

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



MUDr. Alan Sutnar

**BIOCHEMICKÉ MARKERY
U PRIMÁRNÍCH A SEKUNDÁRNÍCH
TUMORŮ JATER – VLIV NA VÝSLEDKY
RESEKČNÍ LÉČBY**

Disertační práce

Chirurgická klinika LF UK v Plzni

2007

Poděkování

Rád bych poděkoval všem osobám, bez jejichž přispění by tato práce nemohla vzniknout. Svému školiteli **Prof. MUDr. V. Třeškovi, DrSc.**, za poskytnutí námětu, odborné vedení a za cenné rady v průběhu práce.

Mgr. M. Peštovi, Ph.D., a **MUDr. L. Holubcovi, Ph.D.**, za odborné vedení laboratorní části práce.

Doc. T. Skalickému, Ph.D., **MUDr. V. Liškovi** a **Prof. MUDr. O. Topolčanovi, CSc.**, děkuji za pomoc při hodnocení klinických dat.

Ing. S. Kormundovi děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Obsah

1 Seznam zkratk	5
2 Úvod	7
3 Současný stav problematiky	9
3.1 Primární nádory jater	9
3.1.1 Etiopatogeneze	9
3.2 Sekundární nádory jater	10
3.2.1 Angiogeneze a metastazování	11
3.2.2 Prognostické faktory přežití	14
3.3 Nádorové markery obecně	16
3.3.1 Přehled současně používaných nádorových markerů	18
3.3.2 Charakteristiky vybraných markerů nejčastěji využívaných u primárních či sekundárních nádorů jater	19
3.4 Matrixové metaloproteinázy	24
3.5 Symptomatologie u primárních a sekundárních nádorů jater	29
3.6 Diagnostika	29
3.7 Léčba	31
3.7.1 Jaterní resekce	33
3.7.2 Abláční metody	35
3.7.3 Onkologická léčba	36
4 Cíl práce	38
5 Soubor nemocných	39

5.1 Charakteristika jednotlivých skupin	40
6 Metodika	41
6.1 Detekce mRNA MMP a TIMP ve tkáňových vzorcích pomocí RT-PCR	41
6.2 Detekce MMP a TIMP v periferní krvi v séru	42
6.3 Statistické zpracování	43
7 Výsledky	45
7.1 Výsledky tkáňových vzorků	45
7.2 Výsledky sérových vzorků	49
7.2.1 Stanovení normálu	49
7.2.2 Benigní onemocnění jater – ložiskové procesy jater	51
7.2.3 Resekční výkony při metastatickém procesu KRK	53
7.3 Porovnání sérových vzorků ve vztahu k DFI a OS	55
7.3.1 Celkové přežití	59
7.3.2 DFI	59
7.4 Výsledky porovnání sérových a tkáňových vzorků	59
7.5 Klinická korelace jednotlivých onkomarkerů	60
8 Diskuze	62
9 Závěry	71
10 Literatura	72
11 Publikace autora	80
12 Přílohy	86

1 Seznam zkratek

AFP	Alfa-fetoprotein
CA 19-9	Mucinózní antigen CA 19-9
CEA	Karcinoembryonální antigen
CHT	Chemoterapie
CK20	Fragment cytokeratininu 20
CLM	Colorectal liver metastases - metastázy kolorektálního karcinomu
CT	Computed tomography - výpočetní tomografie
CTC	Circulating tumor cells - cirkulující nádorové buňky
CUSA	Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator - ultrazvukový disektor
CYFRA	Fragment cytokeratininu 19
DDŽ	Dolní dutá žíla
DFI	Disease free interval – bezpříznakové přežití
GAPDH	Glyceraldehyd-fosfát-dehydrogenáza
HCC	Hepatocelulární karcinom
KRK	Kolorektální karcinom
MMP	Matrix metalloproteinázy
MR	Magnetická rezonance
OS	Overall survival – celkové přežití
PET	Positronová emisní tomografie
PVE	Portal vein embolization - embolizace portální žíly
RFA	Radiofrekvenční ablace
ROC	Receiving operative curves
RT	Reverzní transkripce
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction - RT polymerázová řetězová reakce

THVE	Totální vaskulární hepatální exkluze
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases - tkáňový inhibitor metaloproteináz
TK	Thymidinkináza
TPA	Tkáňový polypeptidový antigen
TPS	Tkáňový specifický polypeptidový antigen
USG	Ultrasonografie

2 Úvod

V naší společnosti bohužel stále vzrůstá počet nádorových onemocnění. Za posledních 15 let jsme zaznamenali také významný nárůst primárních a sekundárních malignit jaterního parenchymu. Z primárních tumorů je zde nejvíce zastoupen hepatocelulární karcinom (HCC). Ze sekundárních jsou to metastázy kolorektálního karcinomu (CLM), které tvoří kolem 70-75 % všech jaterních metastáz. Česká republika je stále na jednom z prvních míst na světě v incidenci kolorektálního karcinomu (KRK). Až 60 % nemocných s KRK je postiženo metastázami jater. U 30 % jsou diagnostikovány již při primární operaci KRK, u zbývajících 30 % nemocných jsou, přes odstranění primárního nádoru, diagnostikovány jaterní metastázy v průběhu následujících 5 let po této operaci.

Na léčbě nemocných s tumory jater se podílí z největší části chirurg a onkolog. Léčebný postup závisí na rozsahu onemocnění. Pokud je příhodný lokální nález, je přistoupeno k primárnímu chirurgickému výkonu a následně nemocný podstoupí chemoterapii (CHT). V případě nepříznivého nálezu je indikována nejprve neoadjuvantní onkologická léčba (chemoterapie systémová či lokoregionální), a pokud dojde ke zlepšení lokálního nálezu, následuje v druhé době chirurgický výkon. Stadium onemocnění však může být tak pokročilé, že nepřipouští chirurgický výkon a nemocní jsou dále léčeni onkologem paliativní chemoterapií. Díky oběma oborům a rozvoji nových technických i medicínských přístupů je i u takto závažných onemocnění prodlužována délka života a zlepšována jeho kvalita.

Další cestou, k prodlužování délky života, by bylo včasné odhalování agresivnějších nádorů, u kterých je pravděpodobné časnější metastazování a riziko jejich recidivy je vyšší. Pro tento účel by mohly být využity nádorové markery, a to jak klasické (např. CEA, AFP), tak nově zkoumané.

Záměrem této práce bylo pokusit se o využití jak stávajících, tak nových nádorových markerů (matrixových metaloproteináz a jejich inhibitorů) pro včasnou detekci recidivy onemocnění jaterními metastázami kolorektálního karcinomu u nemocných po chirurgické léčbě. To by vedlo k eliminaci pokročilých, chirurgicky neřešitelných nálezů, a tím ke zlepšení kvality a prodloužení délky života nemocných.

3 Současný stav problematiky

3.1 Primární nádory jater

Nejčastějším primárním maligním nádorem jater je hepatocelulární karcinom (HCC), který tvoří až 80 % primárních nádorů jater. Ve zbylých 20 % jsou zastoupeny cholangiocelulární karcinom, smíšený hepatocholangiocelulární karcinom a vzácně angiosarkom, hemangioendoteliom a cystadenokarcinom.

V Evropě patří HCC mezi vzácnější nádory s incidencí 2 : 100 000 obyvatel. Postihuje především muže v poměru 4-8 : 1. Je pro něho typické, že v časných stádiích se chová jako pomalu rostoucí a dobře diferencovaný nádor. Během krátké doby je však schopen přejít k růstu rychlému a zvrhnout se na nádor s nízkým stupněm diferenciací, který tvoří velmi záhy ve svém okolí další ložiska. V takovém případě se nemocní nedožívají v průměru déle než 2-3 měsíců. U nemocných s možností radikálního řešení je průměrná doba přežívání 20-30 měsíců.

3.1.1 Etiopatogeneze

Až 90 % HCC vzniká na podkladě hepatitidy typu B nebo C a jaterní cirhózy. Uvádí se, že nejvyšší riziko vzniku HCC mají nemocní, kteří prodělali hepatitidu B v dětském věku. Zde se může vyvinout HCC až ve 40 % případů. U nemocných, kteří prodělali hepatitidu B ve věku dospělém, je toto riziko výrazně nižší, jen 10 %. Zda se vyvine HCC u cirhózy, závisí na její etiopatogenezi. Nejvíce jsou ohroženi nemocní po hepatitidě B nebo C, rovněž pak nemocní s její aktivní formou, kde riziko vzniku HCC je až 40 %, dále jsou to nemocní s jaterní

cirhózou na alkoholickém podkladě, kde je riziko až 25 %. Nejméně častý vznik je pak u nemocných s primární biliární cirhózou, 2-3 %.

HCC se rovněž vyskytuje ve vyšší míře u nemocných s hemochromatózou nebo metabolickými poruchami, jako je deficit alfa 1 antitrypsinu. Významným rizikovým faktorem pro vznik HCC je také užívání anabolik. Ta způsobují vznik adenomu jater, což je prekanceróza, a časem se z něho transformuje právě HCC. Mezi potenciální kancerogeny patří organická rozpouštědla, vinylchlorid, pesticidy, arsen a další. Rovněž může vzniknout HCC na podkladě sklerozující cholangitidy či napadení různými parazity. To je však ve střední Evropě velmi vzácný jev, častěji je zaznamenán v Asii či Africe.

HCC je většinou solitární tumor, v terénu cirhózy jsou však častější vícečetná ložiska. Jeho difuzní růst je spíše vzácnější. Metastázy tvoří v hilových či paraaortálních uzlinách, dále pak na plicích či peritoneu.

3.2 Sekundární nádory jater

Nejčastějším sekundárním nádorem jater jsou metastázy KRK. Tvoří 70-75 % z celkového počtu jaterních metastáz. Česká republika je na jednom z prvních míst ve světě v incidenci KRK vůbec. Ročně přibude cca 7 800 nových nemocných s touto diagnózou, asi u 50-60 % z nich se vyvinou v průběhu onemocnění jaterní metastázy, a to buď synchronní či metachronní. Z dalších nádorů metastazujících do jater jsou to i ostatní nádory GIT, dále nádory prsu, ledvin, nádory gynekologické, v malém procentu i celá řada dalších. Pouze 15-20 % nemocných s metastázami jater je schopno podstoupit radikální chirurgickou léčbu ve smyslu resekce. Dalších 5-10 % jsme schopni ošetřit pomocí různých ablačních metod, jako je RFA, kryodestrukce, alkoholizace, laserová či mikrovlnná ablace. Ostatní přichází s onemocněním tak pokročilým, že nejsou schopni podstoupit žádnou chirurgickou léčbu.

U nemocných léčených resekční léčbou jsou výsledky poměrně uspokojivé, pět let přežívá 35-40 % nemocných. Tuto metodu lze hodnotit jako kurativní, protože signifikantně prodlouží nemocným život. Ablací metody mají vysoké procento recidiv (cca 60-70 %) během prvních dvou let. Pět let zde přežívá cca 5-15 % nemocných. Nemocní neléčení chirurgicky mají prognózu špatnou, umírají přibližně do 12-18 měsíců. Záleží to na tom, jak je nádor citlivý k chemoterapii a zda je vůbec chemoterapie u nich indikována.

3.2.1 Angiogeneze a metastazování

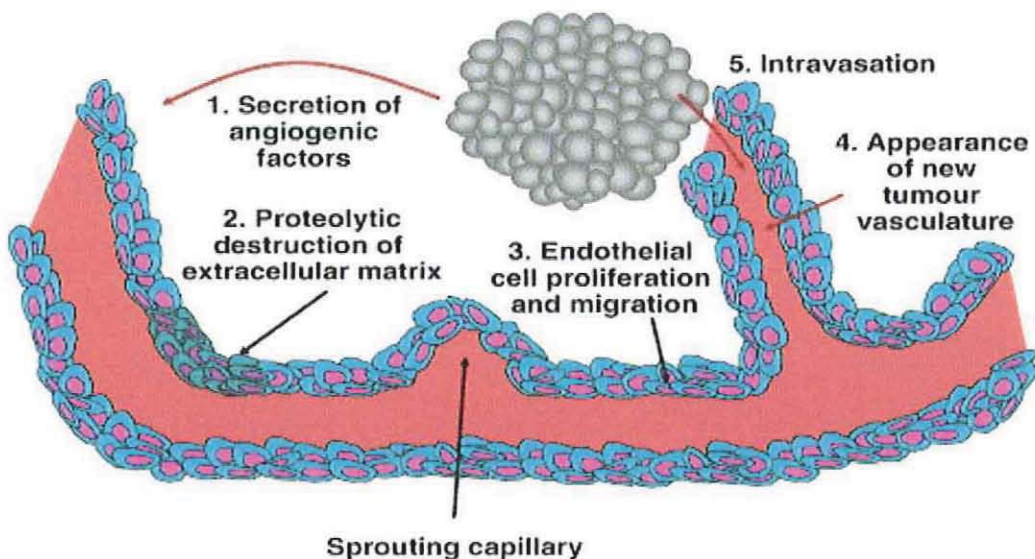
Nádorové buňky nejsou obvykle angiogenní. U rostoucího nádoru je zajištěn přívod kyslíku a živin prostou difuzí do velikosti nádoru maximálně 1 mm³. Normální maximální vzdálenost savčí buňky od krevní kapiláry je 0,1-0,2 mm [1]. Větší velikost nádoru vyžaduje vlastní tvorbu cév. To má za následek stimulaci vaskularizace ve prospěch nádoru, tento jev se nazývá „angiogenní switch“. Protože v nádoru je porušena rovnováha mezi faktory stimulačními a inhibujícími angiogenezi ve smyslu proangiogenním, získává tak nádor schopnost indukovat angiogenezi (obr. č.1). Tento stav umožňuje trvalý růst nádoru a také metastazování (obr. č.2).

Schopnost nádoru tvořit nové cévy lze rovněž posoudit kvantitativně, a to změřením hustoty malých cév. Je to nezávislý negativní prognostický faktor vzhledem k progredování tumoru a k celkovému přežití (OS) [2].

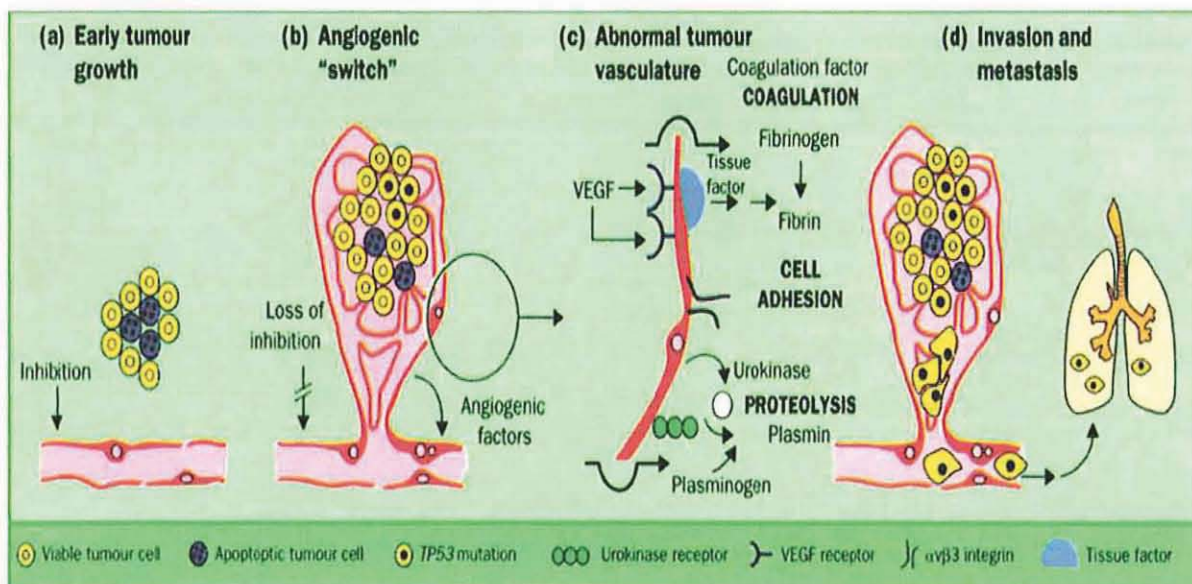
Většina karcinomů vzniká v avaskulární epidermální vrstvě nebo v mukose, oddělené bazální membránou od vrstvy dermis nebo submukosy, které již vaskularizované jsou. V době, kdy je zahájena neovaskularizace, je bazální membrána ještě intaktní. Nově tvořené cévy jsou zpočátku oddělené od tumoru. V okamžiku, kdy dojde k degradaci bazální membrány, směřují nově tvořené cévy k tumoru a velmi časně jsou obklopeny nádorovými buňkami. Z toho plyne, že vaskularizace tumoru a jeho invazivita jsou velmi úzce spojeny [3].



Na degradaci bazální membrány se podílí hlavně matrixové metaloproteinázy.



Obrázek č.1 – Schéma angiogeneze a intravazace 1. Sekrece angiogenních faktorů, 2. Proteolytická destrukce extracelulární matrix, 3. Proliferace a migrace endotelových buněk, 4. Novotvořená kapilára zásobující nádor, 5. Intravazace



Obrázek č.2 – Schéma metastatického procesu a) Časné stadium nádoru, b) Angiogenní switch, c) Novotvořená kapilára jdoucí nádorem, d) Invaze a tvorba metastáz

Proces metastazování je poměrně složitý a zahrnuje v sobě následující stupně:

- a) Invaze nádoru do okolí
- b) Transport nádorových buněk
- c) Nidace nádorových buněk
- d) Růst metastáz

Primárním krokem je tedy invaze nádoru do okolí, což je komplexní interakce mezi stromatem a nádorovou tkání. Základem je proteolytická degradace extracelulární matrix, kterou zajistí faktory produkované tumorem či tumorem uvolňované z normální tkáně, hlavně metaloproteinázy. Tento krok je rovněž důležitý pro angiogenezi. Buňky, které se dostávají po rozrušení bazální membrány takto do okolí, mohou dále pronikat lymfatickou či krevní cestou. Vstup do cévního systému je právě usnadněn v procesu vaskularizace, kdy současné odbourávání matrix a formování nových cév tvoří velmi dobré podmínky. Po vstupu do cévního systému nastává transport buňky. Faktem je, že pouze minimum nádorových buněk má schopnost vytvořit metastázu. Naprostá většina nepřežije oddělení od vlastního nádoru a zbytek je likvidován makrofágy a granulocyty. Pokud se taková buňka zachytí v kapiláře cílového orgánu, dojde k vytvoření mikrotrombu agregací trombocytů. Zde hraje roli také schopnost adheze nádorové buňky k povrchu endothelu. Následně se uplatní růstový faktor uvolněný z trombocytů (PDGF), který stimuluje další růst nádoru v nových podmínkách. Při dalším růstu metastázy opět působí matrixové metaloproteinázy destrukci ECM.

V souvislosti s nidací nádorové buňky v novém prostředí byly zmíněny adhezivní molekuly, které umožní kontakt s jinými buňkami nebo se strukturami mezibuněčně matrix. Adheze má při metastazování dvě v zásadě opačné role. Na jedné straně brání adheze uvolnění nádorové buňky od vlastního tumoru. Na straně druhé je však třeba, aby adheze pomohla volné buňce k uchycení v cílovém orgánu. U nádorů je prokázána vyšší produkce adhezivních molekul

(selektiny, integriny, kadheriny, adhezivní molekuly z rodiny imunoglobulinů – ICAM, VCAM, PECAM). Jim příbuzná je skupina CEACAM (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molekule) pojmenovaná podle CEA, který má pojmenování v této terminologii CEACAM-5.

3.2.2 Prognostické faktory přežití

Mezi prognostické faktory patří staging primárního tumoru, mimojaterní postižení, resekcční okraj, počet a velikost metastáz, disease-free interval (DFI), dále věk, bilobární postižení jater, hladina nádorových markerů.

Staging – nemocní s postižením lymfatických uzlin primárním nádorem mají horší prognózu než nemocní bez tohoto postižení. Je nutné je zajistit adjuvantní chemoterapií, ale lymfatické šíření není kontraindikací k jaterní resekcii.

Mimojaterní postižení – je ve většině případů bráno jako kontraindikace jaterní resekce. I v případě, že je kompletně odstraněno, mají nemocní horší prognózu v celkovém přežití (overall survival - OS), kdy pět let přežívá asi 18 % nemocných, bez mimojaterního postižení pak 38 % [4]. Pokud se nádorový proces šíří pouze do okolí jater, např. metastáza prorůstá do bránice, je možno ho odstranit společně s resekovánými játry a prognóza je lepší než v případě vzdálených metastáz základního nádoru. Na druhou stranu pozitivní nález nádoru v uzlinách hepatoduodenálního ligamenta je kontraindikací k resekcímu výkonu. Tento nález je brán jako metastázy metastáz a má nulové pětileté přežití [5]. Druhým nejčastěji postiženým orgánem u metastáz KRK jsou plíce. V poslední době je snaha i u takového postižení, kdy jsou postižena játra a plíce, přistoupit k resekcímu výkonu na játrech a ošetřit nález na plicích rovněž resekcí či alespoň RFA. Tito nemocní však musí být v dobrém celkovém stavu a ložiska na játrech i plicích musí být příznivě uložena.

Resekční okraj – u resekcí jater je nutné, aby vzdálenost metastázy od okraje resekční plochy byla alespoň 10 mm. Takto provedené resekce se označují jako R0. Tento postup není možno často dodržet, protože metastáza je umístěna v jaterním parenchymu takovým způsobem, že naléhá na žlučovod či cévní struktury, které musíme ponechat intaktní. V takovém případě hovoříme o resekčním okraji R1, kdy je vzdálenost metastázy od resekční plochy méně než 10 mm, nebo o R2, kdy je provedena resekce v nádoru. Tito nemocní pak mají prognózu výrazně horší než u resekcí R0. Pětileté přežití je o 20 % nižší. V případě, že víme již při resekci o faktu, že nebudeme schopni dodržet bezpečnostní lem, je třeba ošetřit resekční plochu pomocí RFA.

Počet a velikost metastáz – s tímto prognostickým faktorem souvisí i bilobární postižení, kdy při vyšším počtu metastáz je rozhodně pravděpodobnější. Je zřejmé, že jak větší rozměry, tak vyšší počet metastáz svědčí pro horší prognózu nemocných. Vyšší počet poukazuje na agresivnější nádor. Větší rozměry pak na onemocnění déle probíhající. Při ponechání dostatečně velkého zbytku jater a dodržení bezpečného okraje však není ani jeden z faktorů limitující pro jaterní resekci. Zatím nebyl definován ani přesný rozměr metastázy, ani velikost, od kterých by byla prognóza výrazně horší. Při bilobárním postižení je prognóza horší, neboť jen u málo nemocných lze provést etapový výkon s eventuální embolizací jednoho z jaterních laloků.

Disease-free interval (DFI) – je období, kdy v organismu nejsou od primární operace patrné žádné známky maligního procesu. DFI souvisí s dobou celkového přežívání (overall survival - OS). Čím déle se objeví od primární operace metastázy, tím je lepší prognóza. Je to dáno biologicky menší agresivitou nádoru. Při porovnání synchronních a metachronních metastáz bylo zcela zřejmé, že OS je lepší u nemocných s metachronními metastázami [6].

Hladina nádorových markerů – v několika studiích byla uváděna horší prognóza u nemocných, kteří měli u metastáz KRK předoperační hladinu CEA nad 200 ng/l [7]. Zde je

třeba se zaměřit především na dynamiku nádorových markerů a snažit se je využít k zachycení časné recidivy metastatického jaterního onemocnění. Protože jak se ukazuje, nemocní opakovaně resekovaní pro jaterní metastázy mají stejnou šanci na celkové uzdravení jako nemocní, kteří jsou resekováni jen jednou. Nutno je však zachytit recidivu včas, aby nález nezprogredoval do fáze inoperabilní.

Žádný z prognostických faktorů nás nesmí odradit od pokusu o kurativní řešení a je třeba k jednotlivým nemocným přistupovat vždy individuálně. Musíme však respektovat v současné době uznávané kontraindikace jaterních resekcí, jako je: ponechaná nedostatečná funkční rezerva jaterního parenchymu – kdy by hrozilo jaterní selhání, přítomnost neresekabilních ložisek jinde v organismu či ponechání primárního tumoru v organismu.

3.3 Nádorové markery obecně

Nádorové markery jsou molekuly přítomné v nádoru nebo produkované nádorem (antigeny asociované s nádorem). Mohou být také produkované hostitelem jako odpověď na maligní proces v organismu (indukované nádorové markery, např. proteiny akutní fáze). U zdravého jedince se tyto molekuly buď vůbec nevyskytují, anebo se vyskytují v podstatně nižší koncentraci, než je tomu v případě přítomnosti nádoru. Obecně se předpokládá určitá korelace mezi koncentrací markeru a aktivní hmotou nádoru, proto jsou nádorové markery užitečným nástrojem v péči o nemocné s nádorovým onemocněním. Využívá se jich pro hodnocení prognózy pacientů, depistáž a monitorování léčby. Při měření koncentrací markerů je nutné kromě absolutních hodnot a hodnot cut off zohledňovat také relativní trendy [8].

Nádorové markery jsou látky převážně proteinového charakteru. Jsou detekovatelné jak ve tkáni zhoubného nádoru (celulární nádorové markery), tak v tělních tekutinách (humorální nádorové markery, cirkulující markery) a souvisí s růstem nádoru v organismu.

V současné době se věnuje nádorovým markerům stále větší pozornost, neboť je snaha nalézt způsoby, jak podle hladiny markerů stanovit přesnější prognózu nemocných s nádorovým onemocněním. Sérové markery tak představují důležitý parametr, podle kterého je možné stanovit progresi či remisi nádorového procesu. K tomu samozřejmě přispívá i správná znalost všech indikací vyšetření, znalost jejich analytických možností a přesná interpretace výsledků [9]. Nádorové markery by tak měly být využívány pro screening, primární diagnostiku, staging a prognózu. Hlavní využití je však především v odhadu časné recidivy nádorového onemocnění a monitorování terapie.

Zvláštní skupinou nádorových markerů jsou onkofetální antigeny. Jsou to látky, které mají důležité funkce během vývoje plodu a u zdravých jedinců jsou během dospělého života zachycovány jen v nízkých koncentracích. Některé nádorové markery mají vztah k procesu proliferace, eventuálně k procesům, které s proliferací úzce souvisí a reagují na změny rovnováhy mezi proliferací, apoptózou či případnou degradací tkáně primárního tumoru. Mezi nádorové markery řadíme dále některé enzymy, hormony či jiné tkáňové metabolity. Především hormony mohou vykazovat ektopickou syntézu ve tkáni, kde za fyziologického stavu produkovány vůbec nejsou. Vyšetřování tkáňových biologických markerů souvisejících s hormonální závislostí nádorů (steroidní receptory), s jejich metastatickým potenciálem (proteinázy), s růstem (růstové faktory a jejich receptory), s proliferací, apoptózou, angiogenezí, immortalitou, změnami na úrovni genomu (onkogeny, nádorové supresorové geny) a chemorezistencí je však v začátcích. Zatím se rutinně využívá stanovení steroidních receptorů hlavně u Ca prsu. Základem pro výše uvedené nové metody je studium nových parametrů, založené na metodách imunohistochemických, enzymologických a na možnostech molekulární biologie.

3.3.1 Přehled současně používaných nádorových markerů [10]:

Sérové nádorové markery:

Onkofetální proteiny: karcinoembryonální antigen – CEA, alfa-1-fetoprotein – AFP,
postatický specifický antigen – PSA, antigeny Ca typu definované
protilátkou – CA15-3, CA19-9, CA72-4, CA125, CA50, CA549,
CA242, CA M26, CA M29, antigen mucinózních karcinomů – MCA
fragment cystokeratinu 19 – CYFRA21-1, antigen skvamózních
buněk – SCC

Antigeny spojené s růstem nádoru: tkáňový polypeptidový antigen – TPA, tkáňový
polypeptidový specifický antigen – TPS

Enzymy: neuron specifická enolasa – NSE, thymidinkinasa – TK, prostatická frakce kyselý
Fosfát – PAP, laktátdehydrogenasa – LD

Hormony: lidský choriongonadotropin – HCG, thyreoglobulin – TG, kalcitonin – CT,
prolaktin – PRL, růstový hormon – GH, parathormon – PTH,
antidiuretický hormon – ADH

Sérové proteiny: ferritin – FER, beta-2-mikroglobulin – B2M, reaktanty akutní fáze – RAF,
cirkulující imunitní komplexy – CIK, paraproteiny

Metabolity: kyselina vanilmandlová – VMK, kyselina hydroxyindolactová – HIOK,

melanogeny – MEL, močový gonadotropinový peptid – UGP, proteiny,

nukleární matrix – NMP-22, protein S-100 – S-100,

chromogranin A – CHrA

Celulární nádorové markery: receptory estradiolu a progesteronu – ER, PR, katepsin D – CD,

onkoprotein HER-2/neu – HER-2/neu, protein p53 – p53

3.3.2 Charakteristiky vybraných markerů nejčastěji využívaných u primárních či sekundárních nádorů jater

Alfafetoprotein - AFP

Alfafetoprotein je fyziologická bílkovina produkovaná fetálními játry a žloutkovým váčkem a je proto markerem pro nádory z těchto tkání. AFP se nachází na 4. chromosomu v regionu q11-q22, což bylo zjištěno in situ hybridizací Harperem a Dugaiczykem v roce 1983.

Po narození se jeho koncentrace v biologických tekutinách a tkáních výrazně sníží, ale v určitém množství přetrvává i nadále. Zvýšená produkce nastupuje zejména u primárních nádorů jater (hepatoblastom, hepatocelulární karcinom) a u některých embryonálních nádorů (teratoblastomy resp. nádory žloutkového váčku, jako jsou některé germinální tumory, vzácně pak některé karcinomy pankreatu a gastrointestinálního traktu). Jde o nádory, které vznikly maligní transformací buněk, produkujících v určité fázi alfafetoprotein fyziologicky, jako jsou buňky primitivního celomu, buňky žloutkového váčku a hepatoblastomy. K mírnému zvýšení může docházet při benigním onemocnění jater. Zvýšené hodnoty tohoto markeru provázejí asi

20 % gastrointestinálních tumorů a bronchogenní karcinomy, obvykle s přítomnými metastázami v játrech. Specifita v případě hepatomu je v literatuře udávána v rozptylu 50-85 %.

Alfafetoprotein je markerem první volby pro karcinom jater. Normální hodnota tohoto markeru se pohybuje kolem 10IU/ml. AFP je vedle hCG druhým nejdůležitějším markerem zárodečných nádorů (testes, ovarium). V karcinomech ze žloutkového vaku je nalézán až v 80 % případů. U AFP negativních cholangiogenních karcinomů je markerem další volby CA19-9 a při sekundárním postižení jater pak CEA.

Rozdílná množství polysacharidu v molekule AFP podle místa jeho tvorby byla předmětem modifikovaných analýz. Zatím však nelze o jejich přínosu hovořit [11].

CEA - Karcinoembryonální antigen neboli CEACAM 5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5) [12]

Pro svoji vysokou sensitivitu u kolorektálního karcinomu (71 %) je jedním z nejčastěji používaných markerů – karcinoembryonální antigen CEA. Popsaný r. 1965 [13] patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům. Je to onkofetální protein s rolí v procesu buněčné adheze. Za fyziologických podmínek je CEA produkce pozorována ve vyvíjejícím se embryu, kde je syntetizovaný v epiteliálních buňkách, a to především na jejich membránách. Ve fetálním séru je prokazatelný od 8. týdne těhotenství. V dospělém věku je syntetizován v minimálním množství epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. Z benigních onemocnění je zvýšená koncentrace CEA v séru i ve tkáni detekována především u nemocných s jaterní cirhózou, s hepatitidou, zánětlivým onemocněním pankreatu, s Crohnovou chorobou či ulcerózní kolitidou. Vyšší koncentrace tohoto markeru jsou zaznamenány u některých benigních nádorů mléčné žlázy (fibroadenom, fibrózně-cystická choroba). Nejvýznamnější je však přítomnost CEA ve tkáni maligních nádorů tlustého střeva a konečníku. Z dalších nádorů

GIT je CEA produkován nádory žaludku, pankreatu, jícnu a žlučových cest.

Lidská CEA genová rodina sestává z 29 genů umístěných na chromosomu 19 [14], z nichž 18 je aktivně transkribováno. Molekulová hmotnost je 180-200 kDa. Na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami, zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce.

Antigen CA 19-9

CA 19-9 patří k tumor-asociovaným antigenům, definovaným na podkladě monoklonálních protilátek, a patří také do skupiny onkofetálních antigenů.

Specifická protilátka odpovídá modifikované determinantě krevních skupin typu Lewis. Jeho výskyt je charakteristický pro adenokarcinomy pankreatu, žaludku, tlustého střeva, jater a vybraných gynekologických nádorů. Stanovuje se často v kombinaci s CEA. Molekula CA 19-9 se vyskytuje jako glykolipid ve tkáni nebo mucin v séru, molekulová hmotnost je asi 36 kDa (lipid), event. výrazně vyšší (mucin). Úloha CA 19-9 je dosud neznámá. Vzhledem k asociaci mezi nespecifickým zvýšením některých adhezních molekul a CA 19-9 v séru není vyloučena jeho možná vazba jako ligand, např. na E-selektin [15]. *In vitro* byla rovněž prokázána vazba CA 19-9-epitopu na cytokeratin 8. Přítomnost takto vázaného cytokeratinu koreluje se zvýšenou invazivitou *in vitro* i *in vivo*.

Imunohistochemické vyšetření prokázalo přítomnost tohoto antigenu především v maligních onemocněních středně a dobře diferencovaných karcinomů pankreatu, kde je lokalizovaný apikálně na epiteliích vystylajících žlázové vývody, i v hlenu uvnitř žlázových vývodů. Dále je produkován dalšími nádory GIT, z gynekologických nádorů především u mucinózních ovariálních tumorů. U kolorektálního karcinomu má senzitivitu 18-58 %. Jeho poločas v cirkulaci je asi 5 dní.

Antigen CA 72-4

CA 72-4 má diagnostickou senzitivitu u kolorektálního karcinomu 20-41 %. Stanovení CA 72-4 je založeno na detekci antigenu TAG 72 glykoproteinového typu determinovaného monoklonálními protilátkami. Antigen TAG 72 (tumor-asociovaný glykoprotein TAG 72) je definovaný na podkladě monoklonálních protilátek [16]. Je to mucinový komplex o molekulové hmotnosti větší než 10^6 Da. Za fyziologického stavu jej především produkuje vyvíjející se plod, a to v povrchových epitelech žaludku, jícnu a pankreatu. Stopové množství CA 72-4 bylo prokázáno rovněž u dospělých v tkáních plic, v gastrointestinálních a reprodukčních orgánech. Vysoký obsah CA 72-4 v dospělosti vykazují především maligní nádory žaludku, střeva, pankreatu, mléčné žlázy a některých nádorů ovaria (mucinózní typy). Biologický poločas dosud nebyl určen.

Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS)

Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) byl prokázán Bjorklundem jako antigen epiteliálních buněk karcinomů. Je to polypeptid, jehož struktura odpovídá směsi fragmentů cytokeratinů [17]. Byl prokázán ve většině karcinomů, klidová zdravá tkáň jej neobsahuje. Jeho výskyt je však spojen s rychle se množícími epiteliálními buňkami plodu. Přítomnost TPA v séru u nemocných s výraznou proliferací maligního nádoru vedla zpočátku k představě jeho přímé vazby s procesem proliferace. Dalšími experimenty bylo prokázáno, že jeho výskyt v séru je svázán, na rozdíl od diferenciačních antigenů, spíše s buněčnou aktivitou než s objemem nádorové hmoty. Tato aktivita může reflektovat nejen proces dělení buněk, ale i apoptózu, ev. degradaci tkáně a nekrózu.

Antigen s velice podobnou charakteristikou, definovaný na podkladě další monoklonální protilátky, byl nazván TPS (tkáňový polypeptidický specifický antigen). Dalšími experimenty

byly definovány typy cytokeratinů, jejichž fragmenty se uvolňují do séra.

Antigen TPA, determinovaný původní polyklonální protilátkou, je polypeptid, který odpovídá solubilním fragmentům cytokeratinů. Molekulová hmotnost těchto fragmentů je asi 40 kDa. Protilátky proti TPA reagují proti cytokeratinům 8, 18 a 19. Imunohistochemická nebo kvantitativní analýza tkáňového TPA (TPS) dosud nevedla k jednoznačným závěrům o jeho úloze, což odpovídá zřejmě složitému procesu fragmentace této cytoskeletální složky a její roli při buněčném dělení.

Fyziologicky je TPA (TPS) produkce pozorována 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. Poločas TPA je asi 7 dní.

Thymidinkinasa - TK

Thymidinkinasa (TK), neboli plným názvem ATP:thymidin-5'-fosfotransferasa (EC 2.7.1.21), je přesně definovaný enzym, patří k enzymům syntézy DNA, které jsou charakteristické pro proliferující tkáň. V G1/S fázi buněčného cyklu je zvýšená aktivita fetálního cytoplasmatického izoenzymu TK.

TK katalýza spočívá v přeměně thymidinu na thymidin-5'-fosfát v přítomnosti ATP. Thymidin-5' fosfát je pak pomocí ATP dále fosforylován až na thymidin-5'-trifosfát, který je použit pro syntézu DNA. Tato reakce doplňuje přímou cestu „*de novo*“ syntézy deoxynukleotidů, kdy vzniká thymidin-5'-fosfát methylační reakcí za účasti methylen-tetrahydrofolátu z deoxyuridin-5'-fosfátu. TK používá jako substrát exogenní thymidin z potravy nebo endogenní thymidin uvolněný jako degradační produkt. TK patří tedy mezi enzymy záchranné (náhradní) cesty syntézy deoxynukleotidů a DNA (podobně jako hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferasa nebo adenin-fosforibosyltransferasa). Jde tedy

o intracelulární enzym „zvláštního určení“, za fyziologických podmínek probíhá jeho syntéza především v játrech během vývoje plodu, po porodu se syntéza zpomaluje.

Patologicky se nachází v rychle proliferujících tkáních a z těchto tkání se dostává do cirkulace. Intenzivní produkce je pozorována především u onemocnění s generalizovanou zvýšenou proliferací a u hematologických malignit [18]. Zvýšená produkce TK je typická rovněž pro některá virová, zánětlivá a revmatická onemocnění. Biologický poločas je asi dva dny.

3.4 Matrixové metaloproteinázy

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou skupina vysoce konzervovaných endopeptidáz, které mají schopnost degradovat většinu komponent bazální membrány. Uplatňují se prostřednictvím remodelace extracelulární matrix (ECM) při procesech migrace buněk extracelulární matrix. Prostřednictvím změny extracelulární matrix metaloproteinázami mohou buňky přejít do proliferace, apoptózy nebo morfogeneze. MMP mohou také měnit aktivitu růstových faktorů a receptorů růstových faktorů [19]. Jejich fyziologická a patologická funkce se projevuje také v modulaci extracelulární matrix během embryogeneze, ovariálního cyklu nebo při zánětu, např.: revmatoidní artritída, fibróza jater, zánětlivá onemocnění ledvin. MMP se účastní také procesu degradace ECM a bazální membrány při invazivním růstu nádorů [20, 21, 22]. Regulace matrixových metaloproteináz probíhá na několika úrovních, na úrovni jejich transkripce, jejich aktivace a prostřednictvím specifických tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP) [19].

V současné době je známo více než 28 lidských matrixových metaloproteináz a nové jsou stále objevovány. Klasifikace MMP je založena na kombinaci substrátové aktivity *in vitro*, aminokyselinové sekvenci a proteinové struktury. Některé matrixové metaloproteinázy

zachovávají historické číslování. Typy MMP nevázané na membránu jsou klasifikovány podle jejich substrátové aktivity: kolagenázy (MMP-1, -8, -13, -18), gelatinázy (MMP-2 a MMP-9), stromelysiny (MMP-3, -10, -11), matrilysiny (MMP-7 a MMP-26), makrofágová elastináza (MMP-12), enamelysin (MMP-20), membránové MMP (MT-MMP; MMP 14-17, 24, 25) a v současnosti objevené matrixové metaloproteinázy (MMP-19, -21, -23, -27, -28) jsou ve skupině nezařazené, tabulka 2.

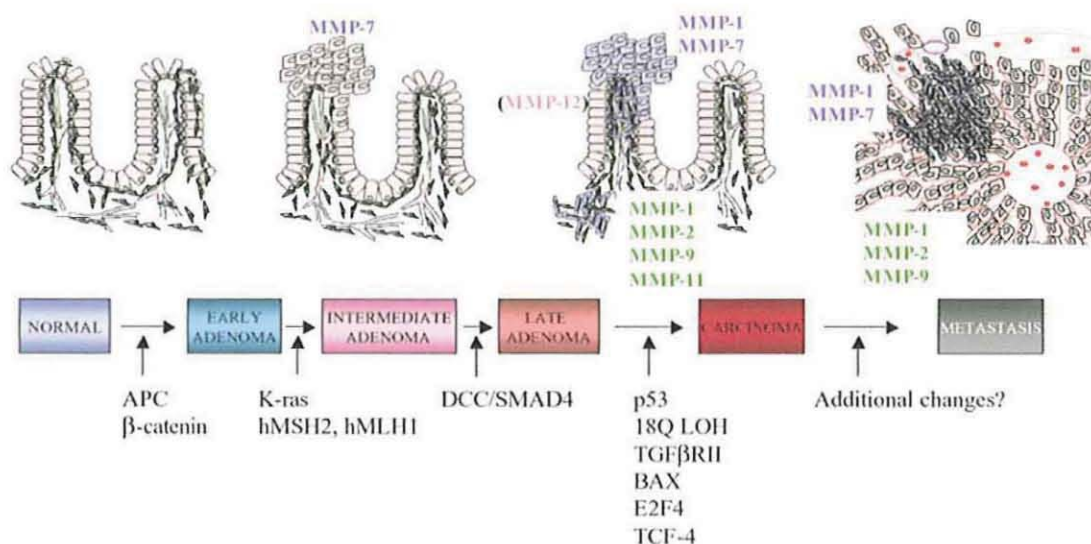
MMP jsou syntetizovány ve formě zymogenů, k jejich přeměně na vlastní aktivní formu je nutná aktivace. Většina MMP je aktivována extracelulárně, ale některé z nich (MMP-11, -14, -15, -16, -17, -28) mohou být aktivovány i intracelulárně. Spouštěcí neboli propeptidová doména MMP obsahuje vysoké procento hydrofobních aminokyselin. Vlastní propeptidová doména má v sobě standardně zabudováno několik molekul cysteinu (s –SH funkční skupinou), které vážou na katalytickém místě atom zinku. Aktivace metaloproteináz se děje rozštěpením propeptidové domény s ponecháním atomu zinku na katalytickém místě. Ten je nezbytný pro samotnou enzymatickou aktivitu MMP. Pre-, pro- a katalytické domény jsou společné pro všechny metaloproteinázy. Variabilita ostatních domén pak zajišťuje vlastní substrátovou specifitu jednotlivých enzymů.

Tabulka 2: Přehled matrixových metaloproteináz s jejich substrátovou specifikou

<i>Matrixové metaloproteinázy</i>			
<i>Skupina</i>	<i>Druh</i>	<i>zkratka</i>	<i>Primární substrát</i>
<i>Kolagenázy</i>	<i>intersticiální kolagenáza</i>	<i>MMP-1</i>	Kolagen typu I, II, III, VII, VIII, IX, Želatin
	<i>Neutrofilní kolagenáza kolagenáza 2</i>	<i>MMP-8</i>	Kolagen typu I, II, III
	<i>kolagenáza 3</i>	<i>MMP-13</i>	aggrekan, kolagen I, II, II, gelatin
	<i>xenopus kolagenáza</i>	<i>MMP-18</i>	
<i>Gelatinázy</i>	<i>gelatináza A</i>	<i>MMP-2</i>	Kolagen typu IV, V, VII, X, elastin, fibronektin, gelatin, prokolagenáza-3
	<i>gelatináza B</i>	<i>MMP-9</i>	Kolagen typu IV, V, elastin, gelatin
<i>Stromelyziny</i>	<i>stromelyzin-1</i>	<i>MMP-3</i>	Kolagen typu III, IV, V, IX, kolagenáza 1, entaktin, fibronektin, gelatin, laminin, proteoglykany
	<i>stromelyzin-2</i>	<i>MMP-10</i>	Kolagen typu III, IV, V, IX, fibronektin, gelatin, laminin, proteoglykany
	<i>stromelyzin-3</i>	<i>MMP-11</i>	fibronektin, laminin, a-1-proteinase inhibitor
<i>Matriliziny</i>	<i>Matrilizin</i>	<i>MMP-7</i>	Kolagen typu IV, elastin, entaktin, fibronektin, gelatin, laminin, tenascin
	<i>matrilizin-2</i>	<i>MMP-26</i>	fibrinogen, fibronektin
<i>Elastázy</i>	<i>Metaloelastázy</i>	<i>MMP-12</i>	elastin, fibrinogen, fibronektin
<i>metaloproteinázy membránového typu</i>	<i>MT1-MMP</i>	<i>MMP-14</i>	kolagen I, II, III, fibronektin, prokolagenáza-3, progelatináza A, Proteoglykany
	<i>MT2-MMP</i>	<i>MMP-15</i>	progelatináza A
	<i>MT3-MMP</i>	<i>MMP-16</i>	Kolagen III, fibronektin, gelatin
	<i>MT4-MMP</i>	<i>MMP-24</i>	
	<i>MT5-MMP</i>	<i>MMP-25</i>	progelatináza A
<i>neklasifikované metaloproteinázy</i>		<i>MMP-19</i>	
		<i>MMP-23</i>	
		<i>MMP-27</i>	Vitronektin
		<i>MMP-28</i>	Epilysin

Studie jednotlivých matrixových metaloproteináz ukázaly zvýšenou expresi některých MMP ve tkáni kolorektálního karcinomu. Tyto MMP je možné sledovat i u různých stadií adenomů, které se mohou transformovat až v karcinom (viz obr. č.3), stejně tak hrají svoji roli při tvorbě jaterních metastáz KRK [23]. Můžeme zde pozorovat MMP působící v epitelu, nebo ve tkáňovém stromatu. Některé z nich mohou mít paradoxně protektivní účinek. Např. nemocní s KRK, u nichž byla zaznamenána nízká exprese MMP-12, měli statisticky významně horší celkové přežití než ostatní. Pokles MMP-12 koreloval s invazí do střešní stěny, šířením do lymfatického a cévního systému. Jakým způsobem však působí MMP-12 protektivně na střešní stěnu, není zatím známo [24].

Některé studie prokázaly statisticky významnou spojitost exprese či aktivity MMP u kolorektálního karcinomu s prognózou a dalšími klinickými údaji. Jiné studie ji však popřely, a tak vztah ke stadiu onemocnění, prognóze, případnému klinickému využití zůstává předmětem dalších výzkumů [19, 25]. Nyní je snaha objasňovat různé role specifických MMP v časných stadiích onkogeneze kolorektálního karcinomu.



Obrázek č.3 – demonstruje účast a působení MMP ve stěně střešní při rozvoji adenomu, při jeho přestavbě na adenom s vysokým stupněm dysplazie, na karcinom a posléze i na metastazování karcinomu do jater, **protektivní MMP**, **epitelové MMP**, **stromální MMP**

MMP-2 degraduje molekuly kolagenu IV, který je hlavní komponentou bazální membrány, dále kolagen V, VII, X [26]. Zvýšená exprese mRNA MMP-2 byla některými autory zaznamenána v nádorové tkáni KKK oproti tkáni normální [27, 28], další studie však tuto teorii nepodporují [29]. Nemocní se zvýšenou expresí mRNA MMP-9 měli šestkrát častěji recidivu základního onemocnění než nemocní, u kterých byla exprese nízká. V multivariační analýze bylo zřejmé, že nemocní se zvýšenou expresí mRNA MMP-9 mají i horší celkové přežití [30, 31].

Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMP) jsou hlavními endogenními regulátory aktivity MMP ve tkáních. Zatím známe 4 tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4 [32, 33]. Někteří odborníci jsou přesvědčeni, že bude v blízké budoucnosti možné používat v indikovaných případech genové terapie pomocí TIMP [34]. Jsou proto vyvíjeny různé preparáty, které by měly fungovat jako inhibitory MMP. Mají různé složení a podle toho je můžeme rozdělit na pseudopeptidové, nepeptidové s krystalickou strukturou, deriváty tetracyklinu a na skupinu různorodých inhibitorů MMP. Většina z nich působí na bázi vyvázání atomu zinku z katalytického místa a tím inaktivací vlastní MMP [35]. Zajímavé jsou preparáty tetracyklinu, které nemají žádnou antibiotickou aktivitu. Působí jak na snížení aktivity MMP vyvázáním atomu zinku, tak snižují jejich produkci tím, že ruší štěpení propeptidové domény.

Při sledování aktivity některých endogenních TIMP se TIMP-2 váže specificky nekovalentní vazbou na pro-formu MMP-2 [36] a převážně inhibuje jeho enzymatickou aktivitu. TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7. Bylo zjištěno, že zvýšená exprese TIMP-1 a TIMP-2 in vivo potlačuje metastázy [37], také však byla zjištěna zvýšená exprese TIMP-1 v nádorové tkáni [38]. Stejně tak byla u nemocných s kolorektálním karcinomem sledována exprese TIMP-1 v séru a bylo patrné, že při monitoraci exprese TIMP-1 v kombinaci se

sledováním hladiny CEA v séru vzrůstá senzitivita i specificita záchytu časných stadií KRK [35].

3.5 Symptomatologie u primárních a sekundárních nádorů jater

Jak u primárních nádorů jater, tak i u sekundárních může trvat poměrně dlouho bezpříznakové období. První symptomy se bohužel objevují velmi často až pozdě, a to buď hmatnou rezistencí v oblasti pravého podžebří, nebo bezbolestným ikterem nemocného při útlaku jednoho z hlavních žlučovodů. Mezi další celkové příznaky patří nechutenství, zvýšená únava a hubnutí. Mohou se objevovat tlakové bolesti v pravém podžebří, které se propagují do pravého ramena nebo do zad. Ikterus se může objevit i v pokročilejších stadiích, když je větší část jaterního parenchymu spotřebována nádorovým procesem a jaterní funkce jsou výrazně zhoršené. Je většinou doprovázen subfebriliemi až febriliemi z rozpadu tumorozních nekrotických ložisek. Tento příznak, stejně jako přítomnost ascitu v dutině břišní, svědčí pro pokročilé onemocnění a prognóza nemocného je ve většině případů špatná.

Asi u 10 % nemocných s HCC se může objevit krvácení do GIT. Zdrojem jsou jícnové varixy, které se tvoří při portální hypertenzi, nebo vředová choroba gastroduodenální. Vzácnou příhodou je pak spontánní ruptura HCC s krvácením do dutiny břišní a rozvojem hemorhagického šoku. U těchto nemocných je šance na přežití jen velmi malá.

3.6 Diagnostika

Při fyzikálním vyšetření jsme schopni diagnostikovat až pokročilejší stadia nádorů jater, kdy v pravém podžebří a nadbříšku můžeme hmatat zvětšená játra či nádorovou rezistenci z nich vycházející. Naší snahou je však diagnostikovat stadia časná, kdy jsme schopni

nemocného úspěšně léčit. Zde nastupují metody grafické a laboratorní.

Z grafickým metod je to hlavně sonografické vyšetření (USG), které je prováděno u nemocných s KRK jako součást předoperačního vyšetření a po odstranění primárního nádoru je součástí follow-up [39]. U nemocných s jaterní cirhózou je prováděno při pravidelných kontrolách. Celá řada nádorů jater je pak zjištěna náhodou při USG břicha, které je prováděno z úplně jiného důvodu. Pomocí USG je zachyceno největší procento nádorů jater. K jejich přesnější diagnostice a lepší prostorové orientaci se dále využívá výpočetní tomografie (CT) – konkrétně vícefázové CT, kdy jsou posuzovány jednotlivé fáze, jak se kontrastem naplňují jaterní tepny, portální žíly a jaterní žíly a stejně tak se postupně sytí i patologická ložiska. CT je také možno využít v případě, kdy plánujeme rozsáhlejší jaterní resekci a potřebujeme odhadnout velikost zbytkového funkčního parenchymu jater, který v organismu ponecháme. V takovém případě se provádí CT-volumetrie, podle které jsme schopni se přesně rozhodnout a vyloučit tak možné jaterní selhání, které hrozí v případě, kdy odstraníme příliš mnoho funkčního parenchymu jater. Dále je využívána magnetická resonance (MR), která je zvláště výhodná u HCC. U ložisek < než 2 cm má až 90% přesnost, její užití je rovněž vhodné při diferenciální diagnostice hemangiomů. Metodu, kterou můžeme využít u diagnostických rozpaků, je CT angioportografie, ukáže nám přesněji vaskularizaci zkoumaného ložiska a může tak přispět ke správné diagnóze. U sekundárního postižení jater se v poslední době stále více uplatňuje pozitronová emisní tomografie v kombinaci s CT (PET CT). Pomocí této metody je možné diagnostikovat nádorové postižení na různých místech v organismu a indikovat tak příslušnou léčbu.

Z laboratorních metod je to pravidelné sledování sérové hladiny AFP u nemocných s jaterní cirhózou, jehož zvýšení nám signalizuje možný rozvoj HCC. U nemocných po resekci KRK je také pravidelně stanovována hladina CEA a CA19-9. Zde při zvýšení těchto markerů musíme pomýšlet na možnou recidivu základního onemocnění či na tvorbu vzdálených metastáz a je

nutné naplánovat nemocnému další cílená grafická či endoskopická vyšetření.

Jako poslední z vyšetřovacích metod přichází do úvahy odběr biopsie z ložiska, u kterého jsme při ostatních výše zmíněných vyšetřeních nedospěli k jasnému závěru. Je to metoda již invazivní a při odběru biopsie riskujeme diseminaci do oblasti punkčního kanálu. Provádí se pod USG či CT kontrolou tenkou jehlou. Obecně je nutno zmínit, že biopsie by neměla být prováděna nemocným, kde zvažujeme jaterní resekci, či u nemocných s HCC, kde plánujeme do budoucna transplantaci.

Při nejasném diagnostickém závěru, nebo v obou výše uvedených případech (případná resekce či transplantace) je indikováno provedení diagnostické laparoskopie s peroperační USG laparoskopickou sondou, kdy její přesnost je až 95 %. Pokud nemáme jistotu ani při tomto vyšetření, lze odebrat biopsii skrz port, nebo je nutno zvážit ošetření podezřelého ložiska v jedné době s diagnostikou.

3.7 Léčba

Jedinou kurativní léčbou u maligních nádorů jater je chirurgická resekce. Pětileté přežití u nemocných po resekci nádoru jater je mezi 30-40 %. Před vlastní indikací k chirurgickému výkonu musíme u nemocného posoudit rozsah nádorového postižení (technickou odstranitelnost nádoru), stupeň jaterní rezervy a celkový stav. Podle předoperačních vyšetření a peroperačního nálezu se dále rozhodujeme o rozsahu vlastního výkonu. Výkony prováděné na játrech jsou v rozsahu od levostranné či pravostranné hepatektomie, přes lobektomii, neanatomickou či klínovitou resekci až k pouhé metastazektomii. Při resekci musíme mít na paměti radikalitu výkonu, tedy dostatečný rozsah resekce s bezpečnostním lemlem, na druhou stranu je nutné ponechat v organismu takový objem jaterního parenchymu, který zajistí, aby nedošlo po resekcím výkonu k jaternímu selhání. U jinak zdravých jater stačí, když zůstane

25-30 % funkčního jaterního parenchymu. U přidružených chorob jater, jako je steatóza, fibróza či cirhóza, je nutné rozsah výkonu omezit a ponechat 60-80 % jaterního parenchymu. V takovém případě se omezujeme na limitované výkony, jako jsou neanatomické resekce či pouhé metastazektomie.

Funkční rezervu jater je možné hodnotit několika způsoby. Je třeba si však uvědomit, že toto hodnocení je spíše orientační. Nejčastěji se hodnotí jaterní funkce pomocí Child-Pugh klasifikace /viz tab.1/. K resekci jsou indikováni nemocní Child A maximálně Child B, bez portální hypertenze, ascitu a poruch krevní srážlivosti. Dále je možné využít testy orientované na stanovení metabolické funkce jater (ICG test, lidokainový test). Z grafických metod je to pak CT volumetrie, pomocí které můžeme odhadnout ponechaný objem funkčního parenchymu.

Tab.1: Child-Pugh klasifikace

Skóre	1	2	3
Bilirubin (mol/l)	<30	30-45	>45
Albumin (g/l)	>35	30-35	<30
Protrombin. čas (s)	<4	4-6	>6
Ascites	0	mírný	střední, velký
Encefalopatie - stupeň	0	1-2	3-4
Výsledek	A: 5-6 bodů	B: 7-9 bodů	C: >9 bodů

Za nepříznivých okolností, kdy je jaterní rezerva malá a nález by nepřipouštěl dostatečný rozsah výkonu, je, v indikovaných případech, možné provést embolizaci větve portální žíly (PVE) jednoho z jaterních laloků postiženého nádorovým procesem. Tím se zajistí kompenzatorní hypertrofie laloku, který chceme v organismu ponechat. Embolizaci provádí radiolog transhepaticky po nasondování jedné z portálních větví. Při neúspěchu je možné ji provést operačně přes ileokolicou žílu. Po 3–4 týdnech, kdy se projeví hypertrofie

neembolizovaného jaterního laloku, můžeme přistoupit k vlastnímu resekcčnímu výkonu [40]. Tento postup je možné využít i u nemocných, kde je nádorový proces lokalizovaný v obou jaterních lalocích. Nejprve je odstraněno nádorové postižení jednoho jaterního laloku, většinou limitovaným výkonem s ponecháním co nejvíce zbytkového funkčního parenchymu. Následně je provedena PVE a s odstupem je pak dokončen rozsáhlejší resekcční výkon na embolizovaném jaterním laloku. Zde hovoříme o tzv. etapové resekcii jater, která je využívána hlavně u metastatického postižení jater [41, 42].

3.7.1 Jaterní resekcce

Přístup k játrům volíme pravým subkostálním řezem, který je možné rozšířit v případě potřeby do levého subfrenia, nebo ve střední čáře až k procesus xyphoideus, vzniká tak tzv. „Mercedes-Benz“ řez. Výhodné je založení rozvěrače, který zajistí dostatečnou přehlednost v operační ráně, např. Stieberův rozvěrač. Standardně přetínáme ligamentum teres a falciforme hepatis. Palpačně vyšetřujeme játra a hepatoduodenální ligamentum na přítomnost patologicky změněných uzlin. Radiolog provádí peroperační USG, které je posledním grafickým vyšetřením před definitivním rozhodnutím o typu výkonu. Následně mobilizujeme část jater, kterou budeme resekovat. Přetínáme ligamentum triangulare hepatis dextrum či sinistrum a uvolňujeme játra pod bránicí až k dolní duté žíle (DDŽ). U větších resekcí (typu levostranné či pravostranné hepatektomie) provádíme cholecystektomii a preparujeme oblast hepatoduodenálního ligamenta, podvazujeme větve art. hepatica a v. portae. Snažíme se diferencovat levý a pravý duktus hepaticus, což není vždy možné pro jeho větvení až v jaterním parenchymu. Elektrokauterem přetínáme glissonske pouzdro v linii řezu. Pomocí CUSA a harmonického skalpelu rozrušujeme jaterní tkáň a menší žlučovody a cévky. Větší žlučovody a cévy ošetřujeme podvazy. Pravý nebo levý duktus hepaticus přetínáme

intraparenchymatosně. Jako poslední většinou podvazujeme hepatální žíly. Drobná krvácení ošetříme pomocí Argonové koagulace. Na resekční plochu můžeme aplikovat fibrinové tkáňové lepidlo (Tissucol, Flosil) či fibrinové destičky (Lyostyp, Tachocomb, Tachosil). K resekční ploše přiložíme drény.

U menších resekcí typu segmentektomie, klínovité či menší neanatomické resekce nejsme nuceni preparovat jednotlivé struktury hepatoduodenální ligamenta. Hepatoduodenální ligamentum obcházíme a provádíme tzv. Pringleho manévr – pomocí svorky či turniketu můžeme uzavřít průtok hepatoduodenálním ligamentem a tak kontrolovat případnou krevní ztrátu. Důležité je provádět tento manévr přerušovaně, aby ischemie neresekovaného zbytku jater nebyla příliš dlouhá a byla vyloučena případná větší ztráta funkčního parenchymu. Běžně se uzavírá průtok na 20 minut a pak se na 5 minut znovu otevře. Tento postup je možné u zdravých jater opakovat až 4x po sobě. U jater jinak postižených je třeba postupovat opatrněji, podle jejich stavu, ale 2x 20 minut by jejich funkci nemělo výrazně zhoršit.

Menší jaterní resekce je možno provést také pomocí svorek nebo nůžkového stapleru. Svorku naložíme přímo na játra, provedeme resekci postižené části parenchymu a resekční plochu přešijeme pokračujícím stehem v celé šíři parenchymu. Tento postup se nejvíce využívá při resekcích na levém jaterním laloku či pátém segmentu. Dále můžeme u neanatomických resekcí s výhodou využít Tissue-Link či Habibovu radiofrekvenční sondu, kdy resekční plochu postupně koagulujeme a podvazujeme jen větší žlučovody a cévní struktury.

U rozsáhlých jaterních resekcí, kdy je třeba vyřadit po určitou dobu výkonu z oběhu celá játra, se využívá totální vaskulární hepatální exkluze (THVE). Je uzavřena DDŽ, pod játry i nad nimi, a je uzavřen průtok v hepatoduodenálním ligamentu. Asi v polovině případů je nutné drénovat stagnující krev ze splachniku jednou z větví v. mesenterica superior a z dolní poloviny těla z v. femoralis přes krevní pumpu zpět do v. axilaris. Toto řešení musí posoudit operátor podle stavu splachniku při uzavření hepatoduodenálního ligamenta a rovněž

anesteziolog, který musí zhodnotit oběhové parametry nemocného při uzavření DDŽ.

Výsledky resekční léčby jsou při srovnání s obdobím ani ne před 20 lety více než uspokojivé. Je to díky rozvoji nových technických přístrojů, biologických látek, novým chirurgickým technikám, a rovněž díky zcela jiné úrovni pooperační péče, která se mnohonásobně zlepšila. V současné době přežívá jeden rok 58-100 % nemocných po radikálně odstraněném HCC, 3 roky 28-88 % a pět let 20-26 % [6]. U metastáz KRK do jater jsou výsledky ještě lepší, zde přežívá první rok 72-96 % nemocných, 3 roky 38-55 % [43] a pět let 29-37 % nemocných [44, 45].

U nemocných s HCC připadá v úvahu jako další typ léčby transplantace jater. Kritéria pro transplantaci jsou přísná. Přichází v úvahu zejména u HCC v jaterní cirhóze. Rozsah postižení je do 3 uzlů do velikosti 3 cm nebo 1 uzel do velikosti 5 cm. Zde je šance na pětileté přežití 60-80 %. U cholangiocelulárního karcinomu je naděje na dlouhodobé přežití nízká vzhledem k častým recidivám maligního onemocnění v transplantovaných játrech.

3.7.2 Abláční metody

Používají se u primárních i sekundárních nádorů jater v případech, kdy není indikována resekční léčba. Způsobují termální nekrózu nádoru. Řadíme sem RFA, mikrovlnnou ablací, laserovou koagulaci a kryodestrukci. RFA pracuje na principu vln o vlnové délce 460 kHz. Aplikována je místně pomocí RFA sondy, cestou otevřenou, laparo- či thorakoskopicky, nebo perkutánní cestou. Vytváří v játrech kulovitou koagulační nekrózu do průměru 5 cm. Bezpečně se dají tedy ošetřit ložiska do velikosti cca 4 cm [46]. RFA sonda se zavádí do jater pod USG či CT kontrolou. Metoda je to poměrně bezpečná, vzhledem ke kontrolovanému zavedení sondy nejsou poraněny větší cévy či žlučovody. Při normálním průtoku v játrech má krev na sondu ochlazovací efekt a jsou velmi řídké trombózy větších žilních kmenů. Pokud provedeme

Pringleho manévr, zvýšíme účinnost RFA a tím i rozsah nekrózy, zde je však riziko vzniku komplikací větší (hrozí termické poranění cév a žlučovodů). Mikrovlnná ablace pracuje na podobném principu, ale tvoří elipsoidní nekrózy pouze do velikosti 2 cm, je tedy potřeba opakované aplikace do většího ložiska. Laserová koagulace dosahuje koagulace ložisek až do průměru 6-7 cm. Poslední metodou je kryodestrukce. Ta využívá naopak nízkých teplot k destrukci patologického ložiska. Je schopna postihnout ložiska do velikosti až 8 cm. Je však zatížena nejvyšším procentem závažných komplikací ve smyslu ruptury jater s masivním, těžko ošetřitelným krvácením.

Procento recidiv po ošetření ablačními metodami je poměrně vysoké. Souvisí s obtížným cílením ložiska v játrech, dechovými exkurzemi nemocného a ne vždy ideálním tvarem ložiska či pozicí sondy. Jejich výhodou je možnost opakovaného použití při nevelké zátěži nemocného, zvláště perkutánním přístupem. Pětileté přežití se udává přibližně jen do 15 %, u nemocných, kteří nejsou z jakýchkoliv důvodů indikováni k resekcční léčbě, hrají však ablační metody významnou roli.

U nemocných s HCC, kde není možné nádor radikálně odstranit, patří mezi léčebné metody aplikace 95% ethanolu do nádorového ložiska. Aplikace je prováděna pod USG kontrolou a ethanol způsobuje nekrózu nádoru. Tato metoda je rovněž paliativní s vysokým procentem recidiv, ale stále se používá i přes rozvoj výše zmíněných ablačních technik.

3.7.3 Onkologická léčba

U nádorů jater se využívá systémová nebo lokoregionální chemoterapie [47]. Oba druhy jsou využívány jako adjuvantní nebo neoadjuvantní a jsou aplikovány podle různých léčebných schémat (Folfox, Folfiri, Tomox a další). V poslední době přichází v úvahu i léčba novými preparáty, jako jsou Avastin nebo Erbitux. Při lokoregionální léčbě je zaváděn katetr do arteria

hepatica a chemoterapeutikum je podáváno přímo do jater. Toto je možné pomocí operačně implantovaného portu do arteria hepatica přes arteria gastroduodenalis, nebo radiointervenčně z nápichu arteria femoralis a zavedením dočasného katetru do arteria hepatica. Chemoterapeutikum je možno využít rovněž při chemoembolizaci arteria hepatica dextra či sinistra. Embolizační látka je obohacena například o Doxorubicin či Mitomycin. Neoadjuvantní léčby se využívá ke zmenšení masy nádoru a tím k možnosti nádor v druhé době radikálně odstranit. Adjuvantní léčba se uplatňuje po resekčních či ablačních výkonech, aby pokryla možné mikrometastázy, které nebyly chirurgickou léčbou postiženy. O podání a typu onkologické léčby rozhoduje onkolog.

4 Cíle projektu:

1. Zkoumání hladin CEA, matrixových metaloproteináz (MMP-2, MMP-7, MMP-9) a tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz (TIMP-1, TIMP-2) [48, 49, 50] v séru a v nádorové tkáni u nemocných s metastázami kolorektálního karcinomu do jater. Porovnání výsledků s hladinami CEA, MMP a TIMP u nemocných s benigními nádory jater a s nemocnými bez nádorového onemocnění.
2. Zhodnocení vztahu mezi hladinou onkomarkeru a DFI, mezi hladinou onkomarkeru a OS.
3. Posouzení, možnosti využití MMP a TIMP k odhalení časně recidivy metastatického onemocnění po resekčních výkonech na játrech, eventuálně ke zhodnocení prognózy nemocného.

5 Soubor nemocných

Vytvořili jsme následující skupiny nemocných:

Skupina 1 – Nemocní se sekundárními tumory jater

Skupina 2 - Nemocní s benigními tumory jater

Skupina 3 - kontrolní skupina - Nemocní s tříselnou kýlou

5.1 Charakteristika jednotlivých skupin:

Skupina 1 - celkem 40 pacientů, z toho 28 mužů, 12 žen, s průměrným věkem 59 let (v rozmezí 39-82 let), těmto nemocným byla provedena resekce jater pro metastatický proces KRK v rozsahu minimálně 1 segmentu jater, maximálně 5 segmentů jater. Do skupiny 1 byli zařazeni nemocní pouze s metastázami KRK, které tvoří 70-75 % celkového počtu jaterních metastáz. Tímto způsobem jsme sjednotili soubor sekundárních nádorů jater a eliminovali případné zkreslení výsledků různorodostí skupiny.

Skupina 2 - celkem 26 nemocných, z toho 8 mužů, 18 žen, s průměrným věkem 54 let (33-83 let), těmto nemocným byl proveden výkon v rozsahu: enukleace ložiska, fenestrace cyst, až po resekci 4 segmentů jater, a to pro fokální nodulární hyperplazii, hemangiomy, adenomy, cysty solitární či mnohočetné při polycytóze jater.

Skupina 3 - celkem 22 nemocných, z toho 11 mužů, 11 žen, s průměrným věkem 56 let (16-78 let), těmto nemocným byla provedena operace tříselné kýly bez použití zpevňovacích materiálů – typu prolenové sítěky, neměli v anamnéze žádné maligní ani degenerativní onemocnění, neměli ani onemocnění jater, dále neměli v průběhu předchozích 6 měsíců žádné zánětlivé onemocnění. Všichni se zhojili bez komplikací.

6 Metodika a statistické zpracování

6.1 Detekce mRNA MMP a TIMP ve tkáňových vzorcích pomocí RT-PCR

Tkáňové vzorky jaterních metastáz kolorektálního karcinomu byly získány od 40 pacientů (n = 40, průměrný věk 59 let, rozpětí 39-82 let), kteří podstoupili radikální chirurgickou léčbu – resekci. Hladinu exprese mRNA CEA, MMP a TIMP a housekeeping genu (GAPDH, glycerinaldehyd-fosfát-dehydrogenáza) jsme kvantifikovali metodou real-time PCR. Vzorky byly po chirurgickém výkonu histologicky verifikovány a zamrazeny na -75 °C. Ze 100mg vzorku jsme izolovali celkovou RNA. Tkáň jsme homogenizovali ve zkumavkách se speciálními kuličkami přístrojem Fastprep (Fa Thermosavant, USA) a kitem FastRNA. Pro Green Kit (Q BIOgene, USA). 3 µg izolované celkové RNA jsme použili do reverzní transkripce (RT). Reverzní transkripci jsme provedli pomocí enzymu Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, USA). Jako primer pro RT jsme použili oligo d(T)21. Primery pro GAPDH, MMP-9, MMP-7, MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a CEA jsme navrhli tak, aby překračovaly minimálně jeden intron. Fragmenty získané PCR jsme inzerovali do vektoru pGEM (Promega Corporation, USA), klonovali a sekvenovali. Klonované fragmenty MMP-9, MMP-7, MMP-2, TIMP-2, TIMP-1 a GAPDH jsme použili jako standardy o známém počtu molekul. 1 µl cDNA každého vzorku jsme použili pro real-time PCR na přístroji Rotorgene (Corbet Research, Australia) /viz příloha č.1 - kvantifikace TIMP-1/. Pro stanovení amplifikace DNA jsme použili barvu SYBR Green I. Specifitu reakce jsme ověřili pomocí teplotní křivky tání a elektroforézy. Stanovení jsme provedli jako absolutní (počet molekul cDNA) a jako standardy jsme použili klonované fragmenty cDNA. Výsledky jsou uváděny jako:

- Absolutní hodnoty - kvantifikace byla provedena absolutně za použití klonovaných fragmentů o známé koncentraci jako standard (počet kopií molekul/3 µg RNA).
- Normalizované hodnoty - výsledky jsou uváděny jako poměr sledovaného genu a GAPDH (př. MMP-9/GAPDH).

6.2 Detekce MMP a TIMP v periferní krvi v séru

Krev na stanovení nádorových markerů, metaloproteináz a jejich inhibitorů a doplňujících biochemických parametrů byla odebírána standardně z loketní žíly v ranních hodinách. Sérum získané z krve centrifugací 2 000 g 10 min bylo skladováno až do stanovení rutinních nádorových markerů a doplňujících laboratorních parametrů při teplotě -20 °C. Sérum a plasma získaná z krve centrifugací 2 000 g 10 min byly skladovány až do stanovení metaloproteináz a jejich inhibitorů při teplotě -75 °C. Tato vyšetření byla prováděna na Oddělení nukleární medicíny FN v Plzni pomocí komerčních diagnostických souprav podle doporučení výrobců.

Karcinoembryonální antigen (CEA- ng/mL) byl stanoven pomocí soupravy IRMA, (Immunotech Česká republika). Metaloproteinázy (MMP-2- ng/mL, MMP-9-ng/mL) a jejich inhibitory (TIMP-1-ng/mL, TIMP-2-ng/mL) byly stanoveny pomocí souprav ELISA (Chemicon - Millipore, USA). Doplňující biochemické parametry byly vyšetřovány standardizovanými laboratorními postupy v laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky FN Plzeň. Kontrola stanovení byla prováděna jednak pomocí kitového kontrolního séra, kontrolních sér pro dlouhodobou stabilitu metodiky a na základě mezilaboratorních kontrol Biorad (USA), Oncocheck (Francie) a SEKK (ČR).

Vlastní odběr krve pacienta na stanovení metaloproteináz nemocného výrazně nezatížil, jelikož byly dané sérové hladiny stanovovány ze vzorků odebíraných již pro potřeby stanovení rutinně sledovaných onkomarkerů.

Charakteristiky námi sledovaných MMP a TIMP:

- **MMP-2** (72kDa, typ IV kolagenáza, gelatináza A, OMIM: *120360 genový lokus: 16q13)
- **MMP-7** (92kDa, matrilysin, PUMP, OMIM: *178990, genový lokus: 11q21-q22)
- **MMP-9** (92kDa, typ IV kolagenáza, gelatináza B, OMIM: *120361, genový lokus: 20q11,2-q13,1)
- **TIMP-1** (21kDa, OMIM: *305370, genový lokus: Xp11.3-p11.23)
- **TIMP-2** (21kDa, OMIM: *188825, genový lokus: 17q25)

6.3 Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena s užitím software CRAN.

Pro měřené parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto proměnných, byly použity neparametrické testy, a to Kruskal-Wallisův test a Wilcoxonův test. V zásadě byly používány dvouvýběrové varianty těchto testů. Pro zjištění závislostí zkoumaných znaků, vzhledem k rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Pomocí specifict a senzitivit dané metody jsme stanovovali referenční meze (cut off) mezi skupinami a podskupinami pro danou metodu a tyto výsledky byly graficky zpracovány do tzv. ROC křivek. Byly zkoumány různé varianty - tedy jednotlivé skupiny nádorů, jejich sdružené varianty v porovnání s kontrolní skupinou.

Vliv jednotlivých proměnných na délce přežití (resp. DFI) byl zkoumán užitím Kaplan-Maierovy metody odhadu distribuční funkce přežití (resp. DFI). Pro zjištění vlivu daných proměnných na délce přežívání (DFI) pak byly, u kategorických proměnných, počítány tzv. Log-rank test a Wilcoxon test. U spojitých proměnných byl vztah mezi přežitím (resp. DFI)

a danou proměnnou zkoumán pomocí testů asociace. Pro hledání ideální cut off daného parametru byl užit Coxův regresní model. Multivariační analýza byla zpracována užitím Coxova regresního modelu (stepwise regrese).

7 Výsledky

7.1 Výsledky tkáňových vzorků

Sledovali jsme význam exprese hladin mRNA CEA, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 jako prognostického faktoru pro recidivu nádorového onemocnění po resekci jaterních metastáz. Současně byl sledován vztah stanovovaných laboratorních parametrů k celkovému přežití.

Tabulka 2 uvádí vztah bezpříznakového přežití (DFI) a hladin mRNA (absolutní hodnoty) CEA, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 stanovených v jaterní metastatické tkáni. Absolutní hodnoty znamenají počet kopií molekul sledovaných genů vztažených na 3 μ g RNA. Zaznamenali jsme statisticky signifikantní závislost exprese mRNA CEA, MMP-9 a TIMP-1 na DFI ($p < 0.0225$, $p < 0.0282$ a $p < 0.0175$) – graf č. 2 a 3.

Tab. 2: Vztah DFI k hladině exprese mRNA (absolutní hodnoty)

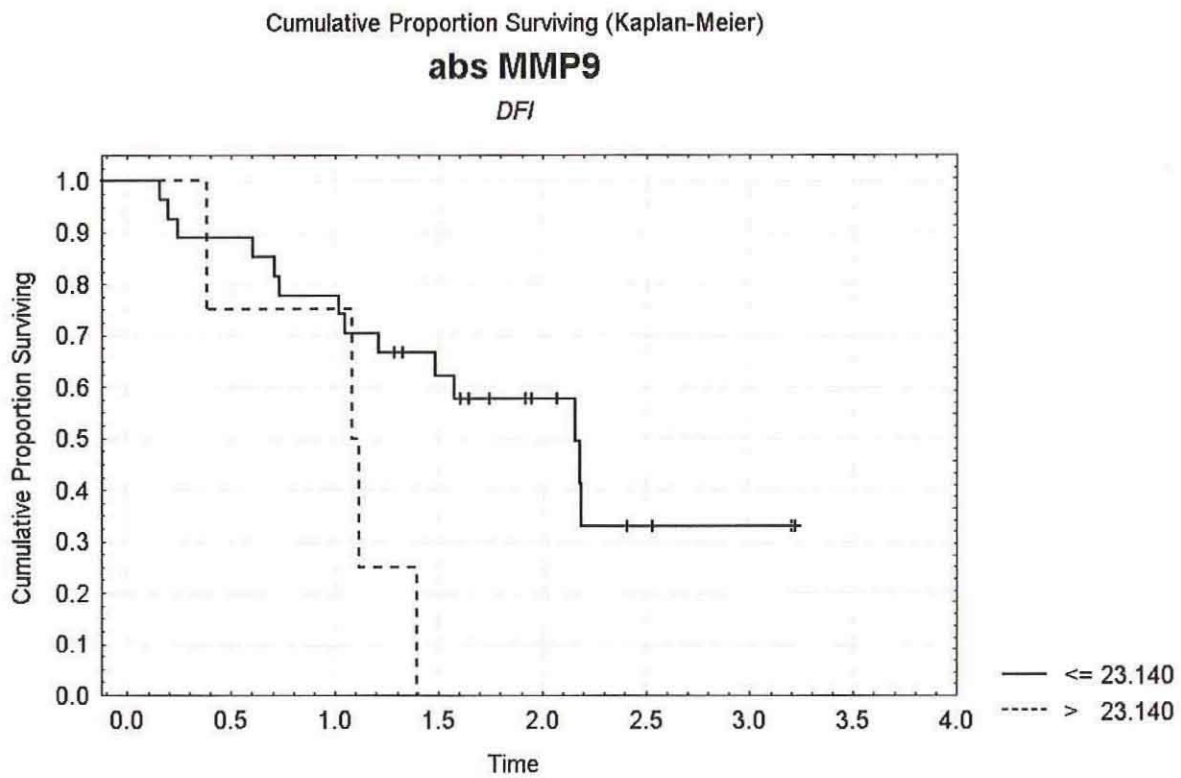
v jaterní metastatické tkáni

mRNA	optimal cut off	Log-rank p-value
CEA	22430	0,0225
MMP-2	0,5	0,991
MMP-7	3400	0,3574
MMP-9	23140	0,0282
TIMP-1	1354000	0,0175
TIMP-2	213	0,3731

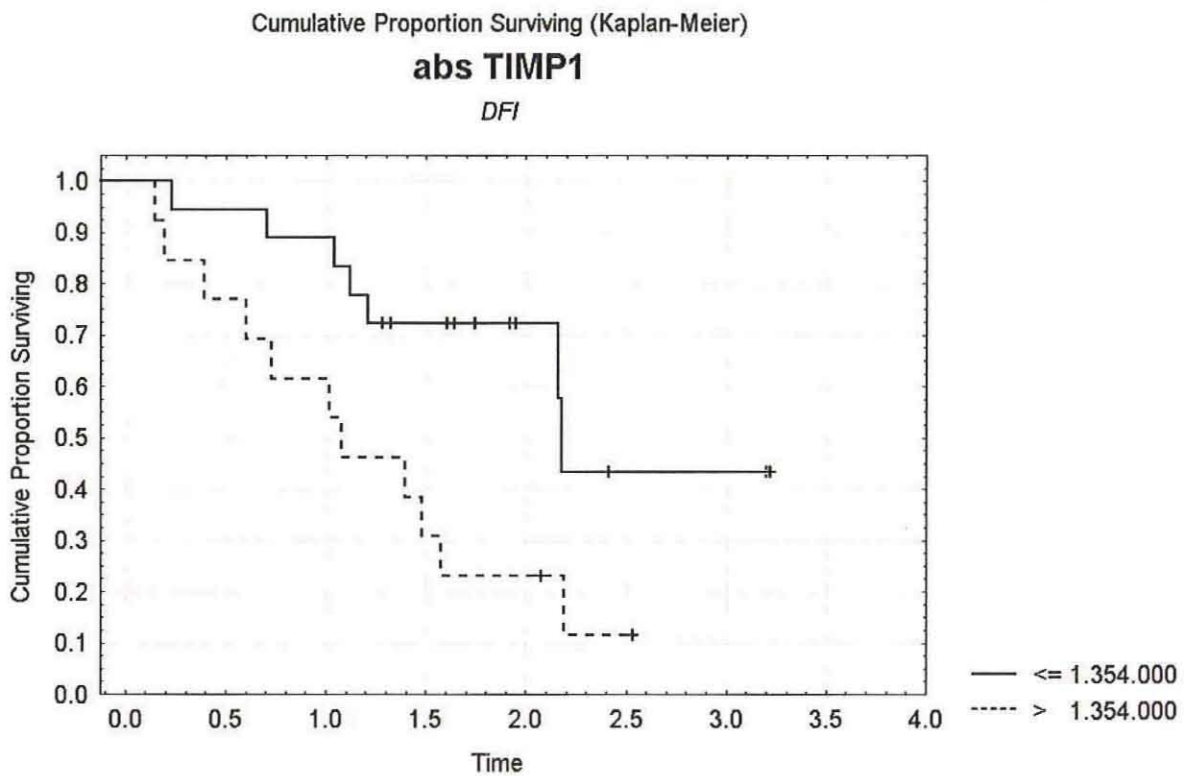
Tabulka 3 ozřejmuje vztah bezpříznakového přežití (DFI) a hladin mRNA stanovených jako normalizované hodnoty. Expres CEA, MMP-2, MMP-7, TIMP-9 a TIMP-1 je vztažena k hladině housekeeping genu GAPDH.

Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní závislost exprese CEA, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 a DFI.

Graf č. 2: Vztah DFI a hladiny exprese mRNA MMP-9 (absolutní hodnota)



Graf č. 3: Vztah DFI a hladiny exprese mRNA TIMP-1 (absolutní hodnota)



Tab. 3: Vztah DFI k hladině exprese mRNA (normalizované hodnoty)**v jaterní metastatické tkáni**

mRNA	optimal cut off	Log-rank p-value
CEA	0,0284	0,5223
MMP-2	0,0023	0,0569
MMP-7	0,021	0,4066
MMP-9	0,851	0,8198
TIMP-1	4,8	0,0761
TIMP-2	0,4	0,218

V tabulce 4 je ukázán vztah celkového přežití (OS) a hladin mRNA (absolutní hodnoty) CEA, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2. Zaznamenali jsme statisticky signifikantní závislost hladin exprese mRNA MMP-9 a TIMP-1 a OS. ($p < 0.0302$ a $p < 0.0431$) - graf č. 4 a 5. Statistická hodnota závislosti exprese mRNA CEA a OS byla hraniční ($p < 0.0543$).

Tab. 4: Vztah OS k hladině exprese mRNA (absolutní hodnoty)**v jaterní metastatické tkáni**

mRNA	optimal cut off	Log-rank p-value
CEA	22430	0,0543
MMP-2	1,1	0,0554
MMP-7	39700	0,2831
MMP-9	23140	0,0302
TIMP-1	1354000	0,0431
TIMP-2	918	0,7858

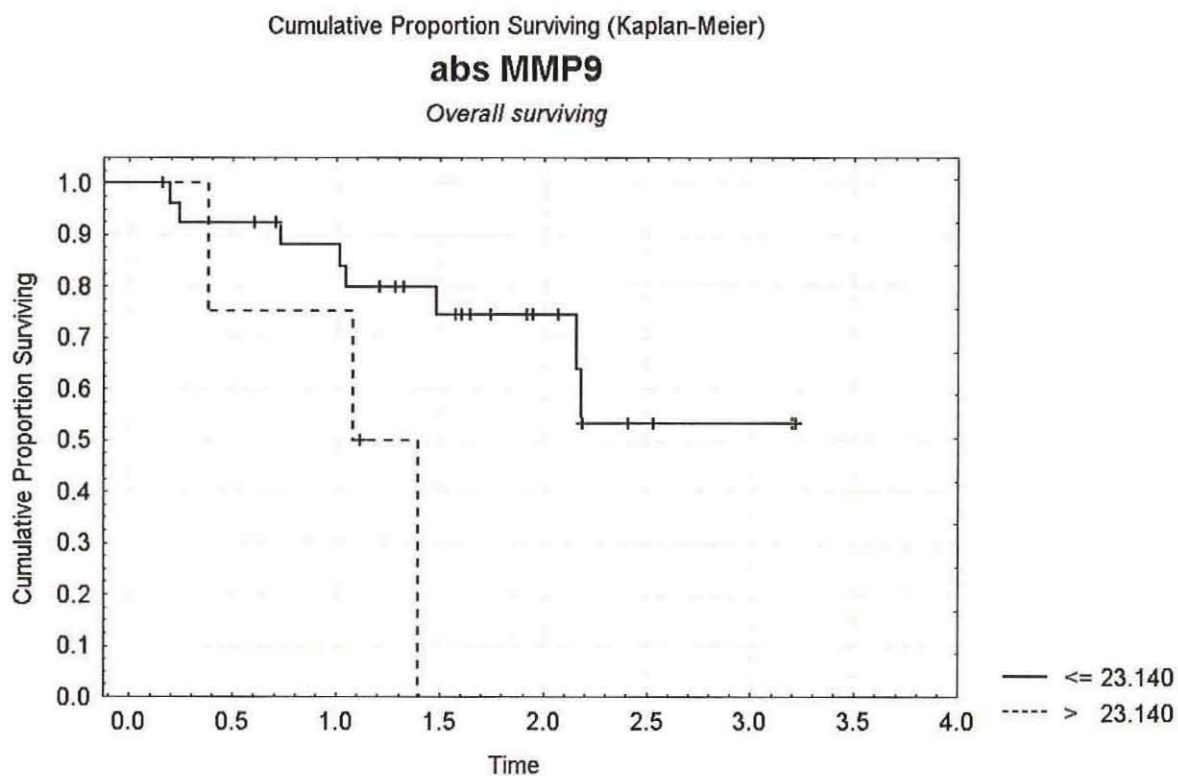
V tabulce 5 jsou hodnoty vztahu exprese mRNA CEA, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 (normalizované hodnoty). Nezaznamenali jsme statisticky signifikantní závislost exprese těchto veličin: CEA, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 a OS.

Tab. 5: Vztah OS k hladině exprese mRNA (normalizované hodnoty)

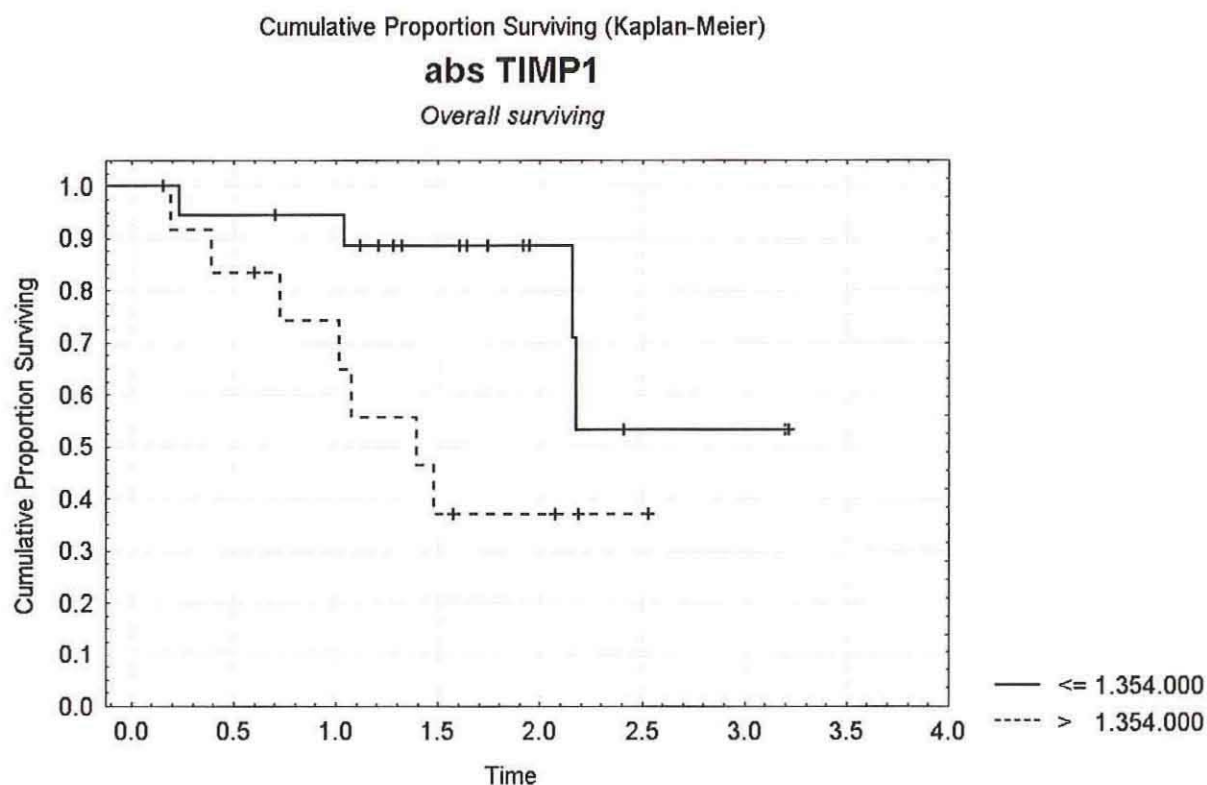
v jaterní metastatické tkáni

mRNA	optimal cut off	Log-rank p-value
CEA	1,714	0,2179
MMP-2	0,00001	0,0811
MMP-7	0,04	0,0763
MMP-9	0,494	0,9207
TIMP-1	34,44	0,3344
TIMP-2	0,0854	0,9569

Graf. č 4: Vztah OS a hladiny exprese mRNA MMP-9 (absolutní hodnota)



Graf č. 5 Vztah OS a hladiny exprese mRNA TIMP-1 (absolutní hodnota)



7.2 Výsledky sérových vzorků

7.2.1 Stanovení normálu – kontrolní skupina (skupina 3)

Nejprve jsme stanovili normály sérových hladin jednotlivých studovaných markerů. Jednalo se o pacienty zařazené do skupiny 3 (nemocní s operací tříselné kýly). Séra byla odebrána před vlastním chirurgickým výkonem. Jako normální hodnoty byly definovány hodnoty odpovídající mediánu jednotlivých hodnot. Jednalo se o následující hodnoty: CEA 0,65 ng/mL; AFP 2,25 ug/L; MMP-2 398,7 ng/mL; MMP-9 74,7 ng/mL; TIMP-1 109,05 ng/mL; TIMP-2 18,9 ng/mL.

**Tab. 6: Stanovení normálu pro jednotlivé markery u skupiny 3 (kontrolní skupina)
podle předoperačního náběru**

Marker	min.- max.	median
CEA	0,1 - 5,5 ng/ml	0,65
AFP	1,1 - 8,9 ug/L	2,25
MMP-2	293 - 669 ng/ml	398,7
MMP-9	18 - 270,8 ng/ml	74,7
TIMP-1	65,6 - 225,5 ng/ml	109,05
TIMP-2	16,2 - 113,2 ng/ml	18,9

Při porovnání s hodnotami měřenými po chirurgickém výkonu se statisticky významně lišily hodnoty CEA $p < 0,049$; AFP $p < 0,019$; MMP-9 $p < 0,002$, /viz tab. 7 a 8/. U CEA a AFP došlo k poklesu hodnot (u CEA došlo k poklesu pooperačních hodnot u 65 % pacientů, u AFP došlo k poklesu u 75 % pacientů). U MMP-9 došlo k signifikantnímu vzestupu pooperačních hodnot.

Tab. 7: Pooperační hodnoty jednotlivých markerů ve skupině 3 (kontrolní skupina)

Marker	min.- max.	median
CEA	0,1 - 4,7 ng/ml	0,65
AFP	1,1 - 8,7 ug/L	2,25
MMP-2	264,3 - 640,8 ng/ml	388
MMP-9	97 - 383,1 ng/ml	137,4
TIMP-1	66,8 - 233,7 ng/ml	116,5
TIMP-2	15,9 - 94,1 ng/ml	18,5

Tab. 8: Porovnání předoperačních a pooperačních hodnot jednotlivých markerů ve skupině 3 (kontrolní skupina)

Marker	Kontroly předop/poop. p-value
CEA	p<0,049
AFP	p<0,019
MMP-2	p<0,26
MMP-9	p<0,002
TIMP-1	p<0,26
TIMP-2	p<0,26

Výsledky kontrolní skupiny byly porovnány s výslednými hodnotami získaných od ostatních skupin.

7.2.2 Benigní onemocnění jater – ložiskové procesy jater (skupina 2)

Při porovnání kontrolní skupiny se skupinou benigních tumorů byly prokázány jako statisticky významně vyšší předoperační sérové hodnoty proteinů MMP-2, p<0,016; MMP-9, p<0,0002, a TIMP-2, p<0,0001; /viz tab. 9 a 10/.

Tab. 9: Předoperační hodnoty jednotlivých markerů ve skupině 2 (benigní nádory)

Marker	min.- max.	median
CEA	0,3 - 1124 ng/ml	1,05
AFP	1,1 - 6,3 ug/L	2,25
MMP-2	288 - 938 ng/ml	481
MMP-9	45,8 - 457 ng/ml	160,75
TIMP-1	59,5 - 195,2 ng/ml	106
TIMP-2	22,1 - 81 ng/ml	41,85

Tab. 10: Porovnání předoperačních hodnot jednotlivých markerů skupiny 2 (benigní nádory) a kontrolní skupiny

Marker	Kontroly/ben.předop. p-value
CEA	p<0,32
AFP	p<0,3
MMP-2	p<0,016
MMP-9	p<0,0002
TIMP-1	p<0,69
TIMP-2	p<0,0001

Pooperačně byly významně vyšší pouze MMP-2, p<0,013 a TIMP-2, p<0,0001; /viz tab. 11 a 12/.

Tab. 11: Pooperační hodnoty jednotlivých markerů ve skupině 2 (benigní nádory)

Marker	min.- max.	median
CEA	0,2 - 389,9 ng/ml	0,7
AFP	0,9 - 4,8ug/L	1,9
MMP-2	231 - 860 ng/ml	476
MMP-9	28,6 - 591,2 ng/ml	174,9
TIMP-1	82,4 - 371,1 ng/ml	126,9
TIMP-2	20 - 78,5 ng/ml	42,6

Tab. 12: Porovnání pooperačních hodnot jednotlivých markerů skupiny 2 (benigní nádory) a kontrolní skupiny

Marker	Kontroly/ben. poop. p-value
CEA	p<0,69
AFP	p<0,06
MMP-2	p<0,013
MMP-9	p<0,4
TIMP-1	p<0,071
TIMP-2	p<0,0001

7.2.3 Resekční výkony při metastatickém procesu KRK (skupina 1)

Porovnáním předoperačních sérových hladin zkoumaných onkomarkerů skupiny 1 (resekce jater pro metastatický proces KRK) s kontrolní skupinou 3 byly prokázány jako statisticky signifikantní změny MMP-2, $p < 0,02$; MMP-9, $p < 0,003$; TIMP-1, $p < 0,04$; TIMP-2, $p < 0,001$ a CEA, $p < 0,001$; /viz tab. 13 a 14/. Všechny onkomarkery byly proti kontrolní skupině zvýšené.

Tab. 13: Předoperační hodnoty jednotlivých markerů ve skupině 1 (resekce)

Marker	min.- max.	median
CEA	0,3 - 44528 ng/ml	23,4
MMP-2	287 - 1000 ng/ml	473
MMP-9	30,1 - 397,4 ng/ml	120
TIMP-1	73,8 - 498,1 ng/ml	134,5
TIMP-2	17,2 - 83 ng/ml	28,3

Tab. 14: Porovnání předoperačních hodnot jednotlivých markerů skupiny 1 (resekce) a kontrolní skupiny

Marker	Kontroly/resekce předop. p-value
CEA	$p < 0,001$
MMP-2	$p < 0,02$
MMP-9	$p < 0,003$
TIMP-1	$p < 0,04$
TIMP-2	$p < 0,001$

Pooperační rozdíly sérových hladin byly v týchž skupinách signifikantní pouze pro MMP-2, $p < 0,001$; TIMP-1, $p < 0,003$; TIMP-2, $p < 0,001$ a CEA, $p < 0,0004$; /viz tab. 15 a 16/.

Tab. 15: Pooperační hodnoty jednotlivých markerů ve skupině 1 (resekce)

Marker	min.- max.	median
CEA	0,2 - 327 ng/ml	4,5
MMP-2	284 - 1694 ng/ml	501
MMP-9	36,7 - 266 ng/ml	119,7
TIMP-1	63,7 - 314,5 ng/ml	165,2
TIMP-2	18,9 - 83 ng/ml	28,7

Tab. 16: Porovnání pooperačních hodnot jednotlivých markerů skupiny 1 (resekce) a kontrolní skupiny

Marker	Kontroly/resekce poop. p-value
CEA	p<0,0004
MMP-2	p<0,001
MMP-9	p<0,11
TIMP-1	p<0,003
TIMP-2	p<0,001

U nemocných se sekundárním tumorem jater, kterým byl proveden resekční výkon a byli po 6 měsících v remisi, přetrvávaly statisticky významně vyšší hodnoty MMP-2, $p<0,0016$ a TIMP-2, $p<0,0002$. Hodnota CEA, $p<0,0045$; /viz tab. 17 a 18/, i když byla vyšší než u kontrolní skupiny, nepřesahovala uznávaný a rutinně v praxi používaný standard. Hodnoty MMP-9 a TIMP-1 se vyrovnávaly s hodnotami kontrolní skupiny před operací.

Tab. 17: Pooperační hodnoty jednotlivých markerů ve skupině 1 (resekce)

u nemocných v remisi po 6 měsících

Marker	min.- max.	median
CEA	0,8 - 180,6 ng/ml	2
MMP-2	274 - 1195 ng/ml	647
MMP-9	11,9 - 217,4 ng/ml	81,95
TIMP-1	68,9 - 209,9 ng/ml	123
TIMP-2	24,2 - 96,9 ng/ml	28,6

Tab. 18: Porovnání pooperačních hodnot jednotlivých markerů skupiny 1 (resekce)

u nemocných v remisi po 6 měsících a kontrolní skupiny

Marker	Kontroly/resekce po 6 měs. p-value
CEA	p<0,0045
MMP-2	p<0,0016
MMP-9	p<0,58
TIMP-1	p<0,16
TIMP-2	p<0,0002

7.3 Porovnání sérových vzorků ve vztahu k DFI a OS

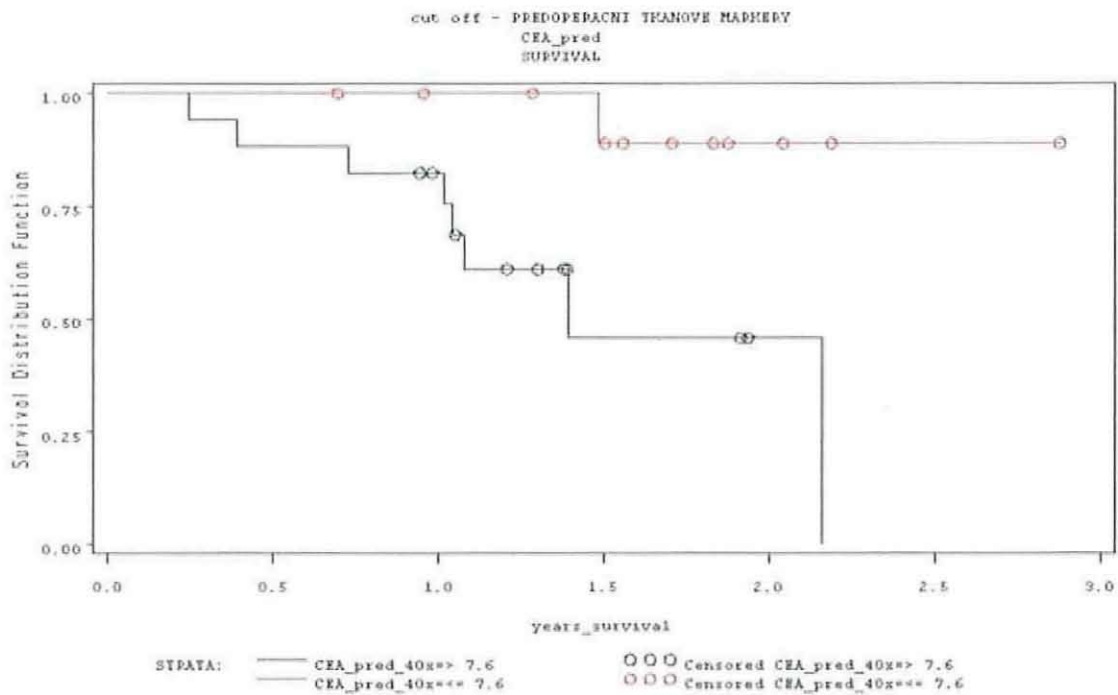
Vztah délky celkového přežití (OS) a bezpříznakového přežití (DFI) k hladině proteinu v periferní krvi (náběry před operací) u skupiny 1 (resekce)

Tabulka 19 ukazuje vztah celkového přežití (OS) k hladině sérových MMP, TIMP a CEA, zaznamenali jsme statisticky signifikantní závislost CEA a OS ($p<0,0082$) – graf č. 6, TIMP-1 a OS ($p<0,0012$) – graf č. 7

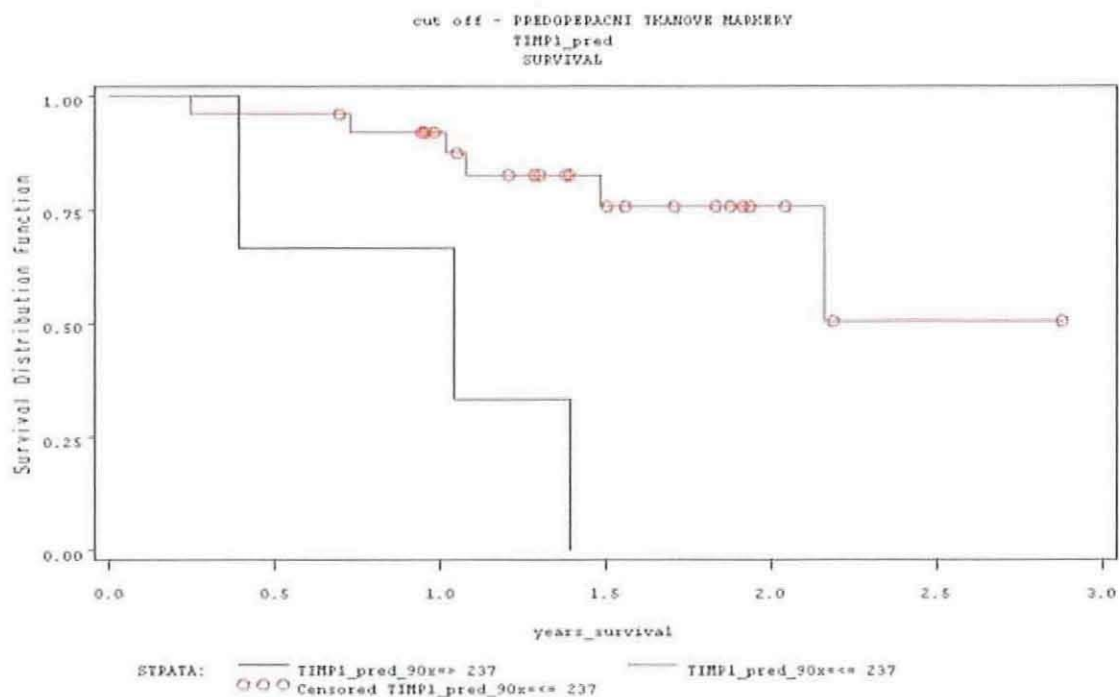
Tab. 19: Vztah OS a předoperační sérové hladiny proteinu v periferní krvi u skupiny 1 (resekce)

Marker	optimal cut off	Log-rank p-value
CEA	7,6 ng/ml	p<0,0082
MMP-2	507 ng/ml	p<0,3694
MMP-9	47,7 ng/ml	p<0,4053
TIMP-1	237 ng/ml	p<0,0012
TIMP-2	43,1 ng/ml	p<0,1611

Graf č. 6: Vztah OS a předoperační sérové hladiny CEA



Graf č. 7: Vztah OS a předoperační sérové hladiny TIMP-1

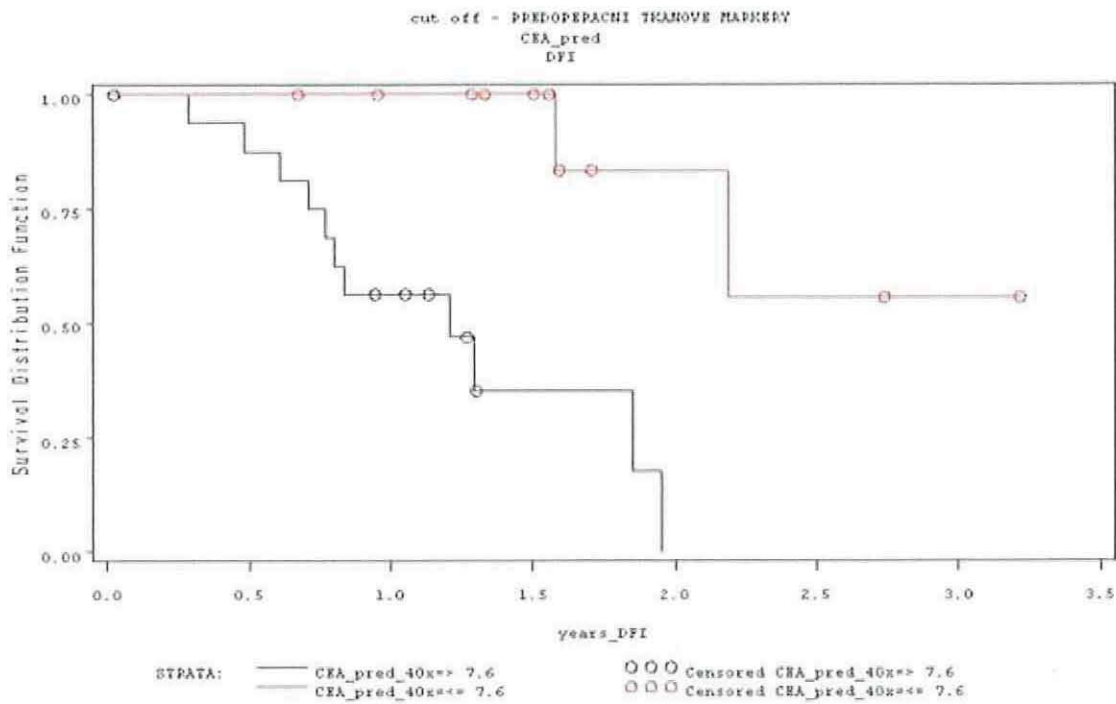


Tabulka 20 ukazuje vztah bezpříznakového přežití (DFI) k hladině sérových MMP, TIMP a CEA, zaznamenali jsme statisticky signifikantní závislost CEA a DFI ($p < 0,0006$) – graf č. 8, TIMP-1 a DFI ($p < 0,0044$) – graf č. 9.

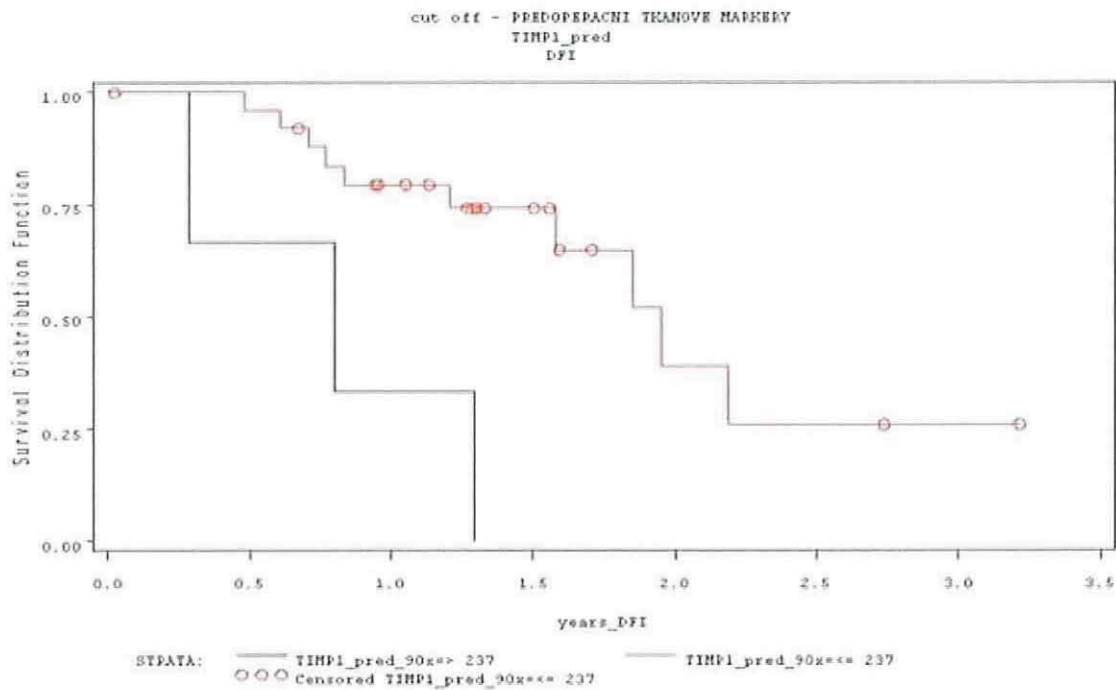
Tab. 20: Vztah DFI a předoperační sérové hladiny proteinu v periferní krvi u skupiny 1 (resekce)

Marker	optimal cut off	Log-rank p-value
CEA	7,6 ng/ml	$p < 0,0006$
MMP-2	683 ng/ml	$p < 0,5256$
MMP-9	153 ng/ml	$p < 0,4362$
TIMP-1	237 ng/ml	$p < 0,0044$
TIMP-2	21,8 ng/ml	$p < 0,0901$

Graf č. 8: Vztah DFI a předoperační sérové hladiny CEA



Graf č. 9: Vztah DFI a předoperační sérové hladiny TIMP-1



7.3.1 Celkové přežití

Současně byla kromě univariační analýzy provedena multivariační analýza (Coxův regresní model). Nejvýznamnějším markerem je CEA – graf č. 6, u kterého při optimalizované cut off (>7.6) CEA je riziko smrti pacienta téměř 11x vyšší u hodnot nad cut off (hazard ratio HR 10,5; $p < 0,0028$). Vliv ostatních faktorů není statisticky signifikantní.

Určitý vliv má také TIMP1 – graf č. 7 (optimalizovaná cut off hodnota = 237), kdy riziko úmrtí pacienta při provedené univariační analýze je 8x vyšší (HR 8,1; $p < 0,0012$). Pro potvrzení významu TIMP-1 je třeba delší follow up.

7.3.2 DFI

Nejvýznamnější faktor (ze všech markerů z univariační analýzy, které vstoupily do multivariační analýzy) je CEA – graf č. 8. Při optimalizované cut off (>7.6) CEA je riziko recidivy metastatického procesu jater téměř 13x vyšší než u pacientů, kteří mají CEA ≤ 7.6 .

7.4 Výsledky porovnání sérových a tkáňových vzorků

Porovnávali jsme hodnoty exprese mRNA genů ve tkáni jaterních metastáz CEA, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 se sérovými hladinami proteinu. Sledovali jsme, zda pacienti, jejichž vzorky nádorové tkáně mají vyšší hodnoty exprese mRNA, mají také vyšší hladiny proteinu v séru. Nezjistili jsme však statisticky signifikantní korelace mezi expresí genů CEA, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 v tkáni a séru /viz tab. 21 a 22/.

I když žádná z korelací nebyla statisticky významná, nejlepší výsledek vycházel pro expresi mRNA TIMP-1 (absolutní hodnoty) v tkáni jaterních metastáz, které nejbližší odpovídá dynamika hladiny proteinu TIMP-1 v séru.

Tab. 21: Korelace mezi expresí mRNA genů CEA MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 ve tkáni jaterních metastáz (absolutní hodnoty exprese) a v séru u pacientů

Hladina mRNA v tkáni x sérový marker (absolutní hodnoty exprese)	Korelační Spearm. koeficient	p-value
mRNA CEA x CEA	0,121	p<0,54
mRNA MMP-2 x MMP-2	-0,2059	p<0,28
mRNA MMP-9 x MMP-9	0,2862	p<0,13
mRNA TIMP-1 x TIMP-1	0,3493	p<0,063
mRNA TIMP-2 x TIMP-2	0,2141	p<0,26

Tab. 22: Korelace mezi expresí mRNA genů CEA MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 ve tkáni jaterních metastáz (normalizované hodnoty exprese) a v séru u pacientů

Hladina mRNA v tkáni x sérový marker (normalizované hodnoty exprese)	Korelační Spearm. koeficient	p-value
mRNA CEA x CEA	0,0868	p<0,66
mRNA MMP-2 x MMP-2	-0,3225	p<0,087
mRNA MMP-9 x MMP-9	0,1818	p<0,34
mRNA TIMP-1 x TIMP-1	0,3143	p<0,096
mRNA TIMP-2 x TIMP-2	0,1419	p<0,46

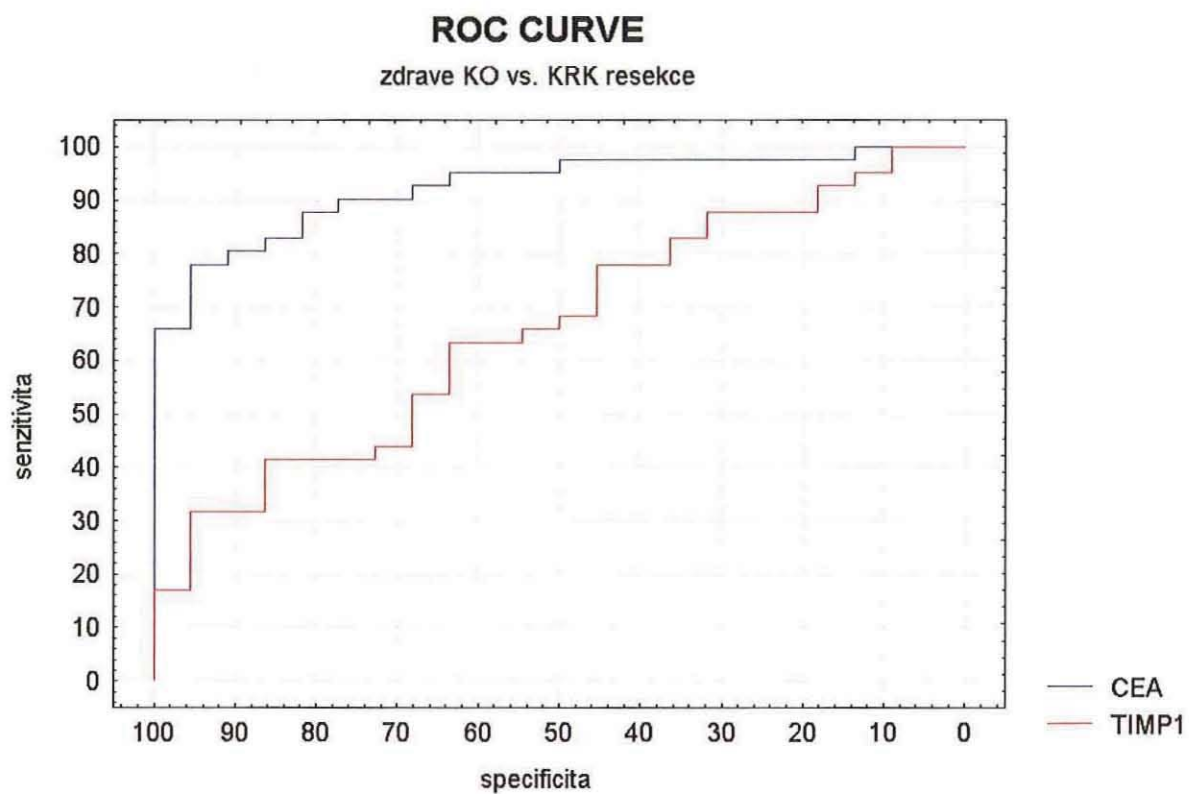
7.5 Klinická korelace jednotlivých onkomarkerů

K porovnání citlivosti metody jsme použili ROC křivky (Receiving operative curves). Srovnávali jsme CEA s TIMP-1, což byl, z námi vybraného souboru MMP a TIMP, nejlépe vycházející marker – graf č. 10. Jeho exprese mRNA ve tkáňových vzorcích i hladina ve

vzorcích sérových prokazatelně souvisela s DFI i OS. Nejlepší výsledky CEA byly u resekcí metastáz KRK, kdy při specifitě 90 % byla senzitivita 80 %. U TIMP-1 vycházela u resekcí metastáz KRK poměrně nízká senzitivita jen 31,5 % při specifitě 90 %.

Velmi uspokojivě však vyšla kombinace obou markerů, kdy při 90% specifitě se senzitivita zvýšila na 85,5 %.

Graf č. 10: Porovnání ROC křivek CEA a TIMP 1



8 Diskuze

Provedli jsme odběr a analýzy vzorků nádorové tkáně z resekovaných jaterních metastáz a odběr vzorků krve u takto léčených nemocných. Naším cílem bylo posoudit možnost využití MMP a TIMP ke stanovení přesnější prognózy nemocných s metastázami KRK do jater, případné využití MMP a TIMP k zachycení časně recidivy onemocnění a porovnání MMP a TIMP s CEA, zástupcem klasických nádorových markerů, běžně využívaným v praxi.

Prezentované výsledky získané analýzou **tkáňových biopsií** tumorů ukazují statisticky signifikantní význam exprese mRNA CEA, MMP-9 a TIMP-1 pro prognózu bezpříznakového přežití (DFI), tedy včasnou detekci recidivy onemocnění jaterních metastáz. Stanovení exprese mRNA MMP-9 a TIMP-1 má rovněž statisticky signifikantní význam pro prognózu celkového přežití (OS).

Statisticky významné hodnoty jsme zaznamenali pouze u hodnot absolutních (vztažených k 3 μ g celkové RNA) u hodnot normalizovaných (poměr s GAPDH, housekeeping gen) se statistické významnosti pouze blížily. To může souviset s některými již dřívějšími pozorováními. Například bylo zaznamenáno, že dochází ke zvýšené expresi GAPDH u potkaních jaterních nádorů [51] nebo v lidských prostatických buňkách [52]. Z toho plyne, že v nádorových buňkách předpoklad konstantní exprese housekeeping genů nemusí platit.

Černá a kol. [53] pozorovali zvýšenou hladinu exprese mRNA CEA u kolorektální nádorové tkáně v porovnání s normální kolorektální tkání. Další autoři sledovali u nemocných s kolorektálním karcinomem hladinu mRNA CEA v periferní krvi a v lymfatických uzlinách. U pacientů s tímto onemocněním tak detekovali mikrometastázy kolorektálního karcinomu [54, 55]. Kijima a kol. [56] shrnuje ve své práci, že detekce mRNA CEA je senzitivnější než detekce vlastního proteinu CEA pro predikci recidivy metastáz KRK. My jsme stanovili hladinu exprese mRNA CEA v jaterních metastázách. Nalezli jsme statisticky významný vztah

mezi hladinou exprese mRNA CEA a DFI. Pozorovali jsme také těsný vztah mezi hladinou mRNA CEA a OS ($p < 0,054$).

Při zkoumání MMP-9 dospěl k podobným závěrům jako my například Tien [57]. Tento autor sledoval roli matrixových metaloproteináz v nádorové tkáni u kolorektálního karcinomu a v jeho jaterních metastázách. Zjistil, že zvýšená aktivita MMP-9 může podporovat metastatický proces v játrech ve fázích po intravazaci, ale ne během intravazace a před ní. Vztah mezi expresí MMP-7 a MMP-9 a agresivitou kolorektálních karcinomů, která je spojena s metastatickým procesem, popsal Heslin [58]. Waas a kol. [59] pozorovali vztah mezi aktivitou matrixových metaloproteináz a opětovným výskytem nádorů. Zjistili, že hladiny aktivní formy enzymů i proenzymů MMP-2 a MMP-9 byly zvýšeny v metastatické tkáni nádoru při opětovném výskytu po 6 měsících od jeho radikální resekce.

Ishida [60] stanovoval sérové hladiny MMP-9 v portální a periferní žilní krvi a zjistil, že zvýšené hladiny těchto metaloproteináz korelovaly se zvýšeným rizikem opětovného výskytu jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. To by mohlo pomoci při výběru ohrožených pacientů. Velmi zajímavá je studie Currana a spolupracovníků [61], kde byl zkoumán profil MMP/TIMP pomocí hierarchické klastrové analýzy (byly použity MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP 2). Kombinovaná analýza MMP a TIMP pomohla nalézt skupinu pacientů ohrožených recidivou nebo metastázami kolorektálního karcinomu, která měla velice zkrácenou dobu celkového přežití. Adachi a kol. [62] zaznamenal, že zvýšená exprese MMP-7 koreluje s přítomností metastáz v uzlinách a vzdálených metastáz u pacientů s kolorektálním nádorem. My jsme však nenalezli žádnou statistickou významnost mezi hladinou exprese mRNA MMP-7 a OS či DFI. To může mít souvislost s výsledky jiných autorů, kteří objevili, že zvýšená exprese MMP-7 je kontrolována geny, jejichž exprese byla identifikována jako důležitá pro časná stadia karcinogeneze kolorektálního karcinomu [20].

TIMP-1 inhibuje proteolytickou aktivitu matrixových metaloproteináz MMP-7 a MMP-9. Avšak u TIMP-1 byly pozorovány i další funkce, jako je stimulace buněčného růstu a inhibice apoptózy, která je také závislá na proteolytické aktivitě. V tomto kontextu není překvapivé, že autoři pozorovali zvýšené hladiny exprese mRNA TIMP-1 a také proteinu TIMP-1 v kolorektální nádorové tkáni [38]. Holten-Andersen a kol. [63] popisuje, že vysoké předoperační hladiny proteinu TIMP-1 v plazmě jsou asociovány s kratším OS u pacientů s kolorektálním karcinomem. Dosud citované práce jsou v souladu s našimi výsledky a podporují naše závěry.

Waas a spolupracovníci [59] však shrnují, že předoperační hladiny pro MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 v plazmě nemají význam jako diagnostické nebo prognostické markery u metastatického onemocnění jater z KRK. Yamamoto a kol. [64] v roce 1999 popisoval zvýšenou expresi mRNA TIMP-1 a TIMP-2 v nádorové tkáni poloviny jaterních karcinomů, ale nenalezl korelaci s klinicko-patologickými vlastnostmi. Metoda, kterou použil pro detekci mRNA Yamamoto, byla semikvantitativní RT-PCR. My jsme použili kvantitativní RT-PCR a zjistili, že hladina exprese mRNA TIMP-1 v nádorové tkáni má statisticky signifikantní vztah k DFI a OS.

Pro analýzu **sérových onkomarkerů** jsme nejprve vytvořili kontrolní skupinu nemocných bez malignity (viz rozdělení skupin). Stanovené hladiny sérových onkomarkerů (CEA, AFP, MMP-2 a MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2) jsme použili k analýze vlastního souboru pacientů s metastatickým postižením jater a souboru s benigními onemocněními jater.

U kontrolní skupiny vlastní chirurgický výkon (plastika tříselné kýly) neovlivnil předoperační a pooperační sérové hladiny MMP-2, TIMP-1 a TIMP-2. Statisticky signifikantní rozdíl mezi předoperační a pooperační hladinou byl však zaznamenán u CEA, AFP (pokles pooperačních hodnot) a MMP-9 (zvýšení pooperačních hodnot). U CEA, přestože byl medián

hodnot před operací a po operaci stejný, došlo u 65 % (13 pacientů) k pooperačnímu poklesu hodnot. U 15 % (3 pacienti) byly hodnoty CEA beze změn a u 20 % (4 pacienti) došlo k vzestupu hodnot. Výsledky u AFP byly obdobné. Hodnoty mediánu před operací a po operaci byly stejné. K poklesu hodnot AFP došlo u 75 % (15 pacientů), beze změny byly hodnoty u 5 % (1 pacient) a k vzestupu hodnot došlo u 20 % (4 pacienti). U obou klasických onkomarkerů tedy došlo k signifikantnímu poklesu pooperačních hodnot ve srovnání s hodnotami před operací (CEA – $p < 0,049$; AFP $p < 0,019$). Z hodnot výsledků je však zcela zřejmé, že uvedené změny těchto markerů jsou velmi nízké a nikdy nebyly překročeny normály používané pro klinickou detekci patologického stavu. Stanovení AFP jsme využili u kontrolní skupiny k zajištění objektivity našeho měření při stanovování CEA, neboť AFP patří rovněž mezi rutinně používané onkomarkery a standardně se stanovuje u HCC jater. Elevace pooperačních hodnot MMP-9 může být důsledkem fyziologické funkce této pleiotropní proteázy v počáteční fázi hojení rány a nezbytné aktivace prozánětlivých mechanismů hojení.

U skupiny benigních ložiskových onemocnění jater (hemangiomy, fokální nodulární hyperplazie, adenomy, cysty jater) jsme porovnávali předoperační a pooperační hodnoty s kontrolní skupinou. Zjistili jsme statisticky významný rozdíl předoperační sérové hladiny MMP-2, MMP-9 a TIMP-2 a pooperační sérové hladiny MMP-2, TIMP-2 ve srovnání s kontrolní skupinou.

Rozdíl ve sledovaných laboratorních parametrech lze vysvětlit vlastní aktivitou benigní tkáně, která v některých případech vykazuje vlastnosti prekancerózy (adenom), dochází zde k dělení a přestavbám tkáně, kterých se MMP a TIMP účastní. V případě benigních lézí jater lze také hypoteticky uvažovat o aktivitě jaterní tkáně v bezprostřední blízkosti léze. Ta je postižena vždy nedostatečnou drenáží žluči a ischemizována v důsledku tlaku benigního

ložiskového procesu (cysta, FNH, hemangiom). To vede k přestavbě této jaterní tkáně, a tak i k možné elevaci uvedených markerů ve srovnání s kontrolní skupinou.

Kontrolní skupina a skupina nemocných s benigním onemocněním jater sloužily jako základní a výchozí skupiny, které měly eliminovat vliv fyziologických procesů a změn sledovaných metaloproteináz a jejich inhibitorů. Předoperační i pooperační hodnoty CEA a AFP nebyly podle očekávání u benigních nádorů zvýšené. U MMP a TIMP došlo ke zvýšení exprese v benigní tkáni oproti kontrolní, přesto je toto zvýšení markerů nesrovnatelné s naměřenými hodnotami při postižení jaterního parenchymu malignitou (jak ukazují výsledky).

Statistická analýza sérových hladin studovaných onkomarkerů u pacientů, kteří podstoupili radikální odstranění malignity jater (v našem případě metastáz KRK), prokázala statisticky významné rozdíly jak u předoperačních hladin (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 a CEA), tak u pooperačních hladin (MMP-2, TIMP-1 a -2 a CEA) při porovnání těchto pacientů (meta KRK) s kontrolní skupinou.

Kromě hodnocení prognózy u jednotlivých markerů jsme zjišťovali chování hladin markerů před chirurgickým výkonem a po něm u skupiny pacientů s malignitou jater (dynamiku jednotlivých markerů).

U karcinoembryonálního antigenu jsme pozorovali pokles mediánu hladiny po operačním výkonu. Vzhledem k radikálnímu odstranění tumorózní masy, jejímuž rozsahu tento marker odpovídá, je tento výrazný pokles logický. U metaloproteináz a jejich inhibitorů, které souvisí s invazivitou a agresivitou malignity, ale jejichž exprese se zvyšuje také u zánětlivých a reparačních procesů, došlo k pooperačnímu zvýšení hladiny.

Na rozdíl od našich výsledků Quaranta a kol. [65] ve své práci zaznamenal výrazný pokles MMP-9 v séru u nemocných po odstranění karcinomu prsní žlázy. Tento pokles dával autor do souvislosti s prodlouženým DFI u těchto pacientů. Podobné výsledky měli u karcinomu prsu

i Ranuncolo a kol. [66], kdy vysoké předoperační hladiny MMP-9 souvisely s horší prognózou nemocných, a pooperační zvýšení hladiny MMP-9, po odstranění karcinomu, souviselo se sklonem pacientů k recidivě. V dostupné literatuře zatím nebyla diskutována role MMP a TIMP v séru, u nemocných po odstranění jaterních metastáz kolorektálního karcinomu ve vztahu ke sledování.

Při porovnání sérových hladin sledovaných onkomarkerů s 6měsíčním odstupem u pacientů s metastázami kolorektálního karcinomu do jater, kteří byli po radikální chirurgické léčbě v remisi, se hodnoty MMP-9 a TIMP-1 vyrovnávaly s hodnotami **kontrolní skupiny** před operací. Tento fakt dokazuje, že hladina TIMP-1 v séru odpovídá biologické aktivitě metastáz KRK [63, 64], a jak již bylo prokázáno u tkáňových vzorků jaterních metastáz, souvisí s přežíváním nemocných.

Dále jsme hodnotili prognostický význam sérových nádorových markerů. Zjistili jsme, že předoperační sérové hladiny CEA a TIMP-1 byly statisticky významné pro predikci celkového přežití pacientů po radikálním odstranění metastatického procesu jater. Multivariační statistickou analýzou byl prognostický význam předoperačních hodnot prokázán u CEA. Pro zhodnocení významu dalších markerů je třeba delšího klinického sledování. Nicméně už nyní toto naše zjištění může přispět k definování vysoce rizikového souboru pacientů, u kterých je zvýšená pravděpodobnost progresu nádorového onemocnění. Tito pacienti by měli být intenzivně sledováni za účelem časně detekce progresu nádorového onemocnění s možností terapeutické intervence (radikální či paliativní chirurgický výkon, dlouhodobé podávání adjuvantní chemoterapie ke snížení rizika recidivy).

Předoperační sérové hladiny CEA a TIMP-1 byly rovněž statisticky významné pro predikci časně recidivy (vzhledem k charakteru souboru) metastatického procesu jater po radikálním odstranění malignity. Z multivariační analýzy, do které vstoupily všechny statisticky významné onkomarkery z univariační analýzy, vychází opět CEA jako nejvýznamnější faktor

časné recidivy metastatického procesu. Stanovili jsme také hranice cut off, která jasným způsobem rozdělila obě podskupiny sledovaného souboru na skupinu s nízkým a vysokým rizikem recidivy. Tato skutečnost pomáhá k rozlišení pacientů, kteří mají riziko časné recidivy malignity, tedy recidivy v době, ve které se ještě nejeví provedený radikální resekcí výkon jako přínos pro nemocného ve srovnání s jinou léčbou (RFA, onkologická léčba, paliativní léčba), a naopak vystavuje nemocného závažným rizikům spojeným s vlastním náročným operačním výkonem, a to včetně rizika úmrtí na tyto komplikace. Z tohoto důvodu je více než žádoucí tyto pacienty rozlišit a s uvážením indikovat léčbu adekvátní tomuto riziku. Tohoto zjištění lze však také využít k zintenzivnění dispenzarizační pooperační péče (častější klinické kontroly, vyšší frekvence a důkladnější výběr zobrazovacích metod, intenzivnější a širší sledování sérových onkomarkerů). To povede k časnější diagnostice této recidivy, což umožní větší části pacientů s recidivujícím metastatickým procesem jater podstoupit opakovaný operační výkon (resekce či RFA) spojený s ošetřením recidivy. V současné době je opakovanými klinickými studii prokázáno stejné celkové přežití těchto pacientů podstoupivších opakovaný operační výkon pro malignitu jater i přes velmi krátké bezpříznakové přežití po provedení první operace [67]. To vše jen v důsledku důkladného follow up a včasné diagnostiky recidivy malignity.

Dále jsme chtěli zjistit vztah mezi hladinou exprese mRNA jednotlivých markerů a jejich sérovými hodnotami. Nezjistili jsme vztah mezi hodnotami mRNA a sérovými hladinami žádného markeru.

Korelaci mezi expresí mRNA CEA v tkáni a hladinami CEA v séru u pacientů s primárně detekovaným kolorektálním karcinomem nepozorovala ani Černá a kol. [53]. Vegh a kol., kteří stanovovali protein CEA v cytosolu buněk nemalobuněčných karcinomů plic [68], a Nakamura a kol. [69], kteří stanovovali mRNA CEA ve tkáni plicních nádorů, také nenašli korelaci se sérovými hladinami CEA. Černá a kol. tuto situaci vysvětlují na základě dřívějších studií

exprese CEA ve střevní tkáni se střevním karcinomem, které popisují volnou cirkulující formu CEA, ale i formu CEA vázanou na buňku. Cirkulující CEA je silně glykozylován a jeho detekce v séru může být závislá na glykoproteinovém charakteru determinanty. Navíc hladina mRNA CEA nemá spojitost s glykozilačním procesem a reprezentuje prekurzor pro obě formy, vázanou i cirkulující.

Obecně je třeba říci, že elevace jakýchkoli sérových nádorových markerů může v principu indikovat jejich zvýšenou syntézu anebo jejich zvýšené uvolňování z tkáně do extracelulárního prostoru.

Elevaci exprese mRNA MMP-2 v kontrastu s poklesem sérové hladiny MMP-2 lze vysvětlit buďto nedokončenou translací mRNA, či internalizací jejího translátu a jeho neúčasti při intracelulárních procesech. Současně nemusí docházet k uvolňování této metaloproteinázy vzhledem k její úzké vazbě na buněčnou membránu či extracelulární matrix a tím nedostatečné uvolnění do krve. Diskutabilní také zůstává efekt dvojího průchodu kapilárním řečištěm před odběrem žilní krve, a to plicní mikrocirkulací a kapilární sítí končetiny, z jejíž žíly je vždy vzorek odebrán.

Přes nesignifikantní korelaci sérových a tkáňových hodnot sledovaných onkomarkerů lze však konstatovat, že jak sérová hladina proteinu, tak tkáňová hladina mRNA CEA a TIMP-1 je prognosticky významným faktorem pro predikci časně recidivy metastatického procesu KRK v játrech a předpovědí špatné prognózy pacienta v souvislosti s nízkým celkovým přežitím.

Použití ROC křivek ke klinické korelaci studovaných markerů ozřejmilo vztah CEA a TIMP-1. V případě analýzy předoperační sérové hladiny, vždy jednotlivého markeru, vycházel u resekci pro metastázy KRK nejlépe CEA. Konkrétně u resekci při specificitě 90 % byla senzitivita 80 %. Předoperační sérová hladina TIMP-1 vycházela poměrně hůře, kdy při specificitě 90 % byla senzitivita jen 31,5 %. Nejvíce uspokojivá se však jevila kombinace obou markerů, kdy při 90% specificitě se senzitivita u resekci zvýšila na 85,5 %. Vzhledem k těmto

výsledkům je třeba doporučit používání kombinací několika onkomarkerů vždy současně, a to i přesto, že některý z nich nemusí samostatně dávat statisticky signifikantní výsledky. Prezentované onkomarkery mohou být také použity jako součást klinických skórovacích systémů [70, 71], které jsou používány při rozhodování o indikaci a rozsahu chirurgické či onkologické léčby.

9 Závěry

1. Zvýšená hladina exprese mRNA MMP-9, TIMP-1 a CEA ve tkáni jaterních metastáz má statisticky signifikantní vztah ke kratšímu DFI. Tkáňová hladina mRNA MMP-9, TIMP-1 a CEA je negativním prognostickým faktorem kratšího DFI. Klinický přínos stanovení těchto markerů je ve zvýšeném množství včasně detekovaných relapsů onemocnění a množství opakovaných resekcí, které by prodloužily přežití pacientů s CLM.

2. Zvýšená hladina exprese mRNA MMP-9 a TIMP-1 ve tkáni jaterních metastáz má statisticky signifikantní vztah ke kratšímu OS. Tkáňová hladina mRNA MMP-9 a TIMP-1 je negativním prognostickým faktorem kratšího OS.

3. Zvýšené hladiny proteinů TIMP-1 a CEA v séru mají statisticky signifikantní vztah ke kratšímu DFI a OS.

4. Studie prokázala klinický přínos stanovení onkomarkerů /CEA a TIMP-1/ pro zvýšení validity prognózy maligního onemocnění po radikální resekcii jater /prognóza časně recidivy onemocnění/.

10 Literatura

1. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.
2. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1603-1612.
3. Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategie for proevntion and intervention. *Cancer res* 1995;55:1856-1862.
4. Fong Y, Fortner J, Sun RI et al. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. Analysis of 1001 consecutive cases. *Ann. Surg* 1999;230:309-318.
5. Registry of hepatic metastases. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: A multi-institutional study of indications for resection. *Surgery* 1988;103:278-288.
6. Skalický T, Třeška V, Šnajdauf J a kol. *Chirurgie jater*. 2004. Praha-Maxdorf.
7. Scheele J, Stang R, Altedorf-Hofmann A et al. Resection of liver metastases. *World J Surgery* 1995;19:59-71.
8. 5th International conference on human tumor markers. Stockholm, Sweden 1988.
9. Stieber A. Sensible use of tumor markers. *J Lab Med* 2001;25:327-336.
10. Nekulová M, Šimíčková M, Jabor A, Zámečník M, editoři. *Encyklopedie laboratorní medicíny 3*. 2003 Praha, SEEK.
11. Adam Z et al. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, 2003. Praha.
12. Barrantov V, Hammarström S. Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA related cell adhesion molecule 1 (CEACAM-1), apically expressed on human colonic M cells, are potential receptors for microbial adhesion. *Histochem Cel Biol* 2004;121:83-89.

13. Gold P, Freedmann SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965;122:467-481.
14. Nishi M, Inazawa J, Inoue K et al. Regional chromosomal assignment of carcinoembryonic antigen gene to chromosome 19 et band q13.2. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;54:77-81.
15. Fabris C, Faletti E, Pirisi M, Soardo G, Toniuto P, Vituli D, Bertolotti N, Gonano F, Bartoli E. Non-specific increase of serum carbohydrate antigen CA 19-9 in patients with liver disease associated with increased circulating levels of adhesion molecules. *Clin Chim Acta* 1995;243:25-33.
16. Guadani F, Roselli M, Ferroni P, Spila A, Cavaliere F, Casaldi V, Wapner G, Abbolito MR, Greiner JW et al. CA 72-4 serum marker – new tool in the management of carcinoma patients. *Cancer Incest* 1995;13:227-238.
17. Bjorklund B. Tissue polypeptide antigen (TPA): Biology, biochemistry improved assay methodology, clinical significance in cancer and other conditions, and future outlook. *Antibiot Chemother* 1978;22:16-31.
18. Broet P, Romain S, Daver A, Ricoleau G, Quillien V, Rallet A, Asselain B, Martin PM, Spyrtos F. Thymidine dinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19:2778-2787.
19. Baker EA, Leaper DJ. Profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in intraperitoneal drainage fluid: relationship to wound healing. *Wound Repair Regen*. 2003 Jul-Aug;11(4):268-74.
20. Leeman MF, Curran S, Murray GI. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol*. 2003 Dec;201(4):528-34.
21. Roeb E, Matern S. Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich)*. 2003 Dec 15;98(12):763-70.

22. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Jan-Jun;23(1-2):101-17.
23. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Dec 17;1705(2):69-89.
24. Yang W, Arai S, Gorrin-Rivas MJ, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance *Cancer* 2001; 91:1277-1283.
25. Leeman MF, McKay JA, Murray GI. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Oct;55(10):758-62.
26. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafdic S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
27. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg.* 2000 Sep;87(9): 1215-21.
28. Murashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Saito T, Kohno K, Kobayashi M. Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol.* 1996 Oct;26(5):303-9.
29. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI et al. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Nov 20;107(4):541-50.
30. Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbles T, Hendriks T. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2002 Jun 17;86(12):1876-83.
31. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):115-20.

32. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999. Jul 30; 274(31):21491-4.
33. Ornstein DL, Cohn KH. Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumors compared to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci.* 2002 Aug;47(8):1821-30.
34. Brand K. Cancer gene therapy with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). *Curr Gene Ther* 2: 255-271, 2002.
35. Wagennar-Miller RA, Fordem L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: Is it worth talking about? *Cancer and metastases rew.* 2004;23:119-135.
36. Goldberg, G.I., Marmer, G. A. Grant, A. Z. Eisen, S. Wilhelm, and C. S. He. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989 86: 8207-8211.
37. Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R. Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer.* 1995 Nov 27;63(5):680-7.
38. Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nilsen OH, Sorensen S, Overgaard J, Lilja H, Harris A, Murphy G, Brønner N. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin. Can. Res.* 2004;8:156-164.
39. Holubec L et al. *Kolorektální karcinom, současné možnosti diagnostiky a léčby.* Praha, Grada, 2004.
40. Liška V, Třeška V, Mírka H, Novák M, Šlauf F, Skalický T, Sutnar A, Kormunda S. Portal vein embolization - increased chance for liver resectability for malignancies *Rozhl Chir.* 2007 Feb;86(2):97-101; discussion 102.

41. Třeška V. News trends in liver surgery. Bratisl. Lék. Listy 2005;106(10):327-9.
42. Chiche L. Surgical management of hepatic metastases from colorectal cancer. J Chir. (Paris) 2003 Apr;140(2):77-89. Review French.
43. Oshowo A, Gillams A, Harrison E, Lees WR, Taylor I. Comparison of resection and radiofrequency ablation for treatment of solitary colorectal liver metastases., Br J Surg, 2003, 90, s. 1240-1243.
44. Mala T, Bohler G, Mathisen O, Bergan A, Soreide O. Hepatic resection for colorectal metastases: Can preoperative scoring predict patient outcome? World J Surg, 2002, 26, s. 1348-1353.
45. Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG et al. Liver resection for colorectal metastases. J Clin Oncol. 1997, 15, s. 938-946.
46. Sutnar A, Třeška V, Skalický T. Radiofrekvenční ablace v současné chirurgii – naše zkušenosti Rozhl Chir. 2004 říjen; ročník 83(10):518-22.
47. Klener P. Chemoterapie. In: Klinická onkologie. Galén, Praha 2002, pp.145-207.
48. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec L S, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R. Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. Anticancer Res. 2005 Sep-Oct;25(5):3387-91.
49. Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma Korean J Gastroenterol. 2005 Jun;45(6):401-8.

50. Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):115-20.
51. Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep.* 1998 Mar-Apr;5(2):469-71.
52. Ripple MO, Wilding G. Alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4234-6.
53. Cerna M, Holubec L Jr, Pesta M, Kormunda S, Topolcan O, Cerny R. Quantitative estimation of CEA and CK20 expression in tumour tissue of colorectal cancer and its liver metastases with reverse transcription and real-time PCR. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1B):803-8.
54. Miura M, Ichikawa Y, Tanaka K, Kamiyama M, Hamaguchi Y, Ishikawa T, Yamaguchi S, Togo S, Ike H, Ooki S, Shimada H. Real-time PCR (TaqMan PCR) quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2B):1271-6.
55. Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, Jacobson A, Spencer M, Rothenberger DA, Niehans GA, D'Cunha J, Kratzke RA. Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 1;10(17):5777-84.
56. Kijima M, Togo S, Ichikawa Y, Miura M, Yamagishi S, Matsuo K, Tanaka K, Masui H, Ishikawa T, Ike H, Shimada H. Clinical significance of serum CEA protein and CEA mRNA after resection of colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr;25(2B):1327-32.
57. Tien YW, Lee PH, Hu RH et al. The role of gelatinase in hepatic metastasis of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2003, 9:4891-4896.
58. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR et al. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Annals of Surgery.* 2001, 233: 786-792.

59. Waas ET, Wobbes T, Ruers T, Lomme RM, Hendriks T. Circulating gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in colorectal cancer metastatic liver disease. *Eur J Surg Oncol.* 2006 Sep;32(7):756-63. Epub 2006 May 2.

60. Ishida H, Murata N, Tada M et al. Determining the levels of matrix metalloproteinases-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastases of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2003, 33:186-91.

61. Curran S, Dundas SR, Buxton J et al. Matrix metalloproteinases/Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:8229-34.

62. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F et al. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 1999, 45: 252-258.

63. Holten-Andersen MN, Hansen U, Brünner N, Nilsen HJ, Illemann M, Nielsen B-S. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int.J. Cancor.* 2005, 113:198-206.

64. Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Fukushima H, Itoh H, Sasaki S, Hinoda Y, Imai K. Messenger RNA expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 1999, Feb;29(2):58-62.

65. Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME, Di Tardo S, Divella R, Trerotoli P, Di Gennaro M, Schittulli F, Fransvea E, Giannelli G. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007 Sep-Oct;27(5B):3593-600.

66. Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Sep 20;106(5):745-51.

67. Kockerling F, Schwartz SI. Liver Surgery - Operative Techniques and Avoidance of Complications. J.A.Barth 2001.

68. Vegh I, Sotelo T, Estenoz J, Fontanellas A, Navarro S, Millán I, Enriquez de Salamanca R. Tumor cytosol carcinoembryonic antigen as prognostic parameter in non small cell lung cancer. *Tumori*. 2002 Mar-Apr;88(2):142-6.
69. Nakamura H, Saji H, Idiris A, Kawasaki N, Hosaka M, Ogata A, Saijo T, Kato H. Comparison of immunohistochemistry and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to detect expression of carcinoembryonic antigen in lung cancer. *Oncol Rep*. 2003 Sep-Oct;10(5):1231-5.
70. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann. Surg*. 1999, 230:309-318.
71. Mann CD, Metcalfe MS, Leopardi LN, Maddern GJ. The clinical risk score: emerging as a reliable preoperative prognostic index in hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg*. 2004, 139:1168-1172.

11 Publikace autora

a) Kapitoly v odborných knihách

Holubec L jr, Topolcan O, Finek J, Holubec L sen, Liska V, **Sutnar A**, Treska V, Elgrova L, Kormunda S, Holdenrieder S, Stieber P. Cell adhesive markers in the process of metastasising colorectal carcinoma. New Research Communications on Tumor Markers, Nova Science Publishers

b) Publikace v odborných zahraničních časopisech

Sutnar A, Pesta M, Liska V, Treska V, Skalicky T, Kormunda S, Topolcan O, Cerny R and Holubec L jr. Clinical relevance of the expression of mRNA of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 tissue samples from colorectal liver metastases. Tumor Biol. 2007. Nov 9;28(5):247-252. (IF 2,4)

Svobodova S, Topolcan O, Holubec L jr, Treska V, **Sutnar A**, Rupert K, Kormunda S, Rousarova M and Finek J. Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer. Anticancer Res. 2007. Jul-Aug;27(4A):1907-9. (IF 1,6)

Liska V, Treska V, Holubec L jr., Kormunda S, Skalicky T, **Sutnar A**, Topolcan O. Recurrence of colorectal liver metastases after surgical treatment: multifactorial study. Hepatogastroenterology. 2007 Sep;54(78):1741-4.

Liska V, Holubec L jr, Treska V, Skalicky T, **Sutnar A**, Topolcan O, Kormunda S and Finek J. Tumor markers as useful predictors of survival rate after exploratory laparotomy for liver malignancies. *Anticancer Res.* 2007. Jul-Aug;27(4A):1887-91. (IF 1,6)

Liska V, Holubec L jr, Treska V, Skalicky T, **Sutnar A**, Kormunda S, Fínek J, Rousarova M, Topolcan O. Dynamics of serum levels of tumor markers and prognosis od recurrence and survival after liver surgery for colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2007. Jul-Aug;27(4C):2861-4. (IF 1,6)

Holubec L jr, Topolcan O, Finek J, Holdenrieder S, Stieber P, Pesta M, Pikner R, Holubec L sen, **Sutnar A**, Liska V, Svobodova S, Visokai V, Kormunda S. Markers of cellular adhesion in diagnosis and therapy control of colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1597-601. (IF 1.6)

Skalicky T, Treska V, **Sutnar A**, Mirka H. Radiofrequency coagulation for splenic resection--a case report. *Zentralbl Chir.* 2004 Apr;129(2):119-21. German. (IF 0,33)

Skalicky T, Treska V, **Sutnar A**, Liska V, Mirka H, Ohlidalova K, Ferda J. Surgical treatment of benign liver tumors. *Bratisl Lek Listy.* 2005;106(10):330-2. Slovak. Rep.

c) Publikace v odborných domácích časopisech :

Sutnar A, Třeška V, Skalický T. Radiofrekvenční ablace v současné chirurgii – naše zkušenosti. Rozhl Chir. 2004 říjen; ročník 83(10):518-22.

Liška V, Třeška V, Mírka H, Novák M, Šlauf F, Skalický T, **Sutnar A**, Kormunda S. Embolizace portální žíly – větší šance resektability jater u malignit. Rozhl Chir. 2007 únor;86(2):97-101; diskuse 102.

Třeška V, Ferda J, Skalický T, **Sutnar A**, Liška V. Hemangiomy jater - diagnostika a strategie léčby. Rozhl Chir. 2007 leden;86(1):28-31.

Třeška V, Skalický T, **Sutnar A**, Ferda J, Fínek J. Ruptura jater po radiofrekvenční ablaci recidivy hepatocelulárního karcinomu. Rozhl Chir. 2006 listopad;85(11):549-53.

Liška V, Třeška V, Holubec L jr., Skalický T, **Sutnar A**, Topolčan O, Fínek J. Časná recidiva metastatického procesu kolorektálního karcinomu po operaci jater – multifaktoriální studie. Rozhl Chir. 2006 únor, ročník 85; 86-89

Třeška V, Skalický T, **Sutnar A**, Liška V, Současné možnosti chirurgické léčby jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. HPB Bulletin, 2005, 13.

Třeška V, Skalický T, Fínek J, Kormunda S, Topolčan O, **Sutnar A**, Neprašová P, Sůvová B. Je jaterní resekce či radiofrekvenční ablace indikována u metastáz karcinomu prsu? Rozhl Chir. 2004 duben;83(4):173-7.

d) Abstrakta přednášek a posterů

Sutnar A, Treska V, Liska V, Pesta M, Skalicky T, Topolcan O, Kormunda S, Holubec L jr. Clinical relevance of expression of mRNA of MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 biopsies from colorectal liver metastase. Tumor Biol 27 (suppl 2), p.53, 2006. Abstract, The XXXIVth Meeting of the ISOBM society, September 16-20, 2006, Pasadena, USA. Poster presentation.

Sutnar A, Treska V, Skalicky T, Liska V, Holubec L jr., Topolcan O, Pesta M. Comparison of the classical tumor markers with the proliferative markers in hepatic metastases Hepato-gastroenterology (suppl 1) vol. 53, p.169 2006 Abstrakt, The16th World congress of the International Association of Surgerons and Gastroenterologists May 25-28 2006 Madrid, Spain, Poster presentation

Holubec L jr., Topolčan O, Fínek J, Liška V, Skalický T, **Sutnar A**, Holubec L sen, Třeška V. Využití imunoanalytických metod pro časnou detekci progresu karcinomu kolorekta do jater. II. Kongres chirurgie jater a žlučových cest a pankreatu, Darová 2005, Sborník abstrakt str. 11.

Liška V, Třeška V, Holubec L jr., Kormunda S, Skalický T, **Sutnar A**, Topolčan O. Multifaktoriální retrospektivní studie recidivy metastatického procesu kolorektálního karcinomu v játrech po chirurgické léčbě. II. Kongres chirurgie jater a žlučových cest a pankreatu, Darová 2005, Sborník abstrakt str. 14.

Liška V, Třeška V, Holubec L jr., Kormunda S, Skalický T, **Sutnar A**, Topolčan O. Lze použít onkomarkery k predikci časně recidivy u nemocných po radiofrekvenční ablacii jaterních malignit? II. Kongres chirurgie jater a žlučových cest a pankreatu, Darová 2005, Sborník abstrakt str. 55.

Topolčan O, Holubec L jr., Liska V, Svobodova S, Treska V, Finek J, Rupert K, **Sutnar A**. 10th International symposium on biology and clinical usefulness of tumor markers, Barcelona 2005, Abstrakt book p. 119.

Liska V, Holubec L jr., Treska V, Skalický T, **Sutnar A**, Kormunda S, Topolčan O. Are Tumor Markers Useful for Prediction of Survival Rate after Explorative Laparotomy for Liver Malignancies. 13th Internationale Hamburg Symposium on Tumor Markers. Hamburg 2005, Anticancer Research. November-December 2005, 25 (6D): 4775.

Topolčan O, Holubec L jr, Liska V, Svobodova S, Treska V, Finek J, Rupert K, **Sutnar A**. Prognostic Importance of TPS at Colorectal Carcinoma. Book of Abstract, p. 30, 6th CECHTUMA conference, Prague, May 30- June 1, 2006. Oral presentation..

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

Pesta M, **Sutnar A**, Topolcan O, Treska V, Holubec L jr, Liska V. Expression of mRNA MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in liver metastasis from patients with colorectal carcinoma. Book of Abstract, p. 30, 6th CECHTUMA conference, Prague, May 30-June 1, 2006. Poster presentation.

Pešta M, Topolčan O, Holubec L jr , **Sutnar A** , Liška V, Třeška V, Skalický T, Kormunda S, Černý R. Klinický význam exprese mRNA MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 ve tkáňových vzorcích metastáz kolorektálního karcinomu. Sborník abstrakt, str.26, II. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 7.-9. prosince 2006. Poster presentation

Pesta M, Topolcan O, **Sutnar A**, Liska V, Skalicky T, Kormunda S, Treska V, Holubec L jr. Clinical relevance of expression of mRNA of CEA, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in biopsies from colorectal liver metastase, 3.Symposium a workshop molekulární patologie, Olomouc 4.-5. květen 2007, Oral presentation

e) Grantová studie související s projektem

Sutnar A. Možnosti využití metaloproteináz k monitorování nemocných s maligním postižením jater a stanovení jejich prognózy po chirurgických výkonech 2004-6.

Oceněna čestným uznáním ministra zdravotnictví

12 Přílohy

Příloha č. 1: TIMP-1 Quantitation Report

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

Experiment Information

Experiment Name	JMTIMP1vz115-132
Experiment Start	1.2.2006 15:38:40
Experiment Finish	1.2.2006 18:12:07
Operator	Martin
Notes	TIMP-1
Gain CH1	5
Gain CH2	5
Normalisation Metod	Dynamic Tube Normalisation
Noise Slope Correction	Yes
Start normalising from cycle	1
Digital Filter	Light
Threshold	0,0396
Left Threshold	1
Standard Curve	conc= 10 [^] (-0,340*CT + 15,080)
Reaction efficiency (*)	1,19 (* = 10 [^] (-m) - 1)
R Value	0,9995
No Template Control Threshold	0,0% (0Fl)

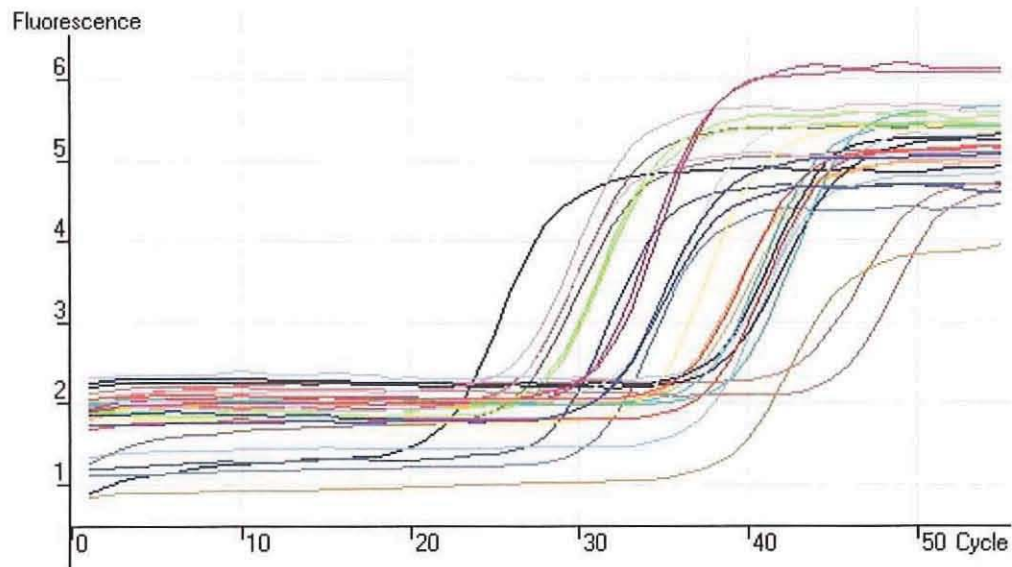
Messages

Message

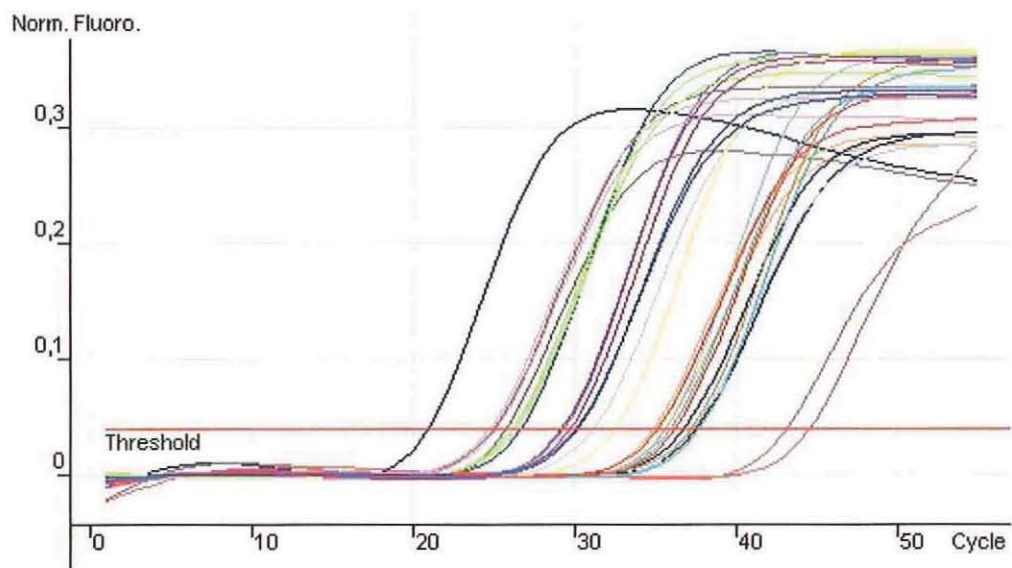
Temperature Profile

Cycle	Cycle Point
Denature @ 94 deg., 600 secs	
Hold @ 94 deg., 300 secs	
Cycling (55 repeats)	Step 1 @ 94 deg., hold 20 secs
	Step 2 @ 58 deg., hold 20 secs
	Step 3 @ 72 deg., hold 25 secs, acquiring to Cycling A(CH1, CH2)
Melt (65-99 deg.) , hold 5 secs, acquiring to Melt A(CH1, CH2)	

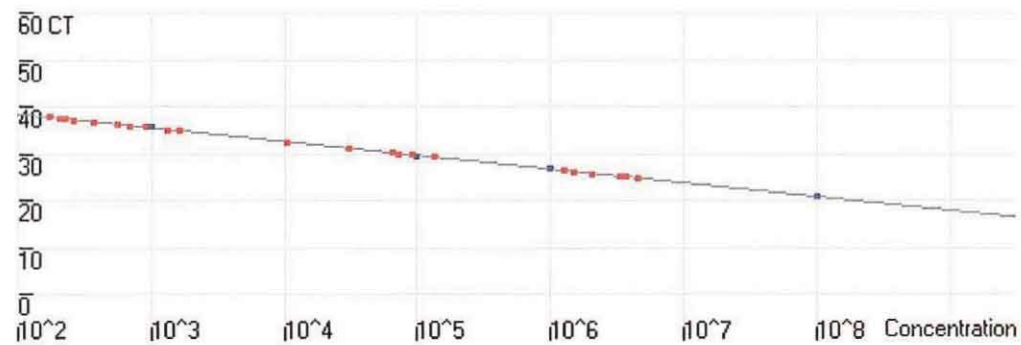
Raw data for Cycling A.CH1































Quantitation data for Cycling A.CH1



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Given (Copies)	Conc. Calculated (Copies)	Conc. CV	Ct	Ct Std. Dev.
1		TIMP-1 st.	Standard	100 000 000,	92 918 961,	7,08%	20,92	
2		TIMP-1 st.	Standard	1 000 000,	961 042,	3,90%	26,76	
3		TIMP-1 st.	Standard	100 000,	125 559,	25,56%	29,36	
5		TIMP-1 st.	Standard	1 000,	892,	10,81%	35,68	
6		TIMP-1 JM115	Sample		1 642,		34,9	
7		TIMP-1 JM115	Sample		920,		35,64	
8		TIMP-1 JM116	Sample		1,		44,61	
9		TIMP-1 JM116	Sample		3,		43,13	
10		TIMP-1 JM117	Sample		2 069 676,		25,78	
11		TIMP-1 JM117	Sample		3 693 789,		25,04	
12		TIMP-1 JM118	Sample		1 244 310,		26,43	
13		TIMP-1 JM118	Sample		1 501 478,		26,19	
14		TIMP-1 JM119	Sample		206,		37,55	
15		TIMP-1 JM119	Sample		371,		36,8	
16		TIMP-1 JM120	Sample		230,		37,41	
18		TIMP-1 JM122	Sample		4 492 230,		24,79	
19		TIMP-1 JM122	Sample		3 284 568,		25,19	
20		TIMP-1 JM125	Sample		265,		37,23	
22		TIMP-1 JM126	Sample		175,		37,76	
23		TIMP-1 JM126	Sample		683,		36,02	
26		TIMP-1 JM128	Sample		91 805,		29,76	
27		TIMP-1 JM128	Sample		135 783,		29,26	
29		TIMP-1 JM129	Sample		30 926,		31,15	
31		TIMP-1 JM130	Sample		10 582,		32,52	
32		TIMP-1 JM131	Sample		558,		36,28	
33		TIMP-1 JM131	Sample		1 340,		35,16	
34		TIMP-1 JM132	Sample		65 566,		30,19	
35		TIMP-1 JM132	Sample		72 590,		30,06	

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

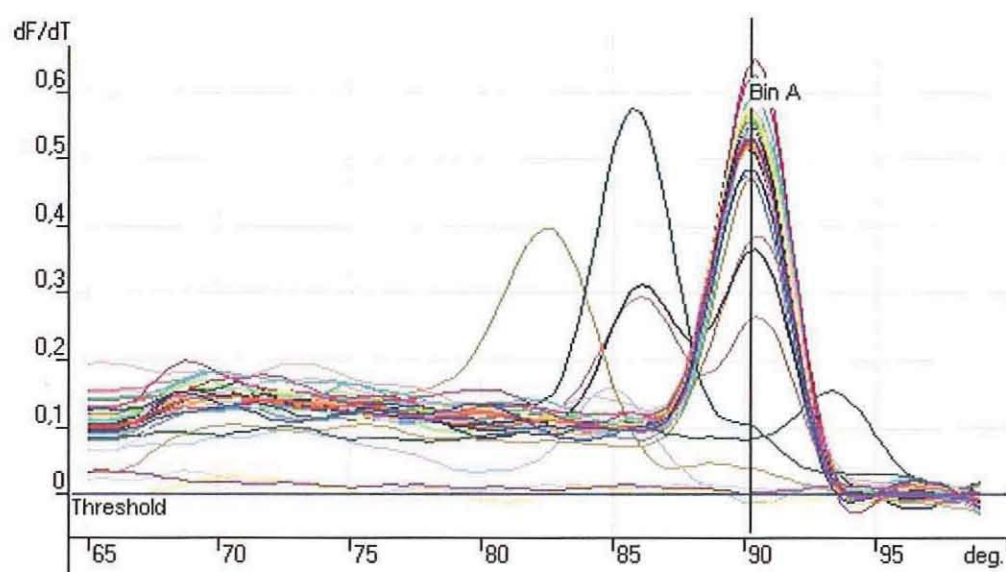
TIMP-1 Melt Report

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

Experiment Information

Experiment Name	JMTIMP1vz115-132
Experiment Start	1.2.2006 15:38:40
Experiment Finish	1.2.2006 18:12:07
Operator	Martin
Notes	TIMP-1
Gain CH1	5
Gain CH2	5
Digital Filter	Light
Threshold	0
Temp. Threshold	0o

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



Příloha č. 2: Kopie jednotlivých článků

Clinical Relevance of the Expression of mRNA of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and CEA Tissue Samples from Colorectal Liver Metastases

A. Sutnar^a M. Pesta^b V. Liska^a V. Treska^a T. Skalicky^a S. Kormunda^b
O. Topolcan^b R. Cerny^d L. Holubec, Jr.^{b,c}

^aDepartment of Surgery, ^bSecond Clinic of Internal Medicine, and ^cDepartment of Oncology, University Hospital Pilsen, and ^dDepartment of Biochemistry, Charles University Prague, Pilsen, Czech Republic

Key Words

Colorectal cancer · Early recurrence · Liver metastases · Liver surgery · Matrix metalloproteinases, inhibitors · Prognostic factors

Abstract

Background: Nowadays we know that survival rates do not differ between repeated and single liver resections for colorectal liver metastases (CLM). To be able to determine patients prone to early recurrence, the use of different markers with a better prognostic value than the routinely employed tumor markers is required. **Aim of Study:** The aim of our study was to assess mRNA expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and CEA in tissue samples from CLM and their relationship to disease-free interval (DFI) and overall survival (OS). **Patients and Methods:** The liver tumor biopsies were obtained from 40 patients suffering from CLM treated with radical surgery. mRNA expression levels of CEA, MMPs and TIMPs and a housekeeping gene (GAPDH) were quantified using RT-PCR. **Results:** The increased expression of CEA, MMP-9 and TIMP-1 in CLM was associated with a short DFI and a high tendency to early CLM recurrence. Statistical analysis confirmed CEA, MMP-9 and TIMP-1 expression as prognostic factors of survival. **Conclusion:** This study demonstrated the importance of CEA, MMP-9 and TIMP-1 in the prognostication of DFI and OS. Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

Only about 15% of colorectal liver metastases (CLM) are completely resectable, and early recurrence of metastases further decreases survival in patients after radical surgical therapy [1]. Up to the present, resection is the most effective treatment with a 5-year survival rate of approximately 30–40% [2]. Recurrence can be expected in up to two thirds of patients. Today we know that survival rates do not differ between single and repeated liver resections for CLM. Early diagnosis of CLM recurrence may increase the number of repeated resections. The determination of patients prone to a short disease-free interval (DFI) is crucial in the treatment of patients who have undergone liver surgery for CLM. Early detection of CLM recurrences could improve patient prognosis and help to devise follow-up strategies.

A better understanding of the biological characteristics of CLM increases the success of surgical therapy. New markers with an exact prognostic value can improve the follow-up of patients and could also help in the selection of optimal treatment. To be able to discern patients with a tendency to early recurrence, other tumor markers than those routinely employed are necessary. We aimed to determine the role of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) in tumor spread. Carcinoembryonic antigen

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
10110-4283/07/0285-0247\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/tbi

Lubos Holubec, MD, PhD
Department of Oncology and Radiotherapy
University Hospital Pilsen
E. Benese 13, CZ-305 99 Pilsen (Czech Republic)
Tel. +420 377 153 131, Fax +420 377 153 222, E-Mail holubec@fnplzen.cz

(CEA) was used as an established tumor marker. Assessment of CEA in serum is recommended to follow up CLM patients [3]. CEA is overexpressed in many tumors, mainly in colorectal cancer. Therefore in many cancer patients the serum level of CEA rises, and preoperative CEA levels provide independent prognostic information and may also affect decisions regarding surgical management [3, 27]. Therefore this tumor marker was used for comparison purposes.

MMPs and TIMPs play an important role in the degradation of extracellular matrix and basal membrane in relation to tumor invasion [4, 5]. It was found that MMP-9 and MMP-7 are overexpressed in colorectal tumor tissue [6, 7]. TIMPs (21–30 kDa) are the major endogenous regulators of MMP activities. So far, four homologous TIMPs (TIMPs-1 to -4) have been identified [8]. TIMP-1 and TIMP-2 are both known to have growth-factor-like properties ('erythroid-potentiating activity'), which have been separated from their MMP-inhibitory functions by structure-function studies [8]. The activity of MMPs depends on the balance between the levels of active enzyme and TIMPs.

The aim of our study was to assess mRNA expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in CLM tissue samples using RT-PCR. The values obtained were associated with DFI and OS.

CEA, a well-known tumor marker with a probable role in cell adhesion [27, 28], was used for comparison in the follow-up of CLM patients.

Patients and Method

Patients

The study cohort included 40 patients with liver tumors who underwent radical liver surgery at the Department of Surgery, University Hospital Pilsen, between 2002 and 2005; 31 of them had CLM and were followed up until July 2006. The median age of the patients was 59 years (range 39–82 years). Nine patients had secondary liver metastases due to other tumors (breast or gall bladder) or primary hepatocellular carcinoma. In the CLM patients, the median DFI was 19 months and the median OS was 26 months.

Methods

Tissue Samples. The tumor tissue samples were obtained during surgery and were immediately stored at -70°C until used. We examined two to three samples per tumor. All samples were histologically verified.

Quantitative Estimation of mRNA Using Real-Time RT-PCR RNA Extractions. Total RNA was isolated from 100 mg of tissue using the fastRNA Pro Green Kit (Q BIOgene, Morgan Irvine, Calif., USA).

RT. 3 μg of isolated total RNA were used for RT, which was performed with Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) and oligo d(T)₂₁ as a primer.

Real-Time PCR. DNA amplification was monitored with SYBR-Green 1 (Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA). 100 ng fragments of CEA, MMP-9, MMP-7, TIMP-2, TIMP-1 and GAPDH were inserted into a pGEM vector (Promega, Madison, Wisc., USA), cloned and sequenced using ALFexpress sequencer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). pGEM plasmids and cloned fragments of mRNA were used as standards. The specificity of the reaction was verified with the melting curve and agarose gel electrophoresis. Absolute quantification was determined (i.e. the number of DNA copies per sample). In all samples mRNA of GAPDH (housekeeping gene) was also assessed, the results are presented as normalized values, the ratio of number of copies in the assessed gene (CEA, MMP-9, MMP-7, TIMP-2, and TIMP-1) to GAPDH. The results are presented as absolute and normalized values.

Measurements of absolute values were done as absolute quantification using cloned specific cDNA as standard (given number of copies/3 μg RNA). For normalized values, results are shown in relation to the housekeeping gene GAPDH (e.g. the MMP-9/GAPDH ratio). The method and sequence of the primers has been described previously [7, 9].

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SAS 8.02. For maximum hazard ratio (OS and DFI), the Cox regression model was used. After finding the 'optimal cutoff' for the maximum hazard ratio, the Kaplan-Meier survival distribution function and the 'optimal cutoffs' were computed in groups and subgroup.

Results

We examined the potential value of mRNA expression of CEA, MMP-9, MMP-7, TIMP-2 and TIMP-1 as prognostic factors for CLM patients after surgical resection.

Table 1 shows the associations of DFI to mRNA expression (absolute values) of CEA, MMP-9, MMP-7, TIMP-2 and TIMP-1 in the metastatic liver tissue. Absolute values refer to the mRNA expression of tumor markers (cDNA copies) to 3 μg of total RNA. mRNA expression of CEA, MMP-9 and TIMP-1 was significantly related with DFI ($p < 0.0225$, $p < 0.0282$ and $p < 0.0282$; fig. 1, 2).

Table 1 also lists the values for the relationship of DFI to mRNA expression using normalized values for mRNA expression. There was no significant association between DFI and mRNA expression of CEA, MMP-9, MMP-7, TIMP-2 and TIMP-1 and DFI.

Table 2 reveals a statistically significant association between mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 to OS ($p = 0.0302$ and $p < 0.0431$; fig. 3, 4). The relationships of

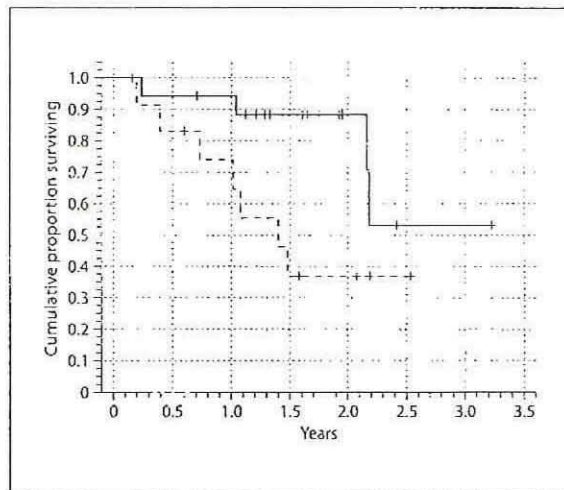
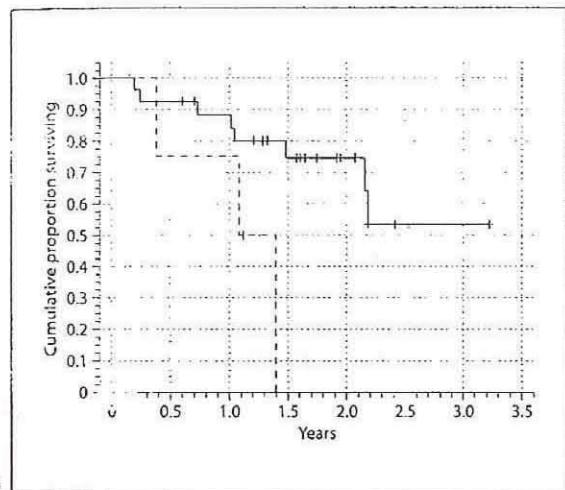
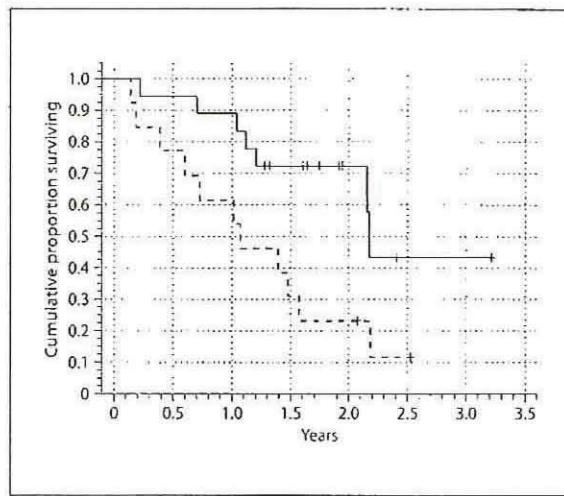
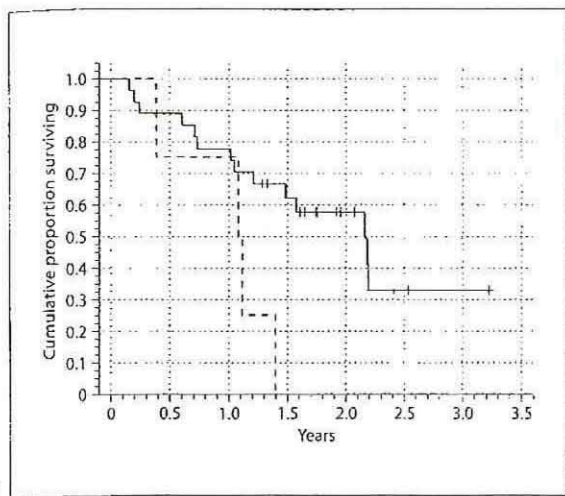


Fig. 1-4. Relation of DFI (1, 2) and OS (3, 4) to mRNA expression of absolute values of MMP-9 [1, 3; 4 patients >23,140 (n of DNA copies; - - -) and 27 patients ≤23,140 (—)] and absolute values of TIMP-1 [2, 4; 13 patients >1,354,000 (- - -) and 18 patients ≤1,354,000 (—)].

to mRNA expression of MMP-7, TIMP-2 and CEA were not significant, with $p < 0.0543$ for CEA.

The values for the relationship of OS to mRNA expression of CEA, MMP-9, MMP-7, TIMP-2 and TIMP-1 (absolute values) are also presented in table 2, and no statistically significant differences were found.

The mRNA expression of TIMP-1, MMP-9 and CEA was significantly higher than cutoff values in patients with shorter DFI and OS (i.e. with a worse prognosis), respectively, and lower than cutoff values in patients with longer DFI and OS (i.e. with a better prognosis), respectively.

Discussion

mRNA expression of CEA, MMP-9 and TIMP-1 demonstrated a statistically significant association with DFI and early recurrence of liver malignancy, and mRNA expression of MMP-9 and TIMP-1 was a prognosticator of OS.

Only with absolute values, but not with values normalized to GAPDH, significant differences were observed, which may be due to the upregulation of GAPDH in some tumors, e.g. in rat hepatomas [10] or human prostate carcinomas [11].

Table 1. Relationship between DFI and mRNA expression in liver metastatic tissue

mRNA	Patients above cutoff	Optimal cutoff	Patients below cutoff	log-rank p value
<i>Absolute values</i>				
CEA	12	22,430	19	0.0225
MMP-7	19	3,400	12	0.3574
MMP-9	4	23,140	27	0.0282
TIMP-1	13	1,354,000	18	0.0175
TIMP-2	18	213	13	0.3731
<i>Normalized values</i>				
CEA	20	0.0284	11	0.5223
MMP-7	22	0.021	9	0.4066
MMP-9	6	0.851	25	0.8198
TIMP-1	21	4.8	10	0.0761
TIMP-2	7	0.4	24	0.2180

Table 2. Relationship between OS and mRNA expression in liver metastatic tissue

mRNA	Patients above cutoff	Optimal cutoff	Patients below cutoff	log-rank p value
<i>Absolute values</i>				
CEA	12	22,430	19	0.0543
MMP-7	12	39,700	19	0.2831
MMP-9	4	23,140	27	0.0302
TIMP-1	13	1,354,000	18	0.0431
TIMP-2	12	918	19	0.7858
<i>Normalized values</i>				
CEA	8	1.714	23	0.2179
MMP-7	18	0.04	13	0.0763
MMP-9	9	0.494	22	0.9207
TIMP-1	12	34.44	19	0.3344
TIMP-2	9	0.0854	22	0.9569

In a study by Cerna et al. [9], mRNA expression of CEA was increased in colorectal tumor tissue compared to normal colorectal tissue. In subsequent reports, mRNA expression of CEA in peripheral blood and lymph node was found to detect micrometastases of cancer cells in patients with colorectal carcinoma [12, 13]. Kijima et al. [14] concluded from their work that CEA mRNA is more sensitive than CEA protein in the detection of CLM recurrence. In our patients, the mRNA level of CEA in liver metastases was statistically associated with DFI.

Our results for MMP-9 were in agreement with a study by Tien et al. [15]. They studied the role of MMPs in colorectal tumor tissue and liver metastases and concluded that the increased MMP-9 activity may facilitate hepatic metastases after, but not during or before tissue invasion. An association between MMP-7 and MMP-9 expression and the aggressiveness of a metastatic colorectal tumor was described by Heslin et al. [16]. Waas et al. [17] examined the relationship between MMP activity and tumor recurrence. Levels of both the active form and the proform of MMP-2 and MMP-9 were raised in metastatic tissue of a patient with tumor recurrence in the liver within 6 months after essentially curative liver metastasectomy.

Tissue expression of the above-mentioned MMPs increases from healthy mucosa to benign adenomas, and the highest expression was measured in carcinomas. However, MMP-9 increases are not restricted to tumor tissue. Ishida et al. [18] examined serum levels of MMP-9 in portal and peripheral vein blood, and increased MMP-

9 levels correlated with a high risk of hepatic recurrence of colorectal cancer, which may help to select colorectal cancer patients at increased risk of hepatic recurrence. Of particular interest, Curran et al. [19] reported an MMP-TIMP profile defined by hierarchical cluster analysis, including MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2, suggesting that in patients with colorectal cancer, the MMP-TIMP profile is a highly significant prognosticator of survival [19]. Increased MMP-7 expression correlated with the presence of nodal or distant metastases in patients with colorectal cancer [20]. We did not find a statistically significant association between the mRNA MMP-7 expression and either OS or DFI. Therefore, transcriptional upregulation of MMP-7 may be controlled by genes important in the early stages of colorectal tumorigenesis [21].

This study firstly describes increased tissue levels of MMP-9 and TIMP-1 in liver metastases (not only primary malignancy) with statistical significance. The tissue levels of MMPs and TIMPs could be distorted by elevated serum levels resulting from malignancy at an extrahepatic site. The elevated tissue levels indicate increased protease activity in the liver or metastatic tissue and increased tumor aggressiveness, with a tendency to early recurrence after radical surgery.

TIMP-1 inhibits the proteolytic activity of MMP-7 and MMP-9, but TIMP-1 also stimulates cell growth and inhibits apoptosis, being independent of antiproteolytic activity. In this context, it is not surprising that mRNA expression of TIMP-1 and also protein expression of

TIMP-1 was increased in colorectal carcinoma tissue [7, 22–24]. Holten-Andersen et al. [25] reported that high preoperative plasma levels of protein TIMP-1 are associated with a shorter survival of colorectal cancer patients. Waas et al. [17] concluded that the preoperative plasma proMMP-2, proMMP-9 and TIMP-1 levels have no potential as diagnostic or prognostic marker in CLM. In 1999, Yamamoto et al. [26] reported that increased mRNA expression of TIMP-1 and TIMP-2 was observed in tumor tissue in half of the patients with hepatocellular carcinoma, but did not correlate with any clinicopathological features using semiquantitative RT-PCR for mRNA determination. We used quantitative RT-PCR, and found that the mRNA level of TIMP-1 expression was statistically significantly associated with DFI and OS.

Postoperative assessment of these tumor markers enabled earlier detection of relapse of CLM and guided decision-making regarding the appropriate adjuvant therapy. This approach facilitates repeated resection of recurrent lesions at an early stage, since patients at increased risk of early CLM recurrence were earlier detected. The results of this study may help to improve our follow-up strategies. MMPs and TIMPs could also be used as prognostic factors in patients at increased risk at long-term follow-up. Using this approach, the number of recurrences

detected in good time may be increased and consequently the number of repeated resections, improving survival in patients after surgical therapy for CLM.

This is the first report of increased tissue levels of MMP-9 and TIMP-1 in liver metastases (not only primary liver malignancy) demonstrating the importance of increased levels of MMP-9, TIMP-1 and CEA for the prediction of a shortened DFI. These results could be used for better detection of patients prone to early CLM recurrence as well as to improve our follow-up strategies and extend our options in radical and palliative treatment. It also helps in decision-making regarding surgical treatment and (neoadjuvant) treatment alternatives to radical liver surgery for CLM. The MMPs and TIMPs could also be used as prognostic factors at long-term follow-up of patients at increased risk. Their clinical relevance will help to increase the number of recurrences detected in good time and the number of repeated resections.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from IGA MZ CR (No. 7905/03) and by the research project MSM 0021620819. Charles University and Teaching Hospital Pilsen, Czech Republic.

References

- Bird NC, Mangnall D, Majeed AW: Biology of colorectal liver metastases: a review. *J Surg Oncol* 2006;94:68–80.
- Beard SM, Holmes M, Price C, Majeed AW: Hepatic resection for colorectal liver metastases: a cost-effectiveness analysis. *Ann Surg* 2000;232:763–776.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Jamerz P, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39:718–727.
- Fingleton BM, Heppner Goss KJ, Crawford HC, Matrisian LM: Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS* 1999;107:107–110.
- Matashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Ito T, Kohno K, Kobayashi M: Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:303–309.
- Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ: Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000;87:1215–1221.
- Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R: Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res* 2005;25:3387–3391.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeisson UP: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111–122.
- Cerna M, Holubec L Jr, Pesta M, Kormunda S, Topolcan O, Cerny R: Quantitative estimation of CEA and CK20 expression in tumour tissue of colorectal cancer and its liver metastases with reverse transcription and real-time PCR. *Anticancer Res* 2006;26:803–808.
- Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ: Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 1998;5:469–471.
- Ripple MO, Wilding G: Alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 1995;55:4234–4236.
- Miura M, Ichikawa Y, Tanaka K, Kamiyama M, Hamaguchi Y, Ishikawa T, Yamaguchi S, Togo S, Ike H, Ooki S, Shimada H: Real-time PCR (TaqMan PCR) quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2003;23:1271–1276.
- Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, Jacobson A, Spencer M, Rothenberger DA, Niehans GA, D' Cunha J, Kratzke RA: Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 2004;10:5777–5784.
- Kijima M, Togo S, Ichikawa Y, Miura M, Yamagishi S, Matsuo K, Tanaka K, Masui H, Ishikawa T, Ike H, Shimada H: Clinical significance of serum CEA protein and CEA mRNA after resection of colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 2005;25:1327–1332.

- 15 Tien YW, Lee PH, Hu RH, Hsu SM, Chang KJ: The role of gelatinase in hepatic metastasis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:4891-4896.
- 16 Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Crist MM: Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001;233:786-792.
- 17 Waas ET, Wobbes T, Ruers T, Lomme RM, Hendriks T: Circulating gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in colorectal cancer metastatic liver disease. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:756-763.
- 18 Ishida H, Murata N, Tada M, et al: Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:186-191.
- 19 Curran S, Dundas SR, Buxton J, et al: Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:8229-8234.
- 20 Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, et al: Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 1999;45:252-258.
- 21 Leeman MF, Curran S, Murray GI: New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol* 2003;201:528-534.
- 22 Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, Clark IM, Cawston TE, Turner DR: Distribution of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int J Cancer* 1991;49:666-672.
- 23 Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG: Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995;1:899-906.
- 24 Murashige M, Miyahara M, Shiraiishi N, Saito T, Kohno K, et al: Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:303-309.
- 25 Holten-Andersen MN, Stephens RW, Nielsen HJ, Murphy G, Christensen IJ, Stetler-Stevenson W, Brunner N: High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4292-4299.
- 26 Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Fukushima H, Itoh H, Sasaki S, Hinoda Y, Imai K: Messenger RNA expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29:58-62.
- 27 European Group on Tumor Markers: Consensus Recommendations. *Anticancer Res* 1999;19:2785-2820.
- 28 Holubec I, Jr, Topolcan O, Finek J, Holdenrieder S, Stieber P, Pesta M, Pikner R, Holubec Sen L, Sutnar A, Liska V, Svobodova S, Visokai V, Kormunda S: Markers of cellular adhesion in diagnosis and therapy control of colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:1597-1601.

Radiofrekvenční ablace v současné chirurgii – naše zkušenosti

Sutnar A., Třeška V., Skalický T.

Chirurgická klinika Fakultní nemocnice Plzeň, přednosta prof. MUDr. V. Třeška, DrSc.

Souhrn

Sutnar A., Třeška V., Skalický T.: Radiofrekvenční ablace v současné chirurgii – naše zkušenosti

Radiofrekvenční ablace (RFA) je jednou z metod využívaných při multimodální léčbě jaterních tumorů. Její možnosti jsou však rozhodně širší. Autoři prezentují možnosti a své zkušenosti s využitím RFA při ošetřování tumorózních lézí jater nebo při ošetřování poraněných parenchymatózních orgánů dutiny břišní. Porovnávají také rozdílné operační přístupy při aplikaci RFA, se zaměřením na jejich výhody.

Klíčová slova: radiofrekvenční ablace – RF sonda – tumory jater – traumata parenchymatózních orgánů

Summary

Sutnar A., Třeška V., Skalický T.: Radiofrequency Ablation in the Contemporary Surgery – Our Experience

Radio-frequency ablation (RFA) is one of the methods used in multimodal treatment of liver tumors. The opportunities for the use of RFA are more wide recently. Authors present their own experience with RFA in the treatment of liver tumors and also its use in the treatment of parenchymatous abdominal organs injury. They compare the different operative approaches for RFA with concentration to their advantages.

Keys words: radio-frequency ablation – radiofrequency catheter – liver tumors – parenchymatous organs injury

Rozhl. Chir., 2004, roč. 83, č. 10, s. 518-522.

ÚVOD

Radiofrekvenční ablace (dále jen RFA) již patří v dnešní době ke standardním chirurgickým metodám. Pracuje na principu radiových vln o vlnové délce 460 MHz, pomocí kterých vzniká v cílovém ložisku, kam je zavedena RF-sonda, koagulační nekróza. Velikost nekrózy je 3–5 cm, což závisí na typu použité sondy. Na našem trhu jsou v současné době dostupné přístroje Radionics (firma Radionics), RITA (firma RITA Medical Systems), RFA systém (firma Boston scientific).

MATERIÁL A METODIKA

Za období od 12/00 do 01/04 jsme ošetřili pomocí RFA celkem 48 nemocných ve věku 45–79 let s tumorózními změnami na játrech z toho 29 mužů a 19 žen. Nejčastěji byly zastoupeny metastázy kolorektálního karcinomu – ve 30 případech, dále karcinomu prsu 4x,

gynekologických nádorů 4x, Grawitzova tumoru 2x, karcinomu plic 1x a karcinoidu 2x. Jedenkrát jsme řešili pomocí RFA hepatom, 1x metastázu cholangio-genního karcinomu a 1x ložisko fokální nodulární hyperplazie a 2x hepatocelulárního karcinomu. Celkem jsme ošetřili 84 ložisek od 0,8 cm až do 5,5 cm. V jednom sezení jsme řešili nejvíce 5 ložisek. U nemocné s karcinoidem jsme ošetřili postupně 8 ložisek ve 3 sezeních. Šestkrát jsme postupovali transkutánně, 3x transtorakálně pomocí videocorakoskopie. U 7 nemocných jsme prováděli RFA opakovaně pro recidivu tumoru jater, z toho 5x po resekci, 2x po RFA, 6 nemocných jsme pro další generalizaci předávali jen do péče onkologů. Do této doby jsme neměli žádné vážnější komplikace.

Pomocí RFA jsme zatím 3x provedli resekci jater, v prvním případě se jednalo o resekci tří segmentů z pravého jaterního laloku, po výkonu došlo ke komplikaci v místě resekční plochy, kde se vytvořil subfrenický absces, který byl následně drénován. Další průběh byl již bez komplikací. Ve druhém případě jsme pomocí RFA provedli neanatomickou resekci v rozsahu asi 2 segmentů v regenerátu po resekci jater, kde

došlo k recidivě onemocnění. Ve třetím případě jsme provedli segmentektomii u nemocného s jaterní cirhózou. Oba dva výkony se obešly bez komplikací.

U traumatu jsme použili RFA zatím 2x, a to u traumatu sleziny. V prvním případě byla nalezena ruptura asi v polovině sleziny, kdy jsme pomocí RFA provedli neanatomickou resekci distální poloviny sleziny. Ve druhém případě se jednalo o silně krvácející trhlínu na konvexitě sleziny. V tomto případě jsme použili RFA ke koagulaci ruptury a zastavení krvácení. Po obou výkonech nebyly známky dalšího krvácení.

DISKUSE – VYUŽITÍ RFA

RFA se používá u ošetřování lézí parenchymatózních orgánů, jako jsou játra, slezina či ledviny. Původně byla určena pro ošetřování primárních či sekundárních tumorů jater. Její možnosti, jak se v klinické praxi ukázalo, jsou však rozhodně širší. RFA je úspěšně využívána nejen u neresekabilních primárních či sekundárních tumorů jater, ale i u resekcí, či ošetřování traumat parenchymatózních orgánů.

1. Primární či sekundární tumory jater

Zde se využívá RFA u nemocných, kde resekcí léčba není možná. Důvody jsou různé, je to četnost a lokalizace metastáz, celkový stav nemocného, či stav po resekcii jater s recidivou nádorového onemocnění. Díky RFA je možné léčit i řadu nemocných, kterým v minulosti chirurg již nic nabídnout nemohl. Přesto nejsme schopni takto ošetřit nemocné všechny a platí určitá indikační kritéria. Jak jsem se výše zmínil, můžeme dosáhnout až 5cm nekrózy, podle typu použité RF sondy. Proto by velikost metastáz rozhodně neměla přesahovat 4 cm, někteří autoři dokonce uvádějí velikost jen do 3,5 cm. Při větším rozměru ložiska totiž hrozí vysoké riziko lokální recidivy. Počet metastáz vhodný k ošetření se podle pracovišť různí [1, 2]. Většinou se udává jako maximum 5–6 ložisek, jsou však práce kde počet ložisek překračuje 10–15. Na základě našich zkušeností se domníváme, že je nutno přihlídnout k etiologii maligního onemocnění, kdy jsme například u metastáz karcinoidu do jater provedli postupně RFA 8 ložisek v kombinaci s následnou chemoterapií s velmi dobrým efektem. Jiná je situace u kolorektálního karcinomu, kde se snažíme dodržovat počet do maximálně šesti ložisek. Nutné je přihlídnout i k celkovému stavu pacienta. Svou roli hraje samozřejmě i lokalizace tumoru, kdy u centrálně uložených metastáz hrozí poškození velkých cév či žlučovýchodů. U velkých cév riskujeme možnost krvácení, nebo tím, jak je ochlazováno nádorové ložisko proudem krve v cévě, dochází k nedostatečné koagulaci metastázy, a možné brzké recidivě v téže lokalizaci. U žlučovýchodů je nebezpečí vzniku nekrózy, následného vytvoření biliárního abscesu a možný vývoj biliární píštěle. Pokud jde o otázku dalšího postižení organismu metastatickým procesem platilo donedávna, že RFA byla provedena pouze pokud nebyly v or-

ganismu známky dalšího nádorového onemocnění. I zde dochází k určitému názorovému vývoji, kdy se odstraňují například postižené uzliny z ligamenta hepatoduodenale a pak je provedena RFA s/nebo bez následné adjuvantní chemoterapie. I po takových operačních výkonech je možná remise základního onemocnění a dosažení významného prodloužení života nemocného.

2. RFA u resekcí tumorů

V případech, kdy je jaterní tkáň změněna cirhotickým procesem a my se snažíme provést resekcí výkon, je využití RFA velmi výhodné. RFA použijeme tak, že jednotlivými vpichy kolem nádorového ložiska vytvoříme hranici mezi tumorem a zdravou tkání. Pak již jen stačí provést excizi tumoru s podvazem větších cévních a žlučových kmenů. RFA aplikujeme při jednotlivém vpichu po dobu 3 minut, což je dostatečně dlouhá doba, aby se vytvořila ve zdravé tkáni koagulační nekróza. Výhody takového ošetření jsou zcela evidentní:

a) U cirhotiků můžeme provést neanatomickou resekci jater, šetříme tak jaterní parenchym a po výkonu se vyvarujeme vzniku možného jaterního selhání. Je známo, že nemocných s jaterní cirhózou, je jen velmi malá funkční rezerva jaterního parenchymu a po resekcii by mělo zůstat minimálně 40 % jaterního parenchymu, aby nedošlo k selhání jater.

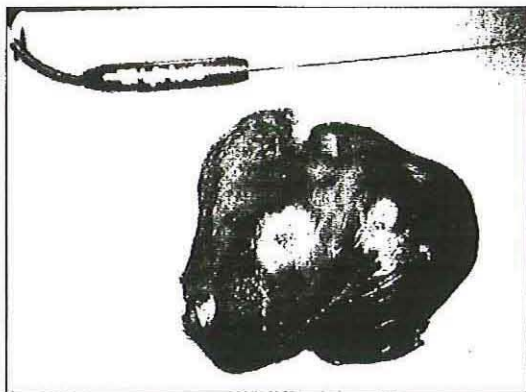
b) Nejsme nuceni preparovat přímo v cirhotické tkáni, která je velmi křehká. Tím se vyhýbáme nebezpečí vzniku větších krevních ztrát, protože postupujeme v tkáni již ošetřené RFA.

Tuto metodu můžeme aplikovat i u necirhotiků, tam kde se rozhodneme provést například neanatomickou resekci jater, či při recidivách tumorů jater, kde se pohybuje v novotvořené tkáni [3].

Metodu lze využít i v urologii u tumorů ledvin při záchovných operacích ledviny. V případech, kdy je druhá ledvina nefunkční nebo má nemocný ledvinu solitární s nutností šetření zbývajících parenchymu.

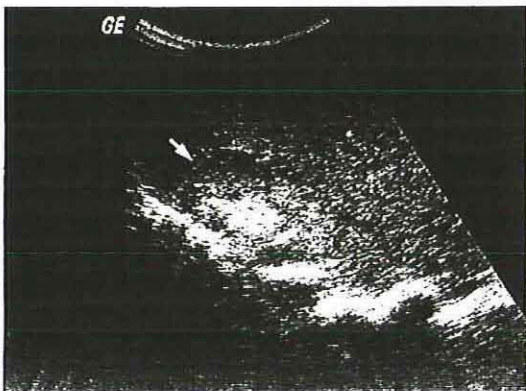
3. RFA u traumat

U traumat má RFA také své místo. Při poraněních parenchymatózních orgánů, využíváme RFA pokud možno k záchovným výkonům na těchto orgánech [4]. Můžeme jí využít při krvácení kdy do poraněného místa zavedeme RF-sondu a pomocí vytvoření koagulační nekrózy v tomto místě krvácení zastavíme. Doba aplikace RFA je cca 3–5 minut. Tento postup je vhodný u menších poranění, kdy nedošlo k dilaceraci postiženého orgánu. Musíme samozřejmě dávat pozor na hloubku a lokalizaci vpichu, aby nedošlo k poškození důležitých struktur, jako například žlučovýchodů. U větších poranění postupuje stejně jako při neanatomických resekcích nádorů. Kolem poraněného místa vytvoříme lem pomocí vpichů RF sondy, tak abychom postihli celou resekcí plochu. Doba působení RFA je při jednotlivém vpichu opět 3 minuty. Pak poraněnou část odstraníme pomocí skalpelu či elektrokoagulace. Úmysl při použití RFA tímto způsobem je evidentní. Jsme schopni takto provést neanatomickou resekci



Obr. 1. Model (hovězí játra) řez koagulační nekrosózou vytvořenou RFA sondou, v horní části RFA sonda Radionics

Pic. 1. A model (beef liver) section through a coagulation necrosis caused by the RFA probe, in the upper part the Radionics RFA probe



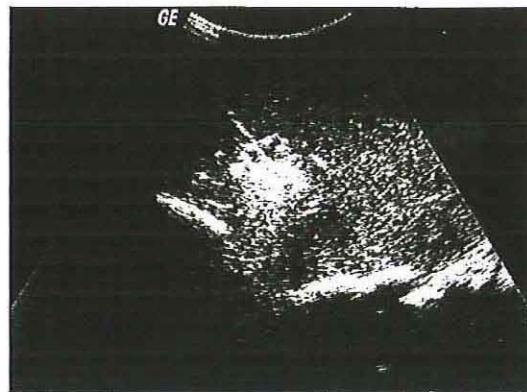
Obr. 2. Peroperační USG obraz oválné metastázy v játrech

Pic. 2. A peroperative ultrasound scan of an oval metastasis in the liver

jater místo například pravostranné hepatektomie při poranění jater, nebo resekovat jen půl sleziny či ledviny oproti splenektomii či nefrektomii. Nemocnému tak v případě traumat zachováme větší část zdravého orgánu.

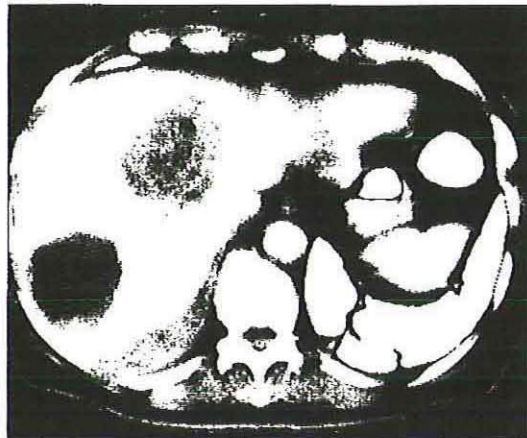
OPERAČNÍ PŘÍSTUP PŘI APLIKACI RFA

Operační přístup volíme jednak podle toho, k čemu chceme RFA využít, dále dle morfologie jednotlivého patologického procesu a v neposlední řadě i podle stavu nemocného. Podle voleného přístupu hodnotíme také invazivitu výkonu. Můžeme tak volit přístup otevřený (z laparotomie), laparoskopický, eventuálně torakoskopický, nebo přístup transkutánní.



Obr. 3. Peroperační USG obraz při aplikaci RFA

Pic. 3. A peroperative ultrasound scan during the RFA introduction

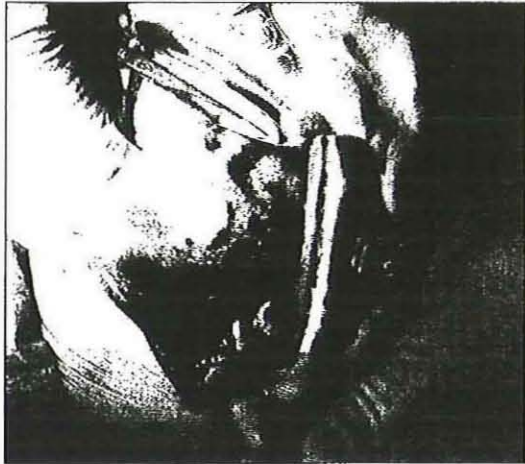


Obr. 4. Kontrolní CT po RFA po 6. měsících, v pravém laloku ložisko po RFA, centrálně je patrná recidiva meta procesu

Pic. 4. A control CT scan, 6 months after the RFA - in the right lobe a post- RFA focus. Centrally, a relaps of the metastatic process is detectable.

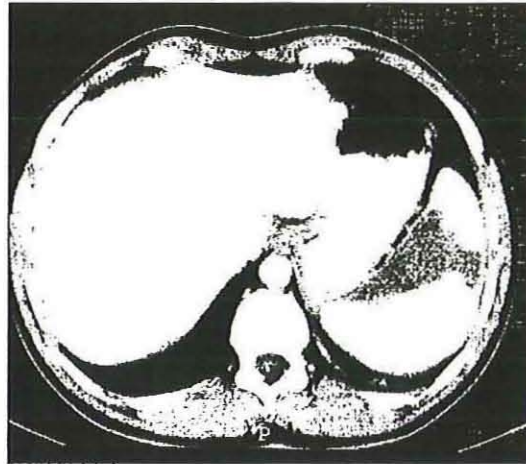
1. RFA otevřeně – z laparotomie

Po laparotomii u nádorů jater provedeme nejprve peroperační sonografií a pak pod její kontrolou zavádíme RF sondu přímo do nádorového ložiska. Tímto způsobem jsme schopni po mobilizaci jater ošetřit většinu ložisek v jaterním parenchymu, včetně dorzálních segmentů. RFA můžeme případně kombinovat s resekcí výkonem [5] či zavedením portu do a. hepatica, k lokoregionální chemoterapii. Při laparotomii také provádíme exploraci břišní dutiny se zaměřením na eventuální další nádorové šíření. Nejsme tak odkázáni pouze na grafické metody. Otevřený přístup většinou volíme rovněž u jaterních resekcí pomocí RFA, i když zde můžeme užít i přístup laparoskopický, záleží přitom na nálezu. U těžkých polytraumat je laparotomie rovněž nezbytná. Vzhledem k tomu, že se jedná většinou o nemocné v závažném stavu, (oběhové



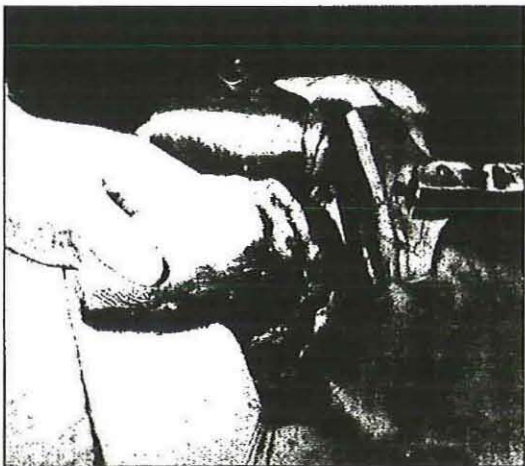
Obr. 5. Aplikace RFA sondy při neanatomické resekcí jater, vytváření koagulační linie

Pic. 5. The RFA probes in a non-anatomical liver resection, creating a coagulation line



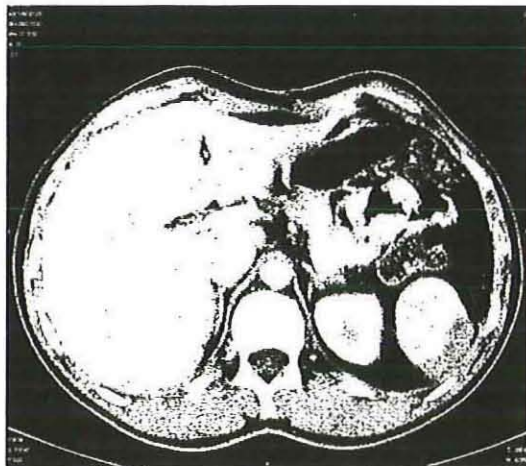
Obr. 7. CT obraz při ruptuře dolního pólu sleziny

Pic. 7. A CT scan of the inferior spleen pole rupture



Obr. 6. Neanatomická resekcí jater po aplikaci RFA sondy v koagulační linii

Pic. 6. The non-anatomical liver resection after the RFA probe introduction in the coagulation line



Obr. 8. CT obraz po resekcí dolního pólu sleziny pomocí RFA

Pic. 8. A CT scan after the inferior spleen pole resection using the RFA

nestabilní, s velkou krevní ztrátou) rozhodujeme se pro ošetření parenchymatózních orgánů pomocí RFA až po dokonalé exploraci a zhodnocení stavu nemocného.

2. RFA – laparoskopicky

Tento postup je samozřejmě méně invazivní než přístup otevřený, ale je podmíněný použitím laparoskopické USG sondy [6]. Pod její kontrolou se pak zavádí RF sonda do cílového ložiska. U nádorů se využívá s výhodou u ložisek příhodně lokalizovaných a k vyloučení generalizace tumoru v dutině břišní. RFA můžeme také využít při laparoskopických jaterních resekcích, i když v těchto případech se většinou

využívá endostaplerů. Další využití je u traumat dutiny břišní, kdy jsme nuceni přistoupit k operační revizi a stav nemocného nám dovoluje laparoskopickou exploraci; v těchto případech můžeme u menších poranění parenchymatózních orgánů (játra, slezina) využít RFA a ošetřit s její pomocí některá drobná krvácení.

3. RFA transtorakálně – videotorakoskopicky

Videotorakoskopii používáme u tumorů jater, které jsou lokalizovány těsně pod bránicí a z břišní dutiny jsou téměř nepřístupné. V takových případech volíme přístup přes pravou pohrudniční dutinu. I zde je výhodné použít laparoskopickou USG-sondu, i když to

není zcela nezbytné jako u laparoskopického přístupu. Můžeme totiž použít USG-sondu klasickou a přes stěnu hrudní zavést RF sondu do ložiska pod její kontrolou. Pokud nemáme laparoskopickou USG sondu, vyplňujeme pravý hemitorax po dobu výkonu vodou, aby byla pro sonografistu přehlednější hranice bránice.

4. RFA – transkutánní

Ze všech přístupů je tento způsob nejméně invazivní. Je volen u polymorbidních nemocných s primárními či sekundárními tumory jater, kteří nejsou schopni postoupit rizika celkové anestezie, laparoskopie, či laparotomie. Používá se při něm jen lokální anestezie, případně analgosedace. RF-sonda je z malé kožní incize zaváděna pod USG nebo CT kontrolou do nádorového ložiska [3]. I když je miniinvazivita nesporně výhodou tohoto přístupu, musíme si uvědomit i možné nevýhody a rizika. Je to horší přesnost při cílení nádorového ložiska a s tím spojená možnost recidiv, nemožnost explorační a v neposlední řadě i riziko poranění okolních orgánů [7]. Mezi játra a stěnu břišní se totiž může interponovat příčný tračník, nebo žaludek a my je můžeme poranit přímo RF sondou, nebo pokud jsou jen v přímé blízkosti působení RFA, může jejich stěnu postihnout koagulační nekróza. Nicméně je však i tento přístup přínosem a při dostatečné obezřetnosti se komplikací ve valné většině můžeme úspěšně vyvarovat.

ZÁVĚR

RFA našla během krátké doby řadu využití, která můžeme shrnout takto. Je již nedílnou součástí při léčbě tumorů jater, kde se stala metodou volby při ošetřování vícečetných metastatických ložisek v játrech, která nejsou resekabilní. U polymorbidních nemocných, kteří by nebyli dříve únosní k žádné chirurgické léčbě, můžeme tuto ablativní metodu rovněž s výhodou použít. Je však nutné zdůraznit, že u nemocných s primárním nebo sekundárním nádorem jater, kteří jsou v dobrém celkovém stavu, by RFA neměla v žádném případě nahradit či zastoupit resekční léčbu, neboť pouze při úplném odstranění nádoru, má nemocný šanci na dlouhodobé přežití. Jak používat RFA při resekcích jater, to je ještě otázka k zamyšlení. Samozřejmě, že u neanatomických resekcí jater, kde použijeme RFA nám zbývá více jaterní tkáně, vzniká nám však poměrně rozsáhlá koagulační nekróza na celé resekční ploše, která se vstřebává delší dobu. Hrozí zde proto reálné riziko zachycení infekce, s následným vytvořením abscesu. Z toho vyplývá, že při využití RFA k resekcím jater by se mělo postupovat podle určitých zásad. Rozhodně bychom ji měli využívat u cirhotiků, kde zachování většího objemu funkčního parenchymu výrazně snižuje již tak vysoké riziko jaterního selhání, které ohrožuje nemocného bezprostředně na životě. Rovněž u reresekcí ja-

ter pro recidivu tumorózního onemocnění, kde je preparace mnohdy obtížná a daná oblast často velmi špatně přehledná, se zdá být použití RFA výhodné. V ostatních případech je třeba přistupovat k dané problematice individuálně s vědomím možných komplikací.

U traumat, zvláště pak u poranění sleziny, je přínos RFA evidentní. Díky RFA jsme schopni lépe provádět její záchovné operace a část zdravého orgánu tak může dále plnit svoji funkci v organismu. U poranění jater se drobné fisury na povrchu dají ošetřit většinou pomocí fibrinových sítěk či lepidel. Velká poranění jater jsou ve většině případů řešena klasickými chirurgickými postupy, proto je zde využití RFA menší. U poranění ledvin nemáme s využitím RFA zatím zkušenosti, tato oblast patří plně do kompetence urologů. Na závěr bychom rádi zdůraznili jednu významnou skutečnost. K tomu, abychom byli schopni s RFA dokonale pracovat a plně využít jejich možností, bychom měli ovládat dobře sonografické vyšetření, nebo musíme mít k dispozici zkušeného sonografistu.

LITERATURA

1. Curley, S. A., et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies. *Ann. Surg.*, 230, 1999, 1-8.
2. Curley, S. A., et al. Radiofrequency ablation of hepatocellular cancer in 110 patients with cirrhosis. *Ann. Surg.*, 232, 2000: 381-391.
3. Rai, R., Seymour, K., Manas, D. Percutaneous radiofrequency thermoablation as an alternative to surgery for treatment of liver tumour recurrence after hepatectomy. *Br. J. Surg.*, 2002, vol. 89, p. 1620.
4. Brammer, R. D., Bramhall, S. R., Mirza, D. F., Mayer, A. D., McMaster P., Buckels, J. A. C. A 10-year experience of complex liver trauma. *Br. J. Surg.*, 2002, vol. 89, p. 1532-37.
5. Scudamore, C. H., Lee, S. I., Patterson, E. J., Buczkowski, A. K., July, L. V., Chung, S. W., Buckley, A. R., Stephen, G. F. Radiofrequency Ablation followed by Resection of Malignant Liver Tumors. *American Journal of Surgery*, 177(5): 411-417, May, 1999.
6. Tait, I. S., Yong, S. M., Cuschieri, A. Laparoscopy *in situ* ablation of liver cancer with cryotherapy and radiofrequency ablation. *Br. J. Surg.*, 2002, vol. 89, p. 1613-19.
7. Kučera, M. Komplikace po radiofrekvenční ablacii metastáz jater kolorektálního karcinomu. *Bulletin HPB*, 12/2004, 1-2.

MUDr. A. Sutnar
Chirurgická klinika FN
Alej Svobody 80
304 60 Plzeň
e-mail: sutnar@fnplzen.cz

Markers of Cellular Adhesion in Diagnosis and Therapy Control of Colorectal Carcinoma

L. HOLUBEC JR.¹, O. TOPOLCAN¹, J. FINEK¹, S. HOLDENRIEDER³, P. STIEBER³, M. PESTA¹, R. PIKNER¹,
L. HOLUBEC SEN.¹, A. SUTNAR¹, V. LISKA¹, S. SVOBODOVA², V. VISOKAI² and S. KORMUNDA¹

¹Charles University Prague, Medical Faculty Pilsen;

²Charles University Prague, First Medical Faculty Prague, Czech Republic;

³Institut fuer Klinische Chemie, LMU-Klinikum Grosshadern, University of Munich, Germany

Abstract. *Aim: Early diagnosis of the progressive tumor disease and control of the effect of therapy in colorectal carcinoma are most frequently performed by monitoring CEA or CA 19-9 tumor markers. Their clinical application is, however, limited. The aim of our study was to demonstrate the contribution of adhesive molecule assessment to the early diagnosis of progression. We also wanted to find out if changes in the levels of cellular adhesion parameters correlate with the effect of antitumor therapy. Materials and Methods: Intercellular cell adhesive molecule-1 (ICAM-1) and Vascular cell adhesive molecule-1 (VCAM-1) were assessed using the ELISA method, and the results were correlated with CEA and CA 19-9 tumor markers. Three hundred and sixty-four patients with colorectal carcinoma in Dukes' stages B-D were monitored. The results were processed with the SAS 6.2. statistical program and Statistica. Results: In 92 patients with first clinical progression (occurrence of distant metastases irrespective of localization), significantly increased ICAM-1 and VCAM-1 values were demonstrated. In ROC evaluation of curves, we also demonstrated high sensitivity of adhesive molecules against both the control healthy group (n=89) and the no evidence of disease group (NED) (n=183). Adhesive molecule levels were closely connected with the type and course of therapy and are presented in the form of case reports. Conclusion: Soluble adhesive molecules are a prospective parameter both for the early diagnosis of progression and for control of the effect of therapy. There is a need for a large-scale study, preferably multicentric, which would verify the suitability of introducing cellular adhesion parameter assessment into routine practice.*

Correspondence to: Lubos Holubec, MD., Ph.D., Dept. of Oncology and Radiotherapy, E. Benes 13, 305 99 Pilsen, Czech Republic, e-mail: HOLUBEC@fnplzen.cz

Key Words: Adhesive molecules, ICAM-1, VCAM-1, colorectal cancer, diagnosis.

With the development of modern surgical techniques in curative therapy of secondary metastases from colorectal carcinoma, there are increasing demands for their early diagnosis (1, 2). Apart from the use of screening methods, the assessment of the markers of tumor biological activity (which characterize individual steps in the metastatic process) seems to offer good prospects. Cellular adhesion markers, which find their application in the nidation of tumor cells and their reverse penetration into tissue, as well as in the formation and growth of metastases in new tissue, may be considered to represent such a parameter (4, 10, 14). Our previous pilot studies demonstrated significant changes of adhesive molecule values in patients with colorectal carcinoma (13). The aim of this study was to demonstrate the contribution of adhesive molecule assessment for an early diagnosis of progression, and also to determine whether changes in the levels of cellular adhesion parameters correlate with the effect of antitumor therapy.

Materials and Methods

Serum values of soluble cell adhesive markers ICAM-1 (Intercellular cell adhesive molecule-1) and VCAM-1 (Vascular cell adhesive molecule-1) were assessed using the ELISA method (Bender Medsystems). The results were correlated with serum values of the recommended CEA (carcinoembryonic antigen) tumor markers and CA 19-9 (carbohydrate antigen) tumor markers using the IRMA method (Immunotech in Prague, Cis Bio International, France).

For the tumor marker assessment, venous blood from the cubital vein was sampled in standard conditions between 7 and 9 a.m., in order to exclude the effects of daily rhythm. The serum obtained by centrifugation was stored at a temperature of -70°C until the laboratory analysis.

Statistical analysis of the data was performed by using the S.A.S program, version 6.12 and the Statistica program. Descriptive statistics (average, median, standard deviation, maximum, minimum) were calculated for the whole group of patients, as well as for individual subgroups.

Table I. Medians (MED) and the statistical significance of differences for the individual compared groups (Healthy, NED, RD).

Groups	Serum levels (median)			
	ICAM-1	VCAM-1	CEA	CA 19-9
Healthy controls	206.0	358.0	1.2	10.5
No evidence of disease (NED)	277.0	640.0	1.4	7.8
Recurrence of disease (RD)	433.0	1111.0	16.5	41.2

Compared groups	p-values (Wilcoxon test)			
	ICAM-1	VCAM-1	CEA	CA 19-9
Healthy x RD	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
NED x RD	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Profiles of specificities and corresponding sensitivities for individual referential groups are illustrated with received operating characteristics (ROC) curves in accordance with EGTM recommendations (5). Comparison of the groups according to different criteria was made with the Wilcoxon non-pair test.

Patients were monitored during the follow-up period at regular 3-month intervals for the first 2 years and at 6-month periods afterwards. Patients were examined by the clinical oncologists using physical examination and imaging methods (X-ray, ultrasound, CT and colonoscopy), according to the recommendation of European Society for Medical Oncology (ESMO). A blood test for tumor markers and basic biochemistry screening was performed for every patient at every regular visit. Inclusion criteria for this clinical trial were normal liver and renal function tests (serum urea, serum creatinine, SGPT, SGOT).

We monitored patients with colorectal carcinoma in Dukes' stages B-D. This included a total of 183 patients with no evidence of disease (NED) and 92 patients with recurrence of disease (RD). The definition of the patients' clinical condition was as follows:

- The first clinical progression of the disease irrespective of localization (without distinguishing locoregional relapse and distant metastases) was considered as recurrence of disease (RD).
- Patients with no evidence of the disease symptoms within at least one year during follow-up were considered as remission patients (NED).

As a control group, we used a group of 89 healthy individuals, whose median age (58 years) corresponded roughly to the median age of the patients with colorectal carcinoma (64 years). The dynamics of tumor marker changes in patients after adjuvant chemotherapy, following primary surgery of colon carcinoma, are presented as case reports. In both cases these were patients in the Dukes' stage C, and both patients were treated with 5-fluorouracil potentiated with leucovorin, according to the MAYO regimen.

Results

Table I presents medians (MED) for the individual compared groups (healthy, NED, RD), and the statistical significance of differences between the groups. In patients

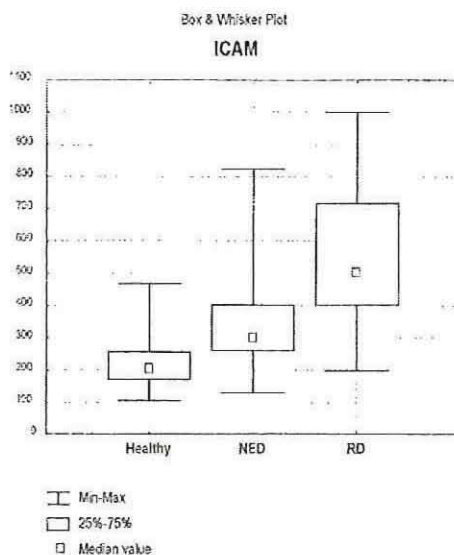


Figure 1. The basic descriptive statistics for ICAM-1.

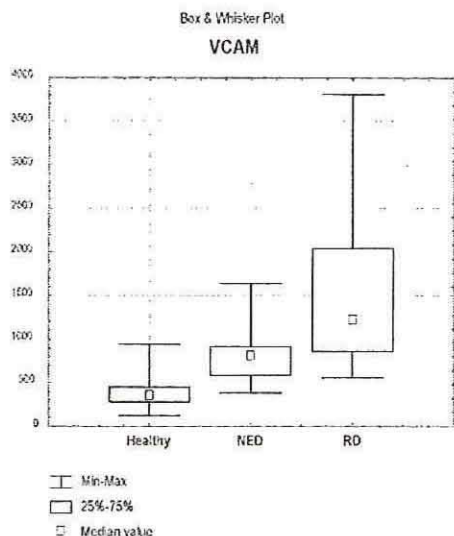


Figure 2. The basic descriptive statistics for VCAM-1.

with clinical progression (occurrence of distant metastases irrespective of localization), we demonstrated significantly increased values of ICAM-1 and VCAM-1 compared to both healthy and remission groups. Best correlation was achieved between the levels of adhesive molecules ICAM-1 and VCAM-1 in patients with clinical progression (Spearman rank correlation coefficient = 0.72; $p < 0.001$).

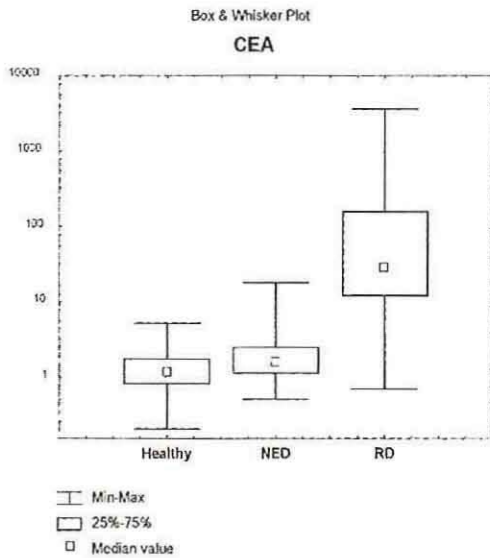


Figure 3. The basic descriptive statistics for CEA.

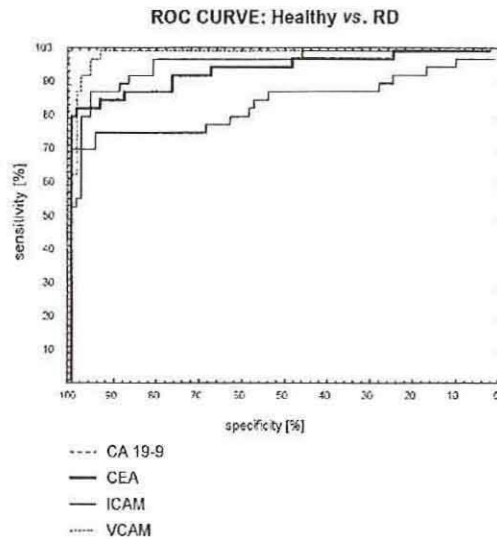


Figure 5. ROC curves assessment: recurrence of disease versus healthy control group.

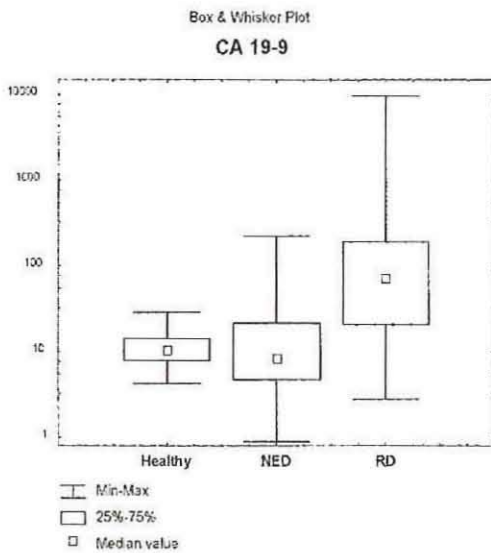


Figure 4. The basic descriptive statistics for CA 19-9.

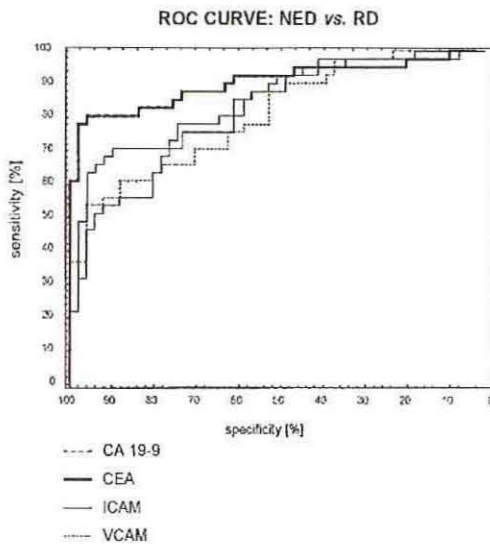


Figure 6. ROC curves assessment: recurrence of disease versus no evidence of disease.

The basic descriptive statistics for individual compared markers (ICAM-1, VCAM-1, CEA and CA 19-9) and individual compared groups (healthy, NED, RD) are given in the form of box plots in Figures 1-4.

We also demonstrated high sensitivity of adhesive molecules during ROC curves assessment, both against the

control healthy group and NED group (see Figures 5, 6). Adhesive molecule levels were closely connected with the type and course of the therapy, and are presented in the form of case reports. The first case was a 62-year-old patient with Dukes' stage C colon tumor. The patient underwent adjuvant chemotherapy and, since its completion, he has

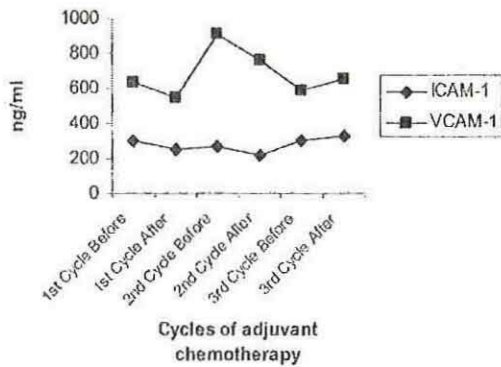


Figure 7. Case report: changes in the level dynamics of ICAM-1 and VCAM-1 during the adjuvant chemotherapy, favorable prognosis.

been in a long-term remission. During the chemotherapy, we observed normal values for ICAM-1 and slightly increased values for VCAM-1. A typical example of the course of changes in the level dynamics is shown in Figure 7. Other tumor marker levels did not demonstrate any substantial changes during the therapy and were mostly within the range of normal values (see Table II).

Figure 8 shows the dynamics of changes in adhesive molecule values in a 57-year-old patient with Dukes' stage C colon tumor. In this patient, disease progression occurred within 6 months after the end of adjuvant chemotherapy. Already during the chemotherapy pathological values of ICAM-1 and VCAM-1 had been registered. The progression did not influence other tumor marker values: only the values for TPS cyokeratin were slightly increased (Table III).

Discussion

Thanks to the development of new therapeutic possibilities for colorectal carcinoma, such as new surgical techniques for liver metastases or new types of chemotherapy drugs and their combinations with immunotherapy, more attention is being paid to the early diagnosis of tumor diseases (9, 11). The situation in colorectal carcinoma, however, is highly unsatisfactory, since more than 50% of tumors are diagnosed in late stages (Dukes' C or D) when locoregional glands are already affected or distant metastases are present. The evidential value of classical tumor markers is limited and, apart from CEA, other markers do not have sufficient sensitivity (7, 8, 12, 15). There is, therefore, an effort to find new markers of tumor biological activity which will replace present markers or, in combination with them, improve their diagnostic possibilities (6, 10). Adhesive molecules represent a group of markers which find their application in the cascade

Table II. Case report: changes in the level dynamics of tumor markers during the adjuvant chemotherapy, favorable prognosis.

Chemotherapy	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA U/l	TPS U/l
1st Cycle Before	297	634	0.7	7.3	31	35
1st Cycle After	254	539	0.8	4.1	31	31
2nd Cycle Before	266	906	0.6	8.4	14	51
2nd Cycle After	220	760	0.8	5.0	10	48
3rd Cycle Before	303	580	0.7	11.5	10	47
3rd Cycle After	324	654	0.7	8.2	14	24

Table III. Case report: changes in the level dynamics of tumor markers during the adjuvant chemotherapy, unfavorable prognosis.

Chemotherapy	ICAM-1 ng/ml	VCAM-1 ng/ml	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA U/l	TPS U/l
1st Cycle Before	430	1388	0.7	7.3	40	130
1st Cycle After	474	1661	0.8	4.1	45	133
2nd Cycle Before	593	1961	0.6	8.4	43	280
2nd Cycle After	624	2933	0.8	5.0	42	245
3rd Cycle Before	712	2244	0.7	11.5	73	340
3rd Cycle After	673	2308	0.7	8.2	49	354

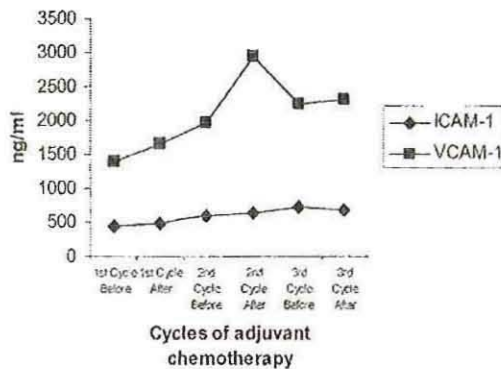


Figure 8. Case report: changes in the level dynamics of ICAM-1 and VCAM-1 during the adjuvant chemotherapy, unfavorable prognosis.

of metastatic processes during the formation and growth of metastases in new tissue (13). We directed our attention to soluble receptors of ICAM-1 and VCAM-1 immunoglobulins which, in interaction with cytokines, participate in endothelium activation and subsequent adhesion of thrombocyte and metastatic tumor cell aggregations to endothelium. In this way, they assist the formation of distant metastases (4, 14). Median values of both these parameters were statistically significantly higher in patients with

progression than in patients with no evidence of disease (NED) and in healthy control groups. While evaluating the specificity-sensitivity profile of ROC curves, we demonstrated high sensitivity of adhesive molecules particularly in comparison with the healthy control group. CEA remained the best marker in comparison with the NED group, and ICAM-1 also demonstrated a good profile. One possible reason for the difference in adhesive molecule profiles between the control healthy group and patients with NED is the anticipated long lead time in these markers, so that some "non-specific" cytoadhesion elevations are in fact already connected with future progression of the tumor. We confirmed this assumption in some cases of patients who underwent adjuvant chemotherapy. When the marker profile did not change during chemotherapy, the prognosis for these patients was good and they are still in a long-term remission of the disease. When gradual elevation of adhesive molecules occurred during the therapy, these patients were diagnosed with progression of the tumor disease.

Adhesive molecules have good prospects as parameters, both for early diagnosis of progression and control of the effect of therapy. There is a need for a large-scale study, preferably multicentric, which would verify the suitability of introducing the assessment of cellular adhesion parameters into routine practice.

Acknowledgements

This study was supported by the grant IGA MZCR NR 7905-3.

References

- 1 Bleiberg H, Kemeny N, Rougier P and Wilke H: Pathology and prognostic factors. *In: Colorectal Cancer: A Clinical Guide to Therapy*. Martin Dunitz Ltd, UK, pp. 55-81, 2002.
- 2 De Vita VT, Vincent T, Hellman S and Rosenberg A: Cancer of the colon. *In: Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott - Raven Publishers. pp. 1144-1182, 1997.
- 3 Araki T, Miki C and Kusunoki M: Biological implications of circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in colorectal cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 36(4): 399-404, 2001.
- 4 Sun JJ, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Feng JX, Zhou G, Xue Q and Chen J: Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Cancer Res Clin Oncol* 125(1): 28-34, 1999.
- 5 European Group on Tumor Markers: Consensus recommendations. *Anticancer Res* 19: 2785-2820, 1999.
- 6 Bidart JM, Thuillier F, Augereau CH *et al*: Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 45(10): 1695-1707, 1999.
- 7 Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H Jr, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG and Somerfield MR: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 15, 19(6): 1865-78, 2001.
- 8 Fleisher M *et al*: Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *Lab Med Pract Guidelines* 15: 5-56, 2002.
- 9 Beretta GD and Labianca R: Individual tailored chemotherapy. *Suppl Tumori* 1(6): S25-7, 2002.
- 10 Nanni O, Volpi A, Frassinetti GL, De Paola F, Granato AM, Dubini A, Zoli W, Scarpi E, Turci D, Oliverio G, Gambi A and Amadori D: Role of biological markers in the clinical outcome of colon cancer. *Br J Cancer* 87(8): 868-75, 2002.
- 11 Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I and Tsigris C: Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 37(18): p. 2392-7, 2001.
- 12 American Society of Clinical Oncology: Recommended colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 17: 1312-1321, 1999.
- 13 Holubec L Jr, Topolcan O and Pikner R: Biological activity in colorectal carcinoma. *Cas Lek Cesk* 141(16): 508-12, 2002.
- 14 Roselli M, Guadagni F, Martini F, Spila A, Mariotti S, D'Alessandro R, Aloe S, Gazzaniga PP, Basili S, Cosimelli M and Ferroni P: Association between serum carcinoembryonic antigen and endothelial cell adhesion molecules in colorectal cancer. *Oncology* 65(2): 132-8, 2003.
- 15 Kantorova I, Lipska L, Belohlavek O, Visokai V, Trubac M and Schneiderova M: Routine (18)F-FDG PET preoperative staging of colorectal cancer: comparison with conventional staging and its impact on treatment decision making. *J Nucl Med* 44(11): 1784-8, 2003.

Received August 2, 2004
Revised December 7, 2004
Accepted February 2, 2005

Dynamics of Serum Levels of Tumour Markers and Prognosis of Recurrence and Survival after Liver Surgery for Colorectal Liver Metastases

V. LISKA¹, L. HOLUBEC JR.^{2,3}, V. TRESKA¹, T. SKALICKY¹, A. SUTNAR¹, S. KORMUNDA³, M. PESTA³, J. FINEK², M. ROUSAROVA² and O. TOPOLCAN³

Departments of ¹Surgery, ²Oncology and ³Central Isotopic Laboratory, University Hospital Pilsen, Charles University Prague, Pilsen, Czech Republic

Abstract. *Background:* The authors present a statistical analysis of the dynamics of tumour markers and compare these with single serum levels in patients before and after liver surgery for colorectal liver metastases (CLM). *Patients and Methods:* The serum levels of tumour markers conventionally used in clinical practice (CA19-9, CEA, CA72-4) and markers informing of the proliferation activity of malignancy (TK, TPA, TPS) were statistically analysed. The authors studied 144 patients who underwent liver surgery for colorectal liver metastases between September 1999 and June 2005. Serum levels of tumour markers before surgery (maximally two weeks before the operation), after surgery (maximally one month after the operation – usually on the day of dismissal), six months (\pm one month) and twelve months after the surgery (\pm one month) were determined. The Log Rank test and the Wilcoxon test were used for statistical evaluation. The survival rate and disease-free intervals (DFI) were computed using the Kaplan-Meier method. *Results:* The statistical analysis of tumour marker dynamic after liver surgery (speed and power of recurrence) supported the dynamics of CA 19-9 and CEA as excellent prognostic factors of early recurrence of CLM in contrast to proliferative tumour markers. *Conclusion:* The results of the study suggest the importance of tumour markers for the prediction of a short survival rate or DFI. This approach would be very helpful for the planning of palliative oncological treatment for patients with liver malignancies that cannot be treated by surgical therapy. Current patients with a high tendency of recurrence of CLM after liver surgery should be followed up more thoroughly to increase the possibility of successful reoperation.

Correspondence to: Vaclav Liska, MD, Department of Surgery, University Hospital Pilsen, Charles University Prague, Alej svobody 80, 323 00 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 377 104 271, +420 732 160 287, e-mail: Vena.liska@seznam.cz / Liskav@fnplzen.cz

Key Words: Colorectal cancer, liver metastasis, liver surgery, tumor markers, prognosis.

The radical resectability of colorectal liver metastases (CLM) is only about 15% and this proportion is further decreased after radical surgical therapy by early recurrence of the metastatic process (1) that is rarely identified in time. It is a fact that repeated liver resections for CLM are associated with as good a survival rate as single resections, hence it is important, that prompt diagnosis of early liver metastases recurrence is made. One way to distinguish patients with a tendency for early recurrence is the use of tumour markers. Under early recurrence of malignancy, relapse after radical surgical therapy can be determined by following tumour marker levels earlier than supposed from the statistical time difference between radical and palliative therapy. This means that patients are burdened with operations without any distinct survival benefit.

Tumour markers should not only be used as static prognostic levels with many single serum levels and any level of cut-off, but their dynamics should also be studied in order to understand their physiological or pathological role in the disease process. Patients with a tendency for a short disease-free interval (DFI) could then be identified swiftly, improving their prognosis and helping in the development of appropriate follow-up strategies. Routine tumour markers (CEA, CA19-9, CA72-4) and proliferative tumour markers (TK, TPS, TPA) are commonly expressed not only by the primary tumour mass but also in metastatic tissues (2, 3). In previous studies, the importance of the statistical analysis of these tumour markers was demonstrated for a predictive prognosis of disease, mainly for the prediction of relapse of malignancy during the follow-up period. Proliferative tumour markers express the proliferative activity of a tumour and can reflect the aggressiveness of a tumour. The serum level of conventional tumour markers, however, depends on tumour mass (4, 5).

Some scoring systems for prediction of early recurrence of the CLM process after surgical therapy use tumour markers as one of the predictive factors (6-8). The tumour

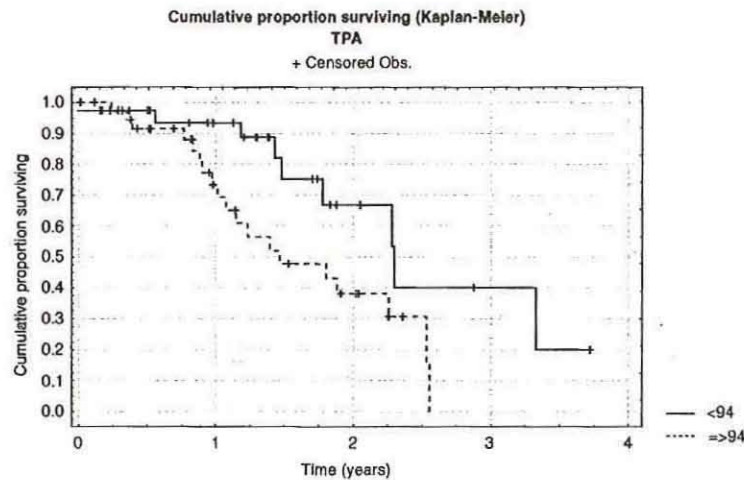


Figure 1. Overall survival using the preoperative serum level of TPA as a prognostic factor of survival rate after surgery for colorectal liver metastases (cut-off 94 IU/L).

marker most often used is CEA (9). The authors present a statistical analysis of the dynamics of tumour markers and compare them with single serum levels in patients after liver surgery for colorectal liver metastases

Patients and Methods

One hundred and forty-four 144 patients, who underwent radical surgical therapy for colorectal liver metastases between September 1999 and November 2005 were retrospectively included into this study. From this group patients were chosen, from whom marker serum levels were acquired during a postoperative period of one year: i.e. 82 patients with CLM who were operated on between September 1999 and June 2005. The purpose was to study the dynamics of tumour markers after radical surgery and determine any association with survival rate and the disease-free interval. The serum levels of routine tumour markers (CEA, CA 19-9, CA 72-4) and proliferative tumour markers (TPS, TPA, TK) were determined from blood samples collected before the operation (maximum two weeks before the operation), after the operation (maximum one month after the operation – usually on the day of release), and six (± 1 month) and twelve months after the operation (± 1 month). In the dynamics study the ratios of preoperative (D 14-0) and postoperative (I. D1-30, II. after 6 ± 1 month, III. after 12 ± 1 month) serum levels of the named tumour markers were compared. All the time deviations were taken into account during the statistical analyses.

The tumor markers were monitored using the following immunoanalytical methods: carcinoembryonic antigen (CEA): IRMA (immuno-radiometric assay), Immunotech, Czech Republic (ng/mL); carbohydrate antigen (CA 19-9): Shering-CIS, France (kIU/L); carbohydrate antigen (CA 72-4): IRMA, Shering-CIS, France (kIU/L); tissue polypeptide antigen (TPA): IRMA, DIASORIN (kIU/L); tissue specific polypeptide antigen (TPS): IRMA, IDL, Sweden (kIU/L); thymidine kinase (TK): REA, Immunotech (kIU/L).

The statistical analysis of both cohorts of patients was processed using S.A.S. version 8.02 (Statistical Analysis Software, Inc.) using Kaplan-Maier curves. The statistical significance was determined using the Log-rank and the Wilcoxon tests. The cut-off of tumour markers was estimated using the quartile system.

Results

The survival rate for patients after radical surgical therapy of CLM was found to be dependent on the preoperative serum level of the proliferative tumour markers TPS and TPA ($p < 0.05$) and the classical tumour markers CA19-9 and CA72-4 ($p < 0.05$) (Figures 1 and 2). The survival rate was dependent on the postoperative (day 1-30) serum level of TPA and CEA (both $p < 0.05$). The DFI in the same group was found to be dependent on the preoperative serum level of the proliferative tumour marker TPS and CA72-4 (both $p < 0.05$). The DFI was also dependent on the postoperative serum level (day 1-30) of CEA (p -value < 0.05). Postoperative serum levels of tumour markers can be influenced by the half-life of the serum tumour marker (10). The statistical analysis of repeated serum levels of named tumour markers demonstrated that the ratio of preoperative and postoperative serum levels of CA19-9 and CEA were statistically significant for the prediction of early recurrence ($p < 0.05$). The dynamics study (again increased or decreased serum level) showed that dynamic changes of CA19-9 and CEA were excellent prognostic factors of the DFI of CLM in contrast to the proliferative tumour markers (Figure 3). The statistical analysis did not demonstrate proliferative tumour markers as prognostic factors for early recurrence. The

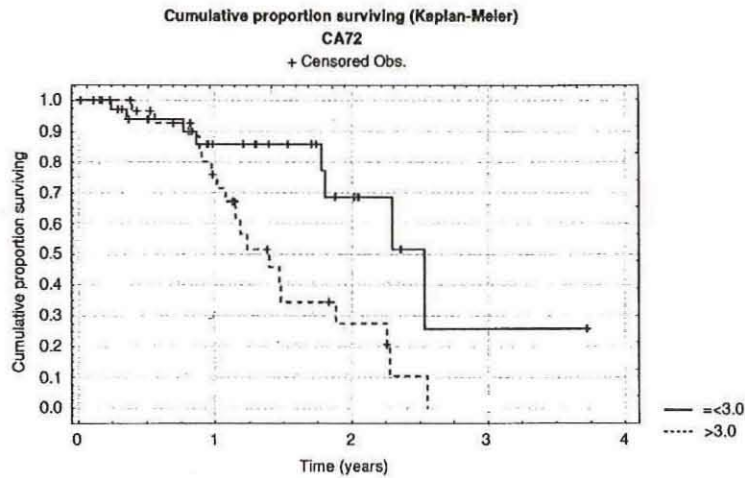


Figure 2. Overall survival using the preoperative serum level of CA72-4 as a prognostic factor of survival rate after surgery for colorectal liver metastases (cut-off 3.0 IU/L).

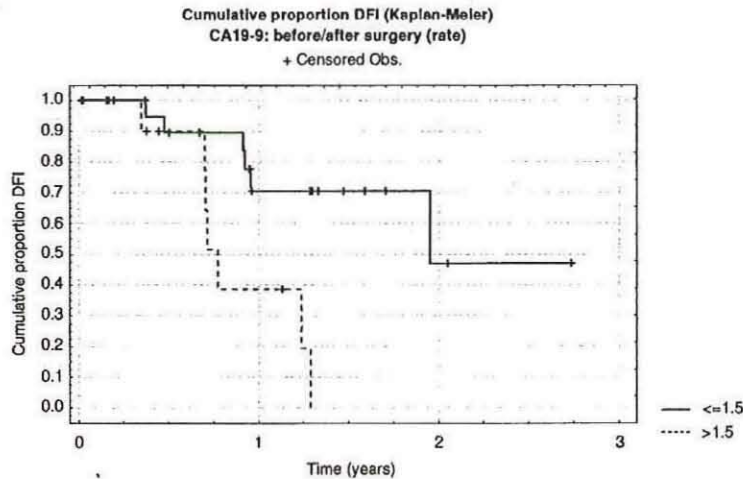


Figure 3. The disease-free interval using the ratio of the preoperative and postoperative serum levels of CA19-9 as a prognostic factor of early recurrence after surgery for CLM (cut-off 1.5).

statistical analysis of the ratio of preoperative and late (6 and 12 months) postoperative serum levels of both groups of tumour markers were not statistically significant for the prediction of the DFI or survival rate.

Discussion

The survival rate of patients with surgically untreated malignancy of the liver depends on tumour mass and whether the liver parenchyma is affected by malignancy. The survival

rate and DFI of patients after surgery for CLM also depend on the preoperative tumour mass and the proliferative activity of the tumour. Early postoperative levels of tumour markers in patients who underwent surgery for CLM were not so important for the prediction of recurrence or survival. The dynamics (increase) of the serum level of classical tumour markers has been shown here to be a prognostic factor for the early recurrence of CLM after surgery. The dynamics of proliferative tumour markers has not been shown as a prognostic factor of early recurrence. The postoperative serum

levels found in the early postoperative period (maximum 30 days after operation) may have been distorted by the longer half life of tumour markers. During the postoperative period, the regeneration and hypertrophy of liver parenchyma commences as a consequence of surgical resection and the necessity for compensation of the parenchymal functional capacity. This process is realised through proliferation. Some of the named proliferative tumour markers are involved in this proliferation process. We did not find any statistically significant changes in serum levels of the proliferative tumour markers in the perioperative period that could reflect the behaviour of CLM after radical surgical therapy.

The question of the significance of the ratio of preoperative and late postoperative serum levels of tumour markers for the prediction of early recurrence remains partially unanswered. This may have been influenced by the small fraction of patients with early recurrence in our patients' cohort or it was not possible to distinguish between early and late recurrence. The use of tumour markers for the prediction of survival rate or the DFI of patients with CLM in clinical practice should be influenced by the actual clinical situation and individual patient history (11-13). Recognition of the clinical situation for which the tumour markers are assessed is crucial for the validity of the results and to enable patients to profit from tumour marker measurement. The interpretation of tumour markers depends on the art of processing, which should be chosen with regard to "the clinical question asked" (14). Understanding the behaviour of tumour markers during the follow up period after surgery for liver malignancy is the most important factor in selecting the follow up strategy. Tumour markers could be used safely as prognostic factors in extended follow-up guidelines for patients with an increased risk ratio of early recurrence of CLM. Their clinical relevance will make it possible to increase the number of timely detected recurrences and the number of repeated resections, and this will increase the overall survival rate in CLM.

Conclusion

In this study, we demonstrated that the preoperative serum level of the proliferative tumour markers TPS, TPA and the conventional tumour markers CA19-9, CA72-4 was as statistically significant for the prediction of the survival rate. The DFI was dependent on the preoperative serum level of the proliferative TPS and CA72-4. The statistical analysis of repeated serum levels of named tumour markers demonstrated the ratio of preoperative to postoperative serum levels of CA19-9 and CEA as statistically significant for the prediction of early recurrence. We could use these facts to improve our follow-up guidelines to achieve early detection of recurrence. This could raise the number of patients who, with repeated surgical therapy, could achieve the same survival rate as patients having had a single surgical operation.

Acknowledgements

This article was supported by grant of IGA MZ CR NR 7905-03, 8301-3 and Research project MSM 0021620819, Medical School and Teaching Hospital Plzen, Czech Republic.

References

- 1 Provenzale D: Screening and surveillance of gastrointestinal cancers. *In: Gastrointestinal Cancer*. Rustgi AK (ed.). Oxford, Saunders, pp. 193-205, 2003.
- 2 Hayes DF: Evaluation of tumor markers: an evidence-based guide for determination of clinical utility. *In: Oncology: An Evidence-based Approach*. Chang AE (ed.). 1st Ed, New York, Springer, pp. 106-112, 2005.
- 3 Stieber P: Sensible use of tumor markers. *J Lab Med* 25(9/10): 327-336, 2001.
- 4 Chang AE and Skibber JM: Evaluation of tumor markers: an evidence-based guide for determination of clinical utility. *In: Oncology: An Evidence-based Approach*. Chang AE (ed.). 1st ed, New York, Springer, pp. 1753-1767, 2006.
- 5 Gion M, Mione R, Barioli P and Dittadi R: Dynamic use of tumor markers, rationale-clinical applications and pitfalls. *Anticancer Res* 16(4B): 2279-2284, 1996.
- 6 Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF and Blumgart LH: Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230: 309-318, 1999.
- 7 Mann CD, Metcalfe MS, Leopardi LN and Maddern GJ: The clinical risk score: emerging as a reliable preoperative prognostic index in hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg* 139: 1168-1172, 2004.
- 8 Liska V, Treska V, Holubec L, Skalicky T, Sunar A, Topolcan O and Finek J: Prognostic factors of early recurrence of colorectal liver metastases and their usage in clinical praxis. *Rozhl Chir* 85(4): 163-168, 2006.
- 9 Nagakura S, Shirai Y, Yokoyama N, Wakai T, Suda T and Hatakeyama K: Major hepatic resection reduces the probability of intrahepatic recurrences following resection of colorectal carcinoma liver metastases. *Hepatogastroenterology* 50: 779-783, 2003.
- 10 Liska V, Treska V, Holubec L Jr, Skalicky T, Sutnar A, Topolcan O and Finek J: A partial relaps of a colorectal carcinoma metastatic process following liver surgery-a multifactorial study. *Rozhl Chir* 85(2): 86-89, 2006.
- 11 Fleisher M: Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *Laboratory Medicine Practice Guidelines* 15: 5-56, 2002.
- 12 9th European group on tumor markers: Consensus recommendations. *Anticancer Res* 19: 2785-2820, 1999.
- 13 Schwartz MK: Tumor markers for colorectal cancer. *In: Tumor Markers. Physiology, Pathology, Technology and Clinical Applications*. Diamandis EP (ed.), New York, AACCC Press, pp. 253-257, 2002.
- 14 Bidart JM, Thuillier F and Augereau CH: Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clinical Chemistry* 45(10): 1695-1707, 1999.

Received January 4, 2007

Revised April 3, 2007

Accepted April 13, 2007

Cystadenom jater s ovariálním stromatem – kazuistika

Sutnar A.¹, Skalický T.¹, Třeška V.¹, Hess O.², Mírka H.³, Michal M.², Novák P.¹, Liška V.¹

¹. Chirurgická klinika FN Plzeň, Prof. MUDr. Vladislav Třeška DrSc.

². Patologicko-anatomický ústav LF UK, FN Plzeň

³. Radiodiagnostická klinika FN Plzeň

Souhrn:

Cystadenom s ovariálním typem stromatu je poměrně vzácná afekce jater. Autoři popisují úskalí diagnostiky a léčby s možnými komplikacemi při nepříznivém uložení cystadenomu centrálně v játrech u 46-leté ženy.

Klíčová slova: cystadenom, ovariální stroma, játra

Úvod

Cystické afekce jater patří ve valné většině případů mezi asymptomatická benigní onemocnění jater. Radíme sem jak onemocnění neinfekční, jako jsou prosté jaterní cysty nebo potraumatické pseudocysty, tak onemocnění infekční, typu parazitárních cyst jater, způsobených echinokoky či amébami, které se mohou vyvinout až do stadia abscesu /1/. Jen malé procento cystických onemocnění jater je způsobeno nádorovými onemocněními (cystadenom, cystadenokarcinom). Cystadenom s ovariálním typem stromatu je poměrně vzácná afekce jater, která se může vyskytovat i v extrahepatálních žlučových cestách. Lze ji diagnostikovat rovněž v pankreatu, nejčastěji v hlavě, nebo v ledvinách /2,3/. Histologicky je tvořen ovariálním stromatem, které lemují cystické adenomatózní struktury tvořené epitelem podobným intrahepatálním žlučovým cestám /4/

Kazuistika

V prezentované kazuistice autoři popisují průběh onemocnění, diagnostiku a léčbu tohoto onemocnění u 46-leté ženy. Nemocná byla přijata k hospitalizaci na Chirurgickou kliniku FN Plzeň dne 28.2.2005 se čtyř denní anamnézou kolikovitých bolestí břicha lokalizovaných v epigastriu a pravém podžebří, které se propagovaly do zad. Byly též přítomny známky akutní cholangitidy. Dle ultrasonografie (USG) a počítačové tomografie (CT) jsme diagnostikovali rozsáhlou cystu, která vycházela z jater. Způsobovala tlakové změny v oblasti porta hepatis s útlakem samotné portální žíly, pravé a střední jaterní žíly, s rozšířením žlučovodů segmentů 5 a 6 a deviací dolní duté žíly (DDŽ) /obr.1,2,3/. Byla v těsném kontaktu s duodenem i hlavou pankreatu. Nemocnou jsme léčili vzhledem k akutní cholangitidě podáním antibiotik (ATB) a 3.3.05 laparoskopickou fenestrací cysty s drenáží Redonovým drénem. Odsáta byla serózní tekutina, cca 1000 ml. Histologicky byla ve stěně popsána cylindrická výstelka, kdy subepiteliálně bylo celulárnější vazivo, možná i kulatobuněčná zánětlivá celulizace. Zachycený cylindrický epitel napodoboval výstelku žlučovodu, bez známek malignity. U

nemocné přetrvávaly tlakové potíže v pravém podžebří a objevila se žlučová sekrece z drénu. 5. pooperační den byla provedena cholangiopankreatikografie pomocí magnetické resonance (MRCP), která odhalila pouze znovu doplnění cysty. K tomuto stavu došlo pravděpodobně ze dvou důvodů. První byl nepříznivé uložení cysty, druhý pak vlastní drenáž, kterou jsme založili z dolní strany jater a tím pádem mohlo dojít k jejímu útlaku. Proto jsme provedli 6. pooperační den laparoskopickou revizi s drenáží Penrouse drénem a rozsáhlejší fenestrací. Histologický nálezu odpovídal získané cystě reprezentující retenční cystu žlučového ductulu.

7. pooperační den byla doplněna ještě endoskopická retrográdní cholangio-pankreatikografie s papilosfinkterotomií (ERCP s PST) s normálním nálezem na žlučových i pankreatických cestách. Stav nemocné se normalizoval, pouze přetrvávala žlučová sekrece drénem, 100 – 300 ml/den.

Pro přetrvávání žlučové sekrece při normálním nálezem na ERCP jsme 10.4.05 provedli parciální resekci cysty s ošetřením zbytku Argonovou koagulací a plombáží omentem s drenáží Penrouse drénem. Již v této době jsme zvažovali pravostrannou hepatektomii, ale vzhledem k úzkému vztahu cysty k dolní duté žíle, portální žíle a možnosti per- i pooperačních komplikací, jsme provedli výkon menšího rozsahu. Tentokrát byl z preparátu histologicky popsán poměrně vzácný tumor, který měl jednak mucinózní epitel, identický s cervikálním epitelem a dále stroma, které bylo identické s ovariálním stromatem. Jednalo se o tzv. cystadenom s ovariálním stromatem. Jeho struktura byla popsána v tomto případě jako zcela benigní. 22.4.05 byla nemocná propouštěna v dobrém stavu, bez elevace jaterních testů či známek zánětu. Drén jsme odstranili 10 dnů po propuštění. Vzhledem k histologickému nálezem zde hrozilo reálné riziko rozvoje možné recidivy, proto jsme nemocnou kontrolovali pravidelně po 3 měsících pomocí USG a CT. V místě původní cysty byl popisován na kontrolních vyšetřeních laločnatý útvar tvořený omentem, který se více jak rok neměnil. 24.8.06 byla popsána na CT jater recidiva cystadenomu v jaterním hilu velikosti 59x48x48 mm. Žlučové cesty nebyly dilatované, nemocná byla stále bez obtíží s normálním laboratorním nálezem.

5.10.06 jsme nemocnou opět přijali se známkami obstrukce žlučových cest a známkami akutní cholangitidy. Důvodem byla další progresse cystadenomu, který opět utlačoval žlučové cesty. Po nasazení ATB a krátkodobé přípravě jsme nemocné provedli 9.10.06 pravostrannou hepatektomii. Jednalo se o komplikovaný výkon pro velmi intimní vztah cystadenomu k DDŽ a jaternímu hilu. Vlastní histologický nálezu popsal benigní mucinózní cystadenom s ovariálním stromatem. Známky maligní transformace nebyly nalezeny. Útvar byl obklopen tenkou tukovou tkání a nedosahoval do resekčního okraje. 9. pooperační den došlo k rozvoji subfrenického abscesu, který byl řešen nejprve drenáží pod CT kontrolou. Následně bylo třeba přistoupit k chirurgické revizi, a to 12. pooperační den, neboť drenáž pod CT nebyla dostatečná. 20. pooperační den bylo na kontrolním CT již jen malé reziduum po abscesu. Nově byla diagnostikována trombóza v. portae a v. mesenterica superior. Tento stav jsme řešili podáváním léčebných dávek nízkomolekulárního heparinu. V pooperačním období jsme provedli celkem 3x evakuace pravostranného fluidothoraxu, který se tvořil jako reaktivní při subfrenickém abscesu.

11.12.06 byla nemocná opět hospitalizována pro recidivu subfrenického abscesu, který se již podařilo vyřešit drenáží pod CT kontrolou a podáním ATB. Na CT byla patrná částečně rekanalizovaná vena portae. Opět jsme byli nuceni provést 3x evakuaci pravostranného fluidothoraxu. 22.12.06 byla nemocná propuštěna do domácího ošetřování, převedena na Warfarin. Warfarin byl podáván po dobu 6 měsíců, na kontrolním USG již byla zcela rekanalizovaná vena portae, vena mesenterica superior byla bez známek trombózy. Při poslední kontrole 21.11.07 byla nemocná zcela bez potíží, v dobré fyzické kondici s normálními hodnotami jaterních testů, bez známek recidivy cystadenomu.

Diskuze

Cystadenom jater s ovariálním stromatem byl poprvé popsán Wheelerem a Edmondsonem v roce 1985. /5/. Vyskytuje se téměř výhradně u žen ve středním věku a vzniká nejspíše na hormonálním pozadí. Tvoří méně jak 5% z cystických lézí jater. Patogeneze cystadenomu není zcela objasněna. Prováděná vyšetření nasvědčují tomu, že tento typ nádoru, který se vyskytuje v játrech a pankreatu, vychází ze stejných epiteliálních buněk jako gonády embrya, které jsou v této lokalizaci před sestupem do pánve /6/. Zajímavým faktem je, že velmi podobný nádor s ovariálním stromatem se vyskytuje u perimenopauzálních žen v ledvinách, kde je označován jako smíšený epiteliální a stromální tumor ledviny. V převážné většině případů je benigní /7/.

Poměrně obtížná je předoperační diagnostika cystadenomu. Ve vysokém procentu je diagnóza stanovena až z histologického preparátu. V našem případě pro ní nesvědčilo ani histologické vyšetření po fenestraci jaterní cisty, kdy byl ze stěny odebrán dvakrát vzorek. Až teprve třetí histologické vyšetření popsalo cystadenom s ovariálním stromatem. Je pravděpodobné, že vzorky odebrané při laparoskopii byly malé a vlastní cystadenom nepostihoval celou stěnu cystického útvaru. Běžně používaná vyšetření jako USG a CT prokazují většinou v játrech pouze cystické útvary, které mohou být ve srovnání s prostou jaterní cystou multilokulární. Při takovém nálezu je na cystadenom nutné pomýšlet. Může se však rovněž jednat o maligní biliární cystické tumory, které komunikují se žlučovým stromem, typu cystadenokarcinomu /8/. Pokud je však cystický útvar bez sept je odlišen obtížně. Ani samotná magnetická rezonance (MR) není schopna tento nádor odlišit /9/. V literatuře je popisováno, že MR s kontrastem v kombinaci s MRCP má poměrně dobré výsledky a je možné se podle těchto vyšetření řídit /10/. V našem případě však tato vyšetření průkazná nebyla. Laboratorní vyšetření nám kromě známek cholestázy a akutní cholangitidy v diferenciální diagnostice rovněž nápomocná nebyla. Z nádorových markerů je v souvislosti s cystadenomem či cystadenokarcinomu zmiňován CA 19-9, jehož hladina bývá zvýšena, a pomocí kterého se monitoruje případná recidiva /11,12/. V našem případě byla hladina CA 19-9 v normě.

Klinicky se cystadenom většinou projeví tupou bolestí v pravém podžebří, nebo může způsobit ikterus či akutní cholangitidu, jak tomu bylo i v našem zmíněném případě. Může být také asymptomatický a diagnostikuje se při vyšetření jater, které bylo indikováno z jiného důvodu.

Léčba cystadenomu je kauzální. Vzhledem k tomu, že určité procento cystadenomů je zatíženo maligním zvratem v cystadenokarcinom, je indikována resekční léčba se snahou odstranit nádor kompletně. Rozsah resekce závisí na uložení a velikosti. Jedná se o výkony od neanatomické resekce až po rozšířenou hepatektomii /11,13/. U centrálně uložených tumorů, je možné použít prostou enukleaci. Zde je však v případě cystadenokarcinomu radikalita sporná a prognóza nemocných bývá špatná. Pokud je u cystadenomu provedena pouze punkce, fenestrace či parciální resekce je velmi pravděpodobná recidiva nádoru /11/. Tak tomu bylo i u naší nemocné. Po parciální resekci, ošetření zbytku cisty Argonovou koagulací a plombáží omentem se zdál stav během jednoho roku stacionární a vyřešený. K recidivě došlo po 15 měsících. Provedená pravostranná hepatektomie se neobešla bez komplikací. Trombózu portální žíly, která je popisována hlavně po transplantaci jater s incidencí 1-2% u dospělých, kdy vede většinou ke ztrátě štěpu a úmrtí nemocného /14/, jsme zaznamenali za posledních 10 let na naší klinice po resekci jater pouze v tomto ojedinělém případě. Proč k této komplikaci došlo nebylo vůbec jasné. Během výkonu jsme sice použili intermitentně uzavření průtoku hepatoduodenálním ligamentem, ale čas po který byl průtok uzavřen, se nikterak nelišil od běžné klampáže u rozsáhlejších resekčních výkonů na játrech. Svoji roli mohl také sehrát subfrenický absces, který se vytvořil v pooperačním období v místě resekční plochy. Trombózu v. portae se podařilo zvládnout podáváním nízkomolekulárního heparinu s následným převedením nemocné na Warfarin. Recidivující subfrenický absces s reaktivním pleurálním výpotkem je po opakovaných resekcích jater komplikací častější. Tento stav byl řešen standardním způsobem pomocí ATB a drenáže a rovněž se podařilo zvládnout.

Po odstranění cystadenomu jsou nemocní kontrolováni pomocí USG jater za 3 měsíce po výkonu a dále za 9, 15 a 24 měsíců. V nejasných případech je indikována kontrola s CT či MR vyšetřením. Přínosem může být ve stejné periodě jako jsou grafická vyšetření stanovit CA 19-9.

Závěr

Cystadenom jater s ovariálním stromatem je vzácné onemocnění jater s obtížnou předoperační diagnostikou. Pokud je parciálně resekován nemusí být zcela průkazné ani histologické vyšetření. Při léčbě cystadenomu je důležité jeho kompletní odstranění, jinak je možná recidiva onemocnění a malignizace rezidua tumoru.

Literatura:

1. Skalický T, Třeška V, Šnajdauf J, a kol. Chirurgie jater. 2004. Praha-Maxdorf
2. Murakami Y, Uemura K, Morifuji M, Hayashidani Y, Sudo T, Sueda T. Mucinous cystic neoplasm of the pancreas with ovarian-type stroma arising in the head of the pancreas: case report and review of the literature. *Dig Dis Sci.* 2006 Mar;51(3):629-32.
3. Mardi K, Sharma J, Mahajan P. Mucinous cystadenoma of the renal pelvis with malignant transformation: a case report. *Indian J Pathol Microbiol.* 2006 Oct;49(4):595-6.
4. Gourley WK, Kumar D, Bouton MS, Fish JC, Nealon W: Cystadenoma and cystadenocarcinoma with mesenchymal stroma of the liver. Immunohistochemical analysis. *Arch Pathol Lab Med* 1992, 116, 1047-1050.
5. Wheeler DA, Edmondson HA. Cystadenoma with mesenchymal stroma (CMS) in the liver and bile ducts. A clinicopathologic study of 17 cases, 4 with malignant change. *Cancer.* 1985 Sep 15;56(6):1434-45.
6. Erdogan D, Lamers WH, Offerhaus GJ, Busch OR, Gouma DJ, van Gulik TM. Cystadenomas with ovarian stroma in liver and pancreas: an evolving concept. *Dig Surg.* 2006;23(3):186-91. Epub 2006 Jul 11.
7. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA: WHO Classification of tumours. Tumours of the urinary system and male genital organs. Pathology and genetics. IARC Press, Lyon, 2004,359str.
8. Zen Y, Fujii T, Itatsu K, Nakamura K, Konishi F, Masuda S, Mitsui T, Asada Y, Miura S, Miyayama S, Uehara T, Katsuyama T, Ohta T, Minato H, Nakanuma Y. Biliary cystic tumors with bile duct communication: a cystic variant of intraductal papillary neoplasm of the bile duct. *Mod Pathol.* 2006 Sep;19(9):1243-54. Epub 2006 Jun 2.
9. Baudin G, Novellas S, Buratti MS, Saint-Paul MC, Chevallier P, Gugenheim J, Bruneton JN. Atypical MRI features of a biliary cystadenoma revealed by jaundice. *Clin Imaging.* 2006 Nov-Dec;30(6):413-5.
10. Lewin M, Mourra N, Honigman I, Fléjou JF, Parc R, Arrivé L, Tubiana JM. Assessment of MRI and MRCP in diagnosis of biliary cystadenoma and cystadenocarcinoma. *Eur Radiol.* 2006 Feb;16(2):407-13. Epub 2005 Jun 28.
11. Beuran M, Venter MD, Dumitru L. Large mucinous biliary cystadenoma with "ovarian-like" stroma: a case report. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 21;12(23):3779-81.
12. Ramírez Plaza CP, Ruiz López M, Santoyo Santoyo J, Iaria M, Suárez Muñoz MA, Jiménez Hernández M, Pérez Daga JA, Fernández Aguilar JL, Bondía Navarro JA, de la Fuente Perucho A. Biliary cystadenoma with mesenchymal stroma "ovarian-like" and high levels of CA19.9 *Rev Esp Enferm Dig.* 2004 Aug;96(8):588-9.
13. Yamashita K, Shinozaki K, Kunitake N, Matsumoto S, Matsuura H, Nakashima A. Cystadenoma of the liver with ovarian-like stroma: case report. *Abdom Imaging.* 2005 Nov-Dec;30(6):741-3. Epub 2005 Oct 26.
14. Gladysz-Polak A, Polak WG, Jazwiec P, Chudoba PJ, Halon A, Patrzalek D, Szyber P. Favorable resolution of hepatic infarctions in transplanted liver after portal vein thrombosis treated by surgical thrombectomy: a case report. *Transplant Proc.* 2006 Nov;38(9):3135-7.

Článek odeslaný do časopisu *Clinical and experimental metastasis* 2/08.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in correlation to proliferative and classical tumor markers during surgical therapy of colorectal liver metastases

Liska V.¹, Sutnar A.¹, Holubec L. jr.^{2,3}, Vrzalova J.³, Treska V.¹, Skalicky T.¹, Pesta M.³, Kormunda S.³, Finek J.², Rousarova M.² and Topolcan O.³

¹Department of Surgery, University Hospital Pilsen, Charles University Prague¹

²Department of Oncology University Hospital Pilsen, Charles University Prague²

³Central Isotopic Laboratory, University Hospital Pilsen, Charles University Prague³

Key words: Tumour markers, Liver surgery, Behavior of tumor markers, CA19-9, CEA, TPA, TPS, TK, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, Liver resection, Radiofrequency ablation, Prognostic factors, Colorectal liver metastases, Early recurrence, Benign liver diseases.

Abstract

Introduction

Classical and proliferative tumor markers and matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors reflect the features of malignancy and are useful in prediction of prognosis of patients with colorectal liver metastases. There is very less information about their physiological functions during regeneration and healing of liver parenchyma after any type of liver surgery for malignancy.

Patient and methods

In the presented study were included patients, who were operated at the Department of Surgery, University Hospital Pilsen, Charles University Prague between 11/2002 and 12/2004 and underwent following surgical procedures for CLM, benign liver lesions and inguinal hernias: Group A: 22 patients with inguinal hernias, Group B: 26 patients with benign liver lesions, Group C: 30 patients with colorectal liver metastases (CLM) who were treated by radiofrequency ablation, Group D: 41 patients with CLM who underwent radical surgical therapy – resection, and Group E: 22 patients with inoperable CLM who underwent explorative laparotomy without any surgical procedure.

Results

The preoperative and postoperative serum levels of CEA, CA19-9, TK, TPA, TPS, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 were statistically analyzed and compared in the groups given to estimate the influence of a surgical procedure type. These results reflect influence of surgical procedure types at serum levels of studied tumor markers during an operation. The authors tried to negate the influence of physiological activity of these tumor markers, which is supposed from their pleiotropic functions at regeneration and remodeling of healing tissues.

Conclusions:

It was first described by using these types of comparison with all metalloproteinases, their inhibitors, and proliferative and classical tumor markers. It could help us to estimate critical relation of these tumor markers for prognoses of disease free survival or overall survival of patients after a surgical procedure for CLM.

Introduction

Colorectal liver metastases (CLM) are the main secondary malignancy of liver, which liver surgery is focused on today (1). The main problem is not an operative technique or preoperative detection of malignant lesions but preoperative judgment of planned operative procedure with regard to patients' benefit, which is described by disease free survival, survival rate and quality of life (2,3). These parameters are confronted with all accessible treatment strategies: surgical vs. oncological, radical vs. palliative vs. symptomatic. The remaining and still open question with each preoperatively discussed patient is an early recurrence which could shorten all the named parameters and so move our patients, with regard to their benefit, from radical operation to palliative therapy. The all underwent surgical procedures with their complications, duration of hospital stay and followed rehabilitation, morbidity and mortality have in the case of early recurrence very poor benefit! The question for today says: Is there any possibility to predict early recurrence with high accuracy?

Classical and proliferative tumor markers and matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors reflect the features of malignancy and are useful in prediction of prognosis of patients with colorectal liver metastases (4). There is very less information about their physiological functions during regeneration and healing of liver parenchyma after any type of liver surgery for malignancy. The aim of study was to analyze the preoperative and postoperative serum levels of CEA, CA19-9, TK, TPA, TPS, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 and to analyze influence of surgical procedure types at serum levels of studied tumor markers during an operation. The authors aimed at studying the relation between tumor markers (MMP, TIMP, classical and proliferative tumor markers) and prediction of recurrence and survival rate after a liver surgery for CLM.

Material and Methods

The presented study included patients who were operated at the Department of Surgery, University Hospital Pilsen, Charles University Prague between 11/2002 and 12/2004 and underwent following surgical procedures for CLM, benign liver lesions, and inguinal hernias.

The patients were divided into four groups for statistical analyses as follows:

Group A: patients with inguinal hernias who were treated with classical hernioplasty with usage of their own tissues without opening abdominal cavity (laparotomy or laparoscopy), without usage of mesh – prolene or goretex, and without any complication. The patients included into this group did not suffer from malignant or degenerative diseases in anamnesis. They had also no extensive polymorbidity including liver diseases and no inflammatory diseases six month before the operation. This group was designed as manifestation of physiological function and expression of studied tumor markers under primary healing of a wound. 22 patients (11 men and 11 women) were included with the mean age of 56 years (range 16-78 years).

Group B: patients with benign liver lesions (cysts, focal nodular hyperplasia, hemangiomas, adenomas, etc.). This group had 26 patients (8 men and 18 women) with the mean age of 54 years (range 33-83 years). The performed surgical procedures involved enucleation of lesion, fenestration of cysts, resection of maximally four segments).

Group C: 30 patients (22 men and 8 women) with CLM who were treated by radiofrequency ablation (RFA) with the mean age of 64 years (range 48-78 years).

Group D: 41 (29 men and 12 women) patients with CLM who underwent radical surgical therapy - resection. The mean age in this group was 61 years (range 45-82 years).

Group E 22 patients (10 men and 12 women) with inoperable CLM, those who underwent explorative laparotomy without any surgical procedure. The average age in this group was 63 years (range 29-85 years).

The serum samples were obtained before (maximally 14 days before) and after operation (maximally 14 days after). The performed surgical therapy was absolutely independent on the cohort membership – the patients with CLM were put in study groups retrospectively.

All the blood samples for assessment of tumor markers, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors were taken under standard conditions from the cubital vein during the morning hours. The serum for assessment of routine tumor markers acquired through centrifugation was stored until laboratory analysis at the temperature of -20°C . The serum for assessment of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors acquired through centrifugation was stored until laboratory analysis at the temperature of -75°C . Tumor markers were assessed at the Dept. of Nuclear

Medicine, Faculty Hospital Pilsen with commercial laboratory kits, in accordance with the manufacturers' recommendations. The following tumor markers were assessed: carcinoembryonic antigen (CEA- ng/mL, IRMA, Immunotech, CR), carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9- IU/L, Shering-CIS France), cytokeratines: tissue specific polypeptide antigen (TPS- kIU/L, IRMA, IDL Sweden), tissue polypeptide antigen (TPA-kIU/L, IRMA, DiaSorin, Italy). Thymidine kinase (TK- IU/L) was measured by radioenzymo analyses (REA) using Immunotech (Prague) assay kits. Matrix metalloproteinases (MMP-2- ng/mL, MMP-9-ng/mL) and their tissue inhibitors (TIMP-1- ng/mL, TIMP-2-ng/mL) were assessed by ELISA methods (Chemicon- Millipore, USA). Serum levels of tumor markers were correlated with clinical diagnoses of the patients.

Statistical analysis was performed with usage of statistical software CRAN. The statistical description parameters were used: mean, median, standard deviation, interquartile interval, minimum value, and maximum values. Non-parametrical Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests were disposed for statistical comparison of distribution of particular parameters in the studied groups with regard to distribution of these values.

Results

Basic descriptive statistic of studied tumor markers for particular subgroups is presented in table I-V. The **group A** was used as a control group – patients with the inguinal hernias. The optimal value of normal serum levels was taken as the 95th percentile of particular serum level values (see table I). With all the following groups there were, in comparison with the group A, changes of serum levels recorded and they were evoked either by a diseases or a surgical procedure.

Group B The comparison of the control group (A) with the group of benign liver lesions demonstrated differences of preoperative serum levels of MMP-2 and -9 and TIMP-2 (p-value<0.016, 0.0002, 0.0001 respectively) and postoperative serum levels of TPS, TK, MMP-2 and TIMP-2 (p-value<0.018, 0.0012, 0.013 and 0.0001 respectively) as statistically significant.

Group C The comparison of the control group with the group of patients who underwent a radiofrequency ablation of CLM displayed differences of preoperative serum levels of TPA, TPS, MMP-2, TIMP-2, CEA and CA19-9 (p-value<0.0018, 0.0246, 0.007, 0.001, 0.001 and 0.0219 respectively) and postoperative serum levels of TK, TPA, TPS, TIMP-1 and -2, CEA and CA19-9 (p-value<0.0082, 0.0018, 0.0001, 0.002, 0.001 a 0.001, 0.0007 respectively) as statistically significant.

Group D The comparison of the control group with the group of patients who underwent a radical surgical procedure for CLM demonstrated differences of preoperative serum levels of TPA, TPS, MMP-2 and -9, TIMP-1 and -2, CEA and CA19-9 (p-value<0.0007, 0.0007, 0.02, 0.003, 0.04, 0.001, 0.001 and 0.0012 respectively) and postoperative serum levels of TK, TPA, TPS, MMP-9, TIMP-1 and -2, CEA and CA19-9 (p-value<0.0001, 0.0014, 0.0001, 0.001, 0.003, 0.001, 0.001 and 0.008 respectively) as statistically significant.

Group E The comparison of the control group with the group of patients who underwent an explorative laparotomy for inoperable CLM showed differences of preoperative serum levels of TK, TPA, TPS, MMP-2 and -9, TIMP-1 and -2, CEA and CA19-9 (p-value<0.0032, 0.0001, 0.0001, 0.004, 0.007, 0.0007, 0.001, 0.0011 and 0.0001 respectively) and postoperative serum levels of TK, TPA, TPS, MMP-2, TIMP-1 and -2, CEA and CA19-9 (p-value<0.0119, 0.0016, 0.0052, 0.008, 0.0003, 0.0002, 0.0008 and 0.0001 respectively) as statistically significant.

Discussion

Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) have been implicated not only in tumor invasion but also in tissue remodeling, especially in extracellular matrix rebuilding and in regeneration processes and inflammatory responses (5). The levels of MMPs and TIMPs have been also proved to be correlated with tumor aggressiveness and progression (6,7,8). The activity of MMP-2 and -9 and TIMP-1 is overexpressed in tumor mass of colorectal cancer contrary to surrounding healthy colon tissue (9). Contrary TIMP-2 levels are controversial. Baker detected significantly higher levels in normal colon tissue whereas Murashige did not (9,10). The upregulated levels of MMPs and TIMPs also correlate with aggressivity or recurrence in metastatic process of colorectal cancer, especially in colorectal liver metastases (CLM) (11,12). Elevation of MMP-9 is connected with invasiveness of colorectal cancer. Successive increase of tissue expression of MMP-

2, -7 and -9 relates with increase of malignancy – from mucous lesions and adenomas to carcinomas (13).

MMP-2 and -9 have been shown to be overexpressed by the stroma surrounding the tumor (14,15). This could be explication of malignancy invasiveness mechanism. The same mechanism of extracellular matrix (basement membrane) degradation occurs at initiation of angiogenesis, which is crucial for growth of tumor mass (13).

Expression of TIMP-1 is connected with invasiveness or extension of colorectal cancer (16, 17). TIMP-1 is produced by fibroblast-like cells in the invading cancer. The tumor surrounding mucosa is almost without production of TIMP-1. TIMP-1 is not secreted by benign or malignant cells, cells of vessels and muscle cells (16). MMPs reflect not only the penetration of malignancy to surrounding healthy tissue through the increased destruction of matrix and new synthesis of tumor stroma, but also influence the tumor growth secondary by releasing of cytokines (transforming growth factor alpha and Insulin like growth factor – II) bound in extracellular matrix in an inactive form and activated just through the releasing (18). MMPs participate in other processes influencing primary tumor growth, angiogenesis and invasion, intra- and extravasation of metastatical cells and growth of metastatic process (19). The synchronous determination of the levels of MMP-9 in portal and peripheral blood is useful for selecting colorectal cancer patients at high risk of hepatic recurrence (20). TIMP-1 and -2 and MMP-2 were detected during tissue regeneration in rats while MMP-3,-9, -10, -13 and -14 were not (21).

The role of classical tumor markers is generally accepted in prediction of relapse or survival rate of patients after liver surgery for colorectal cancer (22,23). The serum levels of proliferative tumor markers (TPS, TPA, TK) have been used as good prognostic factors for stating tumor aggressivity and recurrence of CLM after a liver surgery. Their relation to survival rate is more unsure (24,25).

The authors aimed at studying the relation between tumor markers (MMP, TIMP, classical and proliferative tumor markers) and prediction of recurrence and survival rate after a liver surgery for CLM. The behavior of particular tumor markers was observed in benign liver lesions during the surgical treatment and in healthy patients without any malignancy or complicated comorbidity undergoing classical hernioplasty for groin hernias without abdominal cavity affecting. The comparison of separate tumor markers in the groups of patients studied and the relations among them should clear up their role in recurrence and mechanism of tumor progression. The aim was not to study each tumor marker individually but in relation to other tumor markers, especially with their other supposed functions and mechanism of behavior. Last but not least, the factor taken into account in this study was to study all these named tumor markers in the same patients and so uncover their relation in each patient. Only CLM patients were enrolled into this study for elimination of influence of diverse malignant diseases (primary or secondary) with different behavior.

Group A The assessed serum levels of studied tumor markers in the control group A were used for analyses of other groups of patients with benign or malignant liver diseases. The own surgical procedure (incisional groin hernia repair) had to serve as the physiological background of normal wound healing. We studied the influence of serum levels of studied tumor markers to differentiate the changes during other more extensive surgical procedures in liver parenchyma. Some elevations or declines in serum levels of studied markers during the operation in the group A were interpreted through pleiotropic function of the given tumor markers during the first period of wound healing and regeneration of non-liver tissues.

Group B The differences of preoperative and postoperative changes between the group of benign liver lesions and the control group could be explained by the own activity of tissue of benign lesions, which could show some features of precanceroses and sometimes there could be malignant inversion (liver adenomas) or increased proliferative activity (focal nodular hyperplasia) detected. The influence of large active surface of endothelium in hemangiomas, especially cavernomatous, is also worth considering. The differences between the groups A and B are uncomparable with increases recorded in the groups with liver malignancy. In case of benign liver diseases we could also hypothesize about the influence of activity of liver parenchyma on the immediate surroundings of benign lesion. This could be influenced by insufficient biliary drainage and underlying ischemia in consequence of pressure by the benign lesion (cystis, hemangioma). This could contribute to tissue remodeling or changes in functions and elevation of given tumor markers in comparison with the control group. These first two discussed groups (A and B) served as essential groups to eliminate the

influence of changes of serum levels during surgical procedures which reflects the physiological function of metalloproteinases, their inhibitors and other studied tumor markers. These differences in test grave our hypothesis that also at benign liver lesions serum levels of studied tumor markers could be also regulated up.

Group C The statistical analysis of the studied tumor markers with the group C (radiofrequency of CLM) brought were valuable results. These were influenced by retained destructed tumor tissue, which could release tumor markers in blood circulation not only during its thermic destruction but also in the postoperative period during remodeling of this destructed lesion and creation of scars. Almost unchanged serum level of CEA is crucial for this hypothesis. In studied metalloproteinases, their inhibitors and proliferative tumor markers there is absolute elevation of their serum levels in postoperative period detected. This could be explained by their releasing from tissue depots or by fibrogenesis and proliferation in scaring lesion and their immediate surroundings.

Group D The classical tumor markers reacted upon elimination of malignant lesion by marked decrease of their serum levels. This confirms the relation of classical tumor markers to the volume of tumor mass. The metalloproteinases and their inhibitors or proliferative tumor markers, which reflect aggressivity, invasiveness and advanced stage of CLM, were elevated after a radical liver surgery (24). In case of resection, we could also hypothesize the persisting activity of the given tumor markers in serum. We could not exclude either participation of these tumor markers in regeneration and remodeling of liver parenchyma after resection as a reaction on changes in functional reserves of remnant liver parenchyma. The liver parenchyma in the immediate surrounding of resection surface could also increase expression of these tumor markers as a reflection of its remodeling because of change in its blood supply and biliary drainage.

Group E Most of the studied tumor markers continue in the same expression of their serum activity after explorative laparotomy for inoperable CLM. This could be explained by minimal influence of performed laparotomy, which is a standard component of other surgical procedures (RFA, liver resections). We could confirm that changes in groups C and D resulted, due to surgical procedure, in liver parenchyma. The group of patients with performed explorative laparotomy serves us as another comparative group, this time with tumor without any intervention in this mass (25).

These results reflect the influence of a type of surgical procedure at serum levels of studied tumor markers during operation. The authors tried to negate the influence of physiological activity of these tumor markers, which is supposed from their pleiotropic functions at regeneration and remodeling of healing tissues. It was first described by using comparison of all metalloproteinases, their inhibitors, proliferative and classical tumor markers. It could help us to find critical relation of these tumor markers for prognosis of disease free survival or overall survival of patients after surgical procedure for CLM.

Acknowledgment:

This article was supported by VZ MSM 0021620819.

Literature:

1. Shah SA, Bromberg R, Coates A, Rempel E, Simunovic M, Gallinger S. Survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma in a large population. *J Am Coll Surg.* 2007 Nov;205(5):676-83. Epub 2007 Sep 14.
2. Benson AB. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm.* 2007 Aug;13(6 Suppl C):S5-18.
3. Pawlik TM, Schulick RD, Choti MA. Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. *Oncologist.* 2008 Jan;13(1):51-64.
4. Sutnar A, Pesta M, Liska V, Treska V, Skalicky T, Kormunda S, Topolcan O, Cerny R, Holubec L Jr. Clinical relevance of the expression of mRNA of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and CEA tissue samples from colorectal liver metastases. *Tumour Biol.* 2007;28(5):247-52.
5. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eurepean Journal of Cancer* 2000, 36: 1621-1630.
6. Curran S, Murray, GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastases. *J. Pathol.* 1999, 189: 300-308.
7. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinases-9. *J Clin oncol* 1996, 14: 3133-3140.

8. Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinases expression between primary tumours with or without liver metastases in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002, 80: 105-110.
9. Baker EA, Bergin FG and Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg*. 2000, 87(9):1215-1221.
10. Murashige M, Miyakara M, Shiraishu N, Saito T, Kohno K, Kobayashi M. Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colon tumours. *Jpn J Clin Oncol* 1996, 26: 303-309.
11. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW. Biology of colorectal liver metastases: A review. *Journal of Surgical Oncology* 2006; 94: 64-80.
12. Yukawa N, Yoshikawa T, Akaike M, Sugimasa M, Takemiya S, Yanoma S, Noguchi Y, Takanashi Y. Plasma concentration of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with colorectal cancer. *British Journal of Surgery* 2001, 88: 1596-1601.
13. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Annals of Surgery* 2001, 233: 786-792.
14. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993, 142: 273-282.
15. Wagenaar-Miller R, Gorden L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: Is it worth talking about? *Cancer and Metastatic Reviews* 2004, 23: 119-135.
16. Holten-Andersen MN, Stephens RW, Nielsen HJ, Murphy G, Christensen IJ, Stetler-Stevenson W, Brunner N. High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Nov;6(11):4292-9.
17. Ishida H, Murata N, Hayashi Y, Tada M, Hashimoto D. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in colorectal cancer patients. *Surg Today* 2003, 33:885-892.
18. Chau I, Rigg A, Cunningham D. Matrix metalloproteinases inhibitors – an emphasis on gastrointestinal malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003, 45: 151-176.
19. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of their role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 1260-1270.
20. Ishida H, Murata N, Tada M, Okada M, Hashimoto D, Kubota D, Shirakawa K, Wakasugi H. Determining the levels of matrix metalloproteinases-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastases of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003, 33:186-191.
21. Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol*. 2000, 113: 443-453.
22. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003, 39: 718-27.
23. Kijima M, Togo S, Ichikawa Y, Miura M, Yamagishi S, Matsuo K, Tanaka K, Masui H, Ishikawa T, Ike H, Shimada H. Clinical significance of serum CEA protein and CEA mRNA after resection of colorectal liver metastases. *Anticancer Res*. 2005, 25: 1327-32.
24. Liska V, Holubec L jr, Treska V, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Finek J, Rousarova M, and Topolcan O. Dynamics of serum levels of tumour markers and prognosis of recurrence and survival after liver surgery for colorectal liver metastases. *Anticancer Res*. 2007 Jul-Aug;27(4C):2861-4.
25. Liska V, Holubec L jr, Treska V, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Finek J, Topolcan O. Are tumor markers useful for prediction of survival rate after explorative laparotomy for liver malignancies. *Anticancer Res*. 2007 Jul-Aug;27(4A):1887-91.

Table 1. Basic descriptive statistics: control group A (patients with inguinal hernias, n=22)

Marker	Control group A- inguinal hernias, n=22			
	preoperative	Preoperative	postoperative	Postoperative
	median	min.- max.	Median	Min.- max.
CEA (ng/mL)	0.65	0.1 – 5.5	0.65	0.1 – 4.7
CA19-9 (IU/L)	6.75	0.8 – 51.2	6.25	0.8 – 48.4
TPS (kIU/L)	42.5	0 – 283	36	0 – 283
TPA (kIU/L)	31.5	0 – 234	29.5	0 – 145
TK (IU/L)	5.45	2.3 – 26.9	4.6	1.7 – 17.2
MMP-2 (ng/mL)	398.7	293 – 669	388	264.3 – 640
MMP-9 (ng/mL)	74.7	18 – 270.8	137.4	97 - 383.1
TIMP-1 (ng/mL)	109,05	65.6 – 225.5	116.5	66.8 - 233.7
TIMP-2 (ng/mL)	18.9	16.2 – 113.2	18.5	15.9 - 94.1

Table 2. Basic descriptive statistics: group B (patients with benign liver lesions, n=26)

Marker	Group B- benign liver lesions, n=26			
	preoperative	preoperative	postoperative	postoperative
	median	min.- max.	median	min.- max.
CEA (ng/mL)	1.05	0.3 – 1124	0.7	0.2 - 389.9
CA19-9 (IU/L)	9.85	0.8 - 34.5	11.2	0.8 – 249
TPS (kIU/L)	34	10 – 261	66	10 – 225
TPA (kIU/L)	16	10 – 101	44.5	10.1 – 91
TK (IU/L)	6	3.1 – 30	12	1.8 - 97.3
MMP-2 (ng/mL)	481	288 - 938	476	231 – 860
MMP-9 (ng/mL)	160.75	45.8 - 457	174.9	28.6 - 591.2
TIMP-1 (ng/mL)	106	59.5 - 195.2	126.9	82.4 - 371.1
TIMP-2 (ng/mL)	41.85	22.1 - 81	42.6	20 - 78.5

Table 3. Basic descriptive statistics: group C (patients with colorectal liver metastases /CLM/ who were treated by radiofrequency ablation /RFA/, n=30)

Marker	Group C: CLM- RFA, n=30			
	Preoperative	postoperative	preoperative	Postoperative
	Median	min.- max.	median	Min.- max.
CEA	19.5	1.0 - 3070	13.75	0.4 – 3586
CA19-9	15.15	0.80 - 1869	20.25	0.80 – 1869
TPS	62.5	10 - 453	143	13 – 476
TPA	70	10 - 220	96	10 – 430
TK	7.4	2.3 - 34.1	8.7	1.4 – 42
MMP-2	506	267 - 759	447.5	56.9 – 4000
MMP-9	101.15	38.6 - 379.2	106.65	36.7 – 600
TIMP-1	111.55	72.2 - 344.4	167.7	87.2 - 319.4
TIMP-2	34.95	20.3 - 67.6	31.5	20 - 81.2

Table 4. Basic descriptive statistics: group D (patients with colorectal liver metastases /CLM/ who underwent radical surgical resection, n=41)

Marker	Group D: CLM- liver resections, n=41			
	Preoperative	preoperative	postoperative	Postoperative
	Median	min.- max.	median	Min.- max.
CEA	23.4	0.3 - 44528	4.5	0.2 – 327
CA19-9	19	0.8 - 6985	32.8	0.8 – 445
TPS	91	10.1 - 6641	98	10.1 – 2372
TPA	99.5	10.1 - 2087	84	10.1 – 2069
TK	6.4	3 - 14.2	10.4	4.2 – 67
MMP-2	473	287 - 1000	501	284 – 1694
MMP-9	120	30.1 - 397.4	119.7	36.7 – 266
TIMP-1	134.5	73.8 - 498.1	165.2	63.7 - 314.5
TIMP-2	28.3	17.2 - 83	28.7	18.9 – 83

Table 5. Basic descriptive statistics: group E (patients with inoperable colorectal liver metastases /CLM/, who underwent explorative laparotomy, n=22)

Marker	Group E: CLM- explorative laparotomy, n=22			
	Preoperative	preoperative	postoperative	Postoperative
	median	min.- max.	median	min.- max.
CEA	12.85	0.4 - 7722	33.9	0.5 – 5431
CA19-9	112.25	3.5 - 20949	124.8	10 – 18953
TPS	380	17 - 4973	326.5	29 – 1629
TPA	281	10 - 1710	266.5	45 – 527
TK	9.35	3.9 - 278	10.15	4.7 - 406.7
MMP-2	534	290 - 690	542	258 – 658
MMP-9	120.8	45.4 - 278.5	132	61.8 - 233.8
TIMP-1	169.5	82.8 - 275.9	206.4	133 - 277.6
TIMP-2	44.05	29.8 - 74.8	52.3	30.6 - 68.3