCCN) doporučily analýzu mutací KRAS genu pro pacienty, kteří obdrží anti-EGFR terapii [Allegra, 2012; NCCN, 2009]. Více než 95% z KRAS mutací se vyskytují v kodonech 12 a 13 v exonu 2 [Brink, 2003; Boss, 1989; Pritchard, 2010]. Z tohoto důvodu je metodika na bázi PCR primárně určená k detekci pro tyto mutace. Vzácněji exon 3 v kodonech 59,60,61 a exon 4 kodony 117 a 146 [Ellis, 2000; Loupakis, 2009]. KRAS mutace je považována za negativní prognostický faktor. Nemutovaný typ nádoru označujeme jako divoký (wild type) WT-KRAS.

Stanovení NRAS

Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (NRAS) je lokalizován v chromozomálním regionu 1p13.2. Je součástí rodiny RAS genů, které kódují proteiny zapojené do přenosu signálů v buňkách a podílí se na regulaci buněčného růstu. Hraje ústřední roli v MAPK signální dráze. Bodové mutace genu NRAS byly nalezeny u různých druhů nádorů, např. u melanomu (13-25%), kolorektálního karcinomu (1-6%), karcinomu plic (1%), hepatocelu-

lárního karcinomu (10%), karcinomu štítné žlázy (7%). Vyšetření genu NRAS provádíme se zaměřením na detekci aktivačních mutací v exonu 2 (kodony 12, 13), exonu 3 (kodony 59, 60, 61) a exonu 4 (kodon 146) [Vaughn, 2011]. Mutovaný NRAS je podobně jako mutovaný KRAS prediktorem rezistence k anti-EGFR terapii a nositelem horší prognózy [Schirripa, 2015].

Stanovení BRAF

BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) genová mutace byla popsána přibližně u 10% kolorektálních karcinomů [Samowitz, 2005; Ogino, 2012; Davies, 2002]. O BRAF mutaci tlustého střeva a konečníku existuje několik zajímavých faktů. Aktivační mutace BRAF a KRAS se téměř vždy vzájemně vylučují [Rajogopalan, 2002; Koimuna, 2004], a tím i testování mutace genu BRAF by mělo být zvažováno až po negativní analýze KRAS mutace. Téměř všechny BRAF mutace jsou identické - V600E bodová mutace [Davies, 2002]. BRAF mutace je identifikována téměř výhradně u ojedinělých nádorů MSI [Weisenberger, 2006]. Přesněji řečeno, aktivující mutace genu BRAF je spojena s vysokou úrovní globálního methylace DNA a epigenetickým potlačením genu MLH1, nalezený u 70-90% sporadických kolorektálních nádorů s mikrosatelitní nestabilním fenotypem [Cunningham, 1998; Koimuna, 2004]. Proto další testování BRAF mutace v nádoru MSI, pomůže objasnit sporadický nebo syndromový původ nádoru [Lagerstedt Robinson, 2007]. Vliv BRAF mutace na prognózu se zdá být MSI-závislý. Můžeme konstatovat, že BRAF divokého typu u MSI-H nádoru je spojen s významně lepší prognózou než BRAF-mutované nádory s MSS fenotypem. BRAF-mutovaný MSI-H nádor a BRAF divokého typu MSS nádoru jsou intermediální, pokud jde o prognózu [Samowitz, 2005; Ogino, 2012]. Z toho vyplývá, že testování MMR abnormalit stejně jako a mutace genu BRAF nabízí další prognostickou informaci [De Rock, 2010].

Tabulka 5. Molekulární charakteristika KRK

Biomarker	Využití	Metoda stanovení	Výskyt v populaci
MSI	prognostické prediktivní	IHC, PCR*	MSI-H 10%
KRAS	prediktivní prognostické	PCR	Mutace v 30-50%
NRAS	prediktivní	PCR	Mutace v 3-5%
BRAF	prediktivní	PCR	Mutace v 10%

	prognostický		
--	--------------	--	--

* PCR- polymerázová řetězová reakce

Patologické a molekulární určení nádoru nám poskytuje souhrnné informace o nádorovém procesu. Standardizovaná zpráva by měla obsahovat informaci o velikosti nádoru, vzdálenosti nádoru od resekčních okrajů a také míru postižení nenádorové tkáně jater po chemoterapii. Stav resekčních okrajů jako známky radikality operace (R0). Za minimální dostačující lem je považován 1 mm. Další důležitou úlohou patologa je posoudit odpověď nádoru na předoperační léčbu. Pomocí hodnocení stupně regrese tumoru a / nebo patologické odpovědi. V neposlední řadě molekulární hodnocení primárního nádoru resp. metastáz má významnou úlohu pro zahájení optimální terapie i na odhad prognózy.

2.4. Diagnostika nádorů žaludku a kolorekta

2.4.1 Endoskopické metody

Endoskopie je základní diagnostickou metodou s nejvyšší mírou spolehlivosti. Umožňuje přímé zobrazení patologického nálezu, jeho lokalizaci, stanovení velikosti, ohraničení a další parametry (exulceraci, nekrotizaci nebo krvácení povrchu, obstrukci průsvitu). Poskytuje možnost biopsie tkáně k histologickému vyšetření.

Ezofagogastroduodenoskopie je endoskopické vyšetření horní části gastrointestinálního traktu s nejvyšší senzitivitou a specificitou (senzitivita u časných stadií okolo 70–80 %). Chromoendoskopie (kombinace endoskopie s barvením časných slizničních lézí), NBI (Narrow Band Imaging), „zoom“ endoskopie a endoskopie s vysokým rozlišením s cílem identifikace časných slizničních změn se stále častěji uplatňují v běžné endoskopické praxi nejen v zemích s vysokou incidencí tohoto onemocnění. Tato vyšetření jsou přínosná v identifikaci a v rozhodování o způsobu řešení časného karcinomu před eventuálním kurativním endoskopickým výkonem: endoskopickou polypektomií, endoskopickou submukózní resekcí (EMR) nebo endoskopickou submukózní disekcí (ESD).

Endosonografické vyšetření (EUS) je součástí diagnostiky a stagingu nádorových lézí žaludku. Upřesní hloubku invaze a postižení regionálních lymfatických uzlin (pro stanovení TNM klasifikace). Toto vyšetření má větší význam u méně pokročilých nádorů, kde posouzení hloubky infiltrace stěny žaludku pomáhá v rozhodnutí o metodě léčby. Zcela zásadní roli

hraje v rozhodování o možnosti endoskopického řešení u časných karcinomů [Hwang, 2010]. EUS rekta upřesní hloubku invaze a postižení regionálních lymfatických uzlin (pro stanovení TNM klasifikace). Toto vyšetření má větší význam u méně pokročilých nádorů, kde posouzení hloubky infiltrace stěny rekta pomáhá v rozhodnutí o metodě léčby.

Kolonoskopické vyšetření je diagnostická metoda sloužící k diagnostice patologických lézí na tlustém střevě. Může být u KRK provedena buď pouze sigmoideoskopie (více než 35% nádorů se nachází do rektosigmoideálního spojení), nebo (preferenčně) celková kolonoskopie. U nádorů v oblasti rekta může být indikovaná pouze rektoskopie. Kolonoskopie jako léčebná metoda se používá k endoskopické polypektomii.

2.4.2 Zobrazovací metody

Počítačová tomografie (CT) je základní stagingová metoda. Měla by být provedena jak s intravenózním, tak s perorálním kontrastem [Labianca, 2013] a nejlépe v rozsahu trupu (hrudník, břicho, pánev). U KRK může CT hrudníku identifikovat plicní metastázy. V době primární diagnózy se vyskytují u přibližně 4% až 9% pacientů [Choi, 2010; Grossmann, 2010; Qui, 2015]. Modifikací CT je virtuální kolonoskopie nebo CT kolonografie. Tyto metody nejsou standardními nicméně v indikovaných případech jsou cennými nástroji pro přesné určení umístění nádoru. Mohou také pomoci při zjišťování synchronních lézí nebo polypů. Touto metodou nelze provádět odběr tkáně ani polypektomie.

Magnetická rezonance (MRI) je speciální diagnostickou metodou přínosnou v indikovaných případech (játra, pánev) nebo pokud je CT břicha a pánve nedostatečné. Dalším důvodem je kontraindikace CT. U karcinomu rekta je ekvivalentní s endosonografií. Problém však bývá v její dostupnosti a interpretaci.

Pozitronová emisní tomografie (PET) je přínosná metoda k průkazu vzdálených metastáz u kolorektálního karcinomu. Není standardně doporučována jako stagingová metoda. Pokud se však na CT nebo MRI vyšetření objeví abnormality, které jsou považovány za podezřelé, ale nekonkrétní pro metastázy, může být vyšetření PET / CT považováno za další diagnostickou možnost. U karcinomu žaludku má senzitivitu velmi nízkou. Z tohoto důvodu obvykle neslouží ke stagingu, ale k detekci recidivujícího onemocnění [Cayvarli, 2014].

Vyšetření horního GIT kontrastní látkou je indikováno u pooperačních stavů v diagnostice pooperačních komplikací (dehiscence a insuficience anastomóz) a poruch pasáže. V předoperačním období může snímek břicha odhalit gastrektazii, ale také sub/ileózní stav při poruše pasáže v případě pokročilého onemocnění nebo při onemocnění s karcinomatózou peritonea.

Sonografické vyšetření (USG) břicha má význam při diagnostice ložiskového postižení parenchymových orgánů, zejména při diagnostice: metastatické infiltrace jater, obstrukčního ikteru při infiltraci malého omenta a hilu jaterního, lymfadenopatie nitrobřišní či ascitu. Prokáže také stagnaci tekutého obsahu v žaludku. Eventuální nález ztlustělé stěny žaludku je podnětem k dalšímu vyšetření.

2.4.3 Laboratorní diagnostika

Biomarkery

Nádorové markery jsou definovány jako molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. Jejich výskyt ve tkáni zhoubného nádoru a v tělních tekutinách souvisí s růstem nádoru. Jsou produkovány buď samotným nádorem nebo jinými tkáněmi jako odpověď na maligní proces v organismu [Nekulová, 1994].

Rozdělení nádorových markerů

Rozdělení nádorových markerů můžeme provádět z různých pohledů. Nejčastěji se rozdělují podle tkáňového původu nebo podle funkce.

Podle tkáňového původu můžeme rozdělit nádorové markery na:

Onkofetální antigeny jsou látky, které vytváří organismus ve fetálním období. Jsou rovněž produkovány placentou po narození. V dospělosti se již netvoří a jejich produkce je tak spojena s objevením se nádorového onemocnění v organismu. Antigeny se objevují časně během ontogeneze a postnatálně jsou typické pro maligní nádory.

Tkáňově a orgánově specifické antigeny jsou běžně přítomny ve zdravé tkáni nebo orgánu a pouze v malém množství pronikají mimo ně. V okamžiku vzniku nádorového bujení, zánětu či jiného patologického jevu, dojde k intenzivnějšímu uvolňování těchto látek.

Nespecifické antigeny, enzymy a hormony jsou produkovány nádory z orgánů, které je normálně neprodukují. Nádorové markery, které hodnotíme v této práci jsou pak popsány v následující kapitole. Rozdělení podle funkce uvádí Tabulka 6.

Tabulka 6. Rozdělení nádorových markerů podle funkce

Onkofetální antigeny	Karcinoembryonální antigen Alfa-1-fetoprotein Lidský choriový gonadotropin Antigeny CA typu: CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 50, CA 72-4
Enzymy	Kyselá prostatická fosfatáza Laktátdehydrogenáza Neuronspecifická enoláza Prostatický specifický antigen Thymidinkináza
Hormony	Adrenokortikotropní hormon Antidiuretický hormon Calcitonin Parathormon Prolaktin
Receptory	Estrogenové, progesteronové, androgenní
Solubilní cytokerainové fragmenty	Tkáňový polypeptidický antigen Tkáňový polypeptidický specifický antigen CYFRA 21-1
Metaloproteinázy (MMP)	MM

Stanovení nádorových markerů není metodou vedoucí k diagnóze ani skríninkovou metodou. Není znám marker dostatečně specifický a senzitivní pro karcinom žaludku, je však standardní součástí sledování průběhu onemocnění a efektu léčby. U KRK je postavení markerů důležitější. Zvýšené předoperační hladiny CEA jsou negativním prognostickým markerem [Fong, 1997].

2.5 Léčba nádorů žaludku a kolorekta

2.5.1 Léčba operabilních stádií

Základem správného stanovení léčebného postupu je **multidisciplinární přístup**. Přestože se jedná o zcela odlišné jednotky, můžeme zde naléznout shodné algoritmy. U karcinomu žaludku stejně jako u KRK je radikální chirurgická léčba stále jediným kurativním řešením.

U časných stádií karcinomu žaludku je synonymem radikálního chirurgického výkonu resekce endoskopická. U lokalizovaných nádorů je základním radikálním chirurgickým postupem provedení gastrektomie, a to obvykle totální. Subtotální gastrektomie je funkčně výhodnější. Z hlediska radikality je možné ji uskutečnit pouze u distálně lokalizovaných tumorů menší velikosti, navíc s přihlédnutím k histologické typizaci nádoru. Subtotální gastrektomie není vhodná u karcinomů difuzních (disociovaných, špatně kohezivních). Na mnoha evropských a všech asijských pracovištích je operačním standardem současnosti D2 lymfadenektomie, kdy se odstraňují mizní uzliny podél a. hepatica communis, a. gastrica sin., truncus coeliacus a a. lienalis až ke slezinnému hilu. Cílem je dosažení radikální resekce (R0) s histologicky negativními okraji a minimálně 15 odebranými uzlinami. Peroperačně je indikováno zavedení jejunostomie k zajištění pooperační enterální výživy. Splenektomie nebo resekce kaudy pankreatu není standardní součástí výkonu. Lze k nim přistoupit v případě, kdy to vyžaduje radikaliza operace při invazi nádoru do těchto struktur. Po kurativní resekcí lokalizovaného karcinomu žaludku se pohybuje pětileté přežití okolo 20-30%.

Pro kolorektální karcinom bez přítomnosti metastáz je radikální chirurgický výkon charakterizován jako kolektomie s odstraněním regionálních lymfatických uzlin [Cohen, 1991; West, 2010]. Rozsah kolektomie by měl být dán jeho umístěním. Počet vyšetřených lymfatických uzlin by měl být dostatečný. Současně by měli být vyšetřeny nebo bioptovány i lymfatické uzliny mimo plánované operační pole, pokud jsou podezřelé. Resekce musí být kompletní (R0), aby byla považována za radikální [Berger, 2005]. Laparoskopická kolektomie je metodou volby [Lee, 2012; Morneau, 2013; Theophilus, 2014; Wang, 2014]. V malé evropské randomizované studii Barcelona se poukázalo na fakt, že laparoskopický přístup je spojen s mírnou výhodou přežití, výrazně rychlejším zotavením a kratším pobytem

v nemocnici [Lacy, 2002]. Nedávno publikovaná rozsáhlejší studie COLOR s 1248 pacienty, kteří byli náhodně přiřazeni k chirurgickému řešení buď konvenčním otevřeným přístupem, nebo laparoskopicky asistovanou operací, ukázala nezanedbatelný absolutní rozdíl 2% ve 3 letém DFS, ve prospěch otevřené kolektomie [Buunen, 2009]. Ve studii CLASICC s 794 pacienty s kolorektálním karcinomem nebyly statisticky signifikantní rozdíly ve tříletém celkovém přežití (OS), době do progresu (DFS), ani frekvencemi lokálních recidiv mezi těmito chirurgickými přístupy [Javne, 2007]. Dlouhodobé sledování pacientů studie CLASICC ukazuje, že ve sledovacím období 62,9 měsíců nejsou rozdíly mezi oběma přístupy [Green, 2013]. Podmínkou je však zkušený chirurg s dostatečným počtem výkonů ročně. Rutinní použití minimálně invazivních resekčních výkonů není v současnosti doporučeno pro nádory indikované k operaci v ileozním stavu či s perforací a pro nádory s prokázanou lokální pokročilostí, nebo s invazí do okolních struktur [Ota, 1994; Nelson, 1995; Wishner, 1995].

U KRK bez přítomnosti metastáz je indikována pouze chirurgická léčba (vyjma chemoradioterapie u nádorů rekta). U nádorů žaludku, vzhledem k jejich biologické povaze, využíváme i u časných stádií celé spektrum onkologické léčby.

Perioperační chemoterapie je podle aktuální metaanalýzy nejlepším postupem. Vede k signifikantnímu prodloužení OS, prodloužení času bez známek progresu (PFS) a redukcí vzdáleného metastazování ve srovnání se samotnou operací [Cunningham, 2006]. Cílem je R0 resekce. Perioperační chemoterapie (CHT) zvyšuje počet radikálních operací. Efektivitu předoperační chemoterapie na bázi fluorouracil/cisplatina prokazují výsledky tří randomizovaných studií fáze III (studie MAGIC, EORTC 40954, ACCORD). Standardem nyní je režim ECF perioperačně (3 cykly před a 3 cykly po operaci) nebo ECX, alternativou je režim bez epirubicinu, který je nyní preferován. Modifikovaný DCF dosahuje nejvíce R0 resekcí a nejvyššího procenta patologických kompletních remisí [Choi, 2015]. **Předoperační chemoradioterapie** je preferovaným postupem v léčbě spinocelulárního karcinomu i adenokarcinomu distálního jícnu, adenokarcinomu EGJ a nádorů kardie. Standardem je konkomitantní režim s cisplatinou a 5-fluorouracilem. Studie fáze III CROSS prokázala efekt při použití paklitaxelu s karboplatinou týdně, konkomitantně s radioterapií (RT). Benefit byl zaznamenán u obou histologických typů (adenokarcinomu i spinocelulárního karcinomu) [Dikken, 2011].

2.5.2 Léčba pooperační – adjuvatní

Adjuvatní léčba se podává s cílem snížit riziko relapsu a prodloužit přežití. U nádorů žaludku závisí volba na celkovém stavu. Za standard se považuje kombinace chemoterapie s radioterapií [Smalley, 2012]. Cílová skupina jsou nemocní s rizikovými faktory, kteří nebyli léčeni předoperačně. Mezi rizikové faktory patří: lymfovaskulární invaze, špatně diferencovaná histologie (G3), postižení spádových lymfatických uzlin, perineurální invaze, méně než D2 lymfadenektomie, věk pod 50 let [Haller, 2005]. U kolorektálního karcinomu jsou identicky indikováni vysoce rizikovní nemocní ve stadiu II a všichni nemocní s postiženými lymfatickými uzlinami ve stadiu III, opět v závislosti na celkovém stavu. Rizikovými faktory jsou: T4 nádor, špatně diferencovaná histologie (G3), lymfangioinvaze a/nebo perineurální invaze, ileózní stav a/nebo perforace jako průvodní jev nemoci, nejisté nebo pozitivní resekční okraje, vyšetření méně než 12 spádových lymfatických uzlin. Možnosti jsou chemoterapie s 5-Fluorouracil/ leukovorin, kapecitabin, FOLFOX, kapecitabin / oxaliplatin (CapeOx) nebo bolusový 5-Fluorouracil / leukovorin / oxaliplatin (FLOX) po dobu 6 měsíců [Haller, 2005; Andre, 1999; Wishner, 1995; Twelves, 2005; Schmoll, 2007; Haller, 2011; Kuebler, 2007; Des Guetz, 2010; Benson, 2004; Andre, 2004; Andre 2009; Andre 2015]. Důležité je také optimální načasování pooperační léčby. Metaanalýza 10 studií zahrnujících více než 15 000 pacientů hodnotících načasování zahájení adjuvantní terapie po chirurgickém výkonu poukázala na fakt, že každé čtyřtýdenní zpoždění chemoterapie vede k poklesu OS o 14%, což naznačuje, že adjuvantní léčba by měla být zahájena co nejdříve je pacient schopen se léčit [Biagi, 2011]. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími podobnými analýzami. Retrospektivní studie 7794 pacientů s karcinomem tlustého střeva ve stadiu II nebo III z Národní databáze nádorů (NCBD) zjistila, že prodleva více než 6 týdnů mezi chirurgickým zákrokem a adjuvantní terapií snížila přežití, resp. každý další týden zpoždění byl spojen se 7% snížením přežití [Sun, 2016]. Další retrospektivní studie 6620 pacientů s rakovinou tlustého střeva ve III. Stádiu z nizozemského registru nádorů také zjistila, že zahájená adjuvantní terapie po 8 týdnech od resekce byla spojena s horším přežíváním [Bos, 2015; Sargent, 2011]. Radioterapie je nedílnou součástí léčby u nádorů konečníku v předoperačním nebo pooperačním podání. V České republice je preferována předoperační chemoradioterapie před pooperační. Chemoterapeutický režim, frakcionace i dávka se může institucionálně lišit nicméně je pravidlem, že k primárnímu chirurgickému výkonu jsou

indikované pouze T1 a T2 nádory. Ostatní stadia bez generalizace by měla být léčena předoperačně.

2.5.3 Léčba pokročilého a metastatického karcinomu žaludku

Léčba pokročilých a metastatických stádií nevede k vyléčení nemocných, může zpomalit průběh nemoci, prodloužit přežití a zlepšit kvalitu života. Mezi tyto paliativní přístupy patří: chemoterapie, radioterapie, chirurgická léčba a speciální metody jako radiofrekvenční ablace a chemoembolizace. U metastatického karcinomu žaludku je 5leté přežití mezi 3,1-5 %.

Paliativní chemoterapie u karcinomu žaludku zlepšuje kvalitu života a OS ve srovnání s nejlepší podpůrnou léčbou (BSC). Monoterapie jedním lékem nemá vliv na přežívání. Základními cytostatiky používanými u inoperabilního lokálně pokročilého a metastatického karcinomu žaludku je 5-fluorouracil, kapecitabin, případně kombinovaný perorální fluoropyrimidinový derivát Teysuno, dále deriváty platiny (cisplatina a oxaliplatina), epirubicin, taxany (paclitaxel, docetaxel), irinotekan, (historicky i mitomycin C, etoposid a metothrexat). Cisplatina i oxaliplatina stejně jako infuzní 5-fluorouracil a kapecitabin jsou volně zaměnitelné. Režim s kontinuálním 5- fluorouracilem nebo perorální léčba kapecitabinem jsou preferovány před podáváním bolusového 5-fluorouracilu, který má vysokou toxicitu. Režimy s oxaliplatinou jsou preferovány u pacientů ve věku nad 65let. Základními cílenými (biologickými) léky, které používáme v této indikaci, jsou trastuzumab a ramucirumab. Předpokladem k použití tarstuzumabu je přítomnost amplifikace genu pro receptor 2 epidermálního růstového faktoru (HER2-neu). S touto situací se setkáváme asi u 12% případů karcinomu žaludku a gastro-eosofageální junkce (GEJ). Dále je k dispozici ramucirumab, protilátka proti receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR2). Radioterapie je indikována jako součást definitivního postupu – konkomitantní chemoradioterapie u lokálně pokročilého inoperabilního karcinomu distálního jícnu či GEJ a/nebo ke kontrole symptomů (krvácení, bolest, obstrukce). Paliativní endoskopické výkony zahrnují endoluminální laserovou terapii, zavedení endoluminálního stentu a gastrojejunostomii. Paliativní chirurgické metody zahrnují paliativní resekci. Tyto výkony jsou indikovány v případě nádorové obstrukce, krvácení či zavedení výživové jejunostomie. Vysoce paliativním výkonem je zavedení derivační gastrostomie.

První linie metastatického onemocnění

Preferovaná je dvojkombinace (dublet) na bázi 5-fluorouracilu a platinového derivátu. Z dubletů používáme 5-FU/cisplatina, kapecitabin/cisplatina nebo oxaliplatinové kombinace. Zpravidla u mladších pacientů nebo u pacientů ve výborném výkonostním stavu indikujeme trojkombinaci cytostatik v modifikaci (redukce) [Al-Batran, 2008]. Epirubicin (studie REAL-2) bývá v současné době z kombinací vypouštěn pro vyšší toxicitu a nízký přínos [Okines, 2008]. S1 (Teysuno) je možno kombinovat s cisplatinou i oxaliplatinou se srovnatelnou účinností, ale profil nežádoucích účinků je horší u kombinace v porovnání s monoterapií S1 [Ajani, 2010]. Irinotekan je cytostatikem volby v první linii léčby metastatického onemocnění. Je indikován v situaci, kdy není možno použít platinový derivát [Guimbaud, 2014]. Trastuzumab se používá v první linii paliativní chemoterapie v kombinaci s kapecitabinem nebo s 5-fluorouracilem a cisplatinou u pacientů s amplifikací HER2-neu. Vyšší amplifikace je vyjádřena u intestinálního karcinomu, cca u 12%-27%, zatímco v případě difúzního karcinomu je amplifikováno pouze 2-6% nádorů. HER2-neu pozitivita je také mnohem častěji popisována u karcinomu GEJ než u karcinomu žaludku (32 versus 18 %). Přidání trastuzumabu do léčby vedlo ve studii fáze III ToGA k prodloužení mOS (13,8 měsíce vs. 11,1 měsíce, $p = 0,0046$), v případě amplifikace IHC2+/3+ a FISH pak rozdíl v mOS činil více než čtyři měsíce (mOS 16 měsíců vs. 11,8 měsíce, HR 0,65). U skupiny IHC 3+ byl zaznamenán maximální benefit (95%CI: 0.50- 0.87; HR 0,66), menší zisk pak měli pacienti s IHC2+(95%CI: 0.55-1.10; HR 0.78) [Bang, 2010]. Další HER2-neu cílený inhibitor, lapatinib, nepřinesl žádný přínos v léčbě metastatického onemocnění (studie LOGIC, TyTAN)

Druhá linie léčby

Druhá linie léčby metastatického karcinomu žaludku se v západních zemích v rámci standardu používá krátce. Ve studiích fáze II a III byla prokázána účinnost irinotekanu (v monoterapii nebo v kombinaci s fluoropyrimidinem), paklitaxelu a docetaxelu. Jejich zařazení do druhé linie vedlo k prodloužení přežití pacientů s metastatickým onemocněním o 1,5 měsíce. Ramucirumab je lidská monoklonální protilátka proti receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor VEGFR2, jejíž podávání vede k bloádě vazby ligandů VEGF A, VEGF B a deaktivací molekulární cesty k inhibici angiogeneze. Účinnost ramucirumabu v léčbě karcinomu žaludku dosud testovaly dvě studie – REGARD a RAINBOW [Fuchs, 2014;

Wilke, 2014]. Studie fáze III REGARD srovnávala účinnost monoterapie ramucirumabem oproti placebu ve druhé linii léčby metastatického karcinomu žaludku a GEJ. Medián OS byl 5,2 měsíce vs. 3,8 měsíce ($p = 0,047$, HR 0,78). Randomizovaná studie fáze III RAINBOW zkoumala význam přidání ramucirumabu k paklitaxelu ve druhé linii léčby lokálně pokročilého a metastatického karcinomu žaludku a GEJ. Druhá linie následovala po selhání režimu založeného na 5-fluorouracilu a cisplatině. Kombinace paklitaxelu s ramucirumabem oproti paclitaxel/placebo prodloužila medián OS na 9,6 měsíce vs. 7,4 měsíce ($p < 0,0001$; HR 0,807) při mediánu follow-up 7,9 měsíce.

Třetí a další linie v léčbě metastatického onemocnění

Použití další linie by mělo být individualizováno podle celkového stavu pacienta a chemosenzitivity onemocnění. Délka léčby má pravděpodobně vliv na celkové přežití pacientů, nepřímo se dá odvozovat právě z výsledků studie RAINBOW, kde asijská populace pacientů dosáhla celkově i ve srovnávacím rameni delšího OS (mOS 10,5 měsíců v rameni s monoterapií paklitaxelem). Výborný výsledek se přikládá právě léčbě následnými liniemi, která je běžná v asijských zemích. Preferována je účast v klinických studiích, dále je možná léčba režimem s docetaxelem, paklitaxelem, irinotekanem, pokud tyto přípravky nebyly použity v předchozích liniích.

Operabilita metastatického onemocnění

Dosud není jednoznačný důkaz o přínosu operace u oligometastatického onemocnění. Optimální výběr pacienta k metastasektomii není stanoven. Dobrým prognostickým faktorem je odpověď na předoperační chemoterapii a radikální resekce [NCCN guidelines-v.1.2017].

2.5.4 Léčba metastatického kolorektálního karcinomu (mKRK)

Jedná se o „skupinu“ nemocí, které mohou mít zcela odlišný průběh a prognózu. **Neresekebilní metastatické onemocnění** je nejrozsáhlejší skupinou nemocných léčenou v klinické praxi. Přibližně u 50% až 60% pacientů s KRK se objevují vzdálené metastázy [Lee, 2007; Van Cutsem, 2006; Yoo, 2006]. Nejčastěji se vyvíjí metachronně, predilekčně postihují játra a jsou z 80 % až 90% neresekebilní [Van Cutsem, 2006; Albert, 2005; Dawood, 2009; Kemeny, 2006; Muratore, 2007; Fong, 1997]. Jedná se o pacienty, kteří za žádných okolností

nebudou kandidáty pro radikální resekční výkon a cílem jejich léčby bude maximální využití léčebných možností k prodloužení celkového přežití při zachování kvality života (QoL). Jako léčebná modalita se zde v omezené míře uplatňuje léčba chirurgická. I přesto, že metastatická nemoc je a bude neresekabilní, odstranění asymptomatického primárního nádoru má pozitivní vliv na celkové přežití a je doporučeno [Clancy, 2014]. Analogicky radioterapie je další léčebnou modalitou, a to jak konvenční, tak stereotaktická. Za určité situace je stereotaktická radioterapie zásadním nositelem prodloužení přežití u lézí nevhodných k chirurgické léčbě, nebo při vyčerpání všech léčebných možností. Radiofrekvenční ablace, chemoembolizace, radioembolizace i HIPEC mohou být pro určitou selektovanou skupinu možností ke zvládnutí symptomů nemoci i k prodloužení přežití [Bhutiani, 2016; Liu, 2015; Martin, 2015; Ruers, 2015; Tanis, 2014; Ruers, 2012; Evrad, 2014; Lencioni, 2008; Petre, 2013; Kashina, 2011; Schlijper, 2014; Ricke, 2010; Sterzing, 2014; Collettini, 2012; Comito, 2014; Filippi, 2014; Tselis, 2011; Peters, 2008; Blomgren, 1995; Wada, 2004; Wulf, 2006; Ambrosino, 2009; Goodman, 2010; Hoyer, 2006; Lee, 2009; Mendes Romero, 2006; Rusthoven, 2009; Scorsetti, 2013; Fumagalli, 2012; Fiorentini, 2012; Hendlisz, 2010; van Hazel, 2016; Garlipp, 2014; Cao, 2009; Cotte, 2009; Elias, 2009; Van Cutsem, 2016]. Nejdůležitější léčebnou modalitou je chemoterapie samotná, nebo v kombinaci s cílenou léčbou. V současnosti se celkové přežití typického pacienta s mKRK pohybuje okolo 30 měsíců. Pravděpodobná léčebná sekvence je následující:

- přibližně 4-6 měsíců indukční léčby první linie
- 4 až 8 měsíců udržovací léčby nebo bezléčebné období po resekci či ablačním výkonu, který následuje po první linii léčby
- přibližně 3 měsíce opakovaného podání chemoterapie nebo léčby po progresi
- 5 až 7 měsíců léčby druhé linie
- léčebné prázdniny před iniciací další linie (pokud není rychlá progresse)
- přibližně 3 měsíce léčby třetí linie
- léčba 4 linie, pokud je WT-KRAS
- několik měsíců opakovaného podání předchozí terapie, podle minulých sekvencí
- několik měsíců symptomatické léčby

Současná léčba metastatického karcinomu tlustého střeva zahrnuje široké spektrum účinných léků jak v monoterapii, tak v kombinaci: 5-Fluorouraci / leukovorin, kapecitabin, irinotekan, oxaliplatina, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, ziv-aflibercept,

ramucirumab, regorafenib, trifluridine/tipiracil, pembrolizumab a nivolumab. Na základě klinických dat bylo vyhodnoceno 5 doporučených léčebných režimů pro pacienty, kteří jsou schopni tolerovat intenzivní kombinační léčbu: **FOLFOX** [Maindrault-Goebel, 1999; Tournigand, 2004], **FOLFIRI** [Andre,1999], **CAPOX** [Cassidy, 2008; Cassidy, 2004; Porschen, 2007], **infuzní 5-FU / LV** nebo **kapecitabin** [Andre,1999; Jager, 1996; Petrelli, 1987; Wolmark, 1993] nebo **FOLFOXIRI** [Falcone, 2007; Souglakos, 2006] s cílenou terapií anebo bez ní [Maindrault-Goebel, 1999].

Cílená biologická léčba je skupina relativně nových léků, které zasahují specifické buněčné struktury a tím způsobují inhibici určité signální cesty. Tímto zásahem dochází k zániku nádorové buňky. S rozvojem molekulární patologie se podařilo identifikovat několik klíčových cílů (targetů) ve vývoji kolorektálního karcinomu. Hlavními cíly jsou receptory pro vaskulární endoteliální faktor (VEGFR) a epidermální růstový faktor (EGFR).

1. linie léčby

Cílená léčba je indikována v 1. linii u většiny pacientů, pokud není kontraindikována.

Anti-VEGFR léčba bevacizumabem v kombinaci:

- s dublety FOLFOX, XELOX, FOLFIRI
- s tripletem FOLFOXIRI, pokud je cílem regrese vhodné u pacientů mutovaným BRAF
- s fluoropyrimidinem v monoterapii u pacientů neschopných agresivní léčby

Anti-EGFR léčba cetuximabem, panitumumabem v kombinaci (jen u WT-KRAS):

- s dublety FOLFOX, FOLFIRI
- není doporučena s kapecitabinem či bolusovým 5-FU

2. linie léčby

Anti-VEGFR léčba:

Pokud nebyl použit bevacizumab v první linii, je nutné zvážit antiangiogenní léčbu v druhé linii – bevacizumab, aflibercept, ramucirumab.

- Aflibercept pouze s režimem FOLFIRI po progresi na režimu s oxaliplatinou. Pokud byl použit bevacizumab první linii, lze jej použít i po progresi [Van Cutsem, 2012]
- Ramucirumab v kombinaci v FOLFIRI po progresi na režimu s oxaliplatinou. Pokud byl použit bevacizumab první linii, lze jej použít i po progresi [Tabernero, 2015].

Anti-EGFR v kombinaci s FOLFIRI/irinotekanem u WT-RAS (WT-BRAF):

- v případě, že nebyla doposud použita

- relativní benefit anti-EGFR protilátek je v pozdějších liniích obdobný jako v linii druhé

3. a 4. linii léčby

Lze zvažovat individuálně podle stavu pacienta. Alternativou je často pouze symptomatická terapie. Pokud nebyly v dřívějších liniích použity anti-EGFR protilátky (cetuximab a panitumumab), mohou být použity jak v monoterapii, tak v kombinaci. Cetuximab s irinotekanem je účinnější v porovnání s cetuximabem samotným i po předchozí progresi na irinotekanu [Pfeiffer, 2008].

Regorafenib lze zvažovat u pacientů předléčených fluoropyrimidiny, oxaliplatinou, irinotekanem, bevacizumabem a anti-EGFR protilátkou v případě WT-RAS [Grothey, 2013]. Trifluridine/tipiracil (Lonsurf©) je indikován pro pacienty předléčené fluoropyrimidiny, oxaliplatinou, irinotekanem, bevacizumabem a anti-EGFR protilátkou v případě WT-RAS [Mayer, 2015].

Imunoterapie

Přibližně 3,5 až 6,5% mKRK jsou charakterizovány jako mikrosatelitně nestabilní (MSI-H), což je biologická stopa deficitu reparačních enzymů DNA (dMMR). Jedná se o další možnost léčby progredujícího onemocnění pro tuto selektovanou skupinu nemocných. Imunoterapie tzv. checkpoint inhibitory nivolumabem [Le, 2015], pembrolizumabem [Overman, 2016] je v současnosti nejmodernější, ale také nejdražší léčebná modalita. Nejsou však data srovnání s chemoterapií a její přínost je otázkou blízké (daleké) budoucnosti. Doporučení je použití ve druhé linii léčby mKRK [NCCN guidelines - v.2.2017].

2.6 Resekabilní a potenciálně resekalibilní jaterní postižení

Ještě před několika lety byla diagnóza jaterních metastáz zcela infaustní. S rozvojem diagnostiky, onkologických postupů a jaterní chirurgie se vyhlídky nemocných výrazně zlepšily a někteří nemocní jsou dokonce trvale vyléčeni. Předpokladem pro stanovení optimálního léčebného postupu je komplexní zhodnocení stavu pacienta, zda je či není kandidátem intenzivní léčby, a to včetně léčby chirurgické. Rozhodovací proces je často velmi složitý a musí zohlednit nejen primární nádorové onemocnění, ale i přidružené choroby a v neposlední řadě i rizika spojené s navrhovanou léčebnou modalitou. Je kladen důraz na komunikaci mezi zkušenými lékaři v dané problematice a na již zmíněnou úlohu

multioborového týmu. Chirurgická léčba charakteru radikální resekce je jedinou kurativní léčebnou modalitou. Jaterní metastázy mohou být synchronní, nebo metachronní.

Synchronní metastázy se vyskytují u 20% - 34% pacientů [Muratore, 2007; Havashi, 2010; ÚZIS ČR, 2016]. Jsou to všechny metastázy (okultní nebo detekovatelné na zobrazovacích metodách) zjištěné před anebo při operaci primárního nádoru [Yin, 2013]. Někteří autoři definují metastázy jako synchronní i v případě, že jsou zjištěny 3 [Ruers, 2012; LiverMetsSurvey], 4 [Edge, 2010] nebo 6 měsíců po diagnóze [Mekenkamp, 2010; Siriwardena, 2014]. Synchronní jaterní postižení je častěji spojeno s postižením i jiných orgánů a má horší prognózu z důvodu nepříznivé histologie, než jaterní postižení metachronní [Tsai, 2007].

Metachronní metastázy dělíme na časné a pozdní. Časné jsou diagnostikované do 12 měsíců od operace primárního nádoru. Pozdní jsou nalezeny déle než 12 měsíců od primární operace [Adam, 2015]. Právě časný záchyt metachronního procesu je důležitý pro operabilitu a prognózu nemocných. Úloha biomarkerů pro časnou diagnostiku je intenzivně zkoumána. Dosud nebyl identifikován žádný biomarker, který by dokázal rozlišit biologické chování a prognózu synchronních od metachronních metastáz. V klinické praxi se můžeme setkat s následujícími scénáři.

Resekabilní onemocnění je primárně indikováno k chirurgickému výkonu. I zde je nutno zvažovat několik možností, především operabilitu primárního nádoru. Pokud jsou obě lokalizace operovatelné a nehrozí progrese jaterního postižení, pak nejčastěji volíme operaci primárního nádoru a v druhé době resekci jaterních metastáz. Je možno postupovat i inverzním přístupem tzv. liver first. Pokud je primární nádor rektum, tak je nutno zvážit předchozí RT či RT/CHT na oblast pánve. Poslední možností je současná resekce primárního nádoru a metastáz. Rozhodnutí závisí na lokalizaci primárního nádoru a rozsahu jaterního postižení (počet a velikost). Některé malé periferní jaterní léze zvláště v kombinaci s hemikolektomií jsou dnes prakticky standardem. Oproti tomu řešení primárního nádoru rekta s jaterní nemocí v jedné době není doporučeno. K dosažení nejlepších výsledků chirurgické léčby, patří tyto výkony do rukou zkušeného operátora s minimálně 25 výkony ročně. Chemoterapie není součástí standardního léčebného přístupu k resekabilní nemoci. Pokud nejsou přítomny negativní prognostické znaky, pak není chemoterapie indikována ani v pooperačním období. U pacientů s technicky resekabilní nemocí, u nichž je prognóza nejasná, nebo pravděpodobně nepříznivá, by měla být podána perioperační kombinovaná

chemoterapie (FOLFOX nebo CAPOX) [Fong, 1999; Nordlinger, 2013]. Cílené preparáty anti-EGFR a anti-VEGR by neměly být součástí perioperační chemoterapie u resekabilních pacientů [Primrose, 2014]. Pacienti bez předchozí chemoterapie s přítomností nepříznivých faktorů jsou kandidáty adjuvantní chemoterapie na bázi oxaliplatin [Mitry, 2008].

Potenciálně resekabilní onemocnění. Někteří pacienti s onemocněním ve stádiu IV (zejména acienti s jaterními metastázami) mohou být léčeni s výhledem k radikálnímu chirurgickému výkonu. Dokonce určitá skupina pacientů s původně neresekovatelnými jaterními metastázami může dojít k resekci, pokud dojde k dostatečné reakci na chemoterapii. Tento přístup byl nazván „konverzní terapií“ [Petrelli, 2007], aby se odlišil od "neoadjuvantní terapie", která se používá jako termín pro předoperační terapii podávanou pacientům, kteří jsou primárně resekabilní. Klíčovým parametrem pro výběr konkrétního režimu v tomto scénáři není přežití nebo zlepšení QoL, ale míra odpovědi (RR) (tj. Schopnost daného režimu zmenšit metastázy) [Folprecht, 2005]. Doporučuje se režim s vysokým RR [Piessevaux, 2013]. Existuje nejistota týkající se nejlepší kombinace, kterou použít, neboť jen několik málo studií bylo takto primárně zaměřeno. U pacientů s WT-KRAS onemocněním se zdá, že chemoterapeutický dublet a anti-EGFR protilátka vykazuje nejlepší konverzní výsledky. Analogicky může být zvažována i kombinace dubletu a anti-VEGFR, který vykazuje menší frekvenci nežádoucích účinků [Venook, 2014]. Někteří pracovníci preferují triplet FOLFOXIRI s bevacizumabem, který rovněž vykazuje vysoké procento RR, je však zatížen vyšším výskytem závažných nežádoucích účinků a je často již primárně redukován [Cremolini, 2014]. Na poslední konferenci ASCO 2017 bylo konstatováno, že žádná s následujících studií s trojkombinací FOLFOXIRI nedosáhla tak dobrých výsledků jako originální Falconeho studie. Evropské i americké doporučení považují za správné i použití pouze dubletů bez cílené terapie. Pacienti musí být pravidelně přehodnocováni, aby se zabránilo přetížení resekabilních pacientů, neboť maximální odpověď se u většiny pacientů očekává po 12 až 16 týdnech [Stintzing, 2014]. Posouzení možnosti chirurgické léčby musí být provedeno v době stanovení diagnózy a znovu při re-stagingu v průběhu terapie, a dokonce i v průběhu operace. Jako metody ke zhodnocení resekability se nejčastěji používají: ultrazvukové vyšetření s kontrastem, počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI) a pozitronová emisní tomografie v kombinaci s CT (PET-CT). Z analýz vyplývá, že MRI je citlivější než CT na subcentimetrové léze jater [Scharitzer, 2013] a po neoadjuvantní / konverzní chemoterapii [Rojas Llimpe, 2014]. CT je naopak nejvhodnější volbou pro

počáteční staging [Ebell, 2004]. Zhodnocením použitých metod ukazuje, že čtyřfázová / třífázová CT technika s optimálním podáním kontrastu zajišťuje vysoké prostorové a kontrastní rozlišení [Motosugi, 2009; Soyer, 2004; Valls, 2001]. Úloha PET-CT je pouze k detekci vzdálených metastáz, v porovnání s CT nepřinesla zlepšení operačních výsledků [Sahani, 2014; de Geus-Oei, 2009]. Intraoperační ultrazvuk je metoda přispívající ke zlepšení radikality výkonu u nemocných po předchozí konverzní terapii [Ruzzenente, 2013]. Resekability lze dosáhnout nejen intenzivní konverzní chemoterapií s nebo bez biologické léčby, ale také některými intervenčními metodami (např. embolizace větve portální žíly) a chirurgickými postupy (např. etapovité operace typu ALLPS) [Schadde, 2014; Li, 2016].

2.7 Klasifikace nádorů žaludku a kolorekta

Viz Přílohy 1-4.

3 Cíle práce

- 1) Ověřit nové biomarkery pro diagnostiku rakoviny žaludku a vypracovat optimální algoritmus jejich použití.
- 2) Posoudit význam stanovení cytokeratinových markerů - Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS) pro diagnostiku metastatického procesu v játrech (primární nádor kolorektální) a porovnat s výsledky CEA, který dlouhodobě patří mezi základní a nejpoužívanější nádorový marker.
- 3) Provést pilotní studii hladin FGF23 u osob s kolorektálním karcinomem a dalšími nádory trávicího traktu a korelovat hladiny tohoto markeru s agresivitou onemocnění.

4 Metodika

4.1 Odběry vzorků

Vzorky žilní krve byly odebírány z kubitální žíly náběrovým systémem VACUETTE firmy Greiner Bio-one, Rakousko. Krev byla centrifugována při 1700 xg po dobu 10 min. Získané sérové nebo plazmové vzorky byly bez odkladu zamraženy a uchovávány při -80°C. Vzorky byly rozmraženy pouze jednou, a to před vlastní analýzou.

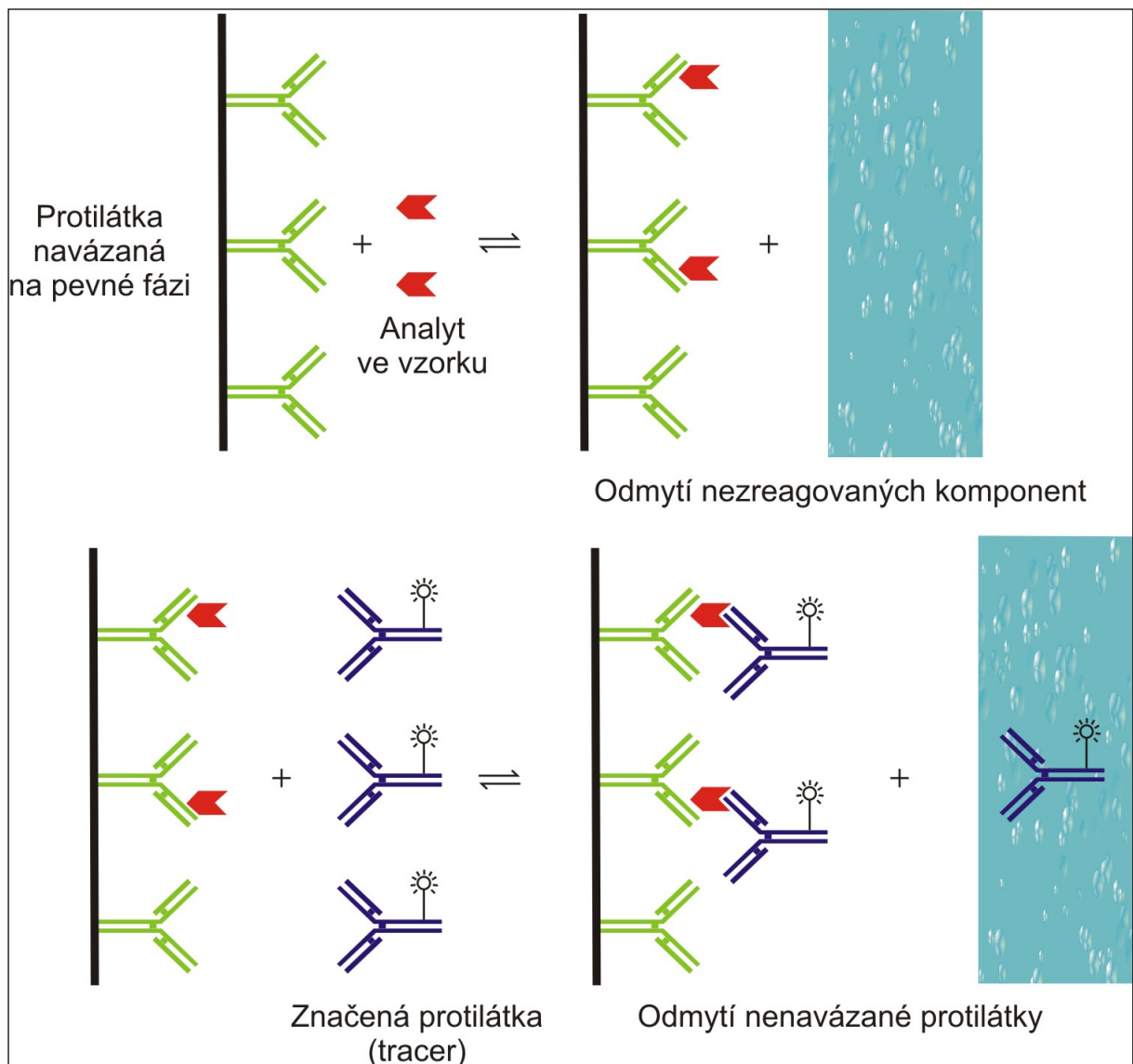
4.2 Principy použitých imunoanalytických metod

Pro analýzu patientských vzorků byly použity metody na principu imunoradiometrického, chemiluminiscenčního, enzymoimunoanalytického a fluorescenčního stanovení. Principy použitých imunoanalytických metod jsou vysvětleny v následujících kapitolách.

4.2.1 Imunoradiometrická analýza (IRMA)

Jedná se o imunoradiometrické stanovení, které se řadí mezi nekompetitivní imunoanalytická stanovení. IRMA soupravy fungují na bázi fixace jedné protilátky na pevnou fázi (plastovou stěnu zkumavky). Po přidání séra, jenž obsahuje analyt (antigen) dojde k navázání tohoto analytu na protilátku, která je fixovaná na stěně zkumavky. Po promytí vhodným roztokem a odstranění nenavázaných částí antigenu se přidává druhá protilátka (tracer), která je značená radioaktivním I^{125} . Následně se odmyjí nenavázané reagenty a pokračuje se měřením vázané radioaktivity (Obrázek 1). Vázaná radioaktivita je přímo úměrná k množství analytu ve vzorku [Ekins, 1979].

Obrázek 1. Princip IRMA

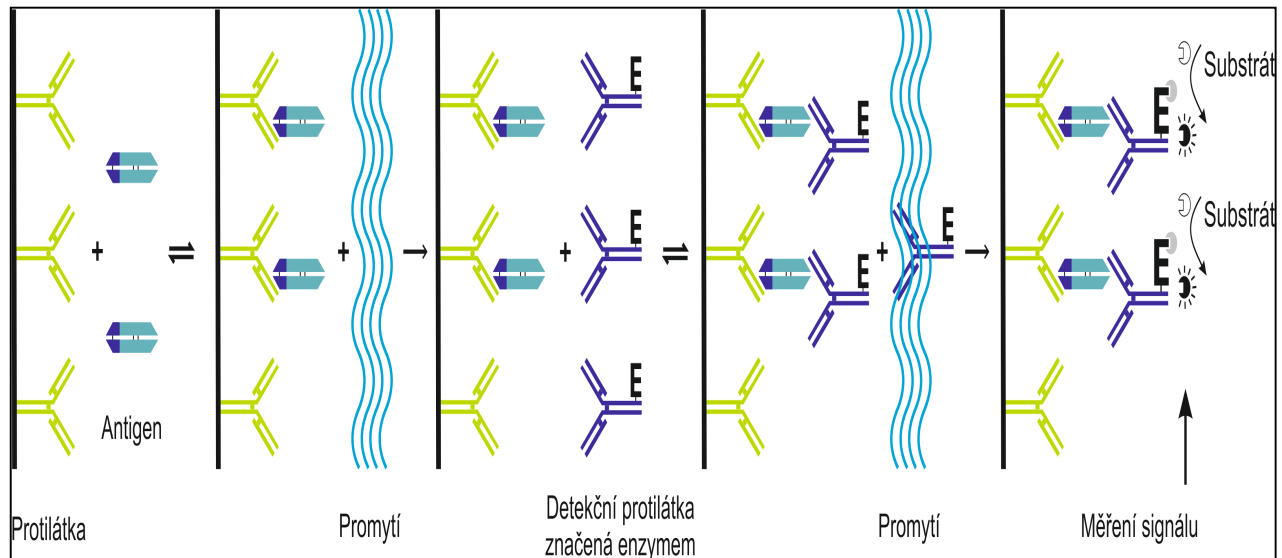


4.2.2 Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)

Jedná se o nekompetitivní enzymoimunoanalytickou metodu. ELISA metody využívají fixace jedné protilátky na pevnou fázi (plastovou stěnu reakční jamky). Po přidání séra, jenž obsahuje analyt (antigen) dojde k navázání tohoto analytu na protilátku, která je fixovaná na stěně jamky. Po promytí vhodným roztokem a odstranění nenavázaných částí antigenu se přidává druhá protilátka v konjugátu s enzymem. Po odmytí nenavázané reagentie se přidá vhodný enzymový substrát. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán

do reakční směsi, na barevný produkt. Ten se následně měří spektrofotometricky. Koncentrace produktu je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku (Obrázek 2).

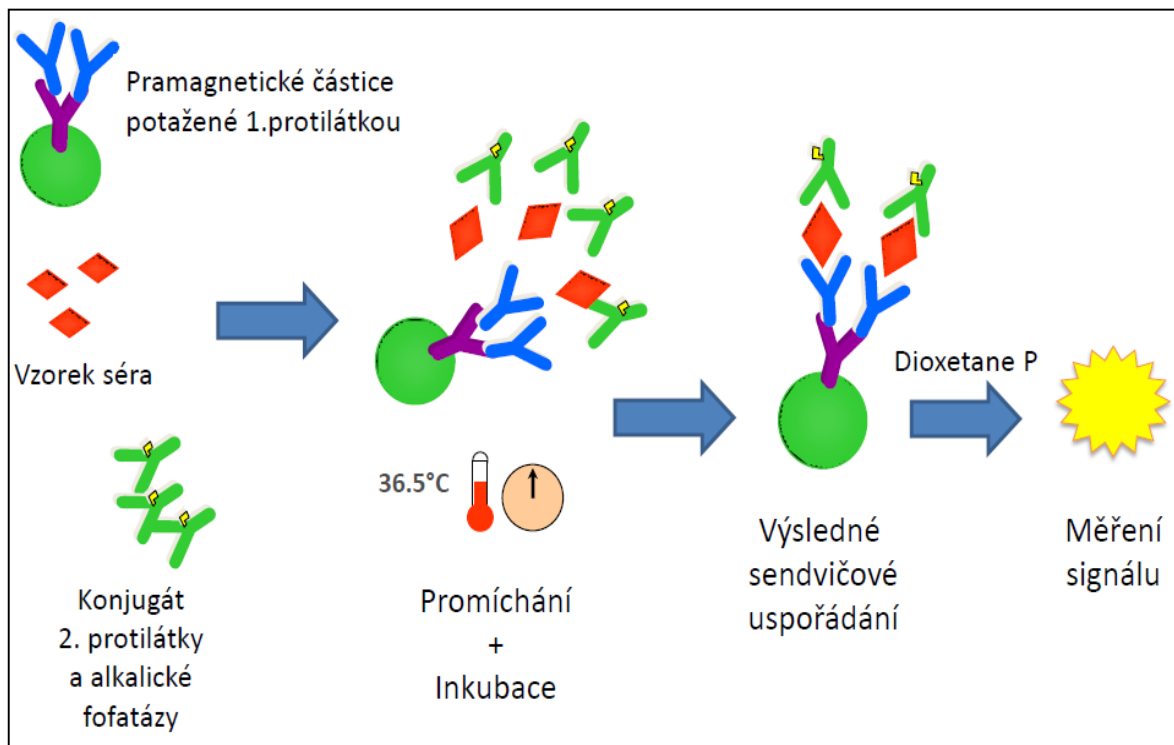
Obrázek 2. Princip ELISA



4.2.3 Chemiluminiscenční analýza (CLIA)

Tato metoda je založena na principu imunoenzymatické chemiluminiscenční analýzy (Obrázek 3). Dochází k reakci mezi dvěma monoklonálními protilátkami a dvěma epitopy (oblast antigenu na kterou se váží protilátka) analytu (antigenu). Jedna protilátka je vázána na magnetických částicích, druhá na sobě nese alkalickou fosfatázu (ALP). Po inkubaci se provede magnetická separace a promytí. Následně se přidává chemiluminiscenční substrát a po proběhnutí reakce s ALP se provede luminometrické měření. Světlo, které tato reakce vytvoří, je opět přímo úměrné koncentraci analytu [Rauhut, 1985].

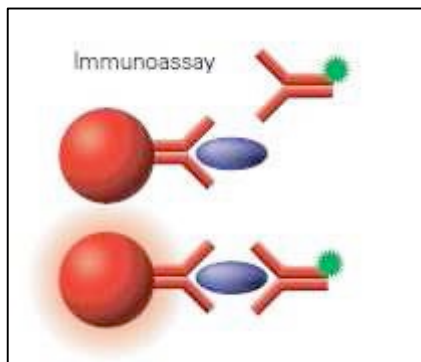
Obrázek 3. Princip CLIA



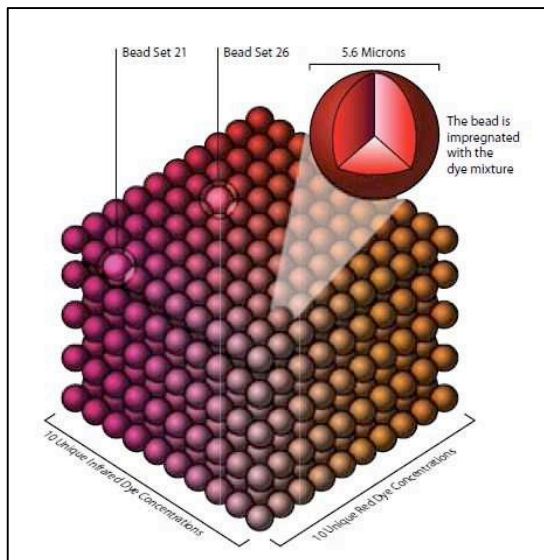
4.2.4 Multiplexová analýza

Tato metoda funguje na principu vazby antigenu a protilátky (Obrázek 4). Protilátka je v tomto případě vázána na povrch barevně odlišených mikročastic (Obrázek 5). Kvantifikace stanovovaných analytů je umožněna díky druhé protilátce, na kterou je navázána fluorescenční molekula. Přístroj pro měření je založen na principu průtokového cytometru. Měření samotné se provádí pomocí dvou laserů. První laser slouží ke kvalitativnímu odlišení kuliček, čímž je vlastně dán typ analytu. Druhý laser zjišťuje množství navázané druhé protilátky s fluorescenčním značením. Koncentrace jednotlivých analytů se vypočítají podle standardní kalibrační křivky. Díky tomuto principu měření, je možné multiplexovou analýzou stanovit větší množství analytů v jediném měření. Objem vzorku je přitom velice nízký, pohybuje se v rozmezí 10–50 μl . Současné přístroje umožňují stanovit až 24 analytů v jednom vzorku [Sharma, 2009].

Obrázek 4. Reakce antigenu a protilátky v multiplexové analýze



Obrázek 5. Barevně odlišené mikročástice v multiplexové analýze



4.3 Sledované biomarkery a jejich charakteristika

Tabulka 7. Základní charakteristika sledovaných biomarkerů

Skupina		Popsán	m.h.(kDA)		Charakteristika
Onkofetální	CEA	1965	150 -300		Glykoprotein
	CA 72 -4	1986	200-400		Mucin sialo- glykolipid
	CA 19-9	1979	200-1000		Mucin – glykoprotein
Cytokeratiny	TPA	1957	22-45		Polypeptid
	TPS	1958	12		Protein
Růstové faktory	FGF 23	2000	25		Protein
Hormony	Gastrin	1905	2,05		Protein
Enzymy	Pepsinogen I	1969	42-44		Protein

Enzymy	Pepsinogen II	1969	39-42		Protein
Ostatní	PIVKA	1984	170		Protein
MMP	MMP 1	1962	54		Protein
	MMP 2	1970	72		Protein
	MMP 7	1988	29,6		Protein
	MMP 8	1990	53,4		Protein
	MMP 9	1992	78,5		Protein
	OPN	1986	44		Glykoprotein
	OPG	1997	55-60		Protein

4.3.1 Karcinoembryonální antigen (CEA)

Byl objeven v roce 1965 a patří tak k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům. Sérový CEA patří k základním markerům studovaným u různých nádorových lokalizací. Jde o směs onkofetálních glykoproteinů o molekulové hmotnosti 150–300kDa. Tato směs je tvořena z 55% sacharidy a ze 45% bílkovinami. Vysoká heterogenita molekuly je dána heterogenitou sacharidové složky, proteinová složka je konstantní. Fyziologicky je CEA produkován ve vyvíjejícím se embryu, tedy ve fetální tkáni plodu, kdy je prokazatelný od 8. týdne gravidity s nejvyšší produkcí v období kolem 22. týdne. V dospělosti je za fyziologických podmínek syntetizován epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů, ale pouze v malém množství [Klener, 2002].

V průběhu maligního procesu je CEA produkován nádorovou tkání, jeho hladiny se výrazně zvyšují především ve vztahu k celkové hmotě nádoru. Komponenty z plazmatické membrány jsou průběžně odštěpovány z jejího povrchu a v podobě váčků pronikají přes lymfu do krve [Hammarström, 1999]. Zvýšené hodnoty CEA se také objevují pacientů s akutním či chronickým zánětem pankreatu, plic, ledvin, při cirhóze, ulcerózní kolitidě, u Crohnovy nemoci a dalších nenádorových onemocnění. Velký vliv na produkci CEA má také kuřáctví a alkoholismus.

CEA má v současné době význam především při monitorování kolorektálních karcinomů, karcinomů plic, prsu, močového měchýře a dalších malignit. Zvýšení jeho koncentrace totiž předchází o několik měsíců klinické projevy relapsu onemocnění [Klener, 2002].

4.3.2 Cancer antigen 19-9 (CA 19-9)

CA 19-9 patří mezi onkofetální nádorové markery. Je monoklonální protilátkou definovaný mucin-sialo-glykolipid s molekulovou hmotností více než 1000 kDa s 10 % sacharidů. 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 bronchů a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. Zvýšené hodnoty CA 19-9 můžeme nalézt u zhoubných nádorů pankreatu, žlučníku a žlučových cest, žaludku. Dále u primárních nádorů jater, u kolorektálního karcinomu, mucinózního typu karcinomu ovarií, karcinomu dělohy. CA 19-9 se eliminuje výhradně žlučí. Zvýšené hodnoty tedy můžeme nalézt i u benigních onemocnění jater a žlučových cest, dále pak u akutní i chronické pankreatitidy a zánětlivých onemocnění žaludku a střev. U málo diferencovaných karcinomů se jeho produkce snižuje a u anaplastických karcinomů chybí úplně.

4.3.3 Cancer antigen 72-4 (CA 72-4)

CA 72-4 je glykoprotein mucinózního typu s molekulovou hmotností 220-400 kDa. Jeho fyziologická funkce není známa. Zvýšené hladiny se vyskytují u karcinomu žaludku, jícnu, ovarií, plic a kolorektálního karcinomu. Zvýšené hodnoty můžeme nalézt i u jaterní cirhózy, akutní pankreatitidy, chronické bronchitidy, vředové choroby žaludku a zánětlivých onemocnění žaludku a střev.

4.3.4 Tkáňový polypeptidický antigen (TPA)

TPA je cirkulující komplex polypeptidových fragmentů cytokeratinů 8, 18 a 19. Poprvé byl prokázán v r. 1957 jako antigen epitelálních buněk karcinomů. Je tvořen normálními i nádorovými buňkami. Fyziologicky je TPA produkován trofoblastem placenty, dále pak játry, plícemi, střevem a ledvinami vyvíjejícího se plodu [Valík, 2014]. TPA je nespecifický nádorový marker, který umožňuje zachytit maligní růst v různých orgánech. Ke zvýšení sérových hladin

dochází při výrazném zvýšení buněčné proliferační aktivity. Byl prokázán ve většině karcinomů. Klidová zdravá tkáň jej neobsahuje. Jeho výskyt je však spojen s rychle se množícími epiteliálními buňkami plodu, např. v těhotenství se zvyšuje během gestace (během 5 dnů po porodu se pak vrací k výchozím hodnotám), zvýšen je též u zánětů. Zvýšené hladiny těchto antigenů můžeme nalézt u maligních nádorů hlavy a krku, dělohy, štítné žlázy, prsu, vaječníků, prostaty, plic, močového měchýře a jiných. Z nezhoubných onemocnění jsou to záněty a benigní choroby plic, jater, pankreatu a urogenitálního systému. TPA je vhodné pro sledování průběhu onemocnění a efektu léčby některých solidních nádorů (Ca prsa, ovaria). Při úspěšné léčbě dochází u těchto markerů obvykle k výrazně rychlejšímu poklesu hodnot než u markerů diferenciačního typu [Nekulová, 2006].

4.3.5 Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS)

TPS je antigen velmi podobný antigenu TPA. Protilátka používaná k jejímu stanovení je namířena proti M3 epitopu molekuly TPA, což je hlavní epitop cytokeratinového fragmentu 18. Fyziologicky se TPS vyskytuje v trofoblastu placenty. Lze jej prokázat i v intenzivně se dělících epiteliích různých orgánů vyvíjejícího se plodu. Je nalézán v malých koncentracích i ve tkáni močového měchýře, mléčné žlázy, plic a trávicího traktu zdravých dospělých. Je přítomen ve tkáni maligních nádorů. Imunohistochemická nebo kvantitativní analýza tkáňového TPS dosud nevedla k jednoznačným závěrům o jeho fyziologické úloze [Ausch, 2010].

Zvýšené hladiny těchto antigenů můžeme nalézt u maligních nádorů prsu, plic, hlavy a krku, dělohy, štítné žlázy, vaječníků, prostaty a jiných, ale může být zvýšen i u jiných onemocnění jako jsou záněty a benigní choroby plic, jater, pankreatu, trávicího ústrojí a urogenitálního systému [Xie, 2014].

4.3.6 Prothrombin induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II)

Anglická zkratka PIVKA zahrnuje proteiny, které vznikají při syntéze koagulačních faktorů závislých na vitamínu K (faktory II, VII, IX, a X, protein C), v jeho nepřítomnosti neobsahují aminokyselinu γ -karboxyglutamovou, protože nedochází k posttranslační γ -

karboxylaci glutaminových zbytků. Ta je nutná pro vazbu faktorů na vápník a jejich plné aktivaci a funkci.

PIKVA-II je nezralá forma protrombinu také známá jako DCP (Des-Gama-Carboxy Prothrombin), vitamin K koagulační faktor, syntetizovaný v játrech. V případě absence vitaminu K, nebo přítomnosti antagonistů jako je například warfarin, PIVKA II je uvolňován do krve. PIVKA-II je nový biomarker, který byl poprvé popsán jako marker pro detekci hepatocelulárního karcinomu [Fujiyama, 1988]. Produkce PIVKA-II byla také popsána u karcinomů žaludku [Takahashi, 2010].

4.4 Parametry kostního metabolismu a nádory

Následující tři biomarkery jsou spojeny s monitorováním kostního metabolismu. V posledních letech se objevily studie, které naznačily jejich možné použití i v nádorové diagnostice. V rutinní diagnostice se uvedené biomarkery zatím nepoužívají. Jejich použití je omezené na klinický výzkum.

4.4.1 Osteoprotegerin (OPG)

Jedná se o glykoprotein, jenž obsahuje 401 aminokyselinových zbytků. Byl objeven při výzkumu molekul, které jsou příbuzné s tumor nekrotizujícím faktorem (TNF). OPG je cytokinový receptor a je produkován především osteoblasty (kostními buňkami) a buňkami stromatu, jenž představuje vazivovou tkáň, která podepírá, vystýlá či vyplňuje prostor žláz, tkání, orgánů či nádorů [Schoppet, 2002]. Je důležitým regulátorem remodelace kostí, a to prostřednictvím jeho klíčové role při osteoklastogenezi. OPG inhibuje osteoklastogenezi vazbou RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B). RANKL je ústřední a rychle účinkující transkripční faktor pro geny související s imunitní odpovědí, regulací zánětu, přežíváním a diferenciací buněk [Stejskal, 2002]. Někteří autoři uvádí, že OPG marker hraje důležitou roli v nádorové angiogenezi, což je klíčový proces pro vývoj nádorů a jejich metastáz. Zvýšená exprese tohoto markeru u invazivního nádoru souvisí s vyvoláním progresu a metastáz. U maligních tumorů produkují nádorové buňky zvýšené množství RANKL. Současně dochází ke zpomalení tvorby OPG, což má za následek zvýšenou kostní resorpci [Tsusamoto, 2011].

4.4.2 Osteopontin (OPN)

Jedná se o glykoprotein, složený ze 300 aminokyselin, který se nachází v extracelulární matrix a je syntetizován pomocí různých typů buněk, jako jsou např. fibroblasty, osteoblasty, některými buňkami kostní dřeně, makrofágy, buňkami hladkého svalstva, myoblasty, endoteliálními buňkami a dalšími. OPN působí jako důležitý faktor v remodelaci kostí. OPN hraje významnou roli při kotvení osteoklastů na minerální kostní matrix a zahajuje tak resorpci kosti [Wang, 2008; Ashozawa, 1996]. Je také významným faktorem podílejícím se na procesech hojení ran, imunitních odpovědích a je významným antiapoptotickým faktorem [Burdo, 2007]. Bylo prokázáno, že OPN je nadměrně exprimován u různých druhů nádorů, jako jsou např. rakoviny plic, prsu, tlustého střeva, žaludku, vaječníků a melanomu [Rittling, 2004]. Byly zaznamenány zvýšené hladiny tohoto markeru v séru u pacientů s pokročilým či metastazujícím nádorovým onemocněním [Furger, 2001].

4.4.3 Fibroblast growth factor 23 (FGF23)

Fibroblastové růstové faktory (FGF) je skupina strukturálně příbuzných polypeptidů, které jsou nezbytné pro vývoj embrya a které postnatálně působí jako homeostatické faktory, v reakci na poranění, při regulaci elektrické excitability buněk a jako hormony regulující metabolismus. U lidí je FGF signální cesta zapojena do vývojových, nádorových, metabolických a neurologických onemocnění. Mají vysokou afinitu k proteoglykanům heparan sulfátu (HPSG) a mohou interagovat s heparinem podobných glykosaminoglykanů (HLGAG) extracelulární matrix (ECM). Fibroblastové růstové faktory obsahují centrální jádro 140 aminokyselin s vysokou homologií, která tvoří topologicky identickou strukturu s interleukinem-1 β (IL-1 β). První z těchto proteinů byly historicky pojmenovány jako "FGF" pro jejich biologickou aktivitu stimulující fibroblasty. U obratlovců obsahuje rodina FGF 23 členů s molekulovou hmotností v rozmezí 17 až 34 kDa a aminokyselinovou schodou mezi členy 13 až 71%. FGF mohou být fylogeneticky rozděleni do sedmi podrodin; FGF 1/2, FGF 4/5/6, FGF 3/7/10/22, FGF 8/17/18, FGF 9/16/20, FGF 11/12/13/14 a FGF 19/21 / 23. Podle mechanismu účinku může být rodina FGF rozdělena do tří kategorií, parakrinní, endokrinní a intrakrinní FGF. Parakrinní FGF jsou tvořeny členy podskupin FGF1 / 2, FGF 4/5/6, FGF

3/7/10/22, FGF 8/17/18, FGF 9/16/20; Tři členové podskupiny FGF 19/21/23 tvoří endokrinní FGF; A intrakrinní FGFs obsahují čtyři členy podskupiny FGF 11/12/13/14. S výjimkou FGF11, FGF12, FGF13 a FGF14 jsou členy rodiny FGF sekretované ligandy, které přenášejí své signály vazbou na FGF receptory (FGFRs). Dále jsou signály přenášeny cestou kinázy RAS / MAP, kinázou PI3 / AKT a cestou PLC γ .

FGF23 je protein ze skupiny fibroblastových růstových faktorů (FGF). Jeho hlavní fyziologickou funkcí je regulace koncentrace fosfátů v séru. První FGF byl identifikován v extraktech hypofýzy v roce 1973. Řada FGF má pouze lokální účinky ve tkáních. FGF19, EGF21 a EGF23 dokáží působit i systémovým mechanismem. FGF23 je vylučován osteocyty v reakci na zvýšenou koncentraci účinné formy vitamínu D – kalcitriolu. Místem účinku FGF23 jsou ledviny, kde v proximálním tubulu snižuje aktivitu sodno-fosfátové pumpy. Následkem je snížení reabsorbce a zvýšení exkrece fosfátů. FGF23 je též inhibitorem 1-alpha-hydroxylázy, která katalyzuje přeměnu zásobní formy vitamínu D (calcidiolu) na aktivní formu vitamínu D (calcitriol), což vede ke snížení absorbce vápníku.

Gen pro FGF23 je lokalizován na chromozomu 12. Mutace v tomto genu, které činí FGF23 rezistentní k proteolytickému štěpení vedou ke zvýšené aktivitě FGF23 a ke zvýšené ztrátě fosfátů. Klinicky se projevuje jako autozomálně dominantní onemocnění hypofosfemická rachitida. FGF23 se nadměrně produkuje též u některých typů nádorů například benigní mezenchymální nádor způsobující osteomalácii – paraneoplastický syndrom. Ztráta účinku FGF23 vede ke zvýšení hladiny fosfátů v séru.

U pacientů s renální insuficiencí a u dialyzovaných pacientů se mohou hodnoty FGF23 pohybovat v řádu několika set až tisíců pg/ml. Toto zvýšení hodnot znemožňuje další diagnostické využití u těchto pacientů [Wahl, 2012; Wolf, 2012; Drew, 2014; Vervloet, 2014; Mettang, 2017]. V posledních letech se objevilo několik prací zkoumajících vztah FGF23 k chromozomálními abnormalitám u kolorektálního carcinomu [Leaf, 2013; Sheffer, 2009].

4.5 Matrix metaloproteinázy (MMP)

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou zinek-dependentní endopeptidázy, které degradují extracelulární matrix a komponenty bazální membrány. V současné době jsou známy enzymy, které jsou klasifikovány jako MMP. Aktivita metaloproteináz je přísně

regulovaná. MMP hrají důležitou roli v procesech remodelace tkání a vývoje orgánů a v regulaci zánětlivých procesů.

MMP jsou schopné degradovat všechny druhy proteinů extracelulární matrix, ale také mohou zpracovávat řadu bioaktivních molekul. Je známo, že se účastní štěpení receptorů na povrchu buněk, uvolnění apoptotických ligandů (například FAS ligandů) a inaktivace hemokinů / cytokinů. Předpokládá se, že MMP hrají významnou roli v buněčných procesech, jako je buněčná proliferace, migrace (adheze / disperze), diferenciaci, angiogeneze, apoptóza a obranyschopnost.

MMP jsou vylučovány a jsou vázané na buněčnou membránu jako neaktivní proenzymy, které potřebují proteolytické zpracování, aby uvolnily katalyticky aktivní enzym. Tohoto procesu může být dosaženo jinými MMP nebo jinými proteázami.

Při fyziologickém vývoji MMP vytvořené pojivovými tkáněmi hrají důležitou roli v remodelaci tkání, při menstruačním cyklu a v procesu hojení ran. Zřejmě destruktivní schopnost MMP přispěla k tomu, že původně většina výzkumů se původně zaměřila na onemocnění, která zahrnují štěpení pojivové tkáně (např. revmatoidní artritida, nádorová onemocnění a onemocnění parodontu). Leukocyty, zejména makrofágy, jsou hlavní zdroje produkce MMP. MMP uvolňované leukocyty umožňují leukocytům extravazaci a proniknutí do tkání, což je klíčový proces u zánětlivých onemocnění. Analogickým způsobem využívají metastatické nádorové buňky MMP, k tomu, aby se dostaly dovnitř a ven z tkání a vytvořily přívod krve [Lagente, 2008]. MMP a jejich specifické inhibitory hrají důležitou roli v progresi nádoru a metastatických procesech, jako je invaze nádorových buněk do bazální membrány a stromatu, penetrace do krevních cév, migrace do vzdálených míst v těle a metastazování [Ashraf, 2013]. Rozdělují se do několika skupin.

Kolagenázy: Tato kategorie zahrnuje intersticiální kolagenázy; kolagenáza 1 (MMP-1), neutrofilní kolagenáza; kolagenáza 2 (MMP-8), kolagenáza 3 a kolagenáza 4 označovaná jako MMP-13 a MMP-18 (Xenopus). Substrát cílený těmito peptidázami je fibrilární kolagen typu I, II a III. MMP-1 enzymu obvykle katalyzuje odbourávání kolagenu typu III, MMP-13 se podílí na degeneraci kolagenu typu II, zatímco MMP-8 ukazuje aktivitu proti kolagenu typu I. Charakteristickým rysem této skupiny proteináz je, že štěpí svůj substrát na specifickém místě. Kromě těchto substrátů, mohou kolagenázy působit na několika dalších molekulách, které mohou nebo nemusí patřit do extracelulární matrix. Studie ukázaly, že kolagenázy se

podílejí na invazi nádorových buněk a metastáz. Zvýšená exprese MMP-13 / kolagenázy 3 byla popsána u karcinomu prsu v porovnání se sníženou expresí v normální tkáni, což naznačuje její účast na invazi nádorových buněk.

Gelatinázy: Tato skupina má dva členy, a to gelatináza A a gelatináza B označené jako MMP-2 a MMP-9. Tyto peptidázy působí na želatiny, tj. denaturovaný kolagen. Ovlivňují degradaci několika typů kolagenů, typu IV (degradace v trojitě šroubovicové struktury), V, VII, IX a X. Katalytická aktivita MMP-2 má podobný účinek na denaturaci kolagenu typu I, II a III. jako kolagenázy. Bazální membrána má nadbytek kolagenu typu IV a MMP-2 / MMP-9 může katalyzovat degradaci bazální membrány, což naznačuje na jejich roli v tvorbě nádorových metastáz. Bylo publikováno, že v mikroprostředí nádoru se obě tyto gelatinázy účastní při angiogenezi ve spojitosti s tumorem asociovanými makrofágy (TAM).

Stromelysiny: Do této skupiny patří Stromelysin 1 (MMP-3), stromelysin-2 (MMP-10) a stromelysin 3 (MMP-11). Stromelysin 1 a stromelysinu 2 jsou stejné, v rámci struktury domény a substrátu a jejich geny jsou lokalizovány na chromozómu 11 spolu s geny jiných MMP, včetně MMP-1, MMP-8, MMP-20. Stromelysin 3 (MMP-11) je vzdáleně příbuzný. Isoformu MMP-11 (β stromelysin 3) nalezeneme intracelulárně v placentě s neznámou funkcí. Tyto stromelysiny jsou rovněž účinné složky, které se účastní při vzniku nádorových metastáz a jejich invazi. Exprese MMP-3 a MMP-10 spolu s dalšími MMP byly zaznamenány v různých nádorech, zejména v prsu, hlavy a krku, jícnu. Vyšší stupeň nádoru u NSCLC je charakterizován zvýšenou expresí MMP-10 a MMP-3.

Matrilysiny: Proteinázy, které patří do této skupiny jsou MMP-7 (matrilysin 1) a MMP-26 (matrilysin 2, také známý jako endometaza). Jsou syntetizovány epiteliálními buňkami a zaměřují se na molekuly buněčného povrchu, jako je E-cadherin, pro-TNF- α , Fas ligand, pro- α -defensin atd. MMP-7 je enzym, který rovněž působí na množství složek extracelulární matrix. Exprese MMP-7, je zvýšena v hypoxických oblastech mikroprostředí nádoru, pokud jsou přítomny TAM. Je exprimován u 53% primárních karcinomů žaludku. Tato proteináza se podílí na migraci endotelu a proliferaci buněk, a tím podporuje angiogenezi v nádoru. MMP-26 (matrilysin 2) se obvykle nachází v intracelulárním prostředí. Degraduje několik složek extracelulární matrix a je často vyjádřena u buněk endometria. MMP-26 je exprimován buňkami duktálního karcinomu prsu a buňkami karcinomu endometria.

Membránové MMP: Tato skupina se dělí na dva typy MMP: transmembránové a GPI (glykosyl fosfatidylinositol) ukotvené. MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16) a MT5-MMP (MMP-24) jsou transmembránové typy, zatímco MT4-MMP (MMP-17) a MT6-MMP (MMP-25) jsou GPI ukotvené. Až na MMP-17, všichni členové této kategorie jsou schopné aktivace pro-MMP-2. Aktivita MT1-MMP je dobře popsána a je známo, že katalyzuje denaturaci několika molekul extracelulární matrix, aktivuje pro-MMP-2, za přítomnosti plazminu. MMP-14 se také podílí na angiogenezi a podporuje vznik nádorových metastáz. MT5-MMP je exprimována v mozečku a v periferní krvi leukocyty. MT6-MMP enzym je exprimován u mozkových nádorů.

Ostatní MMP: Některé z MMP nebylo možné zařadit do jakékoliv z výše uvedených kategorií. Patří sem MMP-12, -19, -20, -23, -27 a -28. MMP-12, -20 a -27 sdílejí stejnou strukturu, stejně jako umístění jejich genů na chromozómu podobné jako to stromelysiny. MMP-12 (makrofágová elastáza) je exprimována hlavně makrofágy a podílí se na jejich migraci. Předpokládá se její role v nádorové angiogenezi a metastazování. MMP-19 je také známá jako RASI (revmatoidní artritida synoviálního zánětu). Je také exprimována proliferujícími keratinocyty v místě hojení rány. MMP-20 je spojena s genetickou poruchou názvem amelogenin imperfekta. MMP-20 rozkládá amelogenin a jeho expresi v nově vznikající zubní sklovině. MMP-23 je kódován dvěma geny, které jsou oba umístěny na chromozomu 1. O MMP-27 jsou známy jen omezené informace. MMP-28 (epilysin) je nejnovější přírůstek do rodiny MMP. Je exprimována v řadě tkáních, jako jsou placenta, varlata, srdce, plíce. Úloha MMP-28 v hojení ran byla identifikována, stejně jako zvýšená exprese u nemocných s osteoartritidou [Khalid, 2016].

4.6 Biomarkery rizika vzniku karcinomu žaludku

Biomarkery rizika karcinomu žaludku nepatří mezi nádorové markery. Jedná se o biomarkery, které slouží k monitoraci produkce kyselé žaludeční šťávy a slouží k diagnostice vředové choroby žaludku a k určení rizika jejího vzniku. Vředová choroba žaludku ve své chronické podobě je pak označována za rizikový faktor karcinomu žaludku.

4.6.1 Pepsinogen I a pepsinogen II

Pepsinogen I a pepsinogen II, jsou proenzymy pepsinu, který je endoproteidázou žaludeční šťávy. Pepsinogen I je vylučován převážně hlavními buňkami žaludeční sliznice [Samloff, 1971], zatímco pepsinogen II je vylučován pylorickými žlázami a proximální duodenální sliznicí [Samloff, 1973]. Kyselina chlorovodíková vytváří kyselé prostředí, které umožňuje štěpení pepsinogenu na aktivní formu enzymu, kterou je pepsin. Pepsin je jednou ze tří hlavních proteáz v lidském trávicím systému, dalšími dvěma jsou chymotrypsin a trypsin. Během procesu trávení, tyto enzymy spolupracují, přičemž každý z nich se specializuje na přerušování vazby mezi jednotlivými druhy aminokyselin.

4.6.2 Poměr pepsinogen I / pepsinogen II

Stanovení poměru hladin obou pepsinogenů (pepsinogen I / pepsinogen II) je dnes považováno za nejvýhodnější variantu serologických markerů gastritidy. Poměr pepsinogen I / pepsinogen II signifikantně klesá v závislosti na histologickém riziku atrofické gastritidy, resp. karcinomu žaludku. Kombinace stanovení hladiny pepsinogenu I, gastrinu, poměru pepsinogenu I a II, a protilátek proti *Helicobacter pylori* je prověřována jako screeningový test rizika karcinomu žaludku.

4.6.3 Gastrin

Hormon gastrin a nervus vagus spouštějí uvolňování jak pepsinogenu, tak kyseliny chlorovodíkové ze žaludeční sliznice při požití potravy. Kyselina chlorovodíková vytváří kyselé prostředí, které umožňuje autokatalytické štěpení pepsinogenu na pepsin.

4.6.4 Helicobacter pylori

Helicobacter pylori je gramnegativní bakterie vyskytující se v žaludku. Bakterie byla objevena v roce 1982 u osob trpících chronickou gastritidou a žaludečními vředy. Více než 50% světové populace je hostitelem *Helicobacter pylori*. Infekce je častější v rozvojových zemích a výskyt klesá ve vyspělých zemích. Nicméně, více než 80% jedinců infikovaných bakterií

nemá žádné příznaky [Blaser, 2006]. *Helicobacter pylori* je spirálovitého tvaru a předpokládá se, že se u něj díky tomu vyvinula schopnost proniknout do buněk žaludeční stěny [Amieva, 2016; Brown, 2000]. Přítomnost *Helicobacteru pylori* je kromě žaludečního vředu také spojena s rozvojem jícnové vředové choroby, duodenálními vředy a v současnosti je považován i za jeden z rizikových faktorů karcinomu žaludku.

4.7 Vybrané parametry statistického hodnocení významu biomarkerů

4.7.1 Senzitivita (SN) je pravděpodobnost zvýšení markeru (koncentrace \geq cut off) za předpokladu recidivy (v sekundární diagnostice), resp. primární malignity (v primární diagnostice). Senzitivita = $\frac{\text{Pravděpodobnost (koncentrace } \geq \text{ cut off | recidiva onemocnění)}}{\text{Pravděpodobnost (koncentrace } \geq \text{ cut off)}}$
Na řádku výše svislá čára „|“ značí „za podmínky“. Slovní vyjádření pojmu senzitivita - kolik procent případů s recidivou onemocnění (resp. s primární malignitou) má zvýšené koncentrace markeru.

4.7.2 Specificita (SP) je pravděpodobnost normální koncentrace (koncentrace $<$ cut off) za předpokladu kompletní remise onemocnění (v sekundární diagnostice), resp. žádného či benigního onemocnění (v primární diagnostice) Specificita = $\frac{\text{Pravděpodobnost (koncentrace } < \text{ cut off | remise onemocnění)}}{\text{Pravděpodobnost (koncentrace } < \text{ cut off)}}$
Slovní vyjádření pojmu specificita - kolik procent případů v kompletní remisi onemocnění (resp. bez malignity v primární diagnostice) má normální koncentrace markeru.

4.7.3 Pozitivní prediktivní hodnota (PV+) je pravděpodobnost recidivy (v sekundární diagnostice), resp. primární malignity (v primární diagnostice) při zvýšené koncentraci markeru.

$PV+ = \frac{\text{Pravděpodobnost (recidiva onemocnění | koncentrace } \geq \text{ cut off)}}{\text{Pravděpodobnost (koncentrace } \geq \text{ cut off)}}$

Slovní vyjádření pojmu pozitivní prediktivní hodnota - kolik procent případů se zvýšenou koncentrací markeru má recidivu onemocnění (resp. primární malignitu).

4.7.4 Negativní prediktivní hodnota (PV-) je pravděpodobnost kompletní remise onemocnění (resp. toho, že nebyla nalezena malignita v primární diagnostice) při normální koncentraci markeru (tzn. kolik procent z nízkých hodnot je ve stavu kompletní remise). $PV- = \frac{\text{Pravděpodobnost (remise onemocnění | koncentrace } < \text{ cut off)}}{\text{Pravděpodobnost (koncentrace } < \text{ cut off)}}$

= Pravděpodobnost (remise onemocnění | koncentrace < cut off) Slovní vyjádření pojmu negativní prediktivní hodnota - kolik procent případů s normální koncentrací markeru je v kompletní remisi onemocnění (resp. bez primární malignity).

4.7.5 Relativní riziko (RR = relative risk) = poměr pravděpodobností recidivy onemocnění při zvýšení markeru a pravděpodobnosti recidivy onemocnění při normální koncentraci markeru.

$$\text{RelRisk} = \frac{\text{Pravděpodobnost (recidiva onemocnění | koncentrace} \geq \text{cut off) /}}{\text{Pravděpodobnost (recidiva onemocnění | koncentrace < cut off)}}$$

Slovní vyjádření pojmu relativní riziko - kolikrát se zvýší riziko recidivy onemocnění zvýšením markeru nad cut off oproti riziku recidivy při normální koncentraci markeru.

4.7.6 ROC křivka (ROC-receiver operating characteristic) vyjadřuje závislost senzitivity na procentuální falešné pozitivitě (tj. 100 % - specificita), měníme-li cut off v celém intervalu měřených hodnot. To přesně znamená, že měníme cut off od dolního detekčního limitu (odpovídá mu 100% SN a 0% SP – tj. bod ROC křivky vpravo nahoře) do horního detekčního limitu (odpovídá mu 0% SN a 100% SP – tj. bod ROC křivky vlevo dole), přičemž pro každou konkrétní hodnotu cut off dostaneme patřičnou senzitivitu a specificitu - tj. pro konkrétní cut off dostaneme jeden bod ROC křivky.

4.7.7 AUC (Area Under The Curve - Plocha pod křivkou) je plocha pod ROC křivkou, čím blíže je tato hodnota rovna 1, tím lépe. Hodnota 0,5 znamená v podstatě nulovou diskriminační schopnost měřeného markeru. Hodnota AUC blízka nule by znamenala, že nízká hodnota parametru je prediktorem malignity nebo její recidivy [Pecen, 2014].

4.8 Statistické hodnocení výsledků

Pro statistické výpočty byl použit software SAS 9.4 (Statistical Analysis Software release 9.4; SAS Institute Inc., Carry, NC, USA). Byly spočítány deskriptivní statistiky pro všechny hodnocené skupiny pacientů. Dále jsou ve výsledcích spočítány následující parametry: aritmetický průměr, medián, minimum a maximum, dále pak byly spočítány pro vyhodnocení užitečnosti jednotlivých markerů ROC křivky a plochy pod křivkou (AUC).

Porovnání změn hladin nádorových markerů ve sledovaných skupinách osob bylo provedeno vzhledem k negaussovskému rozdělení hodnot neparametrickým Wilcoxonovým testem. Všechny provedené testy byly oboustranné a p-value menší než 0.05 indikovalo statistickou významnost. K výpočtu gastric cancer indexu (GCI) byla použita mnohorozměrná postupná logistická regrese (stepwise regression). V této proceduře jsou do statistického modelu postupně přidávány prediktory, dokud jsou po přidání do modelu statisticky významné a vylučovány ty dříve přidané prediktory, které se přidáním dalších staly statisticky nevýznamnými. Tímto způsobem je zaručeno, že všechny prediktory ponechané v logistické regresi jsou statisticky významné. Možné prediktory byly následující: CEA, CA19-9, CA72-4, pepsinogen-I, pepsinogen-II, gastrin, Helicobacter pylori IgG, MMP-1 MMP-2, MMP-7, MM-8, MMP-9, OPG, OPN, PIVKA-II, poměr pepsinogen I / pepsinogen II.

Procedura mnohorozměrné postupné logistické regrese pak vybrala tyto prediktory: CEA, CA72-4, pepsinogen-I, Helicobacter pylori IgG a MMP-7, a k nim určila optimální hodnoty násobících koeficientů.

4.9 Soubory nemocných a použité analytické metody

V disertační práci jsme řešili tři problematiky. Pro každé řešené téma byl vybrán specifický soubor pacientů. Byly hodnoceny následující skupiny pacientů:

- 1) karcinom žaludku
- 2) metastázy kolorektálního karcinomu do jater
- 3) různá stadia kolorektálního karcinomu jako pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu

4.9.1 Karcinom žaludku

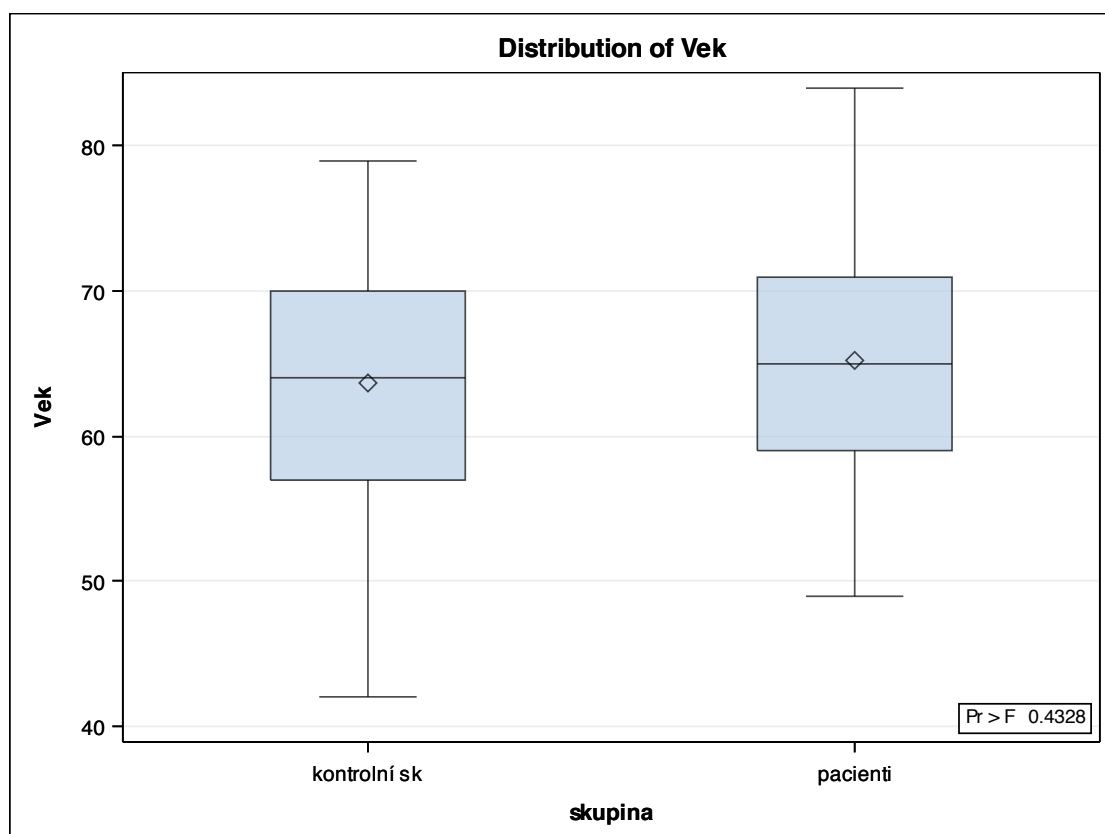
Hodnotili jsme skupinu 105 osob. 36 pacientů s karcinomem žaludku a 69 zdravých osob. Věková charakteristika hodnocených skupin je uvedena v Tabulce 8. a Grafu 1. Při hodnocení takto rozsáhlé skupiny biomarkerů je důležité porovnávat věkově srovnatelné skupiny osob. Pokud jsou v hodnoceném souboru přítomné biomarkery závislé na věku, není při věkové rovnosti hodnocených souborů nutné provádět věkovou adjustaci získaných

hodnot. Z příložené tabulky a grafu je vidět, že podmínka věkové shody porovnávaných skupin je v tomto případě splněna.

Tabulka 8. Věková charakteristika hodnocených skupin – studie karcinom žaludku

Stav	počet (N)	věk (roky)				p-Value Wilcoxon test
		Mean	Medián	Minimum	Maximum	
Zdraví jedinci	69	63.6	64.0	42.0	79.0	0.5030
Ca žaludku	36	65.2	65.0	49.0	84.0	

Graf 1. Věková charakteristika hodnocených skupin – studie karcinom žaludku



Skupina pacientů s karcinomem se skládala z pacientů ve stadiu I (20%), stádiu II (10%), stádiu III (20%) a stadiu IV (50%). Kontrolní skupina zdravých osob se sestávala z lidí, kteří podstoupili pravidelné preventivní prohlídky ve FN Plzeň. Žádný ze zdravých jedinců neměl v anamnéze karcinom žaludku, nebo jiné nádorové onemocnění, vředovou chorobu

žaludku nebo jiné žaludečních onemocnění. Všechny diagnózy karcinomu žaludku byly histologicky ověřené.

U každého pacienta byly stanoveny ve vzorcích séra a plazmy následující biomarkery: CEA, CA 19-9, CA 72-4, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, OPG, OPN, PIVKA II, pepsinogen I, pepsinogen II, gastrin a Helicobacter pylori IgG. Vypočítán byl dále poměr pepsinogen I / pepsinogen II pro každý vzorek.

CEA a CA 19-9 v séru byly stanoveny za použití chemiluminiscenčních kitů ACCESS CEA a ACCESS CA 19-9 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Hladiny CA 72-4 v séru byly analyzovány za použití elektrochemiluminiscenční soupravy COBAS CA 72-4 (Hoffmann - La Roche, Basilej, Švýcarsko). Hladiny všech MMP v plazmě byly stanoveny za použití kitu Bio-Plex Pro Human MMP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). OPG a OPN byly testovány za použití Human Bone Panel Milliplex Map kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Sérové hladiny PIVKA II byly testovány za použití chemiluminiscenčního kitu PIVKA II (Abbott, Libertyville, IL, USA). Pepsinogen I, Pepsinogen II, gastrin a Helicobacter pylori IgG byly analyzovány za použití kitů Biohit ELISA (Biohit, Helsinky, Finsko).

4.9.2 Metastázy kolorektálního karcinomu do jater

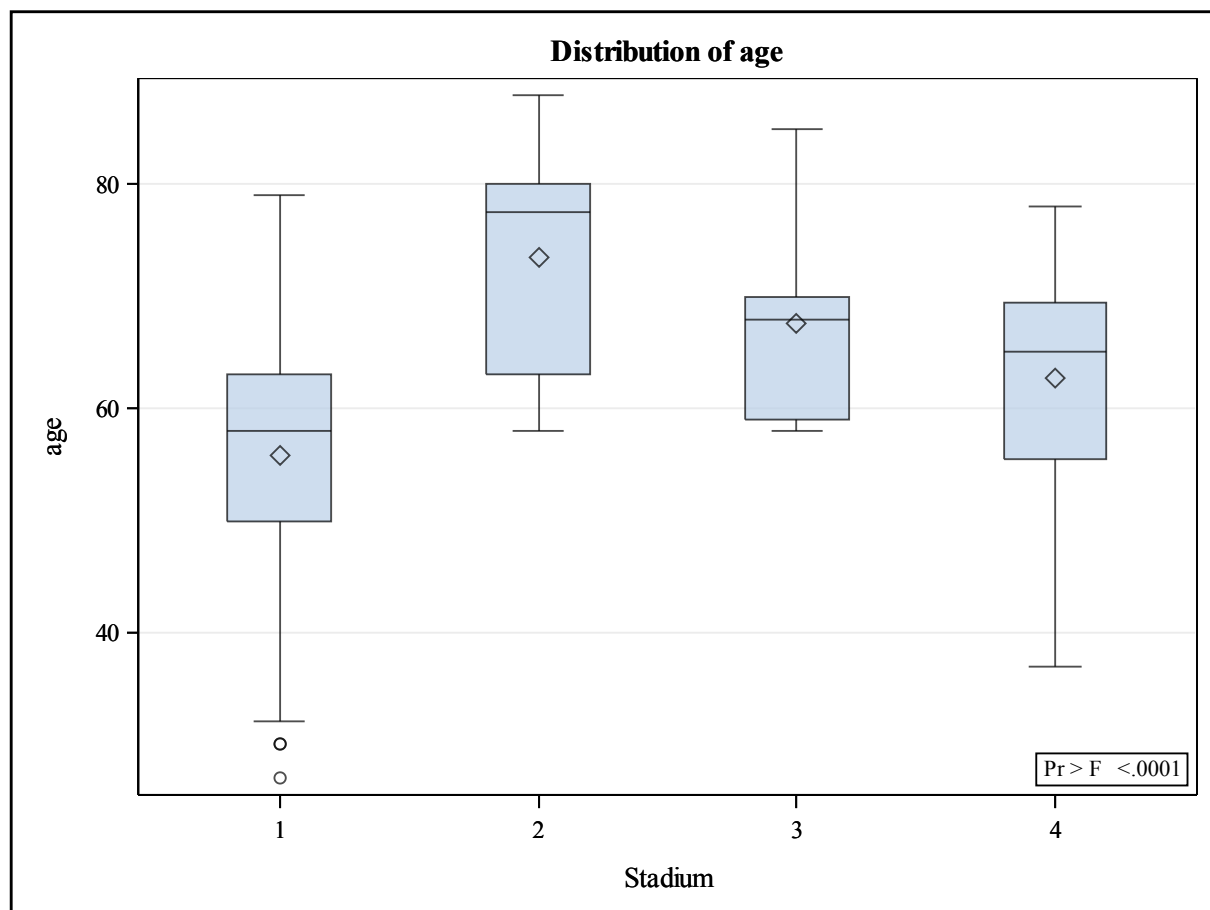
Hodnocená skupina čítala v tomto případě 111 pacientů. Všichni pacienti měli histologicky potvrzenou diagnózu kolorektálního karcinomu. Hodnocená skupina byla rozdělena na čtyři podskupiny (1 – 4) podle stadia onemocnění (I – IV). U všech pacientů byly stanoveny nádorové markery TPS, TPA a CEA. Charakteristiku souborů pacientů uvádí Tabulka 9. Ani jeden ze sledovaných markerů není závislý na věku ani pohlaví. Pro úplnost však uvádím počty mužů a žen v jednotlivých stadiích. Věkové rozložení pak uvádím jak v tabulkové, tak v grafické podobě Graf 2.

Tabulka 9. Základní charakteristika skupin pro markery TPS, TPA a CEA

Rozdělení osob a skupin		1	2	3	4
Ženy	N/%	78/74	7/70	4/57	14/29
Muži	N/%	28/26	3/30	3/43	26/71
Celkem	N	54	10	7	40

Věk	Medián (roky) (min – max)	58 (27 – 79)	77.5 (58 – 88)	68 (58 – 85)	65 (37 – 78)
------------	-------------------------------------	------------------------	--------------------------	------------------------	------------------------

Graf 2. Věkové rozložení pacientů v jednotlivých stadiích



Skupina pacientů s jaterními metastázami (skupina 10) byla tvořena pacienty, kteří měli metastázy pouze v játrech (31) a pacienty, u kterých byla nalezena metastáza současně i v jiné lokaci, nežli pouze v játrech (9). Detailní přehled uvádí Tabulka 10.

Tabulka 10. Rozdělení pacientů ve stadiu IV

Lokalizace metastáz	Počet pacientů (N)	Celkem
Meta pouze játra	31	31
Meta játra + plíce	5	9
Meta játra + skelet	3	

Meta játra + ledviny	1	
-----------------------------	----------	--

CEA v séru bylo stanoveno za použití chemiluminiscenčního kitu ACCESS CEA a (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Hladiny TPS a TPA byly stanoveny soupravami radioimunometrickými. Sérové hladiny TPS byly stanoveny za použití kitu IRMA TPS (IDL Biotech, Bromma, Sweden). Serum Sérové hladiny TPA byly stanoveny za použití kitu IRMA TPA-M (DiaSorin, Saluggia, Itálie).

4.9.3 Různá stádia kolorektálního karcinomu jako pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu

V této pilotní studii byla hodnocena skupina 60 osob. 30 zdravých osob u kterých byla v anamnéze ověřena nepřítomnost nádorového onemocnění a renální insuficience. Dále pak 30 pacientů s kolorektálním karcinomem. Všichni pacienti měli nádorovou diagnózu histologicky ověřenou. Odběr žilní krve byl proveden při prvozáchytu onemocnění, tedy před operací, či zahájením jiné léčby. V hodnocené skupině byla rovnoměrně zastoupena všechna čtyři stádia kolorektálního karcinomu. Věkové složení a porovnání obou hodnocených skupin uvádí Tabulka 11.

Tabulka 11. Věková charakteristika hodnocených skupin – studie FGF23

Stav	počet (N)	věk (roky)				p-Value Wilcoxon test
		Mean	Medián	Minimum	Maximum	
Zdraví jedinci	30	62.2	60	39	87	0.3505
Kolorektální karcinom	30	65.6	64	41	90	

U všech osob byl stanoven FGF23 pomocí chemiluminiscenčního kitu LIAISON FGF23 (DiaSorin, Saluggia, Itálie).

5 Výsledky a diskuze

5.1 Výsledky a hodnocení souboru karcinomu žaludku

Tabulka 12. ukazuje srovnání hladin CEA, CA 19-9, CA 72-4, MMP, OPG, OPN a PIVKA II mezi skupinami zdravých osob a pacientů s karcinomem žaludku.

Tabulka 12. Srovnání hladin CEA, CA 19-9, CA 72-4, MMP, OPG, OPN a PIVKA II mezi skupinami zdravých osob a pacientů s karcinomem žaludku

Analyt (jednotky)	Stav	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Minimum Maximum	p-Value Wilcoxon test
CEA (µg/l)	zdraví	1.49	1.20	0.80	2.00	0.40 – 6.40	0.0008
	nemoc	5.96	2.50	1.50	4.80	0.20 – 78.0	
CA 19-9 (kIU/l)	zdraví	7.93	5.40	2.60	9.60	1.00 – 39.1	0.0112
	nemoc	26.49	10.40	4.60	25.10	1.10 – 228	
CA 72-4 (kIU/l)	zdraví	2.00	1.40	0.98	2.30	0.60 – 7.10	<0.0001
	nemoc	20.48	7.50	5.60	9.90	3.00 – 361	
MMP-1 (pg/ml)	zdraví	2039	614	656	3392	614 – 12284	0.0219
	nemoc	4232	1963	814	5160	614 – 18968	
MMP-2 (pg/ml)	zdraví	4567	2548	1424	7198	1127 – 16555	0.7229
	nemoc	4685	1127	1537	8068	1127 – 17675	
MMP-7 (pg/ml)	zdraví	1748	1730	1443	2120	50 – 3140	0.0012
	nemoc	2337	2214	2007	2508	931 – 4566	
MMP-8 (pg/ml)	zdraví	5319	3532	2441	6299	310 – 25076	0.9949
	nemoc	4888	3799	2117	6416	310 – 14458	
MMP-9 (pg/ml)	zdraví	32494	23439	15345	41095	100 – 111269	0.0445
	nemoc	42170	38197	25203	60314	7025 – 77959	
OPG (pg/ml)	zdraví	577	535	476	726	213 – 885	0.0551
	nemoc	675	643	548	800	401 – 1048	
OPN	zdraví	12956	10483	30232	18925	216 – 78056	0.0053

(pg/ml)	nemoc	20787	16708	12979	27528	4841 – 63950	
PIVKA II	zdraví	29.96	28.14	22.11	34.76	17.50 – 68.57	0.0209
(mAU/ml)	nemoc	858	32.14	26.67	58.55	15.29 – 20167	

Pozorovali jsme statisticky významné zvýšení u skupiny pacientů s karcinomem žaludku a to v následujících biomarkerech: CEA (medián 2.50 µg/l, p<0.0091 oproti 1.40 µg/l ve skupině zdravých osob), CA 72-4 (medián 10.00 kIU/l, p=0.0004 oproti 1.40 kIU/l), MMP-1 (medián 1963 pg/ml, p<0.0254 oproti 1127 pg/ml), MMP-7 (medián 2214 pg/ml, p <0.0034 oproti 1745 pg/ml), OPN (medián 16708 pg/ml, p<0.0053 oproti 10483 pg/ml) a PIVKA II (medián 32,14 mAU/ml, p<0.0209 oproti 28.14 mAU/ml). Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v koncentracích MMP-2, MMP-8 a OPG. Tabulka 13 ukazuje vyhodnocení biomarkerů ukazujících na možná rizika vzniku rakoviny žaludku.

Tabulka 13. Vyhodnocení biomarkerů rizika vzniku rakoviny žaludku

Analyt (unit)	Stav	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Minimum Maximum	p-Value Wilcoxon test
Pepsinogen I (µg/l)	zdraví	1342	1277	836	1931	462 – 2098	0.0463
	nemoc.	1000	850	315	1560	193 – 2098	
Pepsinogen II (µg/l)	zdraví	71.41	59.40	29.31	102	19.30 – 227	0.6014
	nemoc.	75.72	45.44	25.30	122	19.30 – 255	
Ratio Pepsinogen I Pepsinogen II	zdraví	24.39	23.76	15.74	30.65	9.23 – 57.10	0.0045
	nemoc.	17.30	11.62	10.03	20.81	4.79 – 48.09	
Gastrin (pmol/l)	zdraví	15.73	6.50	7.50	11.01	6.50 – 83.50	0.0338
	nemoc.	30.64	12.22	9.60	64.50	6.50 – 80.00	
Helicobacter IgG (U/ml)	zdraví	28.50	13.40	7.30	37.90	2.00 – 148	0.0002
	nemoc.	72.88	65.70	35.00	92.30	6.70 – 171	

Pozorovali jsme statisticky významný pokles koncentrace pepsinogenu-I ve skupině pacientů s nádorem žaludku ve srovnání se skupinou zdravých osob (medián 898 g/l, $p < 0.0204$ oproti 1353 $\mu\text{g/l}$). Pozorovali jsme statisticky významné zvýšení následujících biomarkerů ve skupině pacientů s nádorem žaludku ve srovnání se skupinou zdravých osob: gastrin (medián 12.22 pmol/l, $p < 0.4051$ oproti 8.56 pmol/l) a Helicobacter pylori IgG (medián 45.44 U/ml, $p < 0.0223$ oproti 17.20 u/ml). Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné změny v hladinách pepsinogenu-II.

Multivariační regresní analýza pak vybrala následující biomarkery jako nejlepší prediktory rizika karcinomu žaludku: CEA, CA72-4, pepsinogen-I, Helicobacter pylori, MMP-7. Návrh algoritmu pro výpočet rizika karcinomu žaludku je následující:

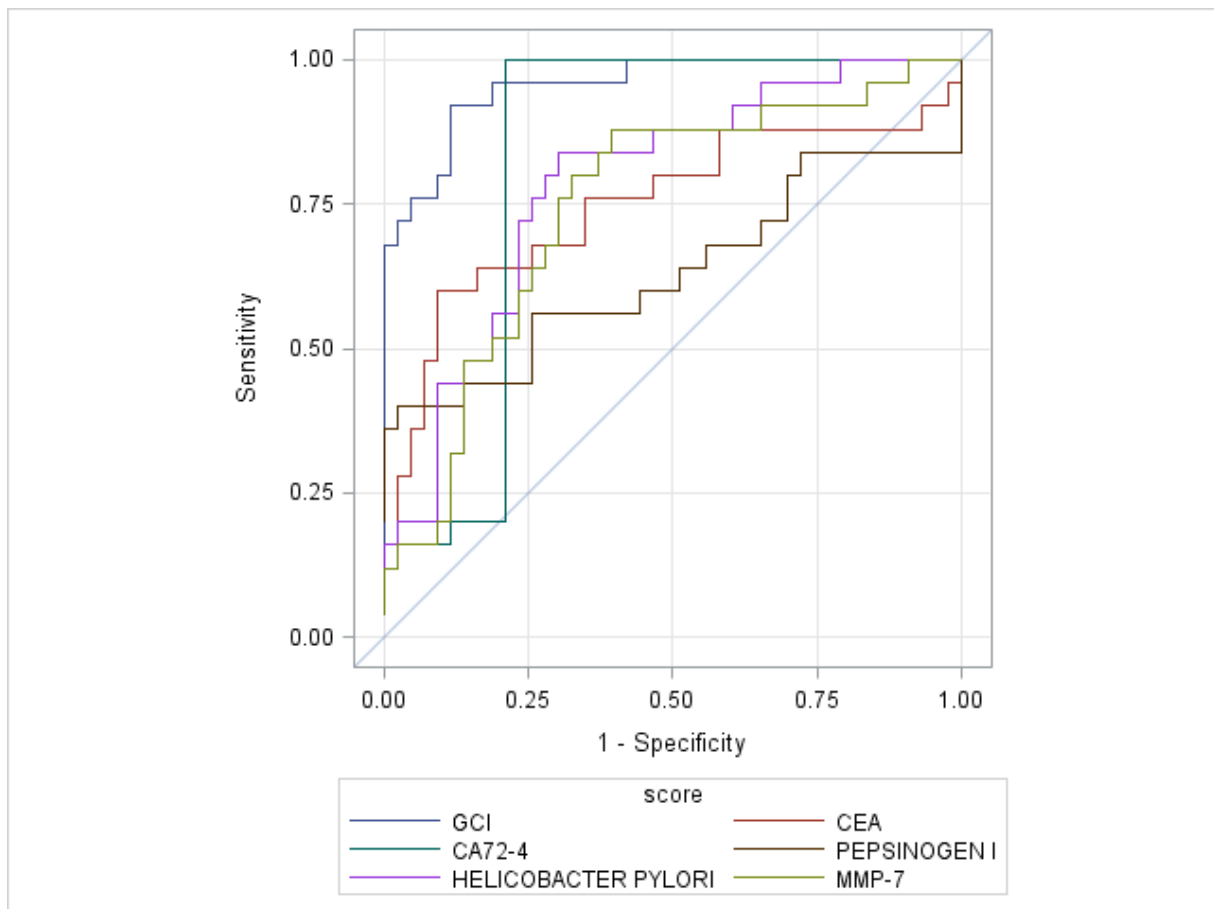
$$\text{GCI} = \text{CEA} * 0.6315 + 0.9344 * \text{CA72-4} - \text{Pepsinogen-I} * 0.00217 + \text{Helicobacter pylori} * 0.0362 + \text{MMP-7} * 0.00180.$$

Dále byly spočítány tvary ROC křivek a vypočítány AUC pro jednotlivé parametry. Nejlepší ROC křivku a nejvyšší AUC (0.9553) měl jednoznačně vypočítaný parametr GCI. (Tabulka 14, Graf 3)

Tabulka 14. Hodnoty AUC CEA, CA 72-4, pepsinogen I, Helicobacter pylori, MMP-7 a GCI

Analyt (unit)	CEA ($\mu\text{g/l}$)	CA 72-4 (kIU/l)	Pepsinogen I ($\mu\text{g/l}$)	Helicobacter pylori (U/ml)	MMP-7 (pg/ml)	GCI (---)
AUC	0.6789	0.7758	0.6484	0.7851	0.7285	0.9553

Graf 3 ROC křivky CEA, CA 72-4, pepsinogen-I, Helicobacter pylori, MMP-7 a GCI



Navzdory mírně klesajícímu počtu případů je karcinom žaludku stále závažné onemocnění se špatnou prognózou [Ferlay, 2012]. Pouze včasná diagnóza dává šanci na úspěšnou léčbu. Předpokladem pro úspěšnou léčbu je provedení radikální operace. Dlouhodobá pozorování ukazují, že pouze 25% pacientů s diagnózou karcinomu žaludku je indikováno k radikální operaci. Nízký počet pacientů, kteří podstupují radikální operaci, je výsledkem záchytu v pokročilém stadiu onemocnění [Smid, 2015].

Nádorové markery CEA, CA19-9 a CA72-4 jsou po dlouhou dobu využívány v rutinní praxi pro diagnostiku karcinomu žaludku [Kim, 2014]. Nicméně, jejich schopnost včasného záchytu tohoto nádorového onemocnění je omezena vzhledem k jejich nedostatečné citlivosti [Yang, 2014]. V této pilotní studii jsme se rozhodli otestovat možnosti využití nových biomarkerů v detekci karcinomu žaludku nebo jejich schopnosti zlepšit senzitivitu výše uvedených nádorových markerů, pokud by se s nimi používaly v kombinaci.

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou zinek-dependentní endopeptidázy, které degradují extracelulární matrix a složky buněčné membrány. Jejich aktivita hraje klíčovou roli v růstu nádoru, jeho invazivitě a metastazování [Gialeli, 2011]. Testovali jsme celý panel MMP, která je v současné době k dispozici jako komerční panel Bio-Plex. Z hodnocení panelu metaloproteináz vyplynulo, že změny MMP-1, MMP-7 a MMP-9 byly statisticky významné. AUC MMP-7 byla jedním z nejvyšších AUC v panelu vybraných biomarkerů a MMP-7 byl vybrán jako jeden z nejlepších prediktorů karcinomu žaludku podle našeho matematického modelu.

OPG a OPN jsou známé díky jejich roli v kostním metabolismu [Albu, 2013]. OPG souvisí především s projevem kostních metastáz určitých druhů zhoubných nádorů včetně karcinomu žaludku [D'Amico, 2013]. Některé studie uvádějí zvýšené hladiny OPN jako negativní prognostický faktor karcinomu žaludku [Chen, 2014]. V naší skupině pacientů byl OPN statisticky významně vyšší ve skupině pacientů s karcinomem žaludku ve srovnání se skupinou zdravých jedinců. To je v souladu se zjištěními ostatních autorů.

PIVKA-II je biomarker, který byl poprvé popsán jako biomarker hepatocelulárního karcinomu [Fujiyama, 1988]. Odborná literatura zmiňuje též produkci PIVKA-II karcinomem žaludku [Takahashi, 2010]. Produkci PIVKA-II karcinomem žaludku potvrzují též pozitivní nálezy v naší skupině pacientů.

Dále jsme sledovali biomarkery, které jsou popsány jako rizikové faktory vředové choroby žaludku a potažmo též karcinomu žaludku [Charvat, 2015]. Potvrdili jsme významnou úlohu pepsinogenu-I, gastrinu a *Helicobacter pylori*, jako rizikových faktorů vzniku karcinomu žaludku. Pepsinogen-I a *Helicobacter pylori* IgG byly také vybrány jako prediktory karcinomu žaludku naším matematickým modelem.

V současné době můžeme říci, že snaha o nalezení nových biomarkerů pro včasnou diagnostiku karcinomu žaludku není tak úspěšná, jak by bylo žádoucí. Naše pilotní studie tuto skutečnost potvrzuje. Nejlepších výsledků (podle p-value, ROC a AUC) bylo dosaženo u tradičních nádorových markerů CA72-4 a CEA. Pro některé onkologické diagnózy jsou v současné době navrhovány matematické modely hodnocení výsledků biomarkerů, ve snaze zvýšit efektivitu diagnostického procesu. Tento způsob se ukázal jako velmi účinný při diagnóze karcinomu prostaty v podobě indexu zdravé prostaty (Prostate Health Index – PHI) [Tosoian, 2012]. Podobně zajímavý se pro praxi jeví algoritmus pro výpočet rizika ovariálních malignit (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm – ROMA) [Moore, 2011]. Rozhodli jsme se

proto použít nový přístup k hledání nástroje, který by mohl být použit pro včasnou diagnózu karcinomu žaludku. S použitím multivariační analýzy jsme vybrali pět biomarkerů jejichž výsledky se zdají být pro diagnostiku karcinomu žaludku nejefektivnější. Výsledkem našeho přístupu je matematický model pro výpočet rizika karcinomu žaludku, který jsme nazvali Gastric Cancer Index – GCI. Při použití GCI jsme dosáhli nejlepší ROC křivky a nejvyšší AUC. V následné studii se zaměříme na ověření přínosu jednotlivých parametrů našeho matematického modelu a celkové vylepšení algoritmu pro výpočet indexu GCI.

Závěrem tedy můžeme konstatovat, že nádorové markery CEA a CA 72-4 zůstávají nejlepšími jednotlivými markery pro diagnostiku karcinomu žaludku. Ujistili jsme se, že MMP-1, MMP-7, OPN a PIVKA II jsou slibnými kandidáty na nové biomarkery pro detekci karcinomu žaludku. Potvrdili jsme nižší hladiny pepsinogenu-I, vyšší hladiny gastrinu a přítomnost *Helicobacteru pylori* jako rizikové faktory vzniku karcinomu žaludku. Vytvořili jsme matematický algoritmus pro posouzení rizika karcinomu žaludku v lidské populaci. Je nutné provést další studie a ověřit naše zjištění na větším souboru pacientů.

5.2 Výsledky a hodnocení metastáz kolorektálního karcinomu do jater

Při vyhodnocení druhého souboru pacientů jsme se zaměřili na změny v hladinách nádorových markerů v jednotlivých stadiích a na interpretaci výsledků pacientů bez metastáz a s metastázami. Výsledky získané vyhodnocením celé skupiny 111 pacientů podle jednotlivých stadií jsou uvedeny v Tabulce 15.

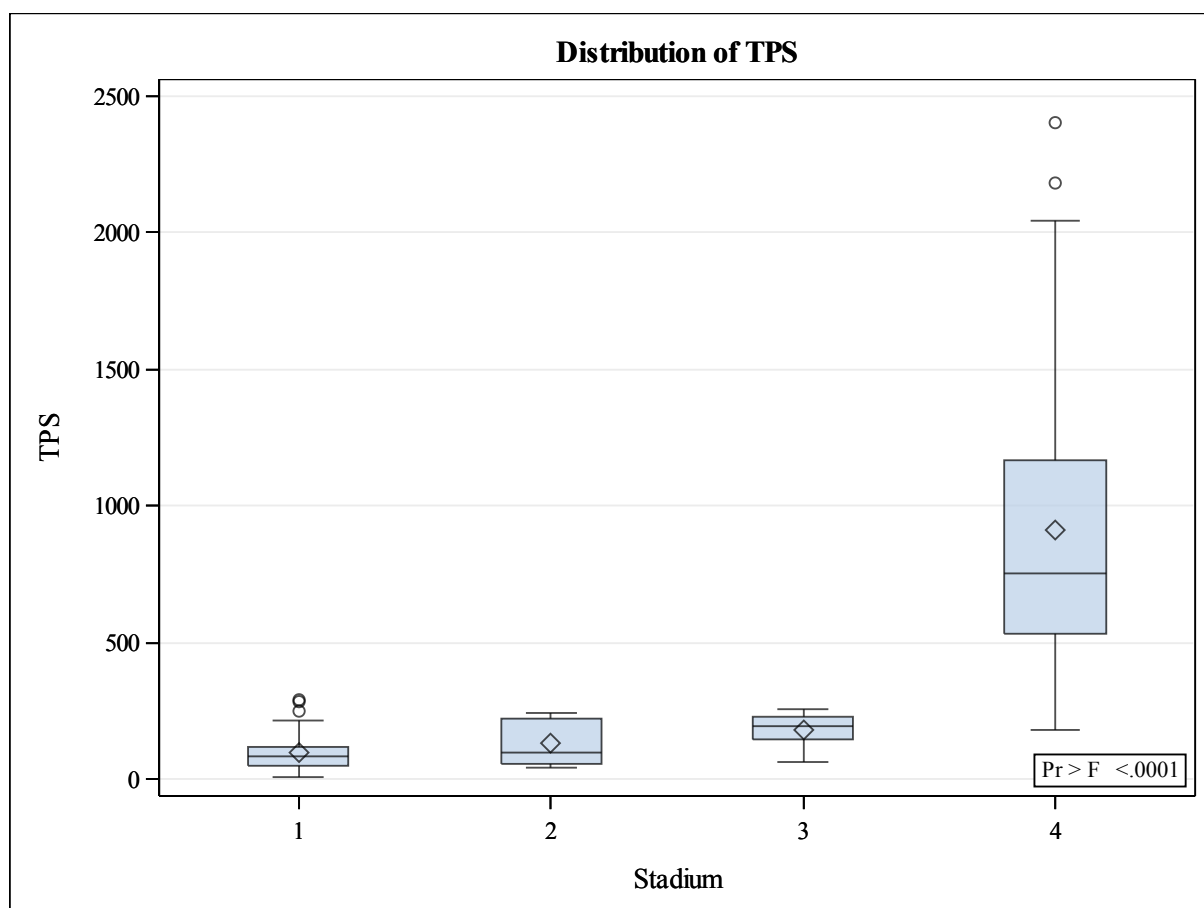
Tabulka 15. Hladiny nádorových markerů TPS, TPA a CEA v jednotlivých stadiích

Stadium	N	Nádorový marker	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Min – Max
I	54	TPS	96.7	81.5	47.0	117.0	10.0 – 293.0
		TPA	51.7	42.0	22.0	73.0	10.0 – 186.0
		CEA	4.6	2.3	1.5	4.7	0.4 – 51.8
II	10	TPS	129.8	97.0	59.0	225.0	41.0 – 242.0
		TPA	101.3	46.5	35.0	186.0	10.0 – 259.0
		CEA	3.5	3.6	2.2	4.3	0.5 – 6.9

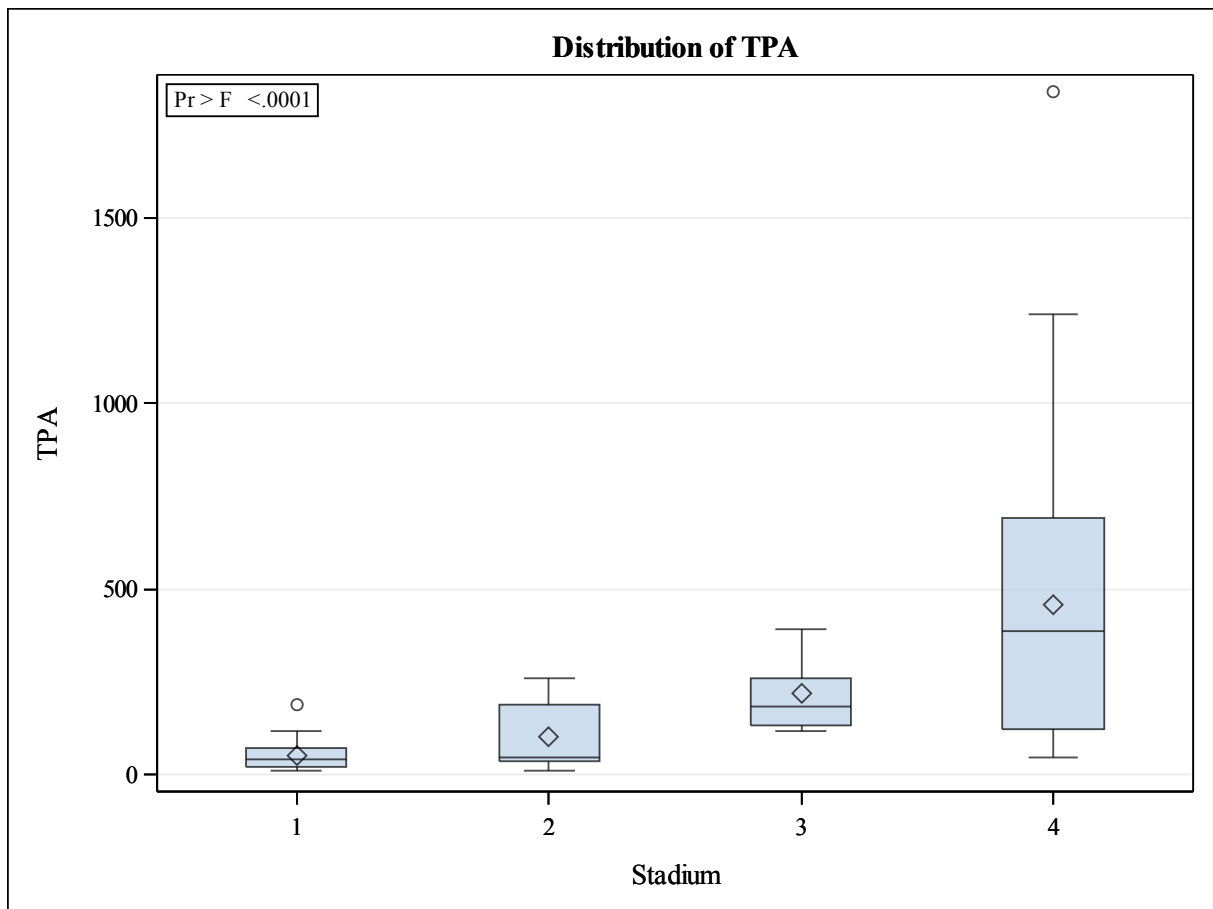
III	7	TPS	178.6	196.0	147.0	230.0	62.0 – 255.0
		TPA	216.6	183.0	132.0	257.0	116.0 – 393.0
		CEA	5.0	1.8	0.7	9.0	0.6 – 14.1
IV	40	TPS	914.2	750.5	532.0	1167	181.0 – 2400
		TPA	456.2	387.5	123.5	698.5	48 – 1838
		CEA	84.5	6.2	2.0	55.0	0.4 – 951.0

Pro lepší představu o rozložení hodnot jsou výsledky nádorových markerů v jednotlivých stadiích zobrazeny v následujících grafech.

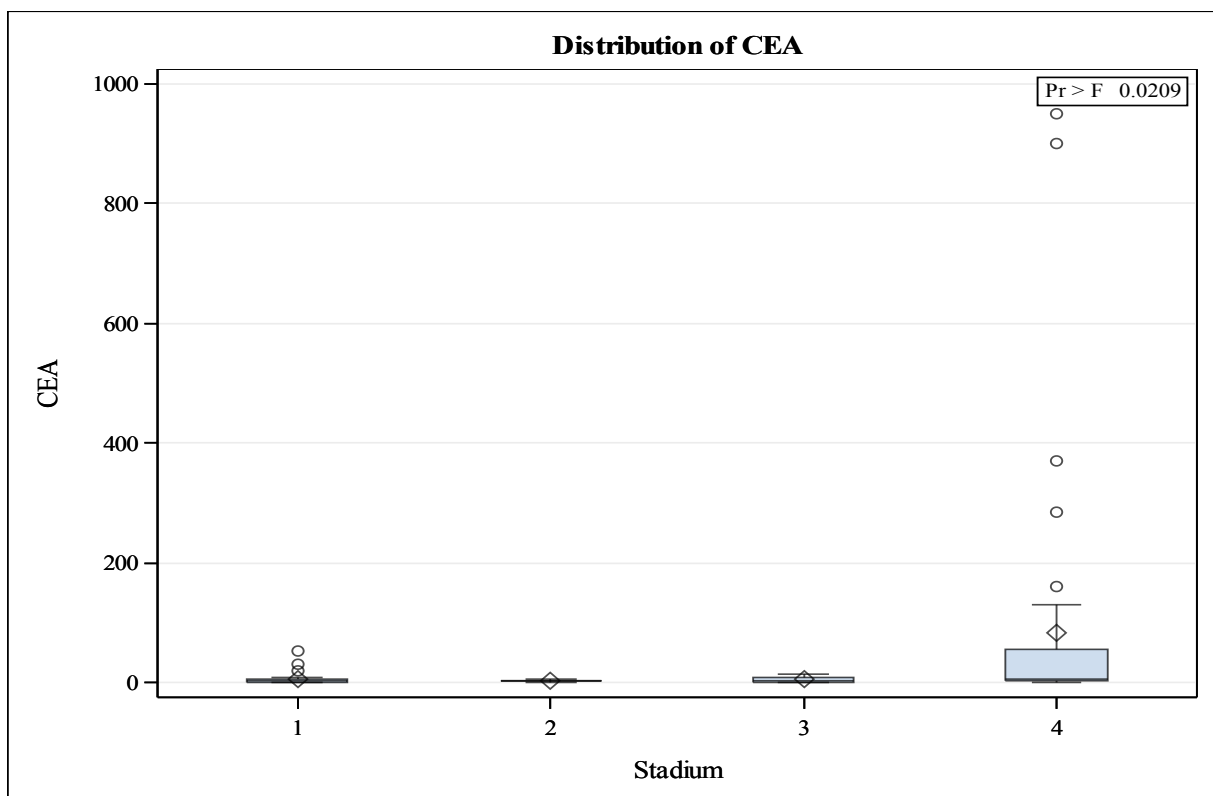
Graf 4. Rozložení hodnot TPS v jednotlivých stadiích



Graf 5. Rozložení hodnot TPA v jednotlivých stadiích



Graf 6. Rozložení hodnot CEA v jednotlivých stadiích



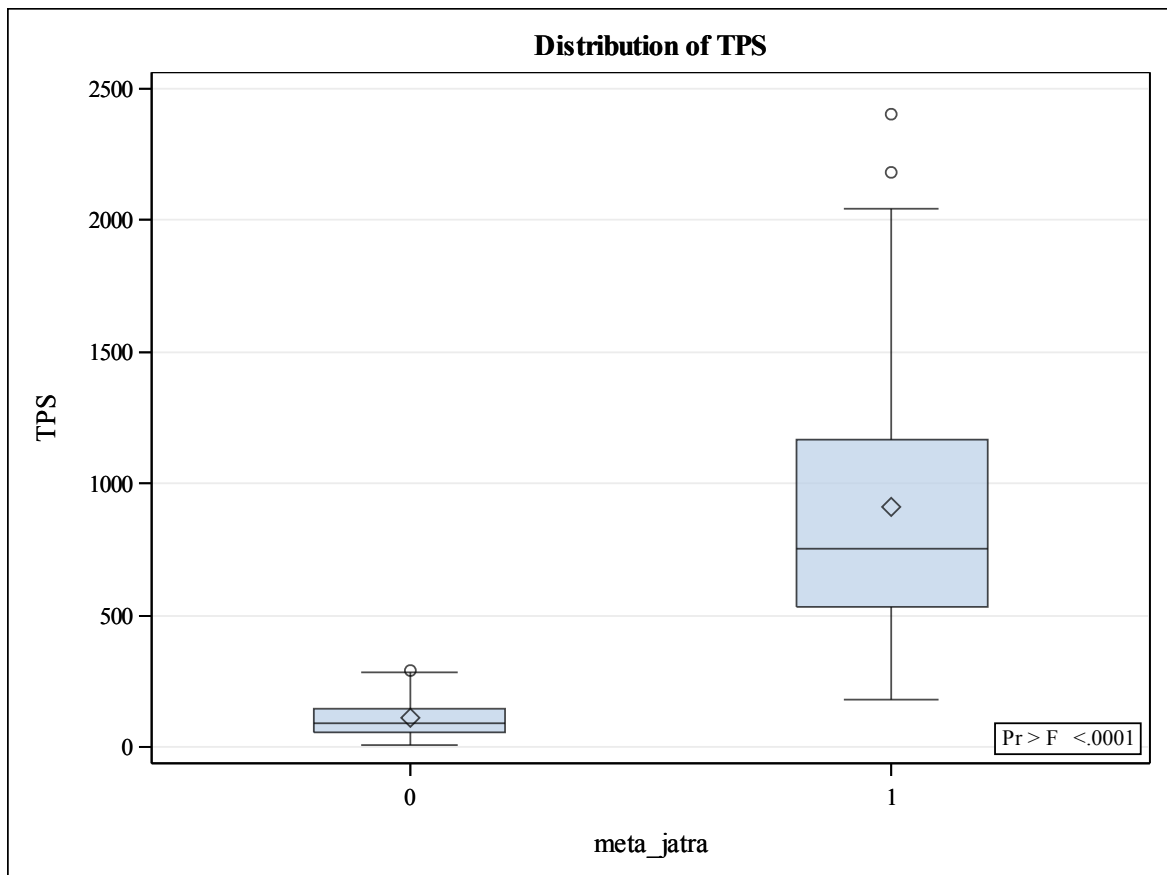
Z uvedených údajů vyplývá, že se zvyšujícím se stádiem onemocnění se většinou zvyšovaly i hladiny sledovaných nádorových markerů. Toto zjištění je sice v souladu s dnes již poměrně vžitou představou o pozitivní korelaci hladin nádorových markerů se závažností klinického stavu, ale v rozhodování o způsobu léčby se dá použít jen velice těžko. Zásadním zvratem a důvodem k rychlému terapeutickému zásahu je zjištění metastáz. Je zdokumentováno, že kolorektální karcinom metastázuje v 80% případů do jater [Dominello, 2014; Ogiso, 2015]. Rozhodli jsme se proto zaměřit na schopnost markerů odlišit stádium s prokázanými metastázami od zbývajících tří stadií. Výsledky tohoto srovnání jsou uvedeny v následující Tabulce 16.

Tabulka 16. Sérové hladiny TPS, TPA a CEA stadium I+II+III vs. stadium IV

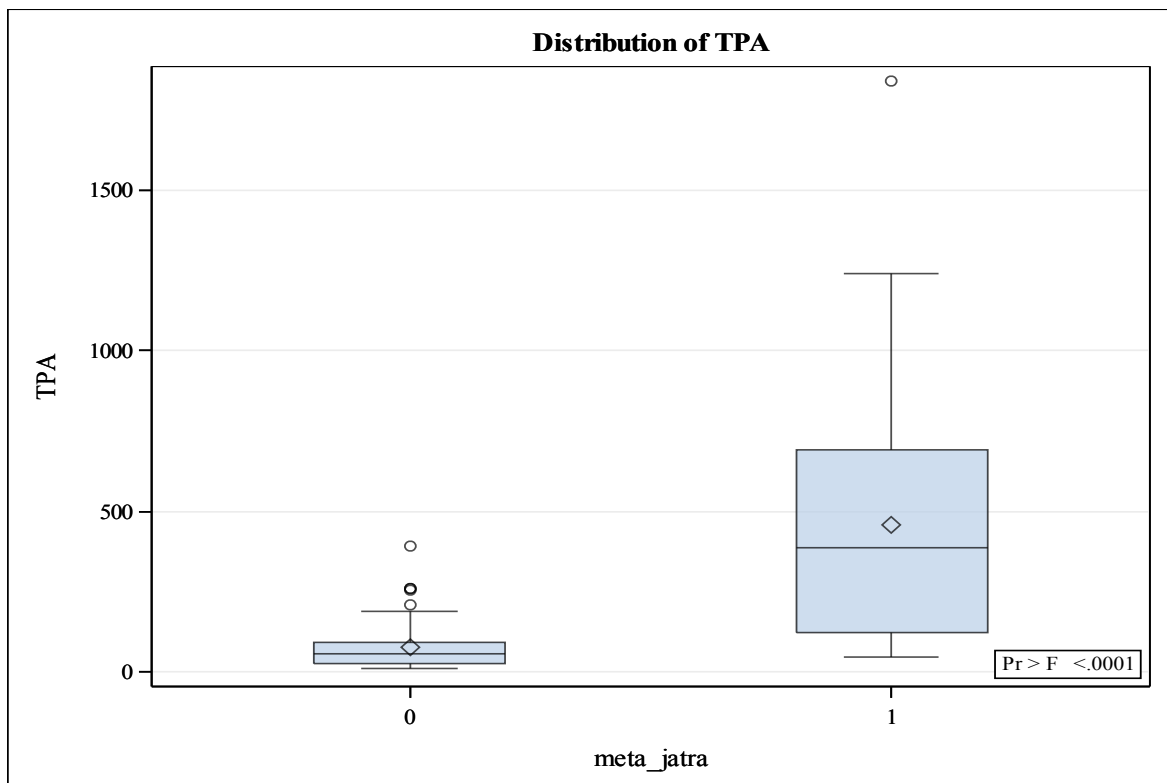
Analyt (unit)	Stadium	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Min – Max	p-value Wilcoxon test
TPS (IU/l)	Stadium I+II+III	109.4	90.0	59.0	149.0	10.0 – 293.0	<0.0001
	Stadium IV	914.2	750.5	532.0	1167	181.0 – 2400	
TPA (IU/l)	Stadium I+II+III	74.9	54.0	24.0	93.0	10.0 – 393.0	<0.0001
	Stadium IV	456.2	387.5	123.5	689.5	48.0 – 1838	
CEA (µg/l)	Stadium I+II+III	4.50	2.50	1.30	5.00	0.40 – 51.8	<0.0011
	Stadium IV	84.5	6.20	2.00	55.0	0.40 – 951.0	

Rozložení hodnot jednotlivých markerů uvádím i v grafické podobě Grafy 7 – 10

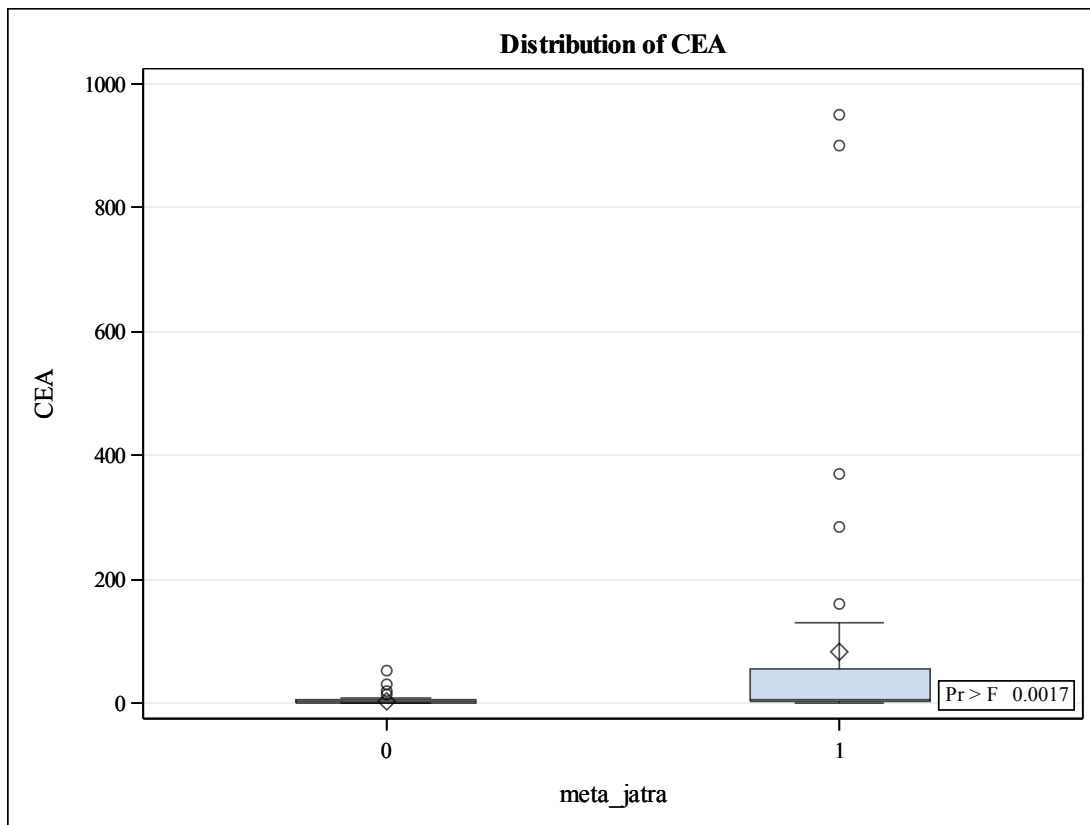
Graf 7. Hodnoty TPS stadium I + II + III vs. stadium IV



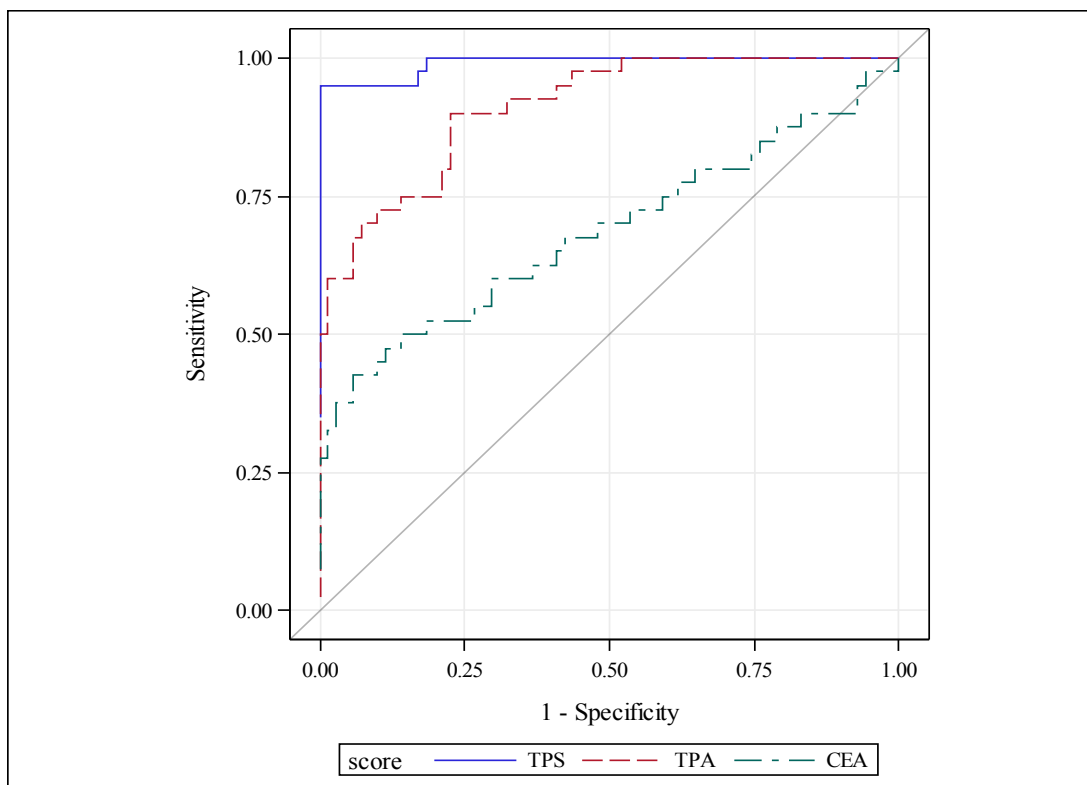
Graf 8. Hodnoty TPA stadium I + II + III vs. stadium IV



Graf 9. Hodnoty CEA stadium I + II + III vs. stadium IV



Graf 10. ROC křivky TPS, TPA a CEA stadium I + II + III vs. stadium IV



O užitečnosti jednotlivých markerů nejlépe vypovídají ROC křivky (Graf 10) a AUC (Tabulka 17). V této tabulce je též spočítaný cut-off pro jednotlivé markery při hodnotě specifity 95%.

Tabulka 17. AUC a cut-off hodnoty TPS, TPA a CEA stadium I + II + III vs. stadium IV

Analyt (jednotky)	AUC	Cut-off	Specifita (%)	Sensitivita (%)
TPS (IU/l)	0.9912	226	90	95.0
TPA (IU/l)	0.9116	184	90	72.5
CEA (µg/l)	0.6903	7.6	90	45.0

Z výše uvedených dat vyplývá, že každý z použitých markerů byl statisticky významně vyšší u stadia IV v porovnání se stadii I + II + III.

Použité nádorové markery jsou zámé již řadu let a jejich pravidelné používání v diagnostice má již více než dvacetiletou tradici. Před dvaceti lety však jejich použití k detekci metastáz nemělo větší klinický význam. Zjištění metastáz, ať již jaterních či jiných, znamenalo v minulosti vždy vážnou komplikaci a výrazné zhoršení prognózy. V současné době je zjištění jaterních metastáz též závažným faktem, nicméně rozvoj nových chirurgických metod a metod systémové léčby nabízí pacientům možnost výrazně delšího přežití se zachováním relativně vysoké kvality života [Kim, 2015]. Základním způsobem léčby je jaterní resekce, nebo je možné použít další chirurgické techniky jako je portální žilní embolizace, chemoembolizace, radioembolizace, tepelná či radiofrekvenční ablace [Treska, 2014].

Závažnost prognózy pacientů s jaterními či jinými metastázami závisí na biologické aktivitě nádoru. Zde se otevírá cesta k použití cytokeratinových nádorových markerů, které mají sice nízkou specifitu, ale jsou úzce spojeny s dělením buněk – jednou ze známek biologické aktivity nádoru [Ahn, 2013]. Při progresi zhoubných nádorů lze pozorovat proteolytické štěpení rozpustných cytokeratinových fragmentů. Tyto fragmenty jsou

uvolňovány do krve, kde mohou být detekovány pomocí in vitro diagnostických testů [Barak, 2007].

CEA je nejběžněji používaným nádorového markerem v séru a řada studií uvádí jeho významné zvýšení u pacientů s jaterními metastázami [Lunachi, 2012; Hara, 2013]. Pokud vycházím z ROC křivek a z AUC, které jsou výsledkem naší studie (Graf 10, Tabulka 17), je zřejmé, že CEA (AUC=0.6903) nedosahuje takové úspěšnosti při detekci metastáz jako oba cytokeratiny – TPS (AUC=0.9912) a TPA (AUC=0.9116). Naše zjištění jsou v souladu se zjištěními dalších autorů, kteří se zabývali stejnou tematikou [Fernandes, 2005; Romero-Ventosa, 2015].

Studie autorů [Vodicka, 2014] uvádí, že rozhodující prognostické faktory celkového přežití u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou počet metastáz a předoperační hodnoty TPS. TPS a TPA byly také popsány jako důležité prognostické markery po jaterní resekci nebo radiofrekvenční ablacii jaterních metastáz kolorektálního karcinomu [Treska, 2009]. I když všechny výše uvedené skutečnosti ukazují, že měření TPS a TPA je nesporným přínosem v diagnostice metastatického procesu, je třeba zmínit, že použití sérových nádorových markerů je omezeno nízkou specificitou. K falešně pozitivním výsledkům by mohly vést následující klinické stavy: jaterní nebo ledvinová nedostatečnost, zánětlivé stavy [Fletcher, 2002]. Sérová hladina cytokeratinů může být také velmi zvýšena v důsledku destrukce nádorových buněk v průběhu úspěšné onkologické léčby [de Haas, 2008]. Další důležitou podmínkou při monitorování pacientů pomocí cytokeratinových markerů, jakož i nádorových markerů obecně, je systematické sledování dynamiky změn sérových hladin. Dynamika změn je mnohdy větším přínosem pro kliniku v jeho rozhodování než absolutní hodnota nádorového markeru [Duffy, 2014]. Všechny tyto skutečnosti je třeba vzít v úvahu při interpretaci výsledků, abychom se vyvarovali nesprávných závěrů.

Jak tedy v našem případě hodnotit naměřené výsledky? Je možné použít referenční meze, které se používají v rutinní praxi? To byly otázky, které jsme si kladli před vyhodnocením výsledků. Z tohoto důvodu byl součástí vyhodnocení též výpočet a návrh cut-off pro použité nádorové markery. V Tabulce 17 výše uvádím hodnoty cut-off při hodnotě specificity nastavené na 90%. Senzitivity pak klesají od TPS k CEA. Všechny hodnoty cut-off jsou vyšší, než používáme v rutinní praxi pro odlišení maligního nádoru od ostatních onemocnění. Zde si však musíme uvědomit, že cut-off by měl sloužit pro oddělení pacientů s nádory bez metastáz (stadia I, II a III) od pacientů s metastázami (stadium IV). Pohybujeme

se tedy ve skupinách pacientů, kteří by měli mít hodnoty sledovaných nádorových markerů tak jako tak nad hranicí referenčních hodnot. Navržené cut-off hodnoty tak jen odrážejí tento fakt.

Pokud tedy vezmeme za prokázané, že TPS a TPA jsou přínosem pro diagnostiku metastáz kolorektálního karcinomu, je možné si dále položit otázku, zda jsou cytokeratiny nebo také CEA schopné odlišit čistě jaterní metastázy od souběžného výskytu metastáz i v jiných lokacích. Výsledek porovnání uvádí Tabulka 18.

Tabulka 18. Sérové hladiny TPS, TPA a CEA metastázy játra vs. metastázy játra a jiné lokace

Analyt (unit)	Stadium	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Min – Max	p-value Wilcoxon test
TPS (IU/l)	meta pouze v játrech	930.1	861.0	517.0	1178.0	181.0 – 2400	0.7236
	meta játra + jiné lokace	859.3	720.0	606.0	987.0	426.0 – 1944	
TPA (IU/l)	meta pouze v játrech	477.0	362.0	110.0	763.0	110.0 – 1838.0	0.6760
	meta játra + jiné lokace	384.2	413.0	254.0	462.0	48.0 – 851.0	
CEA (µg/l)	meta pouze v játrech	76.3	7.10	2.10	56.9	0.50 – 951.0	0.3533
	meta játra + jiné lokace	112.8	4.00	0.90	9.20	0.40 – 900.0	

Pokud porovnáme soubor pacientů, u kterých se metastázy vyskytovaly pouze v játrech, se souborem pacientů s metastázami i v jiných lokacích, vidíme, že průměry a mediány všech tří nádorových markerů se liší. Dle Wilcoxonova testu však vidíme, že nikoliv statisticky významně. I když soubor vícečetných metastáz čítal pouze 9 pacientů, z výsledků

je patrné, že není předpoklad, že by cytokeratinové markery nebo CEA dokázaly odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

V klinické praxi je velmi často používána kombinace nádorových markerů. Většinou se používá kombinace nádorového markeru souvisejícího s hmotou nádoru, jako je například CEA, s nádorovým markerem vypovídajícím o rychlosti růstu nádoru a jeho agresivitě, jako jsou například cytokeratiny. Cytokeratiny trpí nižší specificitou, protože nám signalizují dělení buněk v organismu, a to nejen nádorových. Po vyloučení těchto vlivů (zánětlivé stavy, jaterní nebo ledvinová nedostatečnost, metody léčby vedoucí k destrukci a rozpadu buněk) je možné použít jimi poskytovanou diagnostickou informaci jako doplněk k informaci poskytované nádorovými markery spojenými s hmotou nádoru. Pokud chceme odlišit pacienty bez metastáz od pacientů s metastázami, jsou cytokeratiny velmi vhodnou volbou. Pro konkrétní demonstraci tohoto faktu uvádíme v Tabulkách 19 – 23 níže detailní rozbor falešně negativních a falešně pozitivních pacientů při použití jednotlivých nádorových markerů (CEA, TPS a TPA) a jejich kombinací (CEA + TPA, CEA + TPS).

Pro vyhodnocení jednotlivých nádorových markerů byl použit cut-off s nastavenou specificitou 90%. Pro vyhodnocení kombinací nádorových markerů (Tabulky 22,23), byl ponechán stejný cut-off jako v tabulkách pro vyhodnocení jednotlivých markerů.

U CEA je největším problémem nízká senzitivita (45%), kdy 22 pacientů by bylo hodnoceno jako bez metastáz, ale ve skutečnosti byly metastázy přítomny (Tabulka 19). Výrazně lepších hodnot bylo dosaženo při použití TPA, kdy 11 pacientů by bylo hodnoceno jako falešně negativní na přítomnost metastáz (Tabulka 20). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití TPS, kdy pouze 2 pacienti se jeví z hlediska přítomnosti metastáz jako falešně negativní (Tabulka 21). Při nastavené specificitě 90% je ve všech třech případech vyhodnoceno 7 pacientů jako falešně pozitivních.

Tabulka 19. Rozdělení pacientů na základě hodnocení podle hladiny CEA

CEA (µg/l)	Stadium I+II+III	Stadium IV	Total
<7.6	64	22	86
>=7.6	7	18	25
Total	71	40	111

Tabulka 20. Rozdělení pacientů na základě hodnocení podle hladiny TPA

TPA (IU/l)	Stadium I+II+III	Stadium IV	Total
<7.6	64	11	75
>=7.6	7	29	36
Total	71	40	111

Tabulka 21. Rozdělení pacientů na základě hodnocení podle hladiny TPS

TPS (IU/l)	Stadium I+II+III	Stadium IV	Total
<226	64	2	66
>=226	7	38	45
Total	71	40	111

Při použití kombinací nádorových markerů a zachování vypočítaných cut-off je zařazení cytokeratinového markeru, ať již TPA nebo TPS, jednoznačným přínosem. Specificita kombinovaného testu se sice mírně sníží (82%), což znamená, že u obou dvojkombinací nádorových markerů bude vyhodnoceno 13 pacientů jako falešně pozitivní, ale v případě kombinace CEA + TPA (Tabulka 22) bude vyhodnoceno jako falešně negativních 9 pacientů (senzitivita 78%) oproti 22 pacientům (senzitivita 45%), pokud bychom použili pouze CEA samotné. Pokud použijeme kombinaci CEA + TPS (Tabulka 23) pouze 1 pacient bude hodnocen jako falešně negativní, což znamená senzitivitu 98%.

Tabulka 22. Rozdělení pacientů na základě kombinace CEA a TPA

Status	Stadium I+II+III	Stadium IV	Total
negativní	58	9	67
pozitivní	13	31	44

Total	71	40	111
--------------	----	----	-----

Tabulka 23. Rozdělení pacientů na základě kombinace CEA a TPS

Status	Stadium I+II+III	Stadium IV	Total
negativní	58	1	59
pozitivní	13	39	52
Total	71	40	111

Závěrem je možné konstatovat, že sérové hladiny TPS a TPA je možné doporučit jako užitečné diagnostické nástroje pro detekci jaterních metastáz u kolorektálního karcinomu. Cytokeratinové nádorové markery mohou ve většině případů, dříve než často používaný CEA, upozornit na možnou přítomnost metastázy a urychlit tak radikální léčebné řešení. Tento přístup může výrazně zvýšit efektivitu detekce metastatického procesu a umožnit delší přežití pacientů.

Pokud bychom měli volit v diagnostickém použití mezi TPA a TPS, je vhodnější v případě metastáz kolorektálního karcinomu TPS.

Cytokeratinové markery nedokáží odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

5.3 Výsledky a hodnocení pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu

Úloha FGF23 v mechanismu onkogeneze není příliš jasná. V literatuře lze dohledat dobře zdokumentované případy nádorem indukované osteomalácie, kdy v důsledku nadprodukce FGF23 způsobené genetickou mutací v neoplastické tkáni je možné naměřit vysoké plazmatické hladiny FGF23 [Leaf, 2013]. Protože místem účinku FGF23 jsou ledviny, kde v proximálním tubulu zvyšuje exkreci fosfátů, osteomalácie je pak logickým důsledkem delší dobu neřešené nadprodukce FGF23 [Han, 2016]. FGF23 je též inhibítoem 1-alpha-hydroxylázy, která katalyzuje přeměnu zásobní formy vitamínu D (kalcidiolu) na jeho aktivní

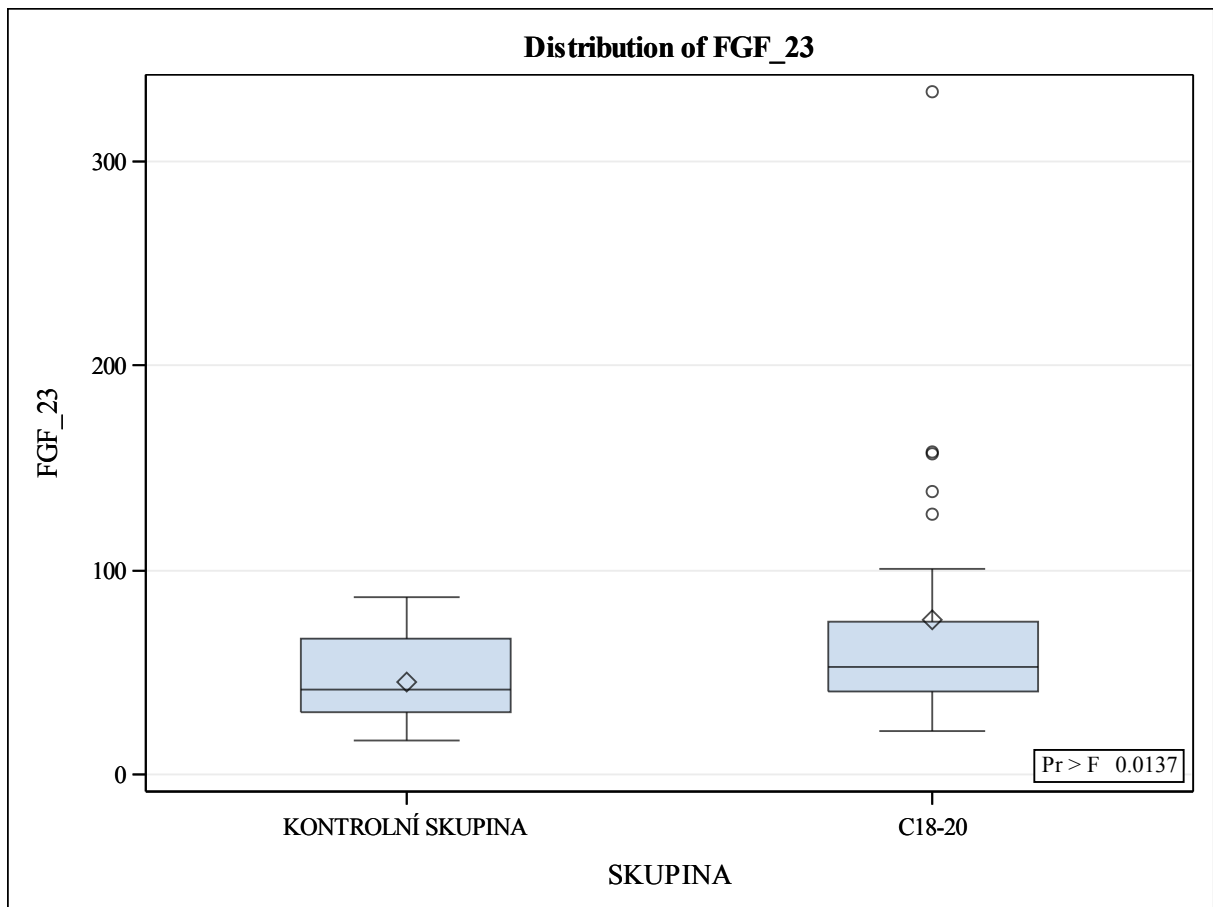
formu (calcitriol). Některé práce se zabývají vztahem hladin FGF23 a vitamínu D v možné účasti FGF23 v procesu onkogeneogeneze. Závěry zatím naznačují, že zvýšené hladiny FGF23 mohou být zapojeny do procesu vývoje kolorektálních neoplázií nezávisle na hladinách vitamínu D [Jacobs, 2011]. Poslední zveřejněné informace z tohoto roku prokazují zapojení FGF23 do procesu angiogeneze. Aktivita glykolytického enzymu hexokinázy 2 (HK2) je kontrolována pomocí signalizace FGF, která je přenášena přes FGF receptor. Pokles hladin HK2 v nepřítomnosti signalizačních vstupů na FGF receptor vede ke snížení glykolýzy, což vede k narušení proliferace a migrace endoteliálních buněk. Zvýšená stimulace FGF receptoru naopak proliferaci a migraci buněk endotelu podporuje [Yu, 2017]. Tento mechanismus byl zatím prokázán na zvířecím modelu.

Nás tedy zajímalo, zda je možné vysledovat rozdíly v hladinách FGF23 u náhodně vybraných pacientů s kolorektálním karcinomem v různých stádiích a vzorkem zdravé populace, zatím nezávisle na jakýchkoliv dalších biomarkerech. Obdobně koncipovanou studii není možné zatím dohledat v žádné dostupné literatuře. Porovnání hladin FGF23 u skupiny zdravých osob a u pacientů s kolorektálním karcinomem uvádí Tabulka 24 a Graf 11.

Tabulka 24. FGF23 u zdravých osob vs. pacienti s kolorektálním karcinomem

Analyt (unit)	Stadium	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Min – Max	p-value Wilcoxon est
FGF23 (pgU/l)	zdraví	45.0	41.7	30.1	74.9	16.9 – 87.0	0.0097
	kolorektální karcinom	75.9	52.3	40.4	66.4	20.9 – 334	

Graf 11. FGF23 u zdravých osob vs. pacienti s kolorektálním karcinomem



Hodnoty FGF23 u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou statisticky významně vyšší než hodnoty naměřené u zdravé populace. Podle minimo-maximálních hodnot je však patrné, že FGF23 nebude použitelné jako marker záchytu v časných stádiích, když hodnoty u zdravé populace se pohybují mezi 16.9 – 87.0 ng/ml a hodnoty kolorektálního karcinomu začínají na 20.9 ng/ml.

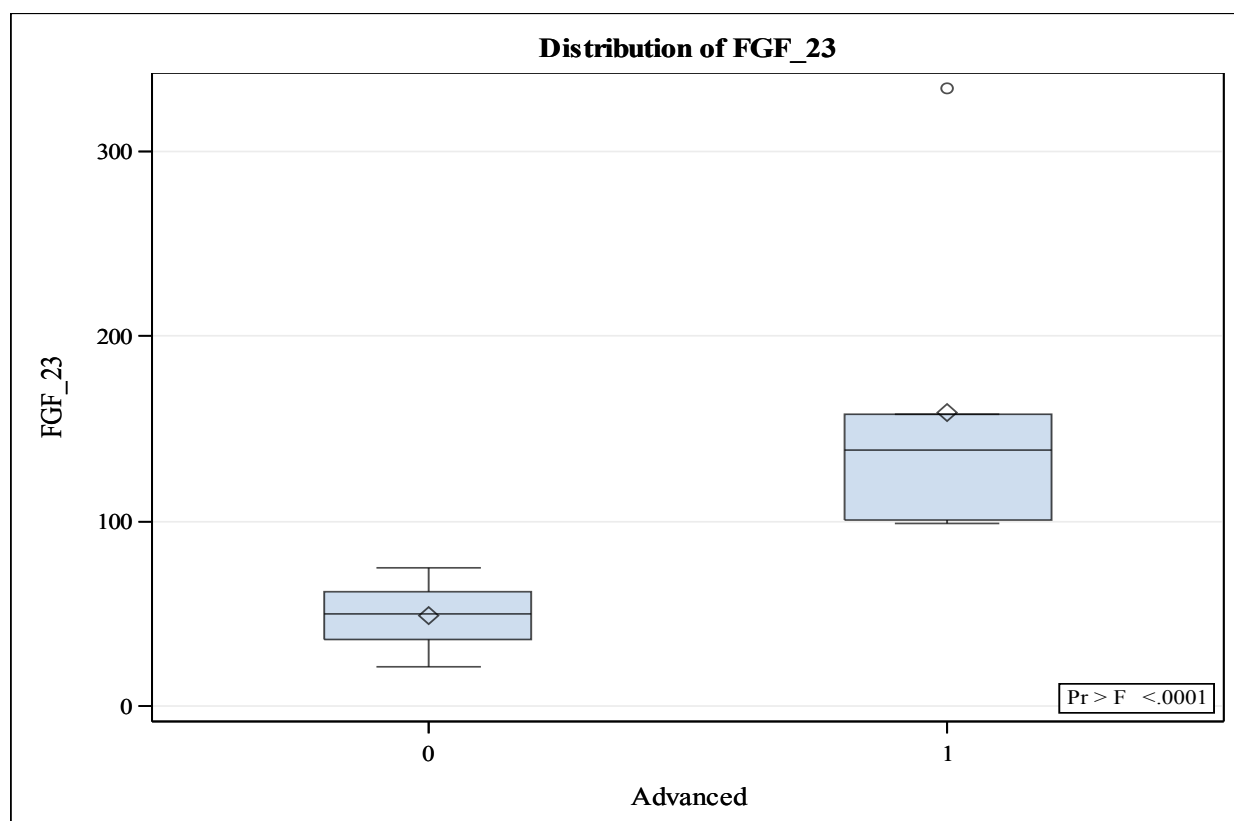
V druhém kroku jsme chtěli zjistit, zda by nebylo možné použít FGF23 jako marker záchytu metastáz. Oddělili jsme proto skupinu se stadiem I, II a III a porovnali ji s hodnotami FGF23 pouze ve stadiu IV, kde byly dosažené hodnoty FGF23 nejvyšší. Výsledek porovnání uvádí Tabulka 25 a Graf 12. Toto srovnání je na první pohled velmi optimistické, protože pokud se podíváme na minimomaximální hodnoty tak zjistíme, že se hodnoty FGF23 u těchto dvou skupin vůbec nepřekrývají, což demonstruje i Graf 12. Takto by měl fungovat ideální biomarker. Na tomto místě je však nutné poznamenat, že jsme porovnávali velmi malý počet pacientů. Ve skupině stadia I, II, a III bylo celkem 22 pacientů a ve skupině stadia IV celkem 8 pacientů.

Námi získané výsledky jsou zajímavá, ale je potřeba pokračovat ve sběru dat a ověřit získané hodnoty na větším souboru pacientů. Z důvodu malého počtu pacientů jsme též neprováděli dynamiku změn FGF23 mezi jednotlivými stadii. Dále je nutné uvést, že do naší pilotní studie jsme pečlivě vybírali pacienty bez údajů o zjištěné osteoporóze v anamnéze či podávání vitamínu D. Chtěli jsme se tím vyhnout možnému ovlivnění výsledků. Dále jsme dbali na to, aby všichni pacienti měli normální ledvinné funkce. Ověření vlivu renální insuficience na hladiny FGF23 uvádím níže.

Tabulka 25. FGF23 u stadia I, II, a III vs. stadium IV

Analyt (unit)	Stadium	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Min – Max	p-value Wilcoxon test
FGF23 (pgU/l)	Stadium I, II, III	49.4	50.0	36.1	62.1	20.9 – 74.88	0.0006
	Stadium IV	159.2	138.9	100.4	158.0	99.05 – 334	

Graf 12. FGF23 u stadia I, II, a III vs. stadium IV



Místem účinku FGF23 jsou ledviny, kde FGF23 snižuje aktivitu sodno-fosfátové pumpy. V literatuře se uvádí vysoké zvýšení FGF23 u dialyzovaných pacientů. Protože jsme do této doby neměli žádné vlastní klinické zkušenosti s FGF23, rozhodli jsme se stanovit plazmatické hladiny FGF23 u několika pacientů s renální insuficiencí a u dialyzovaných pacientů. Výsledky uvádí Tabulka 26.

Tabulka 26. FGF23 u renální insuficience a dialyzovaných pacientů

Stav	FGF23 (pg/ml)
Renální insuficience	367
Renální insuficience	387
Renální insuficience	690
Hemodialýza	1587
Hemodialýza	>5000

Plazmatická hladina FGF23 u všech těchto pacientů překonala hladiny FGF23 u generalizovaných kolorektálních karcinomů. Ke správnému hodnocení vysokých hladin FGF23 je tedy vždy nutné mít informaci o funkčním stavu ledvin.

Závěrem je tedy možné uvést, že plazmatická hladina FGF23 je statisticky významně vyšší u metastatických forem kolorektálního karcinomu. Klinickou využitelnost této informace je nutné ověřit na větším souboru pacientů.

6 Závěry pro klinickou praxi

Závěry disertační práce jsem rozdělil podle řešených problematik.

Závěry plynoucí z vyhodnocení souboru pacientů s karcinomem žaludku:

- Multivariační regresní analýzou byl navržen algoritmus pro výpočet rizika karcinomu žaludku ve tvaru: $GCI = CEA * 0.6315 + 0.9344 * CA72-4 - Pepsinogen-I * 0.00217 + Helicobacter pylori * 0.0362 + MMP-7 * 0.00180$.
- Hodnoty AUC pro navržený GCI jsou jednoznačně vyšší (0.9553) než nejvyšší hodnota dosažená jednotlivým biomarkerem použitým v navrhovaném algoritmu, což byl CA 72-4 s hodnotou AUC=0.7758.

- Pokud bychom nepoužili k hodnocení souboru pacientů GCI, tak CA 72-4 stále zůstává nejlepším jednotlivým nádorovým markerem pro diagnostiku karcinomu žaludku.
- Snížená hladina pepsinogenu-I, vyšší hladina gastrinu a přítomnost *Helicobacteru pylori* jsou rizikové faktory vzniku karcinomu žaludku.
- Algoritmus pro výpočet rizika karcinomu žaludku GCI je potřeba ověřit na větším souboru pacientů.

Závěry plynoucí z vyhodnocení souboru pacientů s metastázami kolorektálního karcinomu:

- Cytokeratinové nádorové markery TPA a TPS je možné doporučit pro použití v diagnostice jaterních metastáz kolorektálního karcinomu
- Pokud bychom měli volit v diagnostickém použití mezi TPA a TPS, je vhodnější v případě metastáz kolorektálního karcinomu TPS.
- TPA a zejména pak TPS mohou ve většině případů dříve, než často používaný CEA upozornit na možnou přítomnost metastázy a urychlit tak radikální léčebné řešení.
- Pokud zvolíme kombinovaný test CEA + cytokeratin, je vždy dosaženo lepších senzitivit než při použití samotného CEA.
- Nejvyšší senzitivity při detekci jaterních metastáz, téměř 100%, je dosaženo při použití kombinace CEA a TPS. Pokud zvolíme cut-off, který byl vypočten pro jednotlivé testy samostatně, je nutné počítat se specificitou na úrovni 80%.
- Cytokeratinové markery, stejně jako CEA, nedokáží odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

Závěry plynoucí z pilotní studie využití FGF23 v diagnostice kolorektálního karcinomu:

- Hodnoty FGF23 u kolorektálního karcinomu se statisticky významně liší od zdravé populace.
- Výrazně zvýšené hodnoty je možné nalézt u metastatických forem onemocnění.
- Využitelnost FGF23 k časnému zachytu metastáz bude nutné ověřit na větší skupině pacientů.

7 Perspektivy

Ze závěrů pro praxi vyplývá, že stále nalézáme nové možnosti využití biomarkerů v klinické praxi. Před zavedením metodik do rutinní praxe je nutné ověřit stávající poznatky na širších souborech pacientů.

8 Literatura

Adam R, Frilling A, Elias D, Laurent C, Ramos E, Capussotti L, et al. Liver resection of colorectal metastases in elderly patients. *Br J Surg* 2010;97:366–76.

Adam R, de Gramont A, Figueras J, et al. Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: A Multidisci-disciplinarny international consensus. *Cancer Treatment Reviews* 2015;41:729–741.

Ahn SK, Moon HG, Ko E, et al. Preoperative serum tissue polypeptide-specific antigen is a valuable prognostic marker in breast cancer. *Int J Cancer*. 2013 Feb 15;132(4):875-81.

Ajani JA, Rodriguez W, Bodoky G, et al. Multicenter Phase III Comparison of Cisplatin/S-1 With Cisplatin/Infusional Fluorouracil in Advanced Gastric or Gastroesophageal Adenocarcinoma Study: The FLAGS Trial. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 20;28(9):1547-53.

Al-Batran SE, Hartmann JT, Hofheinz R, et al. Biweekly fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel (FLOT) for patients with metastatic adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction: a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *Ann Oncol*. 2008 Nov;19(11):1882-7.

Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol* 2005;23:9243-9249.

Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med* 2014;12:168.

Albu A, Fodor D, Bondor C, Crăciun AM. Bone metabolism regulators and arterial stiffness in postmenopausal women. *Maturitas* 2013;76(2):146-150.

Allegra CJ, Jessup JM, Somer eld MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2091-6.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-34.

Ambrosino G, Polistina F, Costantin G, et al. Image-guided robotic stereotactic radiosurgery for unresectable liver metastases: preliminary results. *Anticancer Res* 2009; 29: 3381–3384.

Amieva M, Peek RM. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*. 2016;150(1):64–78.

Andre T, Louvet C, Maindrault-Goebel F, et al. CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. *GERCOR. Eur J Cancer* 1999;35:1343-1347.

Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343-2351.

Andre T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;27:3109- 3116.

Andre T, de Gramont A, Vernerey D, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10- year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol* 2015;33:4176-4187.

Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J.* 2014;55(12): 621–628.

Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 2007;120:3327-35.

Ashozawa N, et al. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J. Clin. Invest.* 1996;98(10): 2218–27.

Ashraf GM, Sheikh IA (Eds). Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer. In: *Advances in Protein Chemistry*, OMICS Group eBooks (2013).

Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Olszewski U, Hamilton G. Circulating cytokeratin 18 fragments and activation of dormant tumor cells in bone marrow of cancer patients. *Exp Ther Med.* 2010 Jan;1(1):9-12.

Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2013; 24(Suppl. 6): vi72–79.

Bang YJ, Cutsem E, Feyereislova et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* 2010; 376(9742):687-697.

Bang YJ, KimYW, Yang HK. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase III trial, *The Lancet* 2012; 379: 315-321.

Barak V, Frenkel S, Valyi-Nagy K, et al. Using the direct-injection model of early uveal melanoma hepatic metastasis to identify TPS as a potentially useful serum biomarker. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Oct;48(10):4399-402.

Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004;37: 529-540.

Beart RW, Melton LJ III, Maruta M, et al. Trends in right and left-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1983;26:393-8.

Benson AB, 3rd, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3408-3419.

Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005;23:8706-8712.

Bhutiani N, Akinwande O, Martin RC, 2nd. Efficacy and toxicity of hepatic intra-arterial drug-eluting (irinotecan) bead (DEBIRI) therapy in irinotecan-refractory unresectable colorectal liver metastases. *World J Surg* 2016;40(5):1178-90.

Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, et al. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011;305:2335- 2342.

Blaser MJ "Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases" (PDF). *EMBO Reports*. 2006;7(10): 956–60.

Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, et al. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol* 1981;34:509-13.

Blomgren H, Lax I, Naslund I, Svanstrom R. Stereotactic high dose fraction radiation therapy of extracranial tumors using an accelerator. Clinical experience of the first thirty-one patients. *Acta Oncol* 1995;34:861–870.

Boige V, Pignon JP, Saint-Aubert, et al. Final results of a randomized trial comparing preoperative 5-FU to surgery alone in adeno- carcinoma of the stomach and Loir esofagus:FNLCC ACCORD07-FFCD 9703 trial. *J Clin Oncol* 2007;25(18S):4510 abstract.

Bos AC, van Erning FN, van Gestel YR, et al. Timing of adjuvant chemotherapy and its relation to survival among patients with stage III colon cancer. *Eur J Cancer* 2015;51(17):2553-61.

Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-9.

Brattström D, Wagenius G, Sandström P, et al. Newly developed assay measuring cytokeratins 8, 18 and 19 in serum is correlated to survival and tumor volume in patients withesophageal carcinoma. *Dis Esophagus*. 2005;18(5):298-303.

Brink M, de Goeij AF, Weijnenberg MP, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003;24:703-10.

Brown LM . *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):283–97.

Bruce JY, Lang JM, McNeel DG, Liu G. Current controversies in the management of biochemical failure in prostate cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2012 Nov;10(11):716-22.

Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 1990;113:779-88.

Buccheri G, Ferrigno D. Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer*. 2001 Dec;34 Suppl 2:S65-9.

Burdo TH, Wood MR, Fox HS. Osteopontin prevents monocyte recirculation and apoptosis
Journal of Leukocyte Biology 2007;81(6):1504-1511.

Buunen M, Veldkamp R, Hop WCJ, et al. Survival after laparoscopic surgery versus open
surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial. Lancet Oncol
2009;10:44-52.

Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for
management. J Med Genet 1999;36:873-80.

Cao C, Yan TD, Black D, Morris DL. A systematic review and meta-analysis of cytoreductive
surgery with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of
colorectal origin. Ann Surg Oncol 2009; 16: 2152–2165.

Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Randomized phase III study of capecitabine plus
oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for
metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008;26:2006-2012.

Cassidy J, Tabernero J, Twelves C, et al. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line
therapy for patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2004;22:2084-2091.

Cavanagh H, Rogers KMA. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic
and stomach cancers. Hereditary Cancer in Clinical Practice 2015; 13:16.

Cayvarlı H, Bekiş R, Akman T, et al. The Role of 18F-FDG PET/CT in the Evaluation of Gastric
Cancer Recurrence. Mol Imaging Radionucl Ther. 2014 Oct; 23(3): 76–83.

Charvat H, Sasazuki S, Inoue M, et al. Prediction of the 10-year probability of gastric cancer
occurrence in the Japanese population: the JPHC study cohort II. Int J Cancer 2015;138:320-
331.

Chen T, Sun L, He C, et al. Serum OPN expression for identification of gastric cancer and atrophic gastritis and its influencing factors. *PLoS One* 9: e114005, 2014.

Choi AH, Kim J, Chao J. Perioperative chemotherapy for resectable gastric cancer: MAGIC and beyond. *World J Gastroenterol*. 2015 Jun 28; 21(24): 7343–7348.

Choi DJ, Kwak JM, Kim J, et al. Preoperative chest computerized tomography in patients with locally advanced mid or lower rectal cancer: its role in staging and impact on treatment strategy. *J Surg Oncol* 2010;102:588-592.

Cho J, Kang MS, Kim KM,. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *J Gastric Cancer*. 2016; 16(1): 1–7.

Choi JS, Han KH, Kim EK, et al. Fine-Needle Aspirate CYFRA 21-1, an Innovative New Marker for Diagnosis of Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015 May;94(19):1-6.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39.

Claes K, Dahan K, Tejpar S, et al. The genetics of familial adenomatous polyposis (FAP) and MutYH-associated polyposis (MAP). *Acta Gastroenterol Belg*. 2011; 74(3):421-426.

Clancy C, Burke JP, Barry M, Kalady MF, Calvin CJ. A meta-analysis to determine the effect of primary tumor resection for stage IV colorectal cancer with unresectable metastases on patient survival. *Ann Surg Oncol* 2014;21:3900–8.

Cohen AM. Surgical considerations in patients with cancer of the colon and rectum. *Semin Oncol* 1991;18:381-387.

Colletini F, Schnapauff D, Poellinger A, et al. Percutaneous CT-guided high-dose brachytherapy (CT-HDRBT) ablation of primary and metastatic lung tumors in nonsurgical candidates. *Rofo* 2012; 184: 316–323.

Colquhoun A, Arnold M, Ferlay J, et al. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut*. 2015;64(12):1881-8.

Comito T, Cozzi L, Clerici E, et al. Stereotactic Ablative Radiotherapy (SABR) in inoperable oligometastatic disease from colorectal cancer: a safe and effective approach. *BMC Cancer* 2014; 14: 619.

Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis* 1999;17:67-79.

Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1016-25.

Cotte E, Passot G, Mohamed F, et al. Management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: current state of practice. *Cancer J* 2009; 15: 243–248.

Cremolini C, Loupakis F, Masi G, et al. FOLFOXIRI/bevacizumab versus FOLFIRI/ bevacizumab as first-line treatment in unresectable metastatic colorectal cancer: results of phase III TRIBE trial by GONO Group. *Ann Oncol* 2014; 24(Suppl 4): abstr O-0026

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 2004;31:450-464.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006;355(1):11-20.

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455-60.

Cunningham D, Starlin N, Rao S, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* 2008;358:36-46.

D'Amico L, Satolli MA, Mecca C, et al. Bone metastases in gastric cancer follow a RANKL-independent mechanism. *Oncol Rep* 2013;29:1453-1458.

Davis DM, Marcet J E, Frattini JC, et al. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg* 2011; 213: 352–361.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.

Dawood O, Mahadevan A, Goodman KA. Stereotactic body radiation therapy for liver metastases. *Eur J Cancer* 2009;45:2947- 2959.

de Haas EC, di Pietro A, Simpson KL, et al. Clinical evaluation of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer. *Neoplasia* 2008;10(10):1041-1048.

de Geus-Oei LF, Vriens D, van Laarhoven HW, et al. Monitoring and predicting response to therapy with 18F-FDG PET in colorectal cancer: a systematic review. *J Nucl Med* 2009;50(Suppl.1):43-54.

Des Guetz G, Uzzan B, Morere JF, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for patients with non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;1:CD007046.

De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010 Aug;11(8):753-62.

Dikken JL, van Sandick JW, Maurits Swellengrebel HA, et al. Neo-adjuvant chemotherapy followed by surgery and chemotherapy or by surgery and chemoradiotherapy for patients with resectable gastric cancer (CRITICS). *BMC Cancer* 2011;11:329.

Dominello M, Bowers J, Zaki M, Konski A: Radiotherapy and radioembolization for liver metastases. *Ann Palliat Med* 2014; 3(2): 104-113.

Drew DA, Tighiouart H, Scott TM, et al. FGF-23 and cognitive performance in hemodialysis patient. *Hemodialysis International* 2014; 18:78-86.

Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int J Cancer* 2014;134(11): 2513-2522.

Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2016-10-15]. Dostupný z WWW:<http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

Ebell MH, Siwek J, Weiss BD, et al. Strength of recommendation taxonomy (SORT): a patient-centered approach to grading evidence in the medical literature. *Am Fam Physician* 2004;69:548–56.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471–4.

Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995;345:939-944.

Ekins, RP. Assay design and quality control. In: BIZOLLON, CH.A. Radioimmunoassay. North Holland, Amsterdam: Elsevier, 1979, s. 239-255. ISBN 0-444-80154-5.

Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, et al. Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol* 2009; 27: 681–685.

Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. *Cell Signal*. 2000 Jul;12(7):425-34.

Evrard S, Poston G, Kissmeyer-Nielsen P, et al. Combined ablation and resection (CARE) as an effective parenchymal sparing treatment for extensive colorectal liver metastases. *PLoS One* 2014; 9: e114404.

Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007;25:1670-1676.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-1403.

Fernandes LC, Kim SB, Matos D: Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging and prognosis of colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11(5):645-648.

Fernandes LC, Kim SB, Saad SS, Matos D: Value of carcinoembryonic antigen and cytokeratins for the detection of recurrent disease following curative resection of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12(24):3891-3894.

Filippi AR, Badellino S, Guarneri A, et al. Outcomes of single fraction stereotactic ablative radiotherapy for lung metastases. *Technol Cancer Res Treat* 2014; 13: 37–45.

Fiorentini G, Aliberti C, Tilli M, et al. Intra-arterial infusion of irinotecan-loaded drug-eluting beads (DEBIRI) versus intravenous therapy (FOLFIRI) for hepatic metastases from colorectal cancer: final results of a phase III study. *Anticancer Res* 2012; 32:1387–1395.

Fischer AB, Graem N, Jensen OM. Risk of gastric cancer after Billroth II resection for duodenal ulcer. *Br J Surg.* 1983 Sep;70(9):552-4.

Fitzgerald RC, Caldas C. Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut* 2004;53:775-778.

Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet* 2010;47:436-444.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012;3(3):153-173.

Fletcher RH. Successful colorectal cancer screening starts with primary care. *Rev. Gastroenterol. Disord* 2002; 2(1): 27–34.

Folprecht G, Grothey A, Alberts S, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005; 16:1311.

Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, et al. Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 1997;15:938-946.

Ford H, Marshall A, Wadsley J, et al. Cougar-02: A randomized phase III study of docetaxel versus active symptom control in advanced esophagogastric adenocarcinoma. Abstrakt ASCO GI 2013, citace J Clin Oncol 30: 2012 (suppl 34; abstr LBA4)

Fuchs CHS, Tomasek J, Zong CHJ, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet 2014;383(9911):31-39.

Fumagalli I, Bibault JE, Dewas S, et al. A single-institution study of stereotactic body radiotherapy for patients with unresectable visceral pulmonary or hepatic oligometastases. Radiat Oncol 2012; 7: 164.

Fujiyama S, Morishita T, Hashiguchi O and Sato T. Plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. Cancer 1988; 61: 1621-1628.

Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. Curr Mol Med. 2001 Nov;1(5):621-32.

Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. Am J Gastroenterol 2006;101:385-398.

Garlipp B, de Baere T, Damm R, et al. Left-liver hypertrophy after therapeutic right-liver radioembolization is substantial but less than after portal vein embolization. Hepatology 2014; 59: 1864–1873.

Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. Cancer Res 1998;58:4086-4089.

Gialeli C, Theocharis AD and Karamanos NK: Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278: 16-27.

Goodman KA, Wiegner EA, Maturen KE, et al. Dose-escalation study of single- fraction stereotactic body radiotherapy for liver malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78: 486–493.

Green BL, Marshall HC, Collinson F, et al. Long-term follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of conventional versus laparoscopically assisted resection in colorectal cancer. *Br J Surg* 2013;100:75-82.

Grossmann I, Avenarius JK, Mastboom WJ, Klaase JM. Preoperative staging with chest CT in patients with colorectal carcinoma: not as a routine procedure. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2045- 2050.

Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381:303.

Guimbaud R et al. Prospective, randomized, multicenter, phase III study of fluorouracil, leucovorin, and irinotecan versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine in advanced gastric adenocarcinoma: A French Intergroup (Fédération Francophone de Cancérologie Digestive, Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer, and Groupe Coopérateur Multidisciplinaire en Oncologie) Study. *J Clin Oncol* 2014 Nov 1; 32:3520.

Hammarström S, The carcinoembryonic antigen (CEA)family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Cancer Biology* 1999;9: 6781.

Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010:134-46.

Han X, Quarles LD. Multiple faces of fibroblast growth factor-23. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016 Jul;25(4):333-42.

Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol* 2005;23:8671- 8678.

Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465-1471.

Hara M, Sato M, Takahashi H, Takayama S, Okada Y, Nagasaki T, Takeyama H. Carcinoembryonic antigen elevation in post-hepatectomy patients with colorectal cancer liver metastasis indicates recurrence with high accuracy. *Hepatogastroenterology*. 2013 Nov-Dec;60(128):1935-9.

Hayashi M, Inoue Y, Komeda K, et al. Clinicopathological analysis of recurrence patterns and prognostic factors for survival after hepatectomy for colorectal liver metastasis. *BMC Surg* 2010;10:2

Hebbard PC, Macmillan A, Huntsman D, et al. Prophylactic total gastrectomy (PTG) for hereditary diffuse gastric cancer (HDGC): the Newfoundland experience with 23 patients. *Ann Surg Oncol* 2009;16:1890-1895.

Hechtman JF, Polydorides AD. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:691-697.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998;391:184-187.

Hendlisz A, Van den Eynde M, Peeters M, et al. Phase III trial comparing protracted intravenous fluorouracil infusion alone or with yttrium-90 resin microspheres radioembolization for liver-limited metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3687–3694.

Hennink SD, van der Meulen-de Jong AE, Wolterbeek R, et al. Randomized comparison of surveillance intervals in familial colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 3(35):4188-93.

Hirota WK, Zuckerman MJ, Adler DG, et al. ASGE guideline: the role of endoscopy in the surveillance of premalignant conditions of the upper GI tract. *Gastrointest Endosc* 2006;63:570-580.

Holdenrieder S, Stieber P, Liska V, Treska V, Topolcan O, Dreslerova J, Matejka VM, Finek J, Holubec L. Cytokeratin serum biomarkers in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012 May;32(5):1971-6.

Hoyer M, Roed H, Traberg Hansen A, et al. Phase II study on stereotactic body radiotherapy of colorectal metastases. *Acta Oncol* 2006; 45: 823–830.

Howe JR, Mitros FA, Summers RW. The Risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* 1998;5:751- 756.

Hu B, Hajj NE, Sittler S, et al. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol* 2012;3(3):251-261.

Hwang SW, Lee DH, Lee SH, et al. Preoperative staging of gastric cancer by endoscopic ultrasonography and multidetector-row computed tomography. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:512-8.

Jacobs E, Martinez ME, Buckmeier J, Lance P, May M, Jurutka P. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with increased risk for metachronous colorectal adenoma. *J Carcinog*. 2011 Feb 12;10:3.

Jager E, Heike M, Bernhard H, et al. Weekly high-dose leucovorin versus low-dose leucovorin combined with fluorouracil in advanced colorectal cancer: results of a randomized multicenter trial. Study Group for Palliative Treatment of Metastatic Colorectal Cancer Study Protocol 1. *J Clin Oncol* 1996;14:2274-2279.

Jakubowska A, Nej K, Huzarski T, Scott RJ, Lubinski J. BRCA2 gene mutations in families with aggregations of breast and stomach cancers. *Br J Cancer*. 2002;87:888–91.

Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986;10:437-59.

Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, et al. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group. *J Clin Oncol* 2007;25:3061-3068.

Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes Control*. 2013 June ; 24(6): 1207–1222.

Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004;17:1392-9.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *J Clin Oncol* 2006 ;24(14):2137-2150.

Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(5):700–713.

Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *Br J Cancer* 2001;84:400-5.

Kang Y-K, Kang W-K, Shin D-B, et al. Capecitabine/cisplatin versus 5- fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol* 2009;20(4):666-73.

Kashima M, Yamakado K, Takaki H, et al. Complications after 1000 lung radiofrequency ablation sessions in 420 patients: a single center's experiences. *Am J Roentgenol* 2011;197: 576-580.

Karlíková M, Topolčan O. Principy imunoanalytických metod pro mediky. Polypress 2013

Kaušitz J. Rádioimunoanalýza v onkologii. LF UK Plzeň, 1995

Kaušitz J, Topolčan O, Karlíková M, et al. Biomarkery v onkologii. 2014.

Kemeny N. Management of liver metastases from colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2006;20:1161-1176, 1179; discussion 1179-1180, 1185-1166.

Khalid A, Javaid MA. Matrix Metalloproteinases: New Targets in Cancer Therapy.

J Cancer Sci Ther 2016;8(6):143-153.

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230-7.

Kim do Y, Kim JW, Kuromatsu RYAn SH, Torimura T, Sherman M. Controversies in surveillance and early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2011;81 Suppl 1:56-60.

Kim JH, Jun KH, Jung H, et al. Prognostic Value of Preoperative Serum Levels of Five Tumor Markers (Carcinoembryonic Antigen, CA19-9, Alpha-fetoprotein, CA72-4, and CA125) in Gastric Cancer. *Hepatogastroenterology* 2014;61:863-869.

Kim MC, Yook JH, Yang HK, et al. Long-Term Surgical Outcome of 1057 Gastric GISTs According to 7th UICC/AJCC TNM System: Multicenter Observational Study From Korea and Japan. *Medicine (Baltimore)* 94(41): e1526, 2015.

Klener P. *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002. 686.

Klener P, Malbohan I. M, Zima T. Náborové markery. In *Laboratorní diagnostika 2002*;1. Vydání: 331-340.

Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004;108:237-42.

Kucera R, Cerna M, Narsanska A, et al. Growth factors and breast tumors, comparison of selected growth factors with traditional tumor markers. *Anticancer Res.* 2011 Dec;31(12):4653-6.

Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C- 07. *J Clin Oncol* 2007;25:2198-2204.

Kulemann V, Schima W, Tamandl D, et al. Preoperative detection of colorectal liver metastases in fatty liver: MDCT or MRI? *Eur J Radiol* 2011;79(2):e1–6.

Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD , et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2013;24 (6): 64–72.

Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Delgado S, et al. Laparoscopy- assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non- metastatic colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 2002;359:2224- 2229.

Lagente V., Boichot E. Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation. Springer Science & Business Media, 179 stran, 2008.

Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovicova J, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:291-9.

Lanza G, Messerini L, Gafà R, Risio M. Colorectal tumors: The histology report. *Digestive and Liver Disease* 2011;43:344–355.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.

Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY. Gastric carcinoma. In: Bowman FT, Carneiro F, Hruban RH, eds. Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon:IARC;2010.

Leaf DE, Pereira RC, Bazari H, Jüppner H. Oncogenic osteomalacia due to FGF23-expressing colon adenocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Mar;98(3):887-91.

Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509-2520.

Lee J, Lim do H, Kim S, et al Phase III trial comparing capecitabine plus cisplatin versus capecitabine plus cisplatin with concurrent capecitabine radiotherapy in completely resected gastric cancer with D2 lymph node dissection: the ARTIST trial. *J Clin Oncol.* 2012 Jan 20; 30(3): 268-73.

Lee JH. Clinical Usefulness of Serum CYFRA 21-1 in Patients with Colorectal Cancer. *Nucl Med Mol Imaging.* 2013 Sep;47(3):181-7.

Lee JK, Delaney CP, Lipman JM. Current state of the art in laparoscopic colorectal surgery for cancer: Update on the multi-centric international trials. *Ann Surg Innov Res* 2012;6:5.

Lee MT, Kim JJ, Dinniwell R, et al. Phase I study of individualized stereotactic body radiotherapy of liver metastases. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1585–1591.

Lee WS, Yun SH, Chun HK, et al. Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: prognostic factors and survival. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:699-704.

Lencioni R, Crocetti L, Cioni R, et al. Response to radiofrequency ablation of pulmonary tumours: a prospective, intention-to-treat, multicentre clinical trial (the RAPTURE study). *Lancet Oncol* 2008; 9: 621–628.

Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma*, 2008, vol. 55, no. 2, s. 138-42.

Li J, et al. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: From technical evolution to oncological benefit. *World J Gastrointest Surg.* 2016 Feb 27; 8(2): 124–133.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-5.

LiverMetSurvey. International registry of patients operated for colorectal liver metastasis. <http://www.livermetsurvey.org> [accessed 2311.11].

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008:1-93.

Liska V, Holubec L Jr, Treska V, et al. Evaluation of tumour markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer. *Anticancer Res.* 2011 Apr;31(4):1447-51.

Liska V, Treska V, Holubec L, et al. Recurrence of colorectal liver metastases after surgical treatment: multifactorial study. *Hepatogastroenterology.* 2007 Sep;54(78):1741-4.

Liu DM, Thakor AS, Baerlocher M, et al. A review of conventional and drug-eluting chemoembolization in the treatment of colorectal liver metastases: principles and proof. *Future Oncol* 2015; 11: 1421–1428.

Lordick F, Kang YK, Chung HC, et al. Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie and EXPAND Investigators. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:490-499.

Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101:715-21.

Lumachi F, Marino F, Orlando R, Chiara GB, Basso SM. Simultaneous multianalyte immunoassay measurement of five serum tumor markers in the detection of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2012 Mar;32(3):985-8.

Lynch HT, Snyder C, Davies JM, Lanspa S, et al. FAP, gastric cancer, and genetic counseling featuring children and young adults: a family study and review. *Fam Cancer.* 2010 Dec;9(4):581-8.

Maguire A, Sheahan K. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7;20(29):9850-61.

Maindrault-Goebel F, Louvet C, Andre T, et al. Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX6). GERCOR. *Eur J Cancer* 1999;35:1338-1342.

Martin RC, 2nd, Scoggins CR, Schreeder M et al. Randomized controlled trial of irinotecan drug-eluting beads with simultaneous FOLFOX and bevacizumab for patients with unresectable colorectal liver-limited metastasis. *Cancer* 2015; 121: 3649–3658.

Masciari S, Dewanwala A, Stoffel EM, et al. Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Genet Med*. 2011 Jul;13(7):651-7.

Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:1909.

McGregor DK, Wu TT, Rashid A, et al. Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2004;28:712-8.

Mekenkamp LJ, Koopman M, Teerenstra S, et al. Clinicopathological features and outcome in advanced colorectal cancer patients with synchronous vs metachronous metastases. *Br J Cancer* 2010;103:159–64.

Mendez Romero A, Wunderink W, Hussain SM, et al. Stereotactic body radiation therapy for primary and metastatic liver tumors: a single institution phase i-ii study. *Acta Oncol* 2006; 45: 831–837.

Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, et al. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*. 2015;121:269–75.

Mettang T, Kunzmann K, Roth HJ, Weisshaar E. Fibroblast Growth-factor 23 and Calcium-binding Proteins are not Associated with Chronic Itch in Patients on Haemodialysis. *Acta Derm Venereol*. 2017 Mar 10;97(3):381-382.

Mirabelli P, Incoronato M. Usefulness of traditional serum biomarkers for management of breast cancer patients. *Biomed Res Int*. 2013;2013:685641. doi:10.1155/2013/685641. Epub 2013 Nov 7. Review.

Mitry E, Fields AL, Bleiberg H, et al. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4906–4911.

Moulton CA, Gu CS, Law CH, Tandan VR, Hart R, Quan D, et al. Effect of PET before liver resection on surgical management for colorectal adenocarcinoma metastases: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311:1863–9.

Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstet Gynecol* 2011;118: 280-288.

Morneau M, Boulanger J, Charlebois P, et al. Laparoscopic versus open surgery for the treatment of colorectal cancer: a literature review and recommendations from the Comité de l'évolution des pratiques en oncologie. *Can J Surg* 2013;56:297-310.

Motosugi U, Ichikawa T, Nakajima H, et al. Imaging of small hepatic metastases of colorectal carcinoma: how to use superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in the multidetector-row computed tomography age? *J Comput Assist Tomogr* 2009;33:266–72.

Muratore A, Zorzi D, Bouzari H, et al. Asymptomatic colorectal cancer with un-resectable liver metastases: immediate colorectal resection or up-front systemic chemotherapy? *Ann Surg Oncol* 2007;14:766-770.

NCCN Guidelines-v.1.2017. Gastric Cancer.

NCCN Guidelines-v.2.2017. Colorectal cancer.

Nelson H, Weeks JC, Wieand HS. Proposed phase III trial comparing laparoscopic-assisted colectomy versus open colectomy for colon cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1995:51-56.

Nekulová M, Simícková M, Pecan L, et al. Early diagnosis of breast cancer dissemination by tumor markers follow-up and method of prediction, *Neoplasma* 194;41(2):113-8.

Nekulová M, Šimíčková M, Valík D. Nádorové markery a epigenetické faktory. Masarykův onkologický ústav, Brno, Klin Biochem Metab. 2006;14(35):152–156.

Nicolini A, Ferrari P, Fulceri F, et al. An individual reference limit for 'early' diagnosis of metastatic breast cancer during postoperative follow-up. *Biomark Med.* 2015 Mar;9(4):307–17.

Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 1208–1215.

Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 1007–1016.

Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008;10:13-27.

Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2012;18:890-900.

Ogino S, Hatano E, Nomi T, Uemoto S. Laparoscopic liver resection: Toward a truly minimally invasive approach. *World J Gastrointest Endosc* 7(3): 159-161, 2015.

Okines AFC NA, McCloud P, Kang Y, Cunningham D. Meta-analysis of the REAL-2 and ML17032 trials comparing capecitabine with 5-FU in advanced oesofago-gastric cancer. *Annals of Oncology* 2008;19 suppl8:viii169(Abstr513PD)

Onaitis MW, Petersen RP, Haney JC, et al. Prognostic factors for recurrence after pulmonary resection of colorectal cancer metastases. *Ann Thorac Surg* 2009;87:1684-1688.

Ota DM, Nelson H, Weeks JC. Controversies regarding laparoscopic colectomy for malignant diseases. *Curr Opin Gen Surg* 1994;208-213.

Overman MJ, Kopetz S, McDermott RS, et al. Nivolumab {+/-} ipilimumab in treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): CheckMate-142 interim results [abstract]. *ASCO Meeting Abstracts* 2016;34:3501.

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, et al. Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:640-3.

Pecen L, Kasík P. Základy biostatistiky a analýz a modelování lékařských dat. ISBN 978-80-260-6314-8, 2014.

Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 2004;20:269-276.

Pesta M, Fichtl J, Kulda V, Topolcan O, Treska V. Monitoring of circulating tumor cells in patients undergoing surgery for hepatic metastases from colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2013, vol. 33, no. 5, s. 2239-43.

Peters N, Wieners G, Pech M, et al. CT-guided interstitial brachytherapy of primary and secondary lung malignancies: results of a prospective phase II trial. *Strahlenther Onkol* 2008; 184: 296–301.

Petre EN, Jia X, Thornton RH, et al. Treatment of pulmonary colorectal metastases by radiofrequency ablation. *Clin Colorectal Cancer* 2013; 12: 37–44.

Petrelli NJ. Plenary program discussion. 43rd annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, Illinois, June 4, 2007

Petrelli N, Herrera L, Rustum Y, et al. A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1987;5:1559-1565.

Pezzi A, Roncucci L, Benatti P, Sassatelli R, Varesco L, Di Gregorio C, et al. Relative role of APC and MUTYH mutations in the pathogenesis of familial adenomatous polyposis. *Gastrointestinal Cancer*. 2009;44(9):1092-1100.

Pfeiffer P, Nielsen D, Bjerregaard J, et al. Biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy in patients with advanced colorectal cancer after failure to irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil. *Ann Oncol* 2008; 19:1141.

Piessevaux H, Buyse M, Schlichting M, et al. Use of early tumor shrinkage to predict long-term outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3764–3775.

Polat E, Duman U, Duman M, et al. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer. *Curr Oncol*. 2014 Feb;21(1):e1-7.

Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, et al. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 1999;6:290-7.

Porschen R, Arkenau H-T, Kubicka S, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol* 2007;25:4217-4223.

Prazakova M, Vrzalova J, Auge JM, et al. The role of MonoTotal in the primary diagnosis, prognosis and follow-up of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Anticancer Res*. 2011 Sep;31(9):3107-12.

Presl J, Kučera R, Topolčan O, et al. Využití biomarkerů pro diagnostiku a monitoraci léčby karcinomu vaječnicků. 2014; ISBN 978-80-263-0816-4

Price CP, Newman DJ. Principles and Practice of Immunoassay 2nd edn, (Macmillan, London), 1997.

Primrose J, Falk S, Finch-Jones M, et al. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 601–611.

Pritchard CC, Akagi L, Reddy PL, et al. COLD-PCR enhanced melting curve analysis improves diagnostic accuracy for KRAS mutations in colorectal carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2010;10:6.

Qiu M, Hu J, Yang D, et al. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget* 2015;6:38658- 38666.

Quintero E, Carrillo M, Leoz ML, et al. Risk of advanced neoplasia in first-degree relatives with colorectal cancer: a large multicenter cross-sectional study. *PLoS Med* 2016;13:e1002008

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.

Rapiti E, Fioretta G, Verkooijen HM, et al. Increased risk of colon cancer after external radiation therapy for prostate cancer *Int J Cancer*. 2008 Sep 1;123(5):1141-5.

Rauhut, Michael M. Chemiluminescence. In Grayson, Martin (Ed) (1985). *Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology* (3rd ed),1985; 247 John Wiley and Sons

Ricke J, Mohnike K, Pech M, et al. Local response and impact on survival after local ablation of liver metastases from colorectal carcinoma by computed tomography-guided high-dose-rate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78: 479–485.

Rittling SR ,Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. Br J Cancer 2004; 90: 1877–1881.

Rojas Llimpe FL, Di Fabio F, Ercolani G, Giampalma E, Cappelli A, Serra C, et al. Imaging in resectable colorectal liver metastasis patients with or without preoperative chemotherapy: results of the PROMETEO-01 study. Br J Cancer 2014;111:667–73.

Romero-Ventosa EY, Blanco-Prieto S, González-Piñeiro AL, et al. Pretreatment levels of the serum biomarkers CEA, CYFRA 21-1, SCC and the soluble EGFR and its ligands EGF, TGF-alpha, HB-EGF in the prediction of outcome in erlotinib treated non-small-cell lung cancer patients. Springerplus. 2015 Apr 9;4:171.

Ruers T, Punt C, Van Coevorden F, et al. Radiofrequency ablation (RFA) combined with chemotherapy for unresectable colorectal liver metastases (CRC LM): long-term survival results of a randomized phase II study of the EORTC-NCRI CCSG-ALM Intergroup 40004 (CLOCC). J Clin Oncol 2015; 33 (15 Suppl): abstr 3501.

Ruers T, Punt C, Van Coevorden F, et al. Radiofrequency ablation combined with systemic treatment versus systemic treatment alone in patients with non- resectable colorectal liver metastases: a randomized EORTC Intergroup phase II study (EORTC 40004). Ann Oncol 2012; 23: 2619–2626.

Rusthoven KE, Kavanagh BD, Cardenes H, et al. Multi-institutional phase I/II trial of stereotactic body radiation therapy for liver metastases. J Clin Oncol 2009; 27: 1572–1578.

Ruzzenente A, Conci S, Iacono C, et al. Usefulness of contrast-enhanced intraoperative ultrasonography (CE-IIOUS) in patients with colorectal liver metastases after preoperative chemotherapy. J Gastrointest Surg 2013;17:281–7.

Sahani DV, Bajwa MA, Andrabi Y, et al. Current status of imaging and emerging techniques to evaluate liver metastases from colorectal carcinoma. Ann Surg 2014;259:861–72.

Sakamoto Y, Miyamoto Y, Beppu T, et al. Post-chemotherapeutic CEA and CA19-9 Are Prognostic Factors in Patients with Colorectal Liver Metastases Treated with Hepatic Resection After Oxaliplatin-based Chemotherapy. *Anticancer Res.* 2015 Apr;35(4):2359-68.

Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 2005;65:6063-9.

Samloff IM. Cellular localization of group I pepsinogens in human gastric mucosa by immunofluorescence. *Gastroenterology.* 1971;61:185–188.

Samloff IM, Liebman WM. Cellular localization of the group II pepsinogens in human stomach and duodenum by immunofluorescence. *Gastroenterology.* 1973;65:36–42.

Sargent D, Grothey A, Gray R. Time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer. *JAMA* 2011;306:1199-1200.

Scorsetti M, Arcangeli S, Tozzi A, et al. Is stereotactic body radiation therapy an attractive option for unresectable liver metastases? A preliminary report from a phase 2 trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 86: 336–342.

Schadde E, Ardiles V, Slankamenac K, et al. ALPPS Offers a Better Chance of Complete Resection in Patients with Primarily Unresectable Liver Tumors Compared with Conventional-Staged Hepatectomies: Results of a Multicenter Analysis. *World J Surg* 2014;38(6):1510–1519.

Scharitzer M, Ba-Ssalamah A, Ringl H, Kolblinger C, Grunberger T, Weber M, et al. Preoperative evaluation of colorectal liver metastases: comparison between gadoxetic acid-enhanced 3.0-T MRI and contrast-enhanced MDCT with histopathological correlation. *Eur Radiol* 2013;23:2187–96.

Sharma RK, Rogojina AT, Chalam KV. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor. *Mol Vis.* 2009;15:60-9.

Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 2015;136:83–90.

Schmoll HJ, Cartwright T, Tabernero J, et al. Phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: a planned safety analysis in 1,864 patients. *J Clin Oncol* 2007;25:102-109.

Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, et al. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer: a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012; 23: 2479–2516.

Schlijper RC, Grutters JP, Houben R, et al. What to choose as radical local treatment for lung metastases from colo-rectal cancer: surgery or radiofrequency ablation? *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 60–67.

Schneider R, Schneider C, Kloor M, et al. Lynch syndrome: clinical, pathological, and genetic insights. *Langenbecks Arch Surg* 2012;397:513-25.

Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer L.C. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* [online]. 2002, sv. 22, č. 4,s. 549–53.

Schuhmacher Ch, Gretschel S, Lordick F, et al. Neoadjuvant chemotherapy versus surgery alone for locally advanced adenocarcinoma of the stomach and cardia: Randomized EORTC phase III trial #40954. *J Clin Oncol* 2010;28(35):5210- 5218.

Shah MA, Janjigian YY, Stoller R, et al. Randomized Multicenter Phase II Study of Modified Docetaxel, Cisplatin, and Fluorouracil (DCF) Versus DCF Plus Growth Factor Support in Patients With Metastatic Gastric Adenocarcinoma: A Study of the US Gastric Cancer Consortium. *J Clin Oncol.* 2015; 33(33):3874-9.

Sheffer M, Bacolod MD, Zuk O, et al. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 28;106(17):7131-6.

Ueda S, Hironaka S, Yasui H, et al. Randomized phase III study of irinotecan (CPT-11) versus weekly paclitaxel (wPTX) for advanced gastric cancer (AGC) refractory to combination chemotherapy (CT) of fluoropyrimidine plus platinum (FP): WJOG4007 trial, *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 4002).

Sjöström J, Alfthan H, Joensuu H, Stenman UH, Lundin J, Blomqvist C. Serum tumour markers CA 15-3, TPA, TPS, hCGbeta and TATI in the monitoring of chemotherapy response in metastatic breast cancer. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001;61(6): 431-41.

Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011;61:212-36.

Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18:1506-12.

Siriwardena AK, Mason JM, Mullaitha S, Hancock HC, Jegatheeswaran S. Management of colorectal cancer presenting with synchronous liver metastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:446–59.

Smalley SR, Benedetti JK, Haller DH, et al. Updated Analysis of SWOG-Directed Intergroup Study 0116: A Phase III Trial of Adjuvant Radiochemotherapy Versus Observation After Curative Gastric Cancer Resection. *J Clin Oncol* 2012;30(19): 2327-2333.

Smid D, Skalicky T, Dolezal J, Kubackova D and Fichtl J: Surgical treatment of gastric cancer. *Bratisl Lek Listy* 2015;116: 666-670.

Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer* 2006;94:798-805.

Soyer P, Pocard M, Boudiaf M, Abitbol M, Hamzi L, Panis Y, et al. Detection of hypovascular hepatic metastases at triple-phase helical CT: sensitivity of phases and comparison with surgical and histopathologic findings. *Radiology* 2004;231:413–20.

Stahl M, Walz M, Stuschke M, et al. Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *J Clin Oncol.* 2009;27:851-6.

Stejskal D, et al. Osteoprotegerin a jeho ligant. *Prakt Léč.* 2002; 4:191-193.

Sterzing F, Brunner TB, Ernst I, et al. Stereotactic body radiotherapy for liver tumors: principles and practical guidelines of the DEGRO Working Group on Stereotactic Radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 2014; 190: 872–881.

Stigbrand T, Andrés C, Bellanger L, et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop., *Tumour Biol.* 1998; 19(2):132-52.

Stintzing S, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, et al. Independent radiological evaluation of objective response, early tumor shrinkage, and depth of response in FIRE-3 (AIO KRK-0306) in the final RAS evaluable population. *Ann Oncol* 2014; 25(Suppl 5): abstr LBA11.

Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clin Chem.* 2008; 54(8):1-10.

Sun Z, Adam MA, Kim J, et al. Determining the optimal timing for initiation of adjuvant chemotherapy after resection for stage II and III colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2016;59:87-93.

Sundström BE, Stigbrand TI. Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *Int J Biol Markers* 1994; 9(2): 102-108.

Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015; 16:499.

Takahashi Y, Inoue T and Fukusato T. Protein induced by vitamin K absence or antagonist II-producing gastric cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2010;1: 129-36.

Takada K,. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol*. 2000 Oct; 53(5): 255–261.

Tanis E, Nordlinger B, Mauer M, et al. Local recurrence rates after radiofrequency ablation or resection of colorectal liver metastases. Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer #40004 and #40983. *Eur J Cancer* 2014; 50: 912–919.

Theophilus M, Platell C, Spilsbury K. Long-term survival following laparoscopic and open colectomy for colon cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Colorectal Dis* 2014;16:O75-81.

Tosoian JJ, Loeb S, Feng Z, Isharwal S, Landis P, Elliot DJ, Veltri R, Epstein JI, Partin AW, Carter HB, Trock and Sokoll LJ: Association of [-2]proPSA with biopsy reclassification during active surveillance for prostate cancer. *J Urol* 2012;188:1131-1136.

Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004;22:229-237.

Tramacere I, Negri E, Pelucchi C, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Annals of Oncology* 2012;23:28-36.

Treska V, Liska V, Fichtl J, et al. Portal vein embolisation with application of haematopoietic stem cells in patients with primarily or non-resectable colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2014 Dec;34(12):7279-85.

Treska V, Topolcan O, Vrzalova J, et al. Predictive value of serum biomarkers in patients after portal vein embolization (PVE): a pilot study. *Anticancer Res.* 2011 Jan;31(1):339-44.

Treska V, Topolcan O, Stanislav K, et al. Preoperative tumor markers as prognostic factors of colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology.* 2009 Mar-Apr;56(90):317-20.

Treska V, Safranek J, Lysak D, Mirka H, Skalicky T, Slauf F, Hes O. A complex oncosurgical approach to increasing the resectability of colorectal cancer metastases - a case report. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014;158(1):154-7.

Truong CD, Feng W, Li W, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:14.

Tsai M-S, Su Y-H, Ho M-C, et al. Clinicopathological features and prognosis in resectable synchronous and metachronous colorectal liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2007;14:786-794.

Tselis N, Ferentinos K, Kolotas C, et al. Computed tomography-guided interstitial high-dose-rate brachytherapy in the local treatment of primary and secondary intrathoracic malignancies. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 545–552.

Tsukamoto S, Ischikawa T, Iida S, et al. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2444-50.

Valík D, Nekulová M, Zdražilová Dubská L, et al. Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klin Biochem Metab.* 2014;22(43):22-39.

Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2696-2704.

Van Cutsem E, Boni C, Tabernero J, et al. Docetaxel plus oxaliplatin with or without fluorouracil or capecitabine in metastatic or locally recurrent gastric cancer: a randomized phase II study. *Ann Oncol.* 2015 Jan;26(1):149-56.

Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology* 2016;27:1386–1422.

Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24 (31): 4991-7.

Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, et al. Towards a pan- European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer* 2006;42:2212-2221.

Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol* 2012; 30:3499.

Van Dalen A: Significance of cytokeratin markers TPA, TPA (cyk), TPS and CYFRA 21.1 in metastatic disease. *Anticancer Res* 1996;16(4B): 2345-2349.

Van Hazel GA, Heinemann V, Sharma NK, et al. SIRFLOX: randomized phase iii trial comparing first-line mFOLFOX6 (plus or minus bevacizumab) versus mFOLFOX6 (plus or minus

bevacizumab) plus selective internal radiation therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2016; 34: 1723–1731.

Vannella L, Lahner E, Osborn J, et al. Systematic review: Gastric cancer incidence in pernicious anaemia. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 Feb; 37(4):375-82.

Vaughn CP, ZoBell SD, Furtado LV, Baker CL and Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosom. Cancer* 2011;50(5):307–312.

Venook A, Niedzwiecki D, Lenz HJ, et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). *J Clin Oncol* 2014; 32(15 Suppl): abstr LBA 3.

Vervloet MG, Massy ZA, Brandenburg VM, et al. Bone: a new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(5): 427 – 436.

Viktorinová M, Ditrichová D. Kožní projevy interních chorob. *Interní Med.* 2005; 5: 242–249.

Vodicka J, Spidlen V, Treska V, et al. Surgical treatment of colorectal cancer pulmonary metastases: 12-year results. *Anticancer Res.* 2014 Aug;34(8):4239-45.

Wada H, Takai Y, Nemoto K, Yamada S. Univariate analysis of factors correlated with tumor control probability of three-dimensional conformal hypofractionated high-dose radiotherapy for small pulmonary or hepatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 1114–1120.

Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 3

Wahl P, Wolf M. FGF-23 in chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;728:107-25.

Walls C, Andia E, Sanchez A, Guma A, Figueras J, Torras J, et al. Hepatic metastases from colorectal cancer: preoperative detection and assessment of resectability with helical CT. *Radiology* 2001;218:55–60.

Wang CL, Qu G, Xu HW. The short- and long-term outcomes of laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer: a meta- analysis. *Int J Colorectal Dis* 2014;29:309-320.

Wang HL, Lopategui J, Amin MB, et al. KRAS mutation testing in human cancers: the pathologist's role in the era of personalized medicine. *Adv Anat Pathol* 2010;17:23-32.

Wang K.X, Denhart D.T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(6): 333-45.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.

Weissman SM, Burt R, Church J, et al. Identification of individuals at risk for Lynch Syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National Society of Genetic Counselors and the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer Joint Practice Guideline. *J Genet Couns* 2012,21:484-93.

Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, et al. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27:303-10

West NP, Hohenberger W, Weber K, et al. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol* 2010;28:272-278.

Wilke HJ, Muro K, Cutsem E, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal

junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 2014;15(11):1224–1235.

Wishner JD, Baker JW, Hoffman GC, et al. Laparoscopic-assisted colectomy. The learning curve. *Surg Endosc* 1995;9:1179-1183.

Wolf M. Update on Fibroblast Growth Factor 23 in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2012; 82(7): 737–747.

Wolmark N, Rockette H, Fisher B, et al. The benefit of leucovorin- modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol* 1993;11:1879-1887.

Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999;17:3553- 3559.

Wulf J, Guckenberger M, Haedinger U, et al. Stereotactic radiotherapy of primary liver cancer and hepatic metastases. *Acta Oncol* 2006; 45: 838–847.

Xie S, Ding X, Mo W, Chen J. Serum tissue polypeptide-specific antigen is an independent predictor in breast cancer. *Acta Histochem*. 2014 Mar;116(2):372-6.

Xu Y, Xu L, Qiu M, et al. Prognostic value of serum cytokeratin 19 fragments (Cyfra 21-1) in patients with non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2015 Apr 22;5:9444.

Yamada Y, Higuchi K, Nishikawa K, et al. Phase III study comparing oxaliplatin plus S-1 with cisplatin plus S-1 in chemotherapy-naïve patients with advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 2015 Jan;26(1):141-8

Yang AP, Liu J, Lei HY, et al. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CAI9-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2014;437: 183-186.

Yang Y, Yin X, Sheng L, Xu S, Dong L, Liu L. Perioperative chemotherapy more of a benefit for overall survival than adjuvant chemotherapy for operable gastric cancer: an updated Meta-analysis. *Sci Rep.* 2015 Aug 5;5:12850

Yin Z, Liu C, Chen Y, Bai Y, Shang C, Yin R, et al. Timing of hepatectomy in resectable synchronous colorectal liver metastases (SCRLM): simultaneous or delayed? *Hepatology* 2013;57:2346–57.

Yoo PS, Lopez-Soler RI, Longo WE, Cha CH. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clin Colorectal Cancer* 2006;6:202-207.

Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, Tung JK, Alves TC, Fang JS, Xie Y, Zhu J, Chen Z, De Smet F, Zhang J, Jin SW, Sun L, Sun H, Kibbey RG, Hirschi KK, Hay N, Carmeliet P, Chittenden TW, Eichmann A, Potente M, Simons M. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature.* 2017 May 11;545(7653):224-228.

Zdravotnická ročenka ČR 2015. ÚZIS, 2016; ISSN 1210-9991.

8 Přílohy

Příloha 1. TNM klasifikace karcinomu žaludku (verze 7)

T	primární nádor
TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního
Tis	karcinoma in situ (nepřesahuje lamina propria)
T1	tumor infiltruje lamina propria, lamina muscularis mucosae nebo submukózu
T1a	🍏 tumor infiltruje lamina propria nebo lamina muscularis mucosae
T1b	🍏 tumor infiltruje submukózu
T2	tumor infiltruje lamina muscularis propria
T3	tumor infiltruje subserózní vazivu
T4	tumor penetruje viscerální peritoneum nebo okolní struktury
T4a	🍏 tumor penetruje viscerální peritoneum
T4b	🍏 tumor infiltruje okolní struktury
N	regionální mízní uzliny
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	metastatické postižení 1-2 regionálních uzlin
N2	metastatické postižení 3-6 regionálních uzlin
N3	metastatické postižení více než 7 regionálních uzlin
N3a	🍏 metastatické postižení 7-15 regionálních uzlin
N3b	🍏 metastatické postižení více než 15 regionálních uzlin
M	vzdálené metastázy
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy

Příloha 2. Rozdělení karcinomu žaludku do stadií

stádium 0		Tis		N0		M0	
stádium IA		T1		N0		M0	
stádium IB		T1		N1		M0	
		T2		N0		M0	
stádium IIA		T1		N2		M0	
		T2		N1		M0	
		T3		N0		M0	
stádium IIB		T1		N3		M0	
		T2		N2		M0	
		T3		N1		M0	
		T4a		N0		M0	
stádium IIIA		T2		N3		M0	
		T3		N2		M0	

		T4b		N1		M0	
stádium IIIB		T3		N3		M0	
		T4a		N2		M0	
		T4b		N0-1		M0	
stádium IIIC		T4a		N3		M0	
		T4b		N2-3		M0	
stádium IV		jakékoliv T		jakékoliv N		M1	

Příloha 3. TNM klasifikace karcinomu tlustého střeva (verze 7)

T	primární nádor
TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního
Tis	karcinoma in situ (intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae-nepřesahuje ji)
T1	nádor postihuje submukózu
T2	nádor postihuje tunica muscularis propria
T3	nádor postihuje subserózu nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáň
T4	nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury a/nebo prorůstá na viscerální peritoneum
T4a	🍏 nádor prorůstá na viscerální peritoneum
T4b	🍏 nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury
N	regionální mízní uzliny
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	metastatické postižení 1-3 regionálních uzlin
N1a	🍏 metastatické postižení v 1 regionální uzlině
N1b	🍏 metastatické postižení ve 2-3 regionálních uzlinách
N1c	🍏 satelity v subseróze nebo neperitonealizované perikolické či perikolické tkáni bez postižení uzlin
N2	metastatické postižení ve 4 regionálních uzlinách
N2a	🍏 metastatické postižení ve 4-6 regionálních uzlinách
N2b	🍏 metastatické postižení v 7 a více regionálních uzlinách
M	vzdálené metastázy
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy
M1a	vzdálené metastázy omezené na jeden orgán
M1b	vzdálené metastázy ve více než jedné orgánu nebo na peritoneu

Příloha 4. Rozdělení karcinomu tlustého střeva do stadií

stádium 0		Tis		N0		M0	
stádium I		T1,T2		N0		M0	
stádium II		T3,T4		N0		M0	
stádium IIA		T3		N0		M0	
stádium IIB		T4a		N0		M0	
stádium IIC		T4b		N0		M0	
stádium III		jakékoliv T		N1,N2		M0	
stádium IIIA		T1,T2		N1		M0	
		T1		N2a		M0	
stádium IIIB		T3,T4a		N1		M0	
		T2,T3		N2a		M0	
		T1,T2		N2b		M0	
stádium IIIC		T4a		N2a		M0	
		T3,T4a		N2b		M0	
		T4b		N1,N2		M0	
stádium IVA		jakékoliv T		jakékoliv N		M1a	
		jakékoliv T		jakékoliv N		M1b	