

**Univerzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**



**Autoreferát disertační práce**

Prognostické markery chirurgické léčby maligních plicních nádorů

Prognostic markers of surgical treatment of malignant lung tumours

**MUDr. Martin Skála**

Plzeň 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného doktorského studijního programu v oboru chirurgie na Chirurgické klinice LF UK v Plzni.

**Uchazeč:** MUDr. Martin Skála  
Chirurgická klinika Fakultní nemocnice Plzeň  
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni

**Předseda oborové rady:** prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.,  
Chirurgická klinika Fakultní nemocnice Plzeň  
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni

**Školitel:** doc. MUDr. Josef Vodička, Ph.D.  
Chirurgická klinika Fakultní nemocnice Plzeň  
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni

**Konzultant:** MUDr. Vojtěch Kurfürst, Ph.D.  
Oddělení kardiochirurgie a hrudní chirurgie,  
Nemocnice České Budějovice

**Oponenti:** prof. MUDr. Čestmír Neoral, CSc.  
I. Chirurgická klinika Fakultní nemocnice v Olomouci  
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Doc. MUDr. Radek Kučera, Ph.D.  
Ústav farmakologie LF UK v Plzni  
Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu chirurgie se koná dne: 9. června 2021 ve: 13:00.

Místo obhajoby: Fakultní nemocnice v Plzni – Aula chirurgických oborů

Podpořeno výzkumným programem Univerzity Karlovy Progres Q39 a projektem institucionálního výzkumu MZČR – FNPI, 00669806.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

## Obsah

Abstrakt .....	- 4 -
1 Úvod.....	- 6 -
2 Hypotézy a cíle .....	- 7 -
3 Materiál a metodika .....	- 7 -
4 Výsledky .....	- 9 -
4.1 Hladina markerů mezi experimentální a kontrolní skupinou .....	- 9 -
4.2 ROC křivky pro jednotlivé markery.....	- 11 -
4.3 ROC křivka – multivariační analýza.....	- 13 -
4.4 Distribuce markerů podle velikosti tumoru – pT (podrobně) .....	- 14 -
4.5 Distribuce markerů podle velikosti – pT (stručné dělení).....	- 14 -
4.6 Distribuce markerů podle klinického stadia.....	- 14 -
4.7 Vztah markerů a celkového, resp. bezpříznakového přežití – OS.....	- 15 -
4.8 Distribuce markerů podle pohlaví (M vs. Z).....	- 16 -
4.9 Typ nádoru a stadium nádoru podle pohlaví.....	- 17 -
4.10 Distribuce markerů podle histologického typu nádoru .....	- 17 -
5 Diskuse.....	- 18 -
6 Závěry .....	- 19 -
7 Literatura.....	- 21 -
8 Publikace autora.....	- 23 -
8.1 Monografie a kapitoly v monografiích.....	- 23 -
8.2 Původní práce .....	- 23 -
8.2.1 Práce s IF .....	- 23 -
8.2.2 Recenzované práce .....	- 23 -
8.3 Přednášky .....	- 24 -

## Abstrakt

**Úvod:** Plicní karcinom je nejčastěji se vyskytující malignitou v dospělé populaci ve vyspělých zemích. Zvolení ideální strategie léčby plicního karcinomu je závislé na včasné diagnostice tohoto onemocnění, jelikož přežití a prognóza onemocnění jsou silně ovlivněny klinickým stadiem, ve kterém je léčba zahájena. Vedle konvenčních diagnostických metod lze diagnostiku doplnit a zpřesnit stanovením imunochemických markerů.

**Cíl:** Žádný z biomarkerů zatím nebyl vyhodnocen jako dostatečně specifický pouze pro jeden typ nádoru. V naší práci jsme se pokusili sestavit panel několika markerů, které by svou specifíčností mohly být užitečné jak ke zhodnocení prognózy, tak i k diagnostice nádorů, zejména v situacích, kdy nelze odebrat validní histologický vzorek. Dále jsme stanovovali souvislost mezi klinicko-patologickými parametry plicního karcinomu a hladinou imunochemických markerů a vliv hladiny imunochemických markerů na prognózu pacientů.

**Metodika:** Do naší studie bylo zařazeno 109 pacientů s plicním karcinomem a 109 osob s negativní onkologickou anamnézou v kontrolní skupině. Pacienti s plicním karcinomem byli operováni na Chirurgické klinice FN a LF UK v Plzni mezi 17. dubnem 2018 a 26. srpnem 2020. U každého pacienta byla stanovena hladina CEA, NSE, CYFRA 21-1, MonoTotal, IGF-1, proGRP a TPS. Náběry u pacientů s plicním karcinomem byly realizovány v den operace, týden po operaci a pak po 90 a 365 dnech. Poté byla hladina jednotlivých markerů statisticky analyzována v souvislosti s vybranými klinicko-patologickými faktory plicního karcinomu a s prognózou pacienta.

**Výsledky:** Hladina každého imunochemického markeru kromě TPS stanovaného v naší studii u pacientů s primárním plicním karcinomem byla statisticky signifikantně vyšší než u pacientů z kontrolní skupiny. V univariační analýze byly vytvořeny ROC křivky pro jednotlivé markery. Křivky všech markerů vyjma TPS byly statisticky signifikantní. Do multivariačního modelu pak byly zvoleny a zahrnuty ROC křivky markerů CYFRA 21-1, CEA a IGF-1. Tento model poskytl plochu pod křivkou  $AUC=0.7730$ . Dále jsme zjistili, že hladina CYFRA 21-1 a markeru MonoTotal signifikantně vzrůstá s klinickým stadiem i velikostí tumoru. Ve vztahu k prognóze byla zastižena statistická signifikance NSE, která vzrůstala před úmrtím, a hladiny CYFRA 21-1 a CEA, jež obě vzrůstaly před recidivou/progresí onemocnění. Epidermoidní plicní karcinom byl spojen se signifikantně vyšší hladinou CYFRA 21-1, plicní adenokarcinom naopak vykazoval statisticky signifikantně vyšší hladinu CEA. Souvislost mezi s hladinou imunochemických markerů a stavem lymfatických uzlin nebyla v naší studii prokázána.

**Závěr:** V naší studii se podařilo stanovit panel tří imunochemických markerů (CYFRA 21-1, CEA a IGF-1), jehož ROC křivka poskytuje  $AUC=0.7730$ . Hodnoty hladin imunochemických markerů v závislosti na klinicko-patologických faktorech plicního karcinomu se shodují s literárními údaji. Pouze hladina imunochemických markerů v závislosti na uzlinovém postižení shodu s dostupnou literaturou neprokázala.

## Summary:

**Introduction:** Lung cancer is the most common malignancy in adults in western countries. The ideal strategy of treatment depends on early diagnosis because the clinical stage strongly impacts the prognosis. Among conventional diagnostic methods, we can analyse immunochemical markers to make the diagnosis more precise.

**Aim:** None of the biomarkers has been evaluated sufficiently specific for one type of tumour. In our work, we tried to find a panel of immunochemical markers, which could be useful as well for the assessment of prognosis as for diagnosis. Especially in situations when taking a biopsy is impossible. The next aim of our study was to evaluate the context between clinical-pathological factors and the level of immunochemical markers and their influence on prognosis.

**Methods:** In our study, we classified 109 patients with lung carcinoma. In the control group were also 109 persons. All 109 patients with NSCLC underwent lung resection at the Department of Surgery of University hospital in Pilsen between 17th April 2018 and 26th August 2020. Blood samples were realized on the day of operation, one week after the operation and then on day 90 and day 365. Serum level of CEA, NSE, CYFRA 21-1, MonoTotal, IGF-1, proGRP and TPS were measured in each blood sample. Statistical analysis was carried out in the context of clinical-pathologic factors and prognosis of patients.

**Results:** The serum level of each immunochemical marker except TPS was statistically significantly higher in the experimental group than in the control group. ROC curves were created for each marker in the univariate analysis. ROC curves of each marker except TPS showed statistical significance. Markers CYFRA 21-1, CEA and IGF-1 were included in the multivariate model. This model provided AUC=0.7730. We ascertained that serum level of CYFRA 21-1 and MonoTotal were statistically significantly increased by clinical-stage and the size of the tumour. We found the statistical significance of the increasing level of NSE according to overall survival and level of CYFRA 21-1 and CEA to progression-free survival. Epidermoid carcinoma related to a statistically significantly higher level of CYFRA 21-1. On the contrary, lung adenocarcinoma showed a statistically significantly higher level of CEA. We did not prove the relation between immunochemical markers and nodal status in our study.

**Conclusion:** In our study, we proved the array of three immunochemical markers (CYFRA 21-1, CEA, IGF-1) of which the ROC curve provided AUC=0.7730. The dependency of the immunochemical markers on clinical-pathological factors conformed with data in the literature. Out of keeping with the available literature, we did not prove any dependency between the level of immunochemical markers and nodal status only.

# 1 Úvod

Plicní karcinom je podle nejnovějších studií nejčastěji se vyskytující nádor v západních zemích, který není pohlavně specifický. Plicní karcinom se pohybuje na prvním místě i ve statistice mortality [1, 2]. Česká republika se podle údajů studie GLOBOCAN 2008 drží na 12. místě ve výskytu plicního karcinomu. Západočeský a severočeský region pak platí v rámci naší republiky za místo s nejvyšší incidencí této malignity [3].

Prognóza a výsledky léčby však silně závisí na klinickém stadiu, v němž je plicní karcinom diagnostikován. U nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) se pětileté přežití pohybuje kolem 61 % ve stadiu I a II, kolem 35 % ve stadiu III a ve stadiu IV dosahuje 6 %. V případě malobuněčného plicního karcinomu je to pak 31 % ve stadiu I, 19 % ve stadiu II, 8 % ve stadiu III a 2 % v posledním – IV. – klinickém stadiu [4]. V poslední době je bohužel většina pacientů diagnostikována ve IV. klinickém stadiu, kdy jsou indikace chirurgické léčby velmi omezeny a rezervovány pouze pro úzké spektrum pacientů, podle dostupných dat je tento fakt způsoben zpřesněním diagnostiky, kdy do IV. stadia jsou nyní zařazeni převážně pacienti, kteří dříve neměli stadium specifikováno [5]. Nutno podotknout, že chirurgická resekce s dodržением podmínek onkologické radikality je dosud jediná modalita léčby s kurativním potenciálem. Tím se rozumí provedení minimálně lobektomie se systematickou disekcí mediastinálních uzlin. Pouze v případě léze opacity mléčného skla a léze charakteru *adenocarcinoma in situ* má anatomická segmentektomie ekvivalentní výsledky jako lobektomie [6, 7].

Vedle klasických diagnostických metod jako je odebrání anamnézy a nynějšího onemocnění, provedení grafických vyšetření a v indikovaných případech i bronchologických vyšetřovacích metod s odebráním biopsie můžeme diagnostický proces doplnit o laboratorní vyšetření imunochemických markerů.

Imunochemické markery jsou definovány jako molekuly, které jsou detekovatelné v organismu v souvislosti s malignitou. V naší práci jsme se věnovali tzv. solubilním markerům, které lze analyzovat z krve pacienta. Pro doplnění – další skupinou markerů jsou tzv. tkáňové, jež se vyskytují v buňkách či na jejich povrchu. Ideální nádorový marker by měl být produkován pouze maligními buňkami, být tkáňově specifický a měl by se vyskytovat ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách. Takový marker dosud nebyl objeven, jelikož hladina řady markerů je zvýšena i při benigních onemocněních, traumatech či při jaterní nebo renální insuficienci [8–15]. Pro docílení maximální výtěžnosti imunochemických markerů je potřeba držet se následujících indikací:

- pooperační follow-up,
- podezření na recidivu nemoci,
- volba onkologické léčby (biologická terapie)
- posouzení efektivity léčby.

Jako vhodné se jeví sestavit panel markerů, které by svou specifičností mohly být žitečné jak ke zhodnocení prognózy, tak i ke zpřesnění diagnostiky nádorů zejména v případech, kdy není možné odebrat validní vzorek [8, 16–18].

## 2 Hypotézy a cíle

**Prvním cílem** naší práce bylo zjistit, zda se liší hladina námi vybraných imunochemických markerů mezi skupinou pacientů s plicním karcinomem a skupinou s negativní onkologickou anamnézou.

**Druhým cílem** bylo stanovit jaká kombinace imunochemických markerů z našeho výběru poskytuje nejlepší senzitivitu a specifitu vyjádřenou jako AUC (plocha pod křivkou).

**Třetím cílem** bylo zjistit vztah mezi hladinou konkrétního imunochemického markeru a klinicko-patologickým faktorem (velikost tumoru, uzlinové postižení, stadium tumoru).

**Čtvrtým cílem** bylo prokázat, zda mají jednotlivé markery prediktivní hodnotu ve vztahu k celkovému (OS – overall survival) či bezpříznakovému přežití (DFS – disease-free survival).

**Pátým cílem** bylo najít vztah mezi pohlavím pacienta a hladinou markeru.

**Šestým cílem** naší práce bylo zjistit, zda histologický typ plicního karcinomu má vliv na hladinu imunochemických markerů.

## 3 Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 109 pacientů, kteří byli operováni na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice v Plzni mezi 17. dubnem 2018 a 26. srpnem 2020 pro plicní karcinom. Po seznámení pacienta s podrobnostmi studie a podepsání informovaného souhlasu byl realizován odběr krevních vzorků před operací, poté po týdnu od operace a dále 90. den a 365. den od operace.

Krevní vzorky byly zpracovány v laboratoři Oddělení imunochemické diagnostiky Fakultní nemocnice v Plzni. V následujícím seznamu jsou uvedeny konkrétní zvolené markery a metodika jejich stanovení:

- proGRP – elektro-chemiluminiscenční metoda,
- CEA – chemiluminiscenční metoda,
- CYFRA 21-1 – radioimunometrická metoda,
- MonoTotal – radioimunometrická metoda,
- IGF-1 – radioimunometrická metoda,
- NSE – chemiluminiscenční metoda,
- TPS – radioimunometrická metoda.

V následující tabulce 1 je v přehledu uvedena skladba našeho souboru.

Tabulka 1.: Deskripce souboru

	Četnost	Relativní počet (%)
<b>Pohlaví</b>		
Muž	66	60,55
Žena	43	39,45
<b>Celkem</b>	<b>109</b>	<b>100,00</b>

<b>Median věku (roky)</b>	<b>68,00</b>
---------------------------	--------------

<b>Histologie NSCLC</b>		
Adenokarcinom	54	49,54
Skvamózní karcinom	40	36,70
Ostatní	15	13,76
<b>Celkem</b>	<b>109</b>	<b>100,00</b>

<b>Typ operace</b>		
Lobektomie	94	86,24
Bi-lobektomie	9	8,26
Pneumonektomie	5	4,59
Segmentektomie	1	0,92
<b>Celkem</b>	<b>109</b>	<b>100,00</b>

<b>TNM klasifikace NSCLC</b>		
IA1	6	5,50
IA2	29	26,61
IA3	16	14,68
IB	13	11,93
IIA	6	5,50
IIB	18	16,51
IIIA	18	16,51
IIIB	3	2,75
<b>Celkem</b>	<b>109</b>	<b>100,00</b>

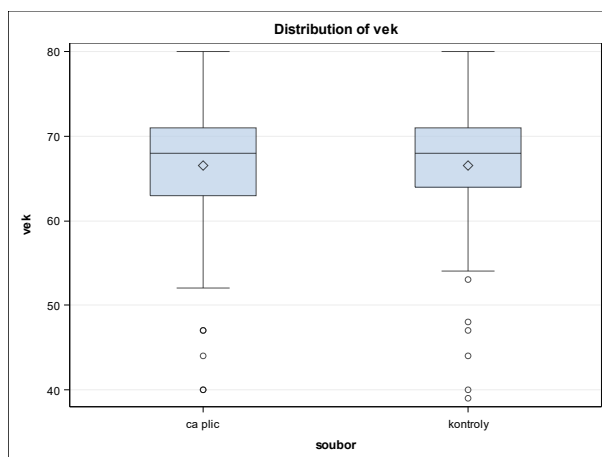
<b>Stav nitrohručních uzlin</b>		
průměrný počet odebraných uzlin	12	
N0	84	77,06
N1	13	11,93
N2	4	3,67
N1+N2	8	7,34
<b>Celkem</b>	<b>109</b>	<b>100,00</b>



## 4 Výsledky

V grafu 1 uvádíme přehled věkové rozvrstvení pacientů s plicním karcinomem a kontrolní skupiny. Rozdíl mezi oběma skupinami není významný ( $p=0.9829$ ). Proto obě skupiny můžeme srovnávat. V tabulce 2 je poté rozdělení pacientů v experimentální, resp. v kontrolní skupině podle pohlaví. I v tomto případě lze obě skupiny srovnávat, neboť rozdíl není statisticky signifikantní.

V dalším textu uvádíme pouze výsledky, které byly statisticky signifikantní. Kompletní výsledky, jejichž uvedení by několikanásobně přesáhlo rámec autoreferátu, jsou v disertační práci.



$p=0.9829$

Graf 1.: Srovnání skupin podle věku

Tabulka 2.: Srovnání skupin podle pohlaví

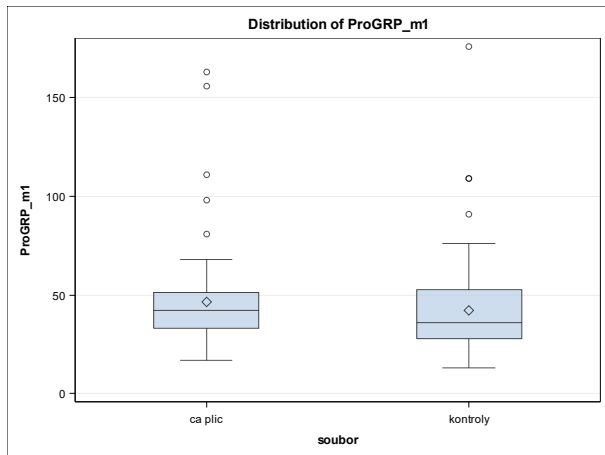
	Muži	Ženy	Celkem
<b>Karcinom plic</b>	66	43	109
<b>Kontrolní sk.</b>	68	41	109
<b>p-hodnota</b>	0.7808		

### 4.1 Hladina markerů mezi experimentální a kontrolní skupinou

V naší studii jsme prokázali statisticky významné rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou u všech stanovovaných markerů kromě TPS. Seřazené hodnoty statistické významnosti pro jednotlivé markery jsou následující:

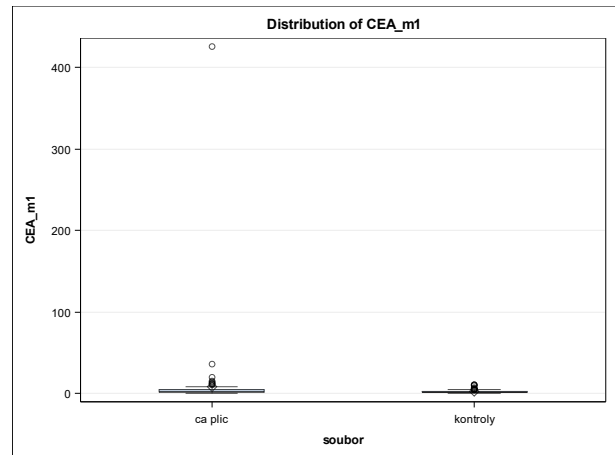
1. **CYFRA 21-1**  $p<0.0001$ ;
2. **CEA**  $p<0.0001$ ;
3. **IGF-1**  $p=0.0020$ ;
4. **MonoTotal**  $p=0.0065$ ;
5. **proGRP**  $p=0.0232$ ;
6. **NSE**  $p=0.0447$ .

Znázornění výsledků s hodnotami  $p$  je uvedeno v grafech 2 až 7.



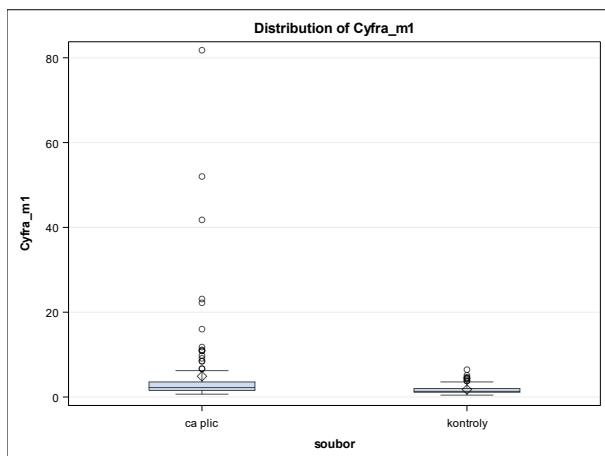
**Graf 2.: proGRP**

$p=0.0232$



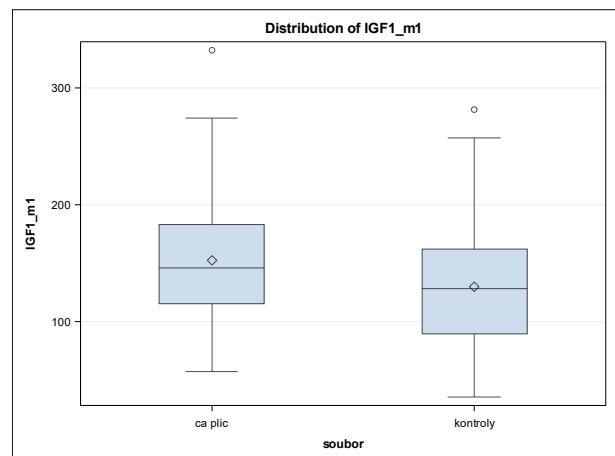
**Graf 3.: CEA**

$p<0.0001$



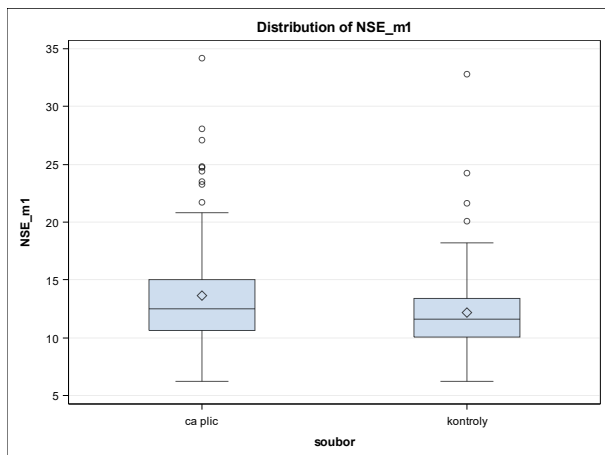
**Graf 4.: CYFRA 21-1**

$p<0.0001$



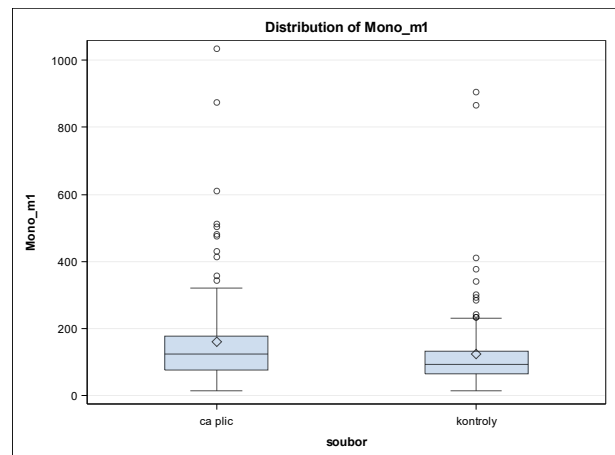
**Graf 5.: IGF-1**

$p=0.0020$



**Graf 6.: NSE**

$p=0.0447$



**Graf 7.: MonoTotal**

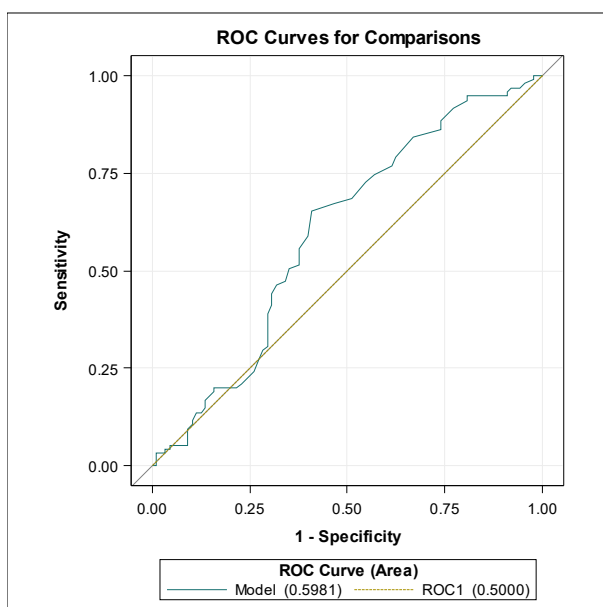
$p=0.0065$

## 4.2 ROC křivky pro jednotlivé markery

ROC křivky pro jednotlivé markery znázorňují grafy 8 až 13. Statistickou signifikanci mezi hypotetickou křivkou s  $AUC=0.5000$  a křivkou daného markeru jsme prokázali opět u všech markerů mimo TPS.

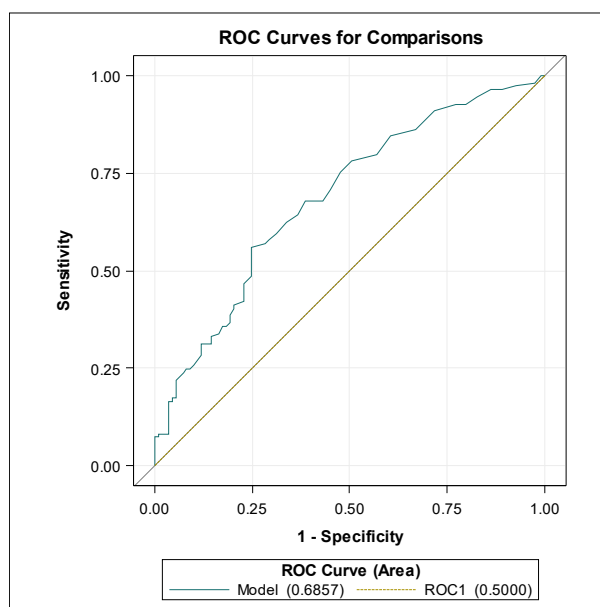
Seřazení markerů podle AUC křivky:

1. **CYFRA 21-1**  $p<0.0001$ ;
2. **CEA**  $p<0.0001$ ;
3. **IGF-1**  $p=0.0006$ ;
4. **MonoTotal**  $p=0.0195$ ;
5. **NSE**  $p=0.0225$ ;
6. **proGRP**  $p=0.0461$ .



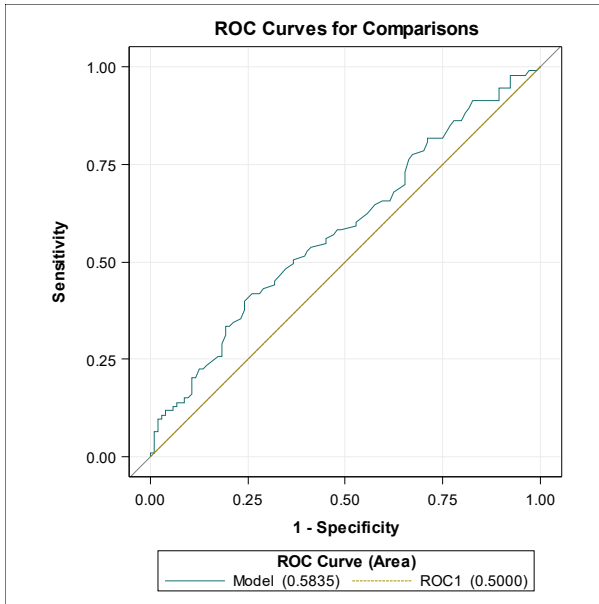
Graf 8.: proGRP

$p=0.0461$



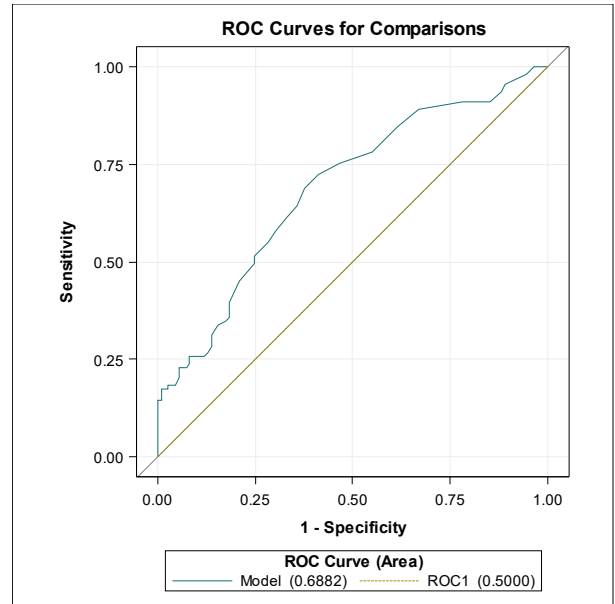
Graf 9.: CEA

$p<0.0001$



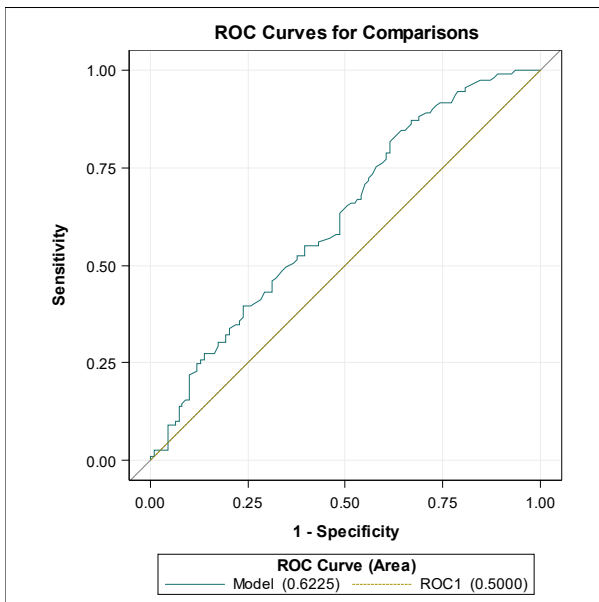
**Graf 10.: NSE**

$p=0.0225$



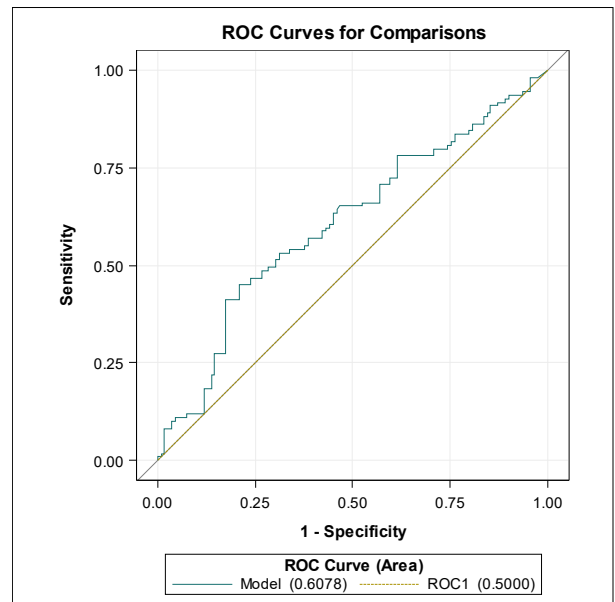
**Graf 11.: CYFRA 21-1**

$p<0.0001$



**Graf 12.: IGF-1**

$p=0.0006$



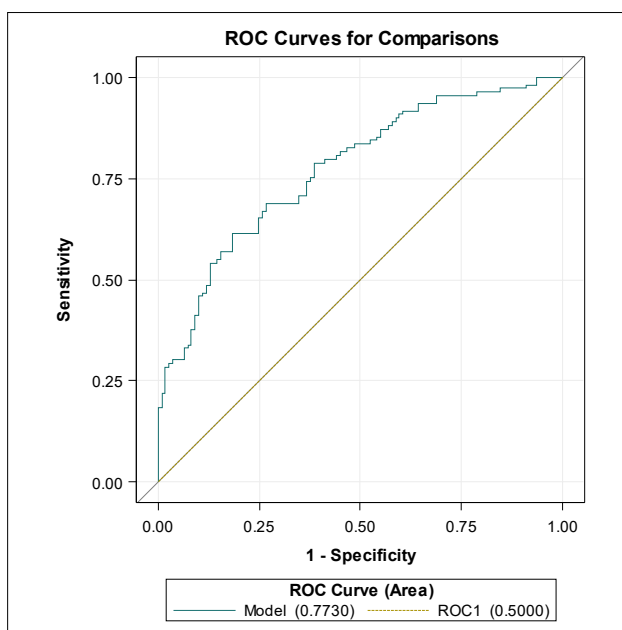
**Graf 13.: MonoTotal**

$p=0.0195$

### 4.3 ROC křivka – multivariační analýza

K markerům CEA a CYFRA 21-1, které měli nejmenší p-hodnotu ( $p < 0.0001$ ), a jejichž ROC křivky tedy byly statisticky nevícé signifikantní oproti hypotetické křivce s  $AUC=0.5000$ , jsme do multiparametrického modelu zahrnuli ještě IGF-1, kteréhož ROC křivka se statisticky významně lišila hypotetické křivky na hladině významnosti  $p=0.0006$ . Tento marker byl k CEA a CYFRA 21-1 vybrán i proto, že byl na ostatních markerech nejméně závislý podle Spearmanova korelačního koeficientu.

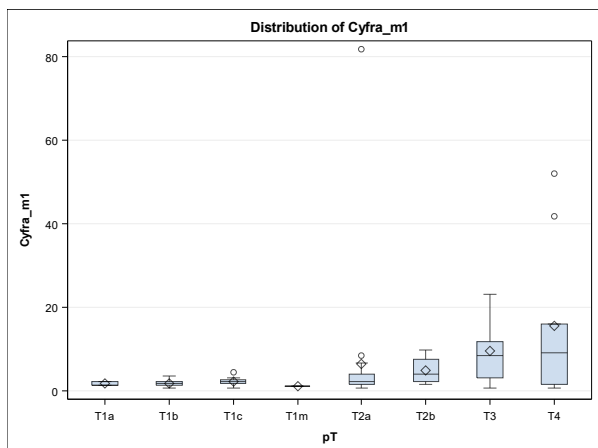
Výsledná křivka našeho multiparametrického modelu je znázorněna v grafu 14. Plocha pod křivkou je  $AUC=0.7730$ .



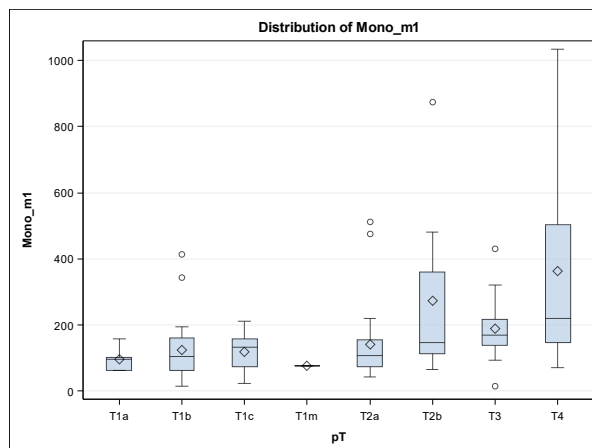
**Graf 14.:** ROC křivka – multivariační model  
 $AUC=0.7730$

#### 4.4 Distribuce markerů podle velikosti tumoru – pT (podrobně)

Ve vztahu k velikosti tumoru podle 8. edice TNM klasifikace poskytoval v naší studii statistickou signifikanci pouze markery CYFRA 21-1 a MonoTotal ( $p=0.0002$ , resp.  $p=0.0236$ ). Jejich hladina stoupá v závislosti na velikosti tumoru, ilustrace této závislosti je uvedena v grafech 15 a 16.



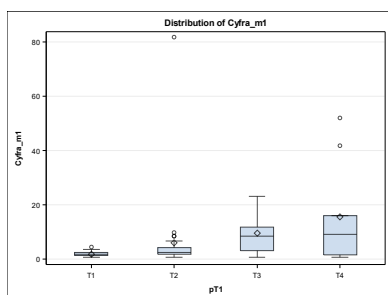
Graf 15.: CYFRA 21-1  
 $p=0.0002$



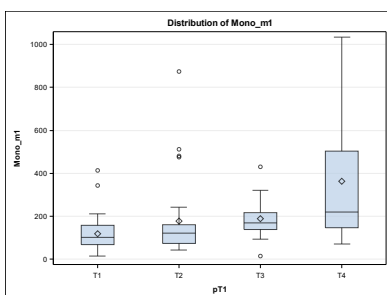
Graf 16.: MonoTotal  
 $p=0.0236$

#### 4.5 Distribuce markerů podle velikosti – pT (stručné dělení)

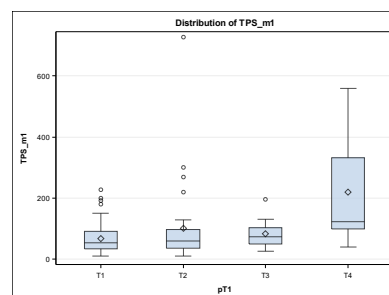
Pokud jsme ale použili stručné dělení podle velikosti tumoru ve smyslu T1, T2, T3 a T4, vyšel statisticky signifikantní k oběma výše zmíněným markerům ještě TPS. Grafy 17, 18 a 19 znázorňují závislost hladiny markeru CYFRA 21-1, MonoTotal a TPS na stručném dělení podle velikosti tumoru.



Graf 17.: CYFRA 21-1  
 $p<0.0001$



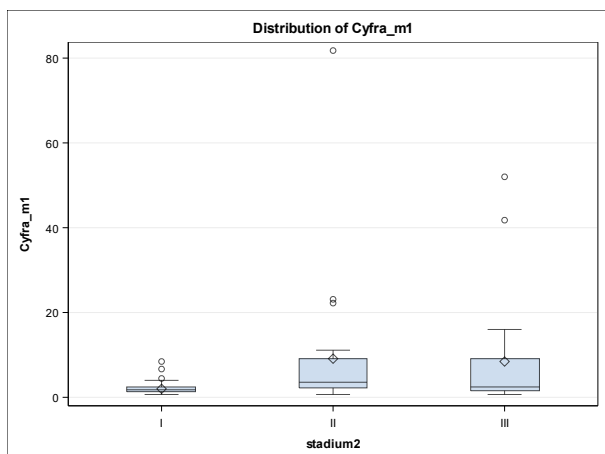
Graf 18.: MonoTotal  
 $p=0.0062$



Graf 19.: TPS  
 $p=0.0148$

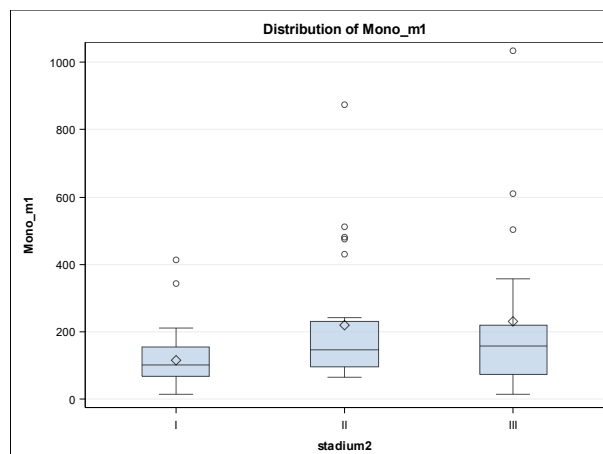
#### 4.6 Distribuce markerů podle klinického stadia

Pokud jde o závislost hladiny markeru na klinickém stadiu plicního karcinomu, našli jsme statistickou závislost pouze v případě markerů CYFRA 21-1 a MonoTotal ( $p<0.0001$ , resp.  $p=0.0063$ ). Tato skutečnost je ilustrována v grafech 20 a 21.



Graf 20.: CYFRA 21-1

$p < 0.0001$



Graf 21.: MonoTotal

$p = 0.0063$

#### 4.7 Vztah markerů a celkového, resp. bezpříznakového přežití – OS

K vyhodnocení vztahu celkového, resp. bezpříznakového přežití byl použit Coxův regresní model s časově závislými kovariátami. Podle tohoto modelu měla pro celkové přežití statistickou signifikanci pouze NSE, která před smrtí vzrůstala. V případě bezpříznakového přežití pak před progresí statisticky signifikantně stoupaly markery CEA a CYFRA 21-1. Údaje jsou zaznamenány v tabulkách 3 a 4. V našem souboru jsme však zaznamenali pouze 6 úmrtí a 26 progresí (tabulka 5 a 6).

	Parameter Estimate	p-hodnota
<b>TPS</b>	0.2980	0.5450
<b>MonoTotal</b>	0.8360	0.1639
<b>IGF-1</b>	-2.0865	0.0541
<b>CYFRA 21-1</b>	6.5091	0.1299
<b>NSE</b>	2.4112	<b>0.0125</b>
<b>CEA</b>	2.2113	0.1159
<b>proGRP</b>	-0.1098	0.8938

Tabulka 3.: Coxův regresní model – celkové přežití

	Parameter Estimate	p-value
<b>TPS</b>	-0.1110	0.6385
<b>MonoTotal</b>	0.2427	0.3827
<b>IGF-1</b>	-0.4750	0.3793
<b>CYFRA 21-1</b>	4.0521	<b>0.0453</b>
<b>NSE</b>	0.7320	0.2884
<b>CEA</b>	2.1546	<b>0.0082</b>
<b>proGRP</b>	0.4733	0.1163

Tabulka 4.: Coxův regresní model - bezpříznakové přežití

	Počet	Relativní počet
<b>Přežití</b>	103	94.5 %
<b>Úmrtí</b>	6	5.5 %

Tabulka 5.: Tabulka celkového přežití

	Počet	Relativní počet
<b>Bezpříznakové přežití</b>	83	76.15 %
<b>Progrese</b>	26	23.85 %

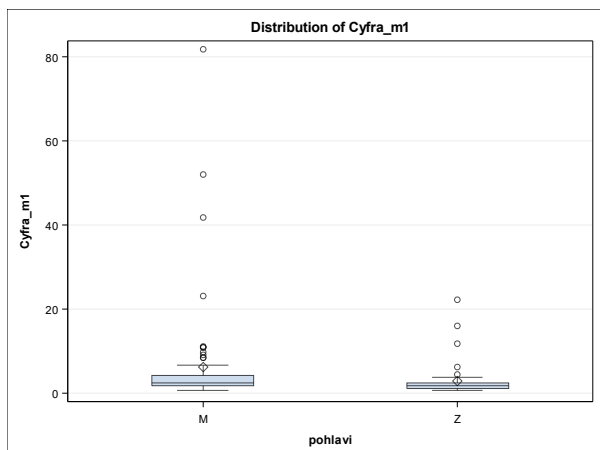
Tabulka 6.: Tabulka bezpříznakového přežití

#### 4.8 Distribuce markerů podle pohlaví (M vs. Z)

Při srovnání hladiny jednotlivých markerů podle pohlaví pacienta jsme našli statisticky signifikantní rozdíly v případě markerů:

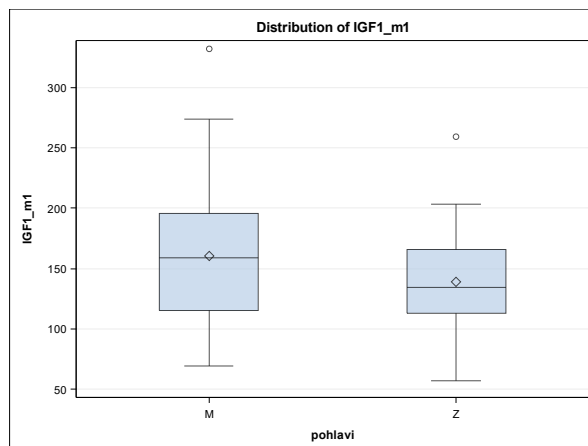
- **CYFRA 21-1**  $p=0.0051$ ;
- **TPS**  $p= 0.0137$ ;
- **MonoTotal**  $p=0.0290$ ;
- **IGF-1**  $p=0.0137$ .

Znázornění hladin je v grafech 22 až 25.



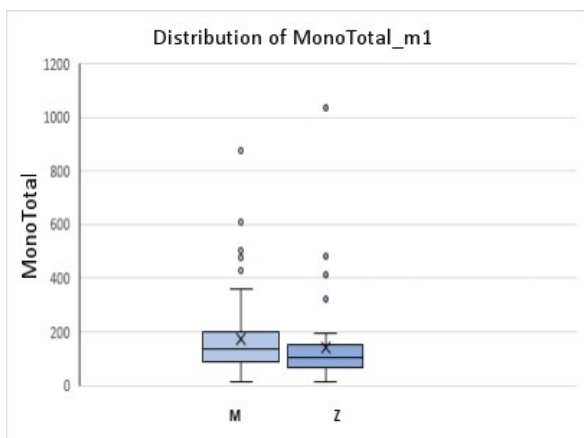
Graf 22.: CYFRA 21-1

$p=0.0051$



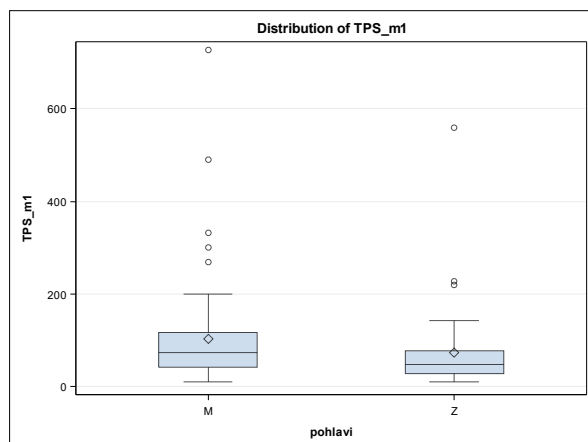
Graf 23.: IGF-1

$p=0.0464$



Graf 24.: MonoTotal

$p=0.0290$



Graf 25.: TPS

$p=0.0137$



#### 4.9 Typ nádoru a stadium nádoru podle pohlaví

V následujících tabulkách 7 a 8 je uvedeno rozvrstvení mužů a žen podle histologického typu a podle klinického stadia.

Stadium	Muži	Ženy	Součet
IA	24	27	51
	47.06 %	52.94 %	
IB	9	4	13
	69.23 %	30.77 %	
II	20	4	24
	83.33 %	16.67 %	
III	13	8	21
	61.90 %	38.10 %	
<b>Součet</b>	<b>66</b>	<b>43</b>	<b>109</b>
<b>Chi-kvadrát</b>		<b>p-hodnota</b>	
		0.0230	

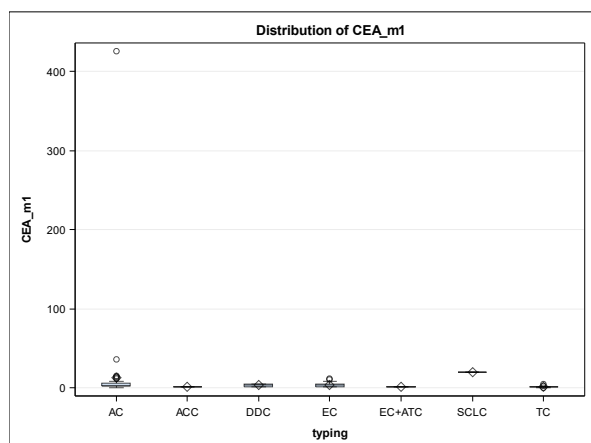
Tabulka 7.: Rozdělení pohlaví podle klinického stadia

Typ	Muži	Ženy	Součet
AC	26	28	54
	48.15 %	51.85 %	
ACC	1	0	1
	100 %	0 %	
DDC	2	0	2
	100 %	0 %	
EC	32	7	39
	82.05 %	17.95 %	
EC ATC	1	0	1
	100 %	0 %	
SCLC	0	1	1
	0 %	100 %	
TC	4	7	11
	36.36 %	63.64 %	
<b>Součet</b>	<b>66</b>	<b>43</b>	<b>109</b>
<b>Chi-kvadrát</b>		<b>p-hodnota</b>	
		0.0066	

Tabulka 8.: Rozdělení pohlaví podle histologického typu

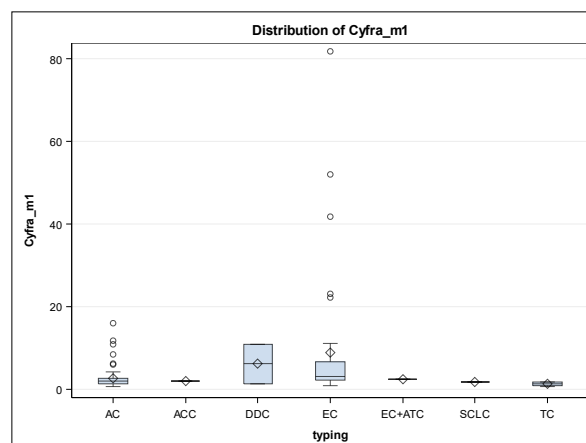
#### 4.10 Distribuce markerů podle histologického typu nádoru

Při analýze distribuce markerů podle histologického typu jsme v našem souboru našli statisticky signifikantní zvýšení hladiny CEA pro plicní adenokarcinom (graf 26) a hladiny CYFRA 21-1 pro plicní epidermoidní karcinom (graf 27).



Graf 26.: CEA

$p=0.0213$



Graf 27.: CYFRA 21-1

$p<0.0001$

## 5 Diskuse

V naší práci jsme se zaměřili na hladinu jednotlivých imunochemických markerů přítomných v krvi pacientů s plicním karcinomem. Ve studii bylo zařazeno celkem 109 pacientů s plicním karcinomem, jejichž hladiny imunochemických markerů byly srovnávány s hladinami markerů pacientů v kontrolní skupině. Podle Wilcoxonova dvouvýběrového testu se experimentální a kontrolní skupina nelišila ani podle věku ani podle pohlaví – rozdíly nebyly významné. Obě skupiny tedy můžeme vzájemně porovnávat. Pro úplnost je nutné uvést, že z provozních důvodů laboratoře bylo proGRP stanoveno pouze u 95 pacientů z experimentální skupiny a u 88 pacientů z kontrolní skupiny. V případě NSE byla analýza vzorků provedena u 93 pacientů z experimentální skupiny a 104 pacientů z kontrolní skupiny. Ostatní markery pak již byly stanoveny u všech 109 pacientů jak z experimentální skupiny, tak z kontrolní skupiny.

Při porovnávání předoperační hladiny všech imunochemických markerů kromě mezi experimentální a kontrolní skupinou kromě TPS byly podle Wilcoxonova dvouvýběrového testu zjištěny statisticky významné rozdíly. Můžeme tedy říct, že hladina každého imunochemického markeru mimo TPS u pacientů s primárním plicním karcinomem byla statisticky signifikantně vyšší než u pacientů z kontrolní skupiny. Tento výsledek byl ve shodě s již provedenými studiemi [8, 19–26].

K vykreslení ROC křivek a vypočtení plochy pod křivkou (AUC) byl použit Mann-Whitney test. V univariační analýze vyšly opět křivky pro téměř všechny markery statisticky významné. Pouze TPS neposkytl statistickou významnost. Významnost klesala od v následující řadě: CYFRA 21-1 > CEA > IGF-1 > MonoTotal > NSE > proGRP. Nejlepší výsledky poskytují CYFRA 21-1 a CEA. Plocha pod křivkou je u CYFRA 21-1 mírně vyšší než u CEA, avšak v klinicky nejzajímavější oblasti kolem 90-95% specificity poskytuje podle ROC křivky lepší výsledky CEA.

Do multivariačního modelu byly pak vybrány tři nejlépe vycházející markery v pořadí: CYFRA 21-1 > CEA > IGF-1. IGF-1 byl vybrán mimo jiné proto, že s žádným s ostatních markerů nekoreloval statisticky významně (podle Spearmannova korelačního koeficientu). Po vymodelování ROC křivky v multivariační analýze pro výše uvedené markery byla plocha pod křivkou 0.7730. To znamená, že při kombinaci těchto tří markerů správně zachytíme 77,3 % pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem. Dále z ROC křivky plyne, že kolem 90-95% specificity se senzitivita blíží ke 100 %. Kombinací těchto tří markerů se nám podařilo navrhnout panel markerů vhodný jako doplňující vyšetření při diagnostice NSCLC. Tato kombinace zatím nebyla v literatuře popsána.

Pro zjištění distribuce markerů podle velikosti tumoru byli pacienti rozřazeni do skupin podle parametru T. Bylo použito jednak podrobné dělení podle nejnovější tj. 8. edice TNM klasifikace a jednak také stručnější dělení ve smyslu T1, T2, T3 a T4. V případě podrobného dělení jsou rozdíly v hladinách markeru mezi jednotlivými kategoriemi velikosti tumoru statisticky signifikantní pouze u CYFRA 21-1 ( $p=0.0002$ ) a u MonoTotal ( $p=0.0236$ ). Očekávaně hladiny markeru rostou s velikostí tumoru. Ke hladině statistické signifikance se blíží TPS ( $p=0.0526$ ), nicméně nedosahuje ji. Pokud však vezmeme v potaz stručné dělení pouze na 4 kategorie, vychází rozdíly mezi jednotlivými skupinami statisticky signifikantně nejen u CYFRA 21-1 ( $p<0.0001$ ) a u MonoTotal ( $p=0.0062$ ), nýbrž i u TPS ( $p=0.0148$ ). Naše výsledky se tedy shodují s výsledky studií uvedených v dostupných publikacích [20–22, 26].

V naší studii se nepodařilo prokázat vztah hladiny imunochemického markeru a stavu lymfatických uzlin ve smyslu N0, N1 a N2 ani v jednom případě. Nejvíce se statistické významnosti blížil marker NSE ( $p=0.0583$ ), avšak nedosáhl ji. V dostupných studiích

týkajících se uzlinového stavu u pacientů s plicním karcinomem však vycházela statisticky signifikantně CYFRA 21-1 [20, 21].

Podle publikovaných prací je hladina markerů CYFRA 21-1 a MonoTotal závislá na klinickém stadiu [18, 20–22]. V naší studii jsme tento fakt potvrdili, jelikož hladina markerů CYFRA 21-1 a MonoTotal statisticky signifikantně vzrůstala v závislosti na klinickém stadiu ( $p < 0.0001$ , resp. 0.0063). Při prezentování těchto výsledků je ale nutné vzít v úvahu, že klinické stadium je mimo metastatického rozsevu (parametr M) hodnoceno ještě podle velikosti tumoru (parametr T) a postižení uzlin (parametr N), kteréžto parametry jsme analyzovali zvlášť. Dále je potřeba počítat s tím, že v našem souboru se nevyskytovali pacienti ve IV. klinickém stadiu, neboť tyto pacienti nebyli indikováni k chirurgické léčbě.

Pro testování závislosti hladiny markeru na celkovém přežití (OS) jsme použili Coxův regresní model s časově závislými kovariátami, kde kovariátou je nádorový marker opakovaně měřený v čase. Testovali jsme, zda určitý marker stoupal či klesal před úmrtím. Podle tohoto testu statisticky signifikantně před úmrtím stoupal pouze NSE ( $p = 0.0125$ ). K hladině statistické signifikance se pak blížil ještě IGF-1 ( $p = 0.0541$ ). K těmto výsledkům však je nutné přistupovat s určitou rezervou, neboť úmrtí bylo v našem souboru pouze 6.

Stejný model byl použit i u hodnocení bezpříznakového přežití (DFI). V naší experimentální skupině jsme zaznamenali 26 pacientů, kteří po operaci dospěli k progresi onemocnění. Jako progrese onemocnění byly hodnocena recidiva nebo úmrtí v souvislosti s plicním karcinomem. Statisticky významně před progresí vzrostla hladina CEA a CYFRA 21-1 ( $p = 0.0082$ , resp.  $p = 0.0453$ ).

Výsledky celkového a bezpříznakového přežití jsou však jistě ovlivněny situací spojenou s pandemií COVID-19, jelikož se nedařilo u všech pacientů zajistit náběr v den 90 resp. 365 ať již z důvodu uzavření zdravotnických zařízení či strachu z nákazy při návštěvě zdravotnického zařízení za účelem náběru krve.

Dále byl stanoven vztah jednotlivých imunochemických markerů a pohlaví pacientů. Statisticky významný rozdíl byl prokázán u CYFRA 21-1, IGF-1, MonoTotal a TPS ( $p = 0.0051$ ,  $p = 0.0464$ ,  $p = 0.0290$ , resp.  $p = 0.0137$ ), kdy u mužů je vždy vyšší hladina než u žen. Avšak k rozdílům v hladinách markerů mezi jednotlivými pohlavími je nutno přistupovat s rezervou, neboť u mužů byla v naší studii statisticky signifikantně častěji prokazována vyšší stadia, a i distribuce různých typů nádorů se statisticky signifikantně lišila. U mužů byl totiž výrazně častěji než u žen prokázán epidermoidní karcinom. Tato statistika je také ovlivněna distribucí markerů podle typu nádoru. Statisticky významně právě vychází vyšší hladina CYFRA 21-1 ( $p < 0.0001$ ) u epidermoidního karcinomu, což se shoduje s dostupnou literaturou [20, 21]. Naopak u adenokarcinomů vyšla v naší studii statisticky významně vyšší hladina CEA ( $p = 0.0213$ ).

## 6 Závěry

V naší studii se podařilo prokázat:

- Hladina každého imunochemického markeru kromě TPS (proGRP, CEA, NSE, CYFRA 21-1, MonoTotal, IGF-1) stanovaného v naší studii u pacientů s primárním plicním karcinomem byla statisticky signifikantně vyšší než u pacientů z kontrolní skupiny.
- AUC pro ROC křivky byla v univariační analýze statisticky signifikantní pro CYFRA 21-1 > CEA > IGF-1 > MonoTotal > NSE > proGRP (v tomto pořadí).
- V multivariačním modelu byly použity pro modelaci ROC křivky CYFRA 21-1 > CEA > IGF-1. Tato kombinace poskytuje AUC=0.7730, čímž jsme vytvořili novou kombinaci markerů ke zpřesnění diagnostiky NSCLC.

- Hladina CYFRA 21-1 a MonoTotal statisticky signifikantně vzrůstala s velikostí tumoru podle 8. edice TNM klasifikace.
- Hladina CYFRA 21-1 i MonoTotal vzrůstala statisticky signifikantně v závislosti na klinickém stadiu NSCLC.
- Před úmrtím vzrostla hladina NSE statisticky významně (hodnocení OS).
- Recidiva byla předznamenána statisticky významným nárůstem hladiny CEA a CYFRA 21-1 (hodnocení DFI).
- Epidermoidní (skvamózní) plicní karcinom je spojen se statisticky signifikantně vyšší hladinou CYFRA 21-1.
- U plicního adenokarcinomu byla statisticky signifikantně vyšší hladina CEA.
- Souvislost stavu uzlin s elevací hladiny imunochemického markeru nebyla prokázána.

## 7 Literatura

1. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*. 2019;85(1):8. doi:10.5334/aogh.2419
2. Neal RD, Sun F, Emery JD, Callister ME. Lung cancer. *BMJ*. Published online June 3, 2019;11725. doi:10.1136/bmj.11725
3. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. <http://www.svod.cz>. Published 2005. Accessed March 2, 2020. <https://svod.cz/>
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34. doi:10.3322/caac.21551
5. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237. doi:10.1093/annonc/mdy275
6. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28:iv1-iv21. doi:10.1093/annonc/mdx222
7. Rami-Porta R, Tsuboi M. Sublobar resection for lung cancer. *Eur Respir J*. 2009;33(2):426-435. doi:10.1183/09031936.00099808
8. Topolcan O, Kaušitz J, Karlíková M, Svobodova S. Biomarkery v onkologii. Published online 2014. [https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery\\_v\\_onkologii.pdf](https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery_v_onkologii.pdf)
9. Kim K-N, Joo N-S, Je S-Y, et al. Carcinoembryonic Antigen Level Can be Overestimated in Metabolic Syndrome. *J Korean Med Sci*. 2011;26(6):759. doi:10.3346/jkms.2011.26.6.759
10. Xu L, Lina W, Xuejun Y. The diagnostic value of serum CEA, NSE and MMP-9 for on-small cell lung cancer. *Open Med*. 2016;11(1). doi:10.1515/med-2016-0012
11. Dong A, Zhang J, Chen X, Ren X, Zhang X. Diagnostic value of ProGRP for small cell lung cancer in different stages. *J Thorac Dis*. 2019;11(4):1182-1189. doi:10.21037/jtd.2019.04.29
12. Dumesny C, Patel O, Lachal S, Giraud AS, Baldwin GS, Shulkes A. Synthesis, Expression and Biological Activity of the Prohormone for Gastrin Releasing Peptide (ProGRP). *Endocrinology*. 2006;147(1):502-509. doi:10.1210/en.2005-0574
13. Stockley RA, Shaw J, Whitfield AG, Whitehead TP, Clarke CA, Burnett D. Effect of cigarette smoking, pulmonary inflammation, and lung disease on concentrations of carcinoembryonic antigen in serum and secretions. *Thorax*. 1986;41(1):17-24. doi:10.1136/thx.41.1.17

14. Paul D, Biswas R, Habib SH. Tissue Polypeptide Specific Antigen as a Marker Used to Determine the Liver Diseases. *Kathmandu Univ Med J.* 2012;9(1):24-27. doi:10.3126/kumj.v9i1.6257
15. Yamaguchi K, Abe K, Kameya T, et al. Production and molecular size heterogeneity of immunoreactive gastrin-releasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. *Cancer Res.* 1983;43(8):3932-3939.
16. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem.* 2002;48(8):1151-1159.
17. Boyer M, Tsao M-S, Jänne P, Ramalingam S, Pitman Lowenthal S, Alam M. Preparing for tomorrow: Molecular diagnostics and the changing nonsmall cell lung cancer landscape: Nonsmall cell lung cancer landscape. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2014;10:2-10. doi:10.1111/ajco.12189
18. Bates J, Rutherford R, Divilly M, et al. Clinical value of CYFRA 21.1, carcinoembryonic antigen, neurone-specific enolase, tissue polypeptide specific antigen and tissue polypeptide antigen in the diagnosis of lung cancer. *Eur Respir J.* 1997;10(11):2535-2538. doi:10.1183/09031936.97.10112535
19. Xu C-M, Luo Y-L, Li S, et al. Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Biosci Rep.* 2019;39(11):BSR20192732. doi:10.1042/BSR20192732
20. He Y, Cui Y, Chang D, Wang T. Postoperative CYFRA 21-1 and CEA as prognostic factors in patients with stage I pulmonary adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(42). doi:10.18632/oncotarget.17611
21. Molina R, Agusti C, Filella X, et al. Study of a new tumor marker, CYFRA 21-1, in malignant and nonmalignant diseases. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 1994;15(6):318-325. doi:10.1159/000217908
22. 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;31(9):3107-3112.
23. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2006;1766(1):23-41. doi:10.1016/j.bbcan.2006.01.003
24. Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X. Plasma Levels of Insulin-Like Growth Factor-I and Lung Cancer Risk: a Case-Control Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1999;91(2):151-156. doi:10.1093/jnci/91.2.151
25. Zhang M, Li X, Zhang X, Yang Y, Feng Z, Liu X. Association of serum hemoglobin A1c, C-peptide and insulin-like growth factor-1 levels with the occurrence and development of lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(4):506-508. doi:10.3892/mco.2014.289
26. Kornek G, Schenk T, Raderer M, Djavarnmad M, Scheithauer W. Tissue polypeptide-specific antigen (TPS) in monitoring palliative treatment response of patients with gastrointestinal tumours. *Br J Cancer.* 1995;71(1):182-185. doi:10.1038/bjc.1995.37

## 8 Publikace autora

### 8.1 Monografie a kapitoly v monografiích

Tonar Z., Eberlová L., Polívka J., Daum O., Witter K., Králíčková A., Gregor T., Nedorost L., Kochová P., Rohan E., Kalusová K., Pálek R., Skála M., Glanc D., Králíčková M., Liška V.: **Stereological methods for quantitative assessment of hepatic microcirculation.** Accepted for publication. - In: Méndez-Villas A. (Ed): Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Microscopy Book Series - 2012 Edition. Formatex Research Centre, Badajoz, Spain. ISBN 978-84-939843-6-6.

### 8.2 Původní práce

#### 8.2.1 Práce s IF

Brůha J., Vyčítal O., Tonar Z., Mírka H., Haidingerová L., Beneš J., Pálek R., Skála M., Třeška V., Liška V.: **Monoclonal antibody against transforming growth factor beta 1 does not influence liver regeneration after resection in large animal experiment.** *In Vivo.* 2015 May-Jun;29(3):327-40. IF 0.832

Krizkova V, Dubova M, Susova S, Vycital O, Bruha J, Skála M., Liska V, Daum O, Soucek P.: **Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(3):595-603. doi:10.1007/s00280-016-3114-7. IF 2.737

EberlovaL, Liska V, Mírka H, Gregor T, Tonar Z, Palek R, Skála M., Bruha J, Vycital O, Kalu sova K, Haviar S, Kralickova M, Lametschwandtner A.: **Porcine liver vascular bed in Biodur E20 corrosion casts.** *Folia Morphol (Warsz).* 2016;75(2):154-161. doi:10.5603/FM.a2015.0094 IF 0.469

Třeška V, Skála M., Procházková K, Švejsová A, Petráková T, Šebek J, Říha I, Rosendorf J, Polák R, Skalický T, Liška V.: **Long-term Results of Surgery for Colorectal Liver Metastases in Terms of Primary Tumour Location and Clinical Risk Factors.** *In Vivo.* 2020 Sep-Oct;34(5):2675-2685. IF 1.541

Vodička J, Fichtl J, Šebek J, Procházková K, Skála M., Třeška V, Kormunda S, Vaňková B, Svatoň M, Topolčan O, Kučera R.: **Outcomes and Prognostic Factors Following Surgical Treatment of Pulmonary Metastases from Colorectal Carcinoma.** *Anticancer Res.* 2020 Dec;40(12):7045-7051. IF 1.994

Vodička J, Pešta M, Kulda V, Houfková K, Vaňková B, Šebek J, Skála M., Fichtl J, Procházková K, Topolčan O.: **Prognostic Significance of Lymph Node Examination by the OSNA Method in Lung Cancer Patients-Comparison with the Standard Histopathological Procedure.** *Cells.* 2020 Dec 4;9(12):2611. IF 4.829

#### 8.2.2 Recenzované práce

Liška V, Emingr M, Skála M., Pálek R, Troup O, Novák P, Vyčítal O, Skalický T, Třeška V.: **Jaterní metastázy karcinomů kolon a rekta z pohledu rozdílů v klinických**

**parametrech [Liver metastases from colon and rectal cancer in terms of differences in their clinical parameters].** *Rozhl Chir.* 2016;95(2):69-77.

Šafránek J, Třeška V, Skalický T, Špidlen V, Doležal J, Kubačková D, Zeithaml J, Skála M, Hošek P.: **Karcinom štítné žlázy, desetiletý soubor [Thyroid carcinoma, ten-years file].** *Rozhl Chir.* 2016;95(11):394-397.

Třeška V, Skalický T, Liška V, Fichtl J, Brůha J, Skála M, Šebek J, Duras P.: **Hemangiomy jater – kdy indikovat invazivní léčbu? [Liver hemangiomas – when is invasive treatment indicated?].** *Rozhl Chir.* 2017;96(4):151-155.

Skála M, Liška V, Třeška V.: **Mesenteric diverticuli as a reason of acute abdomen. Mezenteriální divertikly tenkého střeva jako příčina náhlé příhody břšní.** *Rozhl Chir.* 2019;98(1):27-30.

### **8.3 Přednášky**

Skála M., Gregor T., Pálek R., Glanc D., Králíčková A., Králíčková M.: **Macro- and micro-CT analysis of porcine liver microvascular corrosion.** 6th International Student Medical Congress Košice. 25.-27. červen 2014, Košice.

Skála M., Geiger J., Vodička J., Třeška V.: **Opakované polknutí cizích předmětů u pacientky se schizofrenií – kazuistika.** XX. Dny mladých chirurgů, 18. - 19.6.2018

Skála M., Šebek J., Šafránek J., Geiger J., Andrlé P., Židková A., Martínek J., Třeška V., Vodička J.: **Diagnostika a léčba akutní mediastinitidy ve FN Plzeň.** XIX. Dni mladých chirurgů, Bratislava, 6.-7. června 2019

Skála M., Třeška V.: **Byla to obstipace? XIII.** Pracovní den Sekce mladých chirurgů ČCHS ČLS JEP, Plzeň, 11.12.2019

Skála M., Vodička J., Šebek J., Třeška V, Fichtl J, Procházková K, Vaňková B, Topolčan O, Pecen L, Kučera R.: **The role of serum tumour markers in the detection of lung cancer.** CELCC 2020, 27. – 29. listopad 2020, Praha – *oceněno děleným prvním místem v sekci posterů*