

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

MUDr. Jarmil Šafránek

VYUŽITÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ V
POOPERAČNÍ PROGNÓZE
NEMALOBUNĚČNÉHO KARCINOMU
PLIC.

Disertační práce

chirurgická klinika LF UK v Plzni

2008

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



MUDr. Jarmil Šafránek

VYUŽITÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ V
POOPERAČNÍ PROGNÓZE
NEMALOBUNĚČNÉHO KARCINOMU
PLIC.

USE OF TUMOR MARKERS IN POSTOPERATIVE PROGNOSIS OF NON-SMALL-
CELL LUNG CANCER

chirurgická klinika LF UK v Plzni

2008

Poděkování

Rád bych poděkoval všem osobám, bez jejichž přispění by tato práce nemohla vzniknout :

Svému přednostovi **Prof. MUDr. V. Třeškovi, DrSc.**, za poskytnutí námětu a za cenné rady při vzniku práce.

Svému školiteli **Doc. MUDr. J. Klečkovi, CSc.** za odborné vedení v průběhu postgraduálního studia

RNDr. M. Peštovi, Ph.D., a **as. MUDr. L. Holubcovi, Ph.D.**, za zpracování laboratorní části práce.

Dále celému kolektivu lékařů a sester **chirurgické kliniky FN Plzeň.**

Souhlas s půjčováním :

Autor souhlasí s půjčováním této disertační práce.

V Plzni 30.9.2008

MUDr. Jarmil Šafránek

obsah

1. Předmluva – problematika bronchogenního karcinomu	6
1.1 Epidemiologie	6
1.2 Diagnostika	7
1.3 Terapie	7
2. Přehled současných poznatků onkogeneze NSCLC	8
2.1 Teorie postupné transformace buněk	8
2.2 Teorie nádorových kmenových buněk	10
2.2.1 Embryonální a adultní kmenové buňky	10
2.2.2 Teorie fúze kmenových buněk	11
2.2.3 Proces onkogeneze na buněčné úrovni	12
3. Role nádorových markerů v problematice NSCLC	13
3.1 Využití nádorových markerů	13
3.2 Dělení nádorových markerů	14
3.2.1 Onkogeny	15
3.2.1.1 Dominantní poruchy protoonkogenů	17
3.2.1.2 Recessivní poruchy antionkogenů	19
3.2.1.2.1 Cadheriny	20
3.2.1.3 Reparační geny	21
3.2.1.4 Apoptóza	21
3.2.1.5 Senescence	23
3.3 Lokální invazivita karcinomu, angiogeneze	23
3.4 Metastatický potenciál	24
3.5 Nádorové antigeny	25
3.5.1.CEA	25
3.5.2 CA 19-9	26
3.5.3 NSE	26
3.5.4 TK	27
3.6 Cytokeratiny	28
3.6.1 CYFRA 21-1	29
3.6.2 TPA	29
3.6.3 TPS	29
3.6.4 MonoTotal	30
3.7 Matrixové metaloproteinázy a jejich inhibitory	30
4. Cíl disertační práce	34
5. Metodika disertační práce	35
5.1 Odběr biologického materiálu	35
5.2 RT-PCR	37
5.3 Imunoanalytické metody	38
5.3.1 Luminex® xMAP® technologie	39
5.4 Popis užitých statistických metod	40
5.4.1 Stanovení celkového přežití a bezpříznakového přežití	40
5.4.2 Hledání ideální hranice významnosti (cut off)	40
6. Hodnocení klasických markerů (CYFRA 21-1, CEA, TK, TPS, NSE) imunoanalyt.	40

6.1 Metodika	41
6.2 Výsledky	42
6.3 Diskuze	46
7. Stanovení markerů angiogeneze v séru Luminex® xMAP® technologií	47
7.1 Výsledky	48
7.2 Diskuze	50
8. Srovnání imunoanalyticky stanovených sérových hodnot cytokeratinů se zaměřením na MonoTotal	51
8.1 Metodika	51
8.2 Výsledky	51
8.3 Diskuze	52
9. Exprese mRNA MMP-7 a mRNA TIMP-1 ve tkáni NSCLC, úvodní studie	53
9.1 Úvod	53
9.2 Výsledky	54
9.3 Diskuze	56
10. Exprese metaloproteináz (MMP-7) a jejich inhibitorů (TIMP-1) v tkáni NSCLC vs. plicní tkáni pacientů s benigním onemocněním.	57
10.1 Cíl studie	57
10.2 Metodika	57
10.3 Výsledky	58
10.4 Závěry	63
11. Hodnocení celkového a bezpříznakového přežití dle tkáňové exprese metaloproteináz a jejich inhibitorů	64
11.1 Úvod a metodika	64
11.2 Výsledky	64
11.2.1 Celkové přežití (OS), grafy	65
11.2.2 Bepříznakové přežití (DFI), grafy	69
11.2.3 Výsledky OS a DFI	72
11.2.4 Výsledky stanovení ideální cut off	73
11.3 Souhrn celkových výsledků NSCLC při hodnocení predikce OS a DFI	76
11.4 Souhrn výsledků skupiny epidermoidní forma NSCLC při hodnocení predikce OS a DFI	76
11.5 Souhrn výsledků skupiny adenokarcinom NSCLC při hodnocení predikce OS a DFI	78
11.6 Diskuze	79
12. Shrnutí disertační práce	80
12.1 Diskuse	80
12.2 Závěr s uvedením nových poznatků	85
13. Seznam použité literatury	86
14. Seznam zkratk	98
15. Literatura a prezentace autora k tématu disertační práce	99
16. Souhrn	101
17. Summary	102
18. Appendix	103

1. Předmluva – problematika bronchogenního karcinomu

1.1 Epidemiologie

Karcinom plic je v současnosti nejčastějším zhoubným nádorem u mužů a jeho incidence trvale narůstá u žen. V rozvinutých zemích světa, jakož i v České republice, je nejčastějším smrtícím nádorem u obou pohlaví. V roce 2002 byla incidence bronchogenního karcinomu 4539, t.j. 91,4 na 100 000 mužů a 1405 žen, t.j. 26,8 na 100 000. Mortalita ve stejném roce byla 4268 u mužů (86,0/100 000) a u žen 1273 (24,3/100 000) [1]. Nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC) představuje téměř 80% všech bronchogenních karcinomů a histologicky se dělí na dvě hlavní skupiny, epidermoidní karcinom a adenokarcinom. Bohužel v době stanovení diagnózy má již bezmála 40 % nemocných vzdálené metastázy a 35 % pacientů nádorové postižení uzlin mezihrudí. Celkové pětileté přežití všech nemocných s touto diagnózou je v České republice jen 5-7%. [2]. Samotná chirurgická léčba selže až ve 40% případů stádia I a až v 60% případů stádia II. Projevem tohoto selhání je recidiva. Lokální či lokoregionální recidiva spočívá v nedostatečné resekci – ponechání zbytkového tumoru v resekční linii nebo častěji v lymfatických uzlinách mediastina. Daleko častější je však v těchto nižších stádiích recidiva vzdálená, pod kterou rozumíme metastazování do kontralaterálních uzlin mediastina či manifestaci vzdálené metastázy (mozek, játra) a je o to závažnější, že je málokdy radikálně řešitelná (solitární metastáza mozku a nadledvinky) [3]. Rozsáhlé statistiky, vycházející především z patologickoanatomického materiálu, prokazují, že nejčastějším zdrojem metastatického postižení mozku je primární plicní nádor (40-60%) [4]. Příčinou vzdálené recidivy jsou nepoznané metastázy, klasickými diagnostickými postupy odhalitelné, či těmito postupy nepoznatelné mikrometastázy. Je nepochybné, že tyto metastázy byly již založeny v době operace a termín recidiva tak není zcela na místě, i když se běžně používá.

K přesnějšímu stanovení prognózy nemocného by mohl přispět průkaz právě těchto mikrometastáz, nepřímo např. využitím sérových či tkáňových onkomarkerů. Pak lze vyjádřit suspekci na vyšší stádium onemocnění než je prokázáno operačně, resp. patologicky. To je faktorem navíc v indikaci adjuvantní onkologické léčby a varovným znamením v následné dispenzarizaci. Další možností je hledání jiných prognostických faktorů, které by dokázaly předpovědět pravděpodobné chování nádoru z hlediska možné diseminace i v případech, kdy nebyly zjištěny mikrometastázy. V širším slova smyslu nejsou prognostickými parametry jen faktory molekulárně genetické, resp. molekulárně biologické, ale také klinické, paraneoplastické, právě nádorové markery i běžné laboratorní testy.

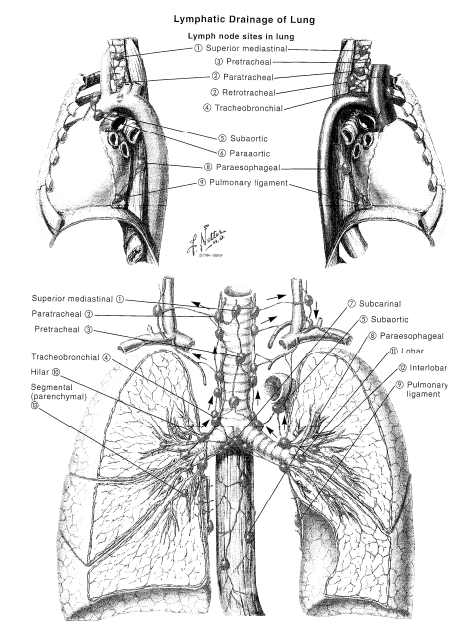
1.2 Diagnostika

Vzhledem ke společenské a zdravotní závažnosti NSCLC je důraz kladen především na přesnou a časnou diagnostiku. Zde hlavní úlohu hraje bronchoskopie, BAL, CT resp. PET-CT, USG jater, ledvin a nadledvin, u symptomatických nemocných i CT či MRI mozku.

1.3 Terapie

Nejúčinnější terapií NSCLC je radikální operace s disekcí nitrohruďních uzlin. Podle stávajícího konsenzu se za radikální resekci bronchogenního karcinomu považuje operace, kdy jsou splněny následující kritéria. Nádorem nesmí být postižené plicní resekční okraje potvrzené histologicky. Musí být provedena systematická mediastinální uzlinová disekce či systematický sampling (odběr vzorků z odpovídajících etáží) lymfatických uzlin mediastina. Nesmí být mikroskopicky prokázáno extrakapsulární uzlinové šíření tumoru. V případě nádorového postižení hilových lymfatických uzlin musí být exstirpované centrálněji uložené uzliny (z vyšších etáží) již nádorem nepostižené. Diskutabilní je rozsah systematického samplingu lymfatických uzlin. Za dostatečný se nyní považuje odběr nejméně 6 lymfatických uzlin z hilu a mediastina. 3 uzliny hilové, 1 uzlina subkarinální a ostatní 2 odpovídající lobární lokalizaci karcinomu. Pro pravý horní a střední lalok tak horní a dolní paratracheální uzliny. Pro pravý dolní lalok paraesofageální uzliny a z lig. pulmonale. Pro levý lalok horní uzliny subaortální a přední mediastinální. Pro levý dolní lalok paraesofageální uzliny a z lig. pulmonale. [5]. Pro přehlednost uvádím v současnosti uznávanou klasifikaci lymfatických uzlin (dle Naruke a Mountain) na obrázku 1 [6,7].

obrázek 1 : Klasifikace lymfatických uzlin (dle Naruke a Mountain) [6,7].



Radikální chirurgická léčba je s výjimkou stádia IA (pT1pN0pM0) doplňována adjuvantní chemoterapií s využitím dubletních kombinací cytostatik tzv. III. generace (vinorelbin, paklitaxel) s platinovými deriváty (cisplatina, karboplatina). Významný přínos adjuvantní chemoterapie potvrdily již čtyři multicentrické randomizované studie fáze III [8]. Naproti tomu koncepce indukční předoperační chemoterapie dosud doporučovaná u stádia IIIA, byla částečně zpochybněna, neboť nebylo dosaženo lepšího přežití nemocných léčených chemoterapií a operací ve srovnání s nemocnými léčenými chemoterapií a následnou radioterapií [9]. V současnosti se proto jeví účelné indikovat primární chirurgickou léčbu pro stádia I a II a podle možnosti provést radikální resekci ve smyslu odstranění všech makroskopicky postižených nádorových lézí, následně pak podávat adjuvantní chemoterapii, jen s výjimkou stádia IA. [2].

Dlouhodobé přežití kompletně resektovaného I. a II. stádia (potenciálně lokalizovaného onemocnění) je přesto souhrně menší než 50 % a většina pacientů však přesto umírá na vzdálené metastázy, které jsou v době stanovení diagnózy (operace) okultní [10].

2. Přehled současných poznatků onkogeneze NSCLC

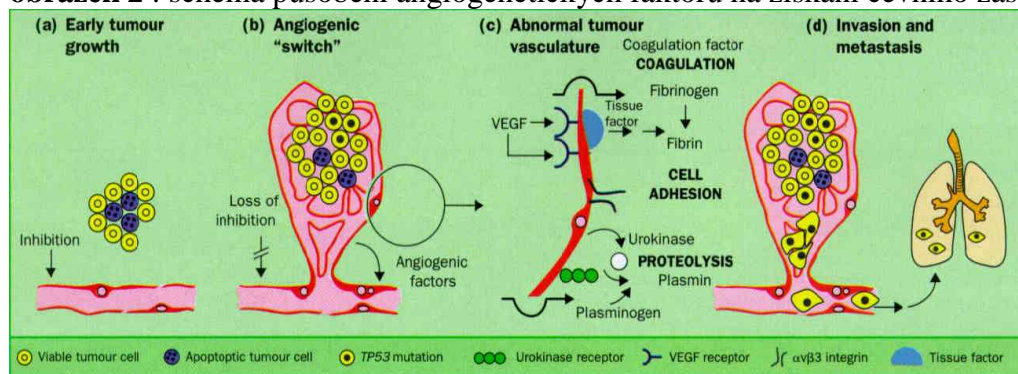
2.1 Teorie postupné transformace buněk

Současné znalosti tumorogeneze, na nichž je založena stávající koncepce onkologické léčby, předpokládají postupnou transformaci normálních buněk v nádorové buňky. V tomto mnohostupňovém procesu dochází k pozvolné akumulaci mutací a epigenetických změn, které vyústí ve změnu fenotypu a genotypu nádorové buňky. Tato ztrácí také schopnost přijímat regulační podněty ze svého okolí a naopak je charakterizována tvorbou autostimulačních faktorů, které urychlují její proliferační aktivitu. Tato teorie je dnes již klasickou kapitolou prakticky každé učebnice zabývající se danou problematikou. Proces nádorové invaze do okolních tkání a metastazování tak je založen na získání vlastního cévního zásobení tumorem. To se děje nejen „prorůstáním“ nádoru do cévy, ale produkcí

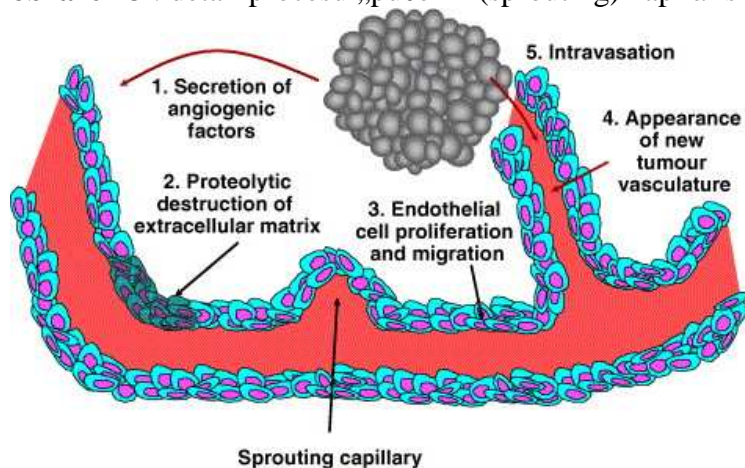
angiogenetických faktorů (např. VEGF, adhezivních molekul aj.) a následným „pučením“ kapilár k nádorové tkáni.

Vlastní proces metastazování začíná uvolňováním nádorových buněk do získaných, arodovaných cév většího průsvitu. Popsaný děj zobrazují přehledně obrázky 2, 3 a 4.

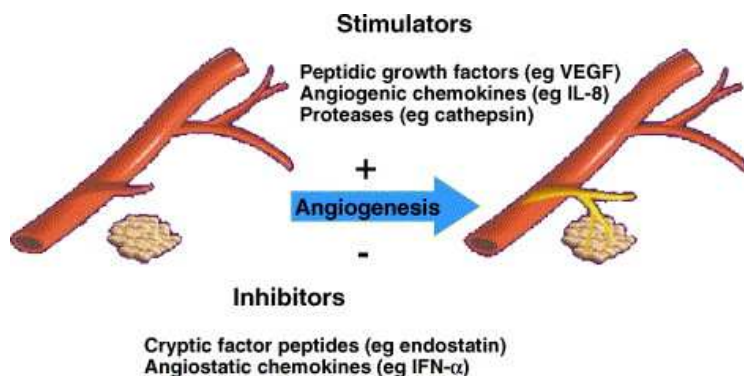
obrázek 2 : schéma působení angiogenetických faktorů na získání cévního zásobení nádorem.



obrázek 3 : detail procesu „pučení“ (sprouting) kapilár směrem k nádorové mase.



obrázek 4 : detail stimulačních a inhibičních procesů v neovaskularizaci nádoru.



2.2 Teorie nádorových kmenových buněk

Otázkou zůstává, proč však normální diferencované tkáňové buňky ztrácí schopnost proliferace. Jak vysvětlit, že částečně změněná prekancerózní tkáň nezaniká a již má schopnost sebeobnovy [11]? V důsledku těchto otázek v současné době určitá skupina vědců prosazuje teorii **nádorové kmenové buňky**, která by právě tuto proliferační aktivitu měla zajišťovat [12,13]. Vyšli z velmi jednoduchého předpokladu, že nádorová masa je vlastně také tkáň se svými jistými pravidly a vztahy. Dokonce se chová jako „nový“ orgán. Má své vlastní cévní zásobení, mezi nádorovými buňkami nalézáme množství pojiva a se svým okolím, tedy zdravými tkáněmi, komunikuje. Kmenové buňky jsou charakterizovány svou schopností sebeobnovy a současně vysokým diferenciačním potenciálem, který jim dává možnost obnovovat alespoň v omezené míře veškeré tkáně lidského těla.

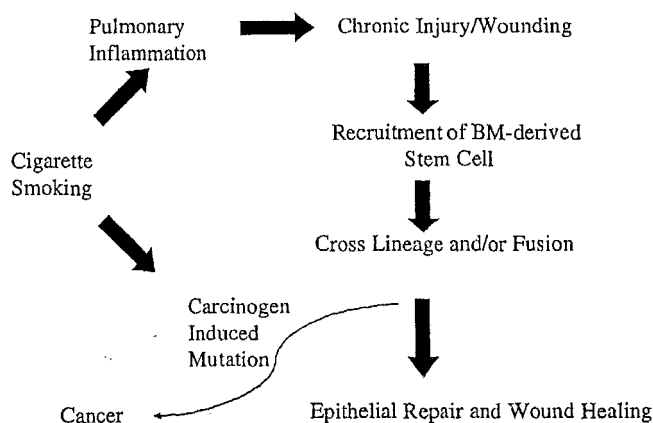
2.2.1 Embryonální a adultní kmenové buňky

Kmenové buňky lze rozdělit na **embryonální** a **adultní**. Embryonální jsou odvozeny z blastocysty a jejich úkolem je vytvořit jednotlivé tkáně a orgány, čímž zodpovídají za konečnou podobu lidského embrya. Mají tedy velmi vysokou schopnost tvořit *de novo*. Opačným případem jsou adultní kmenové buňky, které mají svou diferenciací doplňovat jednotlivé tkáně. Nepředpokládá se u nich, a lze říci, že je nežádoucí, schopnost tvořit nové ještě neexistující tkáně. Nalézají se v jednotlivých tkáních a jsou zodpovědné za reparaci poškozené tkáně. Tyto buňky jsou mechanismy kontaktní inhibice udržovány v klidovém stavu, za normálních okolností proliferují vzácně.

V roce 2001 byla publikována zásadní práce ohlašující změnu pohledu na proces karcinogeneze a připisující hlavní roli v tomto procesu transformaci adultních kmenových buněk [13]. Na tomto základě stojí i práce Haury a kolektivu, která předkládá koncepci nádorové transformace ve spojení s poznatky současné onkologie o etiologii a patogenezi nádoru [12]. Vše dokladuje na vzniku plicního karcinomu a jeho diseminace. Předpokládá, že opakované především cigaretové toxické či jiné zánětlivé inzulty plicního epitelu vyvolávají chronickou zánětlivou odpověď v daném místě. Expozice kmenových buněk kostní dřeně kancerogenům v cigaretovém kouři ústí v genetické změny deregulující normální proces transformace lézí bronchiálního epitelu z reparující kmenové buňky. Jejich proliferační potenciál jim umožňuje podstatně vyšší kapacitu k dokončení regenerace tkáně a to ať již mechanismem stimulace lokálních kmenových buněk (progenitorů) či vlastní diferenciací ve tkáň, která defekt vyplní. Bohužel chronicky inzultovaný epitel zřejmě obsahuje již epitelové buňky transformované, s vysokým množstvím fenotypových a genotypových změn, které

mají narušenou regulaci a mezibuněčnou komunikaci právě v důsledku vystupňované chronické stimulace. Stávající paradigma kancerogeneze NSCLC spočívá v teorii postupné transformace bronchiálního epitelu (hyperplazie, metaplazie, dysplazie, karcinom in situ, invazivní a metastazující karcinom), je sporné v případě NSCLC resp. plicního karcinomu obecně především pro jeho rychlou progresi. Popsané ukazuje obrázek 5.

obrázek 5 : kancerogeneze NSCLC teorií postupné transformace bronchiálního epitelu opakovanými inzulty [12].



2.2.2 Teorie fúze kmenových buněk

Transformované, prekancerotické buňky splývají s přichozími kmenovými buňkami [14]. Tato fúze má vytvořit buňku čistě nádorovou, která má pozměněnou zpětnovazebnou regulaci a mezibuněčnou komunikaci a není tedy přístupná růstovým inhibičním podnětům, které zajišťují integritu orgánu a celého organismu. Ještě zajímavější je přístup k vysvětlení vzniku metastatického procesu. Metastazovat může jen nádorová kmenová buňka, která má nejen schopnost se uvolnit z původní nádorové tkáně a infiltrovat jinou tkáň, ale má i dostatek proliferačního potenciálu. Proto také nelze definitivně spojovat detekci cirkulujících tumorozních buněk s výskytem metastáz či mikrometastatického procesu. Jen malý zlomek těchto buněk jsou transformované buňky kmenové, které mohou metastázu vytvořit. Kterou tkáň si však tato nádorová kmenová buňka vybere k infiltraci a iniciování vzniku metastázy? Je všeobecně známo, že jisté tumory mají i vysoce tkáňově specifické lokalizace svých metastáz. Kaplanová toto vysvětluje teorií *premetastatické niche*. Niche je mikroprostředí, ve kterém je kmenová buňka obklopena ostatními podpůrnými buňkami (pojivo, kapiláry), které ji pomáhají regulovat vlastní proliferaci a diferenciaci [15,16,17]. Dlouhodobé udržení adultních kmenových buněk v klidovém stavu je založeno právě na mechanismech buněčné adheze a interakcích s mezibuněčnou hmotou, každá jednotlivá niche je pro daný orgán specifická, má svou originální molekulární strukturu [18].

Plíce mají schopnost reparace pneumocytů v alveolech po úrazech nebo v rámci alveolární obnovy. Některé práce popisují schopnost kmenových buněk kostní dřeně proliferace v pneumocyty typu II a přispívající tak k plicní reparaci [19]. Jiné prokazují častější uchycení kmenových buněk kostní dřeně v poraněném epitelu než neporaněném [15]. Existující hypotézy, které předpovídají účinek cytokinů a chemokinů v hojící se tkáni nejen na diferencované buňky jako neutrofilů a makrofágy, ale také na kmenové buňky kostní dřeně [16]. Nabízí se tak hypotéza vysvětlující časně systémové postižení bronchogenním karcinomem (především SCLC) časnou nidací dřeňových „nádorových“ kmenových buněk v prostředí pro ně nejvhodnějším – tedy v bronchiálním stromu, dále pak v játrech. Tyto kmenové nádorové buňky od počátku cirkulují krevním oběhem a nidují v příhodných metastatických fokusech. Tato hypotetická představa připouští koexistenci obou dominujících modelů metastazování, jedním je schopnost metastazování dána genomickým programem (schopnost „zasetí“) a druhým je přeměna okolního prostředí v metastaticky vhodné (vhodná „půda“). Tato teorie by vysvětlovala i přítomnost nálezu generalizovaných karcinomů (v mimoplicních lokalizacích), kde je pak obtížně, či zcela nemožné prokázat nějaký původní primární nádor [12].

2.2.3 Proces onkogeneze na buněčné úrovni

Proces onkogeneze na buněčné úrovni je úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy (programované buněčné smrti). Tyto procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Většina nádorových buněk obsahuje mnohočetné genetické změny, které podporují proces onkogeneze právě poškozováním důležitých kontrolních drah. U nádorových onemocnění se takřka pravidelně setkáváme se dvěma základními typy genetických poškození. Prvním typem poškození jsou dominantní poruchy protoonkogenů a druhým typem jsou recesivní poruchy antionkogenů.

Genetické poruchy, které ovlivňují protoonkogeny, jsou zodpovědné za vyvolání stimulačních účinků, zatímco poruchy ovlivňující antionkogeny jsou zodpovědné za ztrátu jejich inhibiční funkce. Molekulární mechanismy kontroly buněčné proliferace zahrnují jak negativní, tak pozitivní regulátory [20]. Důležité procesy, jako je replikace DNA, mitóza a cytokineze, jsou řízeny řadou kontrolních systémů s cílem koordinovat jednotlivé fáze buněčného cyklu. Ve standardním buněčném cyklu je proliferační aktivita kontrolována prostřednictvím inhibitorů, které mohou zastavit cyklus ve specifických kontrolních bodech. Zpětněvazebně signály zde brání v činnosti samotného kontrolního systému, ve snaze zabránit

spuštění dalšího procesu dříve, než byl dokončen předcházející. Klíčový význam inhibitorů spočívá v jejich schopnosti regulovat buněčnou proliferaci v rámci utváření integrity tkáně a organismu. Tato regulace se uskutečňuje v několika důležitých kontrolních bodech buněčného cyklu.

3. Role nádorových markerů v problematice NSCLC

Ať klasický proces kancerogeneze či nově popsaná teorie založená na kmenových buňkách vedou ke vzniku nádoru. Již v samém okamžiku prvního projevu nádoru v dosud zdravém organismu dochází k látkovým i buněčným změnám, které lze následně laboratorně detekovat.

3.1 Využití nádorových markerů

V optimálním případě by tumorozní markery byly využitelné pro screening, diagnostiku, jako prognostický faktor, pro monitoraci onemocnění a k detekci relapsu. V případě NSCLC dosud žádný marker není senzitivní ke screeningu (jako např. PSA pro karcinom prostaty). Nádorové markery nelze zatím řadit ani mezi diagnostické prostředky karcinomu plic. V klinické praxi NSCLC jsou stále nejčastěji užívanými **prognostickými parametry** stádium onemocnění, uzlinový staging, popř. metastatické postižení uzlin mezihrudí [21,22]. Tato hlediska nejsou zcela dostatečná a proto se hledají nové či prověřují stávající prognostické parametry právě mezi onkomarkery [23,24]. Uplatnění onkomarkerů v problematice NSCLC tak zůstává hlavně pro monitoraci léčby popřípadě detekci relapsu karcinomu.

U jednotlivých onkomarkerů nebyla potvrzena senzitivita a specificita vyšší než 70%. Lepších výsledků lze dosáhnout jejich kombinací. [23]. Obvykle je však množství sledovaného markeru závislé na počtu nádorových buněk v organismu a tak iniciální stádium nemoci je obtížně detekovatelné [25]. U pokročilého stádia je diagnostika zpravidla jednodušší a spolehlivější jinými vyšetřovacími postupy. Roli hrají markery při zpřesnění diagnózy, tedy specifitějším určením morfologického typu v případech, kde je stanovení typu bronchogenního karcinomu běžnými cytologickými nebo histologickými metodami obtížné nebo neproveditelné [26,27].

3.2 Dělení nádorových markerů

Nádorové markery jež je i bronchogenní karcinom samozřejmě schopen produkovat, lze obecně dělit do několika kategorií : onkofetální proteiny, strukturální proteiny, enzymy, komponenty buněčných membrán, sekreční peptidy, hormony a další s tumorem spjaté antigeny.

Za nádorové biomarkery lze považovat různé chemické substance, jejichž výskyt a změny koncentrace jsou ve vztahu se vznikem maligního nádoru. Jsou ve zvýšeném množství vyjádřeny v organismu buď zdravými tkáněmi jako reakce na přítomnost nádoru, nebo vlastním nádorem. Mohou být detekovány na jednotlivých buňkách (cytochemicky, průtokovým cytometrem), ve tkáních (histochemicky na tkáňových řezech) a v tělních tekutinách (séru, tekutině bronchoalveolární laváže, pleurálním výpotku, ascitu, mozkomíšním moku). Některé markery jsou stanovovány ve sputu a v moči. Biochemicky se jedná o makromolekuly, proteiny či glykoproteiny. Podle biologické funkce lze rozdělit nádorové markery na antigeny, které jsou nejčastěji onkofetálního původu, hormony, enzymy a další obtížně zařaditelné markery. Neexistuje však žádný ustálený systém dělení onkomarkerů. Příklady dělení dle biochemické povahy ukazuje tabulka 1 a dle biologické aktivity tabulka 2.

tabulka 1 : dělení nádorových markerů podle biochemické povahy.

typ TM		TM	TM histologie
nádorové antigeny	onkofetální antigen	carcinoembryonic antigen (CEA) α -fetoprotein	tračník, pankreas, prs, plíce, žaludek hepatocelulární karcinom, testikulární tu
	polyklonální protilátky	Prostata-specific antigen (PSA) tkáňový polypeptidový antigen (TPA) tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS)	prostata, prs, gyn. Tumory NSCLC obecně buněčná proliferace
	monoklonální protilátky	CA 15-3 CA 19-9 CA 50 CA 242 CA 125	Prs tračník, pankreas, žaludek tračník, pankreas, žaludek tračník, pankreas, žaludek gynekologické Tu
enzymy	neuron specific enolase (NSE) LDH kyselá fosfatáza tyrosinase Tymidinkináza (TK) metaloproteinázy a jejich inhibitory (MMPs, TIMPs)	neuroendokrinní tumory, SCLC, testikulární tumory prostata obecně proliferace	
hormony	β -human chorionic gonadotropin (β -hCG)	testikulární tumory, nádory trofoblastu	
fragменты cytoskeletu	CYFRA 21-1	NSCLC	
okogeny	RET proto-oncogenes	medulární karcinom štítné žlázy, prs	

tabulka 2 : dělení onkomarkerů podle jejich biologické aktivity

genetické parametry	genové mutace	poruchy protoonkogenů	EGFR, cykliny
		poruchy antionkogenů	p53, cadheriny, selektiny
	změny exprese genu	poruchy apoptózy	caspázy
parametry růstu nádoru	převážně epitelové	CEA	
	převážně mucinózní	CA 19-9, CA 125	
	cytokeratinové	CYFRA 21-1, TPA	
	proliferační	TK, TPS	
parametry progresu a metastazování	proteolýzy	metaloproteinázy MMPs	MMP-1-MMP-13
		inhibitory MMPs	TIMP-1,2
	adheze	adhezivní molekuly	ICAM1, VCAM1, selektiny, cadheriny
	angiogeneze	růstové faktory	VEGF
		prozánětlivé cytokiny	IL-1-IL-18

3.2.1 Onkogeny

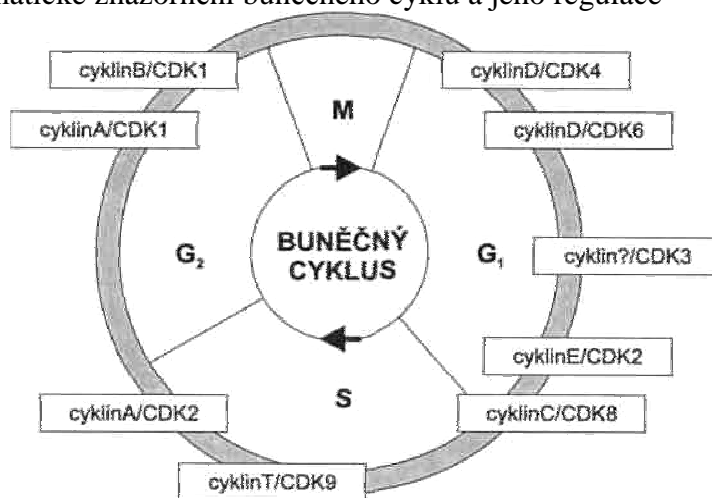
V teorii postupné transformace normálních buněk v nádorové, ale i v teorii kmenové nádorové buňky hrají významnou roli onkogeny, jejich regulátory a vzájemné interakce. Buněčné dělení je základním předpokladem růstu a vývoje všech organismů, ale i fixace náhodně vzniklých mutačních změn v sekvenci DNA. Kontrola buněčného cyklu je pro každou buňku stěžejní záležitostí a její narušení může mít za následek přeměnu normální buňky v buňku nádorovou, která nepodléhá regulačním mechanismům a je schopna nekontrolovaného růstu. Buněčný cyklus je na základě morfologických a biochemických charakteristik rozdělen do několika základních fází (G_0 , G_1 , S, G_2 , a M fáze) a je ukončen rozdělením buňky za vzniku dvou dceřinných buněk, viz obrázek 6. Perioda mezi mitotickými fázemi se označuje jako interfáze. Základní vlastnosti jednotlivých fází buněčného cyklu jsou uvedeny v následujícím přehledu:

- G_0 -fáze, klidová fáze buněčného cyklu, ve které buňka plní své základní funkce a udržuje bazální metabolismus.
- G_1 -fáze, interval mezi ukončením mitózy a začátkem syntézy DNA, je pro něj vlastní intenzivní syntéza všech typů RNA v jádře, v cytoplazmě probíhá proteo-syntéza a buňka roste. Délka G_1 -fáze obvykle určuje délku celého buněčného cyklu.

- S-fáze, v jádře probíhá replikace DNA a v cytoplasmě jsou syntetizovány histony. Po ukončení S-fáze buněčné jádro obsahuje dvojnásobné množství DNA.
- G₂-fáze, interval mezi koncem syntézy DNA a začátkem mitózy, je typický dalším růstem buňky, proteosyntézou, přičemž ve zvýšené míře je syntetizován tubulin a další proteiny sloužící k výstavbě mitotického aparátu. V G₂-fázi cyklu probíhá kontrola ukončení DNA replikace před vstupem do mitózy.
- M-fáze, mitotická. Proces mitotického dělení se sestává z řady na sebe navazujících změn, které dělíme do 6 fází, z nichž prvních pět (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze) představuje dělení jádra. Šestou fází je vlastní rozdělení buňky neboli cytokineze. Mitotickým dělením se zabezpečuje vznik dvou geneticky identických buněk.

G₁, S, G₂ a M fáze jsou součástí buněčného cyklu, ovšem ne všechny buňky procházejí tímto standardním schématem. Ačkoliv délka jednotlivých fází cyklu je do určité míry proměnlivá, největší variabilita byla pozorována v průběhu G₂-fáze. Nejsou-li buňky v G₁-fázi připraveny k replikaci DNA, vstupují do G₀-fáze, klidového stádia, ve kterém mohou setrvat několik dní, týdnů nebo i let, než opět pokračují v proliferaci [20].

Obrázek 6: Schématické znázornění buněčného cyklu a jeho regulace



Změny karyotypu mohou mít charakter náhodný, daný chybami při rychlé proliferaci, tyto změny jsou nestabilní a nespecifické. Jiné odchylky karyotypu mají charakter stabilní a pak jsou pro daný druh nádoru specifické a z hlediska cytogenetického diagnostické. Konstantní translokace se vyskytují v řadě leukemií a u některých lymfomů, ale i ovariálního a renálního karcinomu. Stabilní delece jsou charakteristikou dalších leukemií, retinoblastomu, neuroblastomu a Wilmsova tumoru.

Standardní lokalizace zlomů a delecí je kromě diagnózy důležitá i pro lokalizaci specifických onkogenů a supresorických genů v základním výzkumu jednotlivých nádorů a pro studium interakcí jednotlivých genů v onkogenezi [20].

Proces onkogeneze dosud stále uznávanou postupnou transformací benigních buněk v maligní je na buněčné úrovni úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy (programované buněčné smrti). Výše jmenované procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Většina nádorových buněk obsahuje mnohočetné genetické změny, které podporují proces onkogeneze právě poškozením důležitých kontrolních drah. U nádorových onemocnění se takřka pravidelně setkáváme se dvěma základními typy genetických poškození. Prvním typem poškození jsou **dominantní poruchy protoonkogenů a druhým typem jsou recesivní poruchy antionkogenů**.

Genetické poruchy, které ovlivňují protoonkogeny, jsou zodpovědné za vyvolání stimulačních účinků, zatímco poruchy ovlivňující antionkogeny jsou zodpovědné za ztrátu jejich inhibiční funkce. Molekulární mechanismy kontroly buněčné proliferace zahrnují jak negativní, tak pozitivní regulátory [28].

3.2.1.1 Dominantní poruchy protoonkogenů

Protoonkogeny jsou geny ve zdravých buňkách kódující proteiny, které regulují růst, proliferaci a diferenciaci buněk. Patologická aktivace protoonkogenů vede k nadměrné proliferaci typické pro malignitu, takto aktivovaný protoonkogen se nazývá onkogen (celulární onkogen) a jeho produkt onkoprotein. Onkogeny byly objeveny u virů, které indukují vznik nádorů u zvířat (převážně se jedná o RNA retroviry), a byly označeny jako virové onkogeny. I ty však mají celulární původ, vznikají totiž z protoonkogenů jejich navázáním na virový genom při zabudování DNA kopie RNA viru, tzv. proviru. Homology provirových kopií těchto virových onkogenů jsou tedy ve své inaktivní formě běžnou součástí genomů zvířecích i lidských buněk. V lidské onkologii je však nádorová transformace RNA virem prokázána pouze v případě HTLV-1, který způsobuje jednu z forem lidské T – leukémie a její odpovídající lymfom.

Existuje několik typů aktivace protoonkogenu na onkogen, které můžeme dělit do dvou skupin podle toho, zda dojde ke změně struktury protoonkogenu, čímž vzniká onkogen kódující onkoprotein odlišný od protoonkoproteinu strukturálně a tedy i funkčně, nebo zda dojde k nadměrné produkci, overexpresi nezměněného proteinu. Do první skupiny patří mutace (např. ras), translokace (např. protoonkogenu abl z chromozomu 9 ke genu bcr na

chromozomu 22) a inserce viru, tvorba hybridních genů (virus – savčí gen), který pak tvoří chimerický protein se změněnou funkcí). Druhou skupinu tvoří amplifikace protoonkogenů (erb B, L-myc, cdk 4) nebo translokace či inverze, která umístí protoonkogen do sousedství jiného genu. U B lymfomů je známa translokace myc ke genu kódujícímu těžký řetězec IgH u Burkittova lymfomu. U T lymfomů zase translokace protoonkogenu ke genu kódujícímu T buněčný receptor. K overexpresi dochází také při inserci silného retrovirového promotoru (aktivace c-myc u avian leukosis virus – induced lymfomas). Protoonkogeny (onkogeny) lze rozdělit podle toho, jakou funkci zastává jimi kóvaný produkt [29]. Těmi jsou :

a) Růstové faktory : Konstitutivní exprese růstových faktorů buňkami (TGF α , PDGF aj.), které exprimují receptory pro tyto růstové faktory, vede k autokrinní stimulaci proliferace.

b) Receptory pro růstové faktory : Protoonkogeny p-erb-B 1,2 a 3 kódující EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor s tyroxin kinázovou aktivitou, která se uplatní při vazbě růstových faktorů. Při ní dochází k fosforylaci tyrozinu u celé řady proteinů, které jsou součástí mitotické kaskády. Onkogenní formy těchto receptorů jsou trvale aktivovány bez vazby na příslušné růstové faktory. Tím dodávají permanentní signál pro aktivaci proliferace. Overexprese normální, nezměněné formy erb B1 proteinu (EGF receptoru) byla nalezena až u 80% spinocelulárních karcinomů plic. Druhý člen rodiny EGFR, c-erb – B2, je amplifikován u velkého procenta adenokarcinomu plic. Využitím inhibitorů receptoru pro EGFR (epidermální růstový faktor) jsou dnes preparáty gefitinbem (Iressa®) erlotinbem (Tarceva®), které se využívají jako biologická léčba NSCLC při selhání I. a II. linie chemoterapie. Navíc lze genetickým vyšetřením mutací predikovat jejich účinnost před vlastním podáním [2].

c) Přenašeče signálů (transdukční faktory) můžeme rozdělit na skupinu vázanou na buněčnou membránu s aktivitou tyroxin kinázovou nebo aktivitou GTP-ázovou a skupinu přenašečů signálů v cytoplazmě mající serin/threonin kinázovou aktivitu. Tyroxin kinázovou aktivitu kontrolovanou negativní regulační doménou má produkt abl (Abelsonův gen myší leukémie). U CML a některých ALL se vyskytuje translokace protoonkogenu abl z chromozomu 9 ke genu bcr (break-point cluster region) na chromozomu 22. Fúzí těchto dvou genů vzniká hybridní gen kódující chimérický protein s výraznou tyrozin kinázovou aktivitou, která mnohonásobně převyšuje aktivitu abl. Funkce negativní regulační domény byla translokací genu abl eliminována a následkem je neregulovaná proliferační aktivita. Do skupiny s GTP-ázovou aktivitou patří protein RAS (p21) kóvaný ras. V neaktivní formě váže GDP, ale při vazbě růstového faktoru na receptor je aktivován výměnou GDP za GTP. Mutace v rodině ras genů patří mezi nejčastěji vyskytující se abnormality onkogenů u

lidských nádorů, u adenokarcinomů plic se nacházejí až ve 30%. Produkty onkogenů K-ras nebo H-ras (Kirstenův a Harveyův onkogen sarkomu potkanů) nemají GTPázovou aktivitu, GTP tedy nerozloží, což vede k permanentní stimulaci mitogeneze.

d) Jaderné transkripční faktory : Jsou to nukleární proteiny, které se vážou na specifické úseky DNA, ze kterých mohou aktivovat nebo inhibovat transkripci přilehlých genů. Jejich aktivace je finální etapou transdukční kaskády. Patří sem produkty myc, jun, fos a další. I u karcinomu plic byly zjištěny amplifikace myc, u malobuněčných karcinomů plic pak amplifikace příbuzných genů N-myc a L-myc.

e) Cykliny a cyklin dependentní kinázy (CDK) : Po vazbě růstového faktoru na receptor jsou fosforylací aktivovány přenašeče fosforylující komplex CDK s cyklinem, což umožní přechod do další fáze buněčného cyklu. V 1. kontrolním bodě (přechod G1/S) jsou aktivovány komplexy D/CDK 4,6 či E/CDK 2 a tyto fosforylují supresorový Rb protein. V hyperfosforylované formě je tento supresor neaktivní, uvolní transkripční faktor E2F, který se pak může navázat na specifickou DNA sekvenci a indukuje transkripci genů S fáze, čímž podpoří mitózu. Mutacemi či amplifikacemi protoonkogenů, např. CDK 4 či cyklinů D, tak dochází k nadměrné fosforylaci Rb proteinu vedoucí k zesílení působení E2F faktoru a proliferace. Existují také inhibitory buněčného dělení, např. supresorový protein p53, který se váže na specifickou sekvenci DNA a tím indukuje transkripci inhibitoru CDK – proteinu p21^{waf1} bránícího vytvoření komplexu mezi cyklinem a CDK [30].

3.2.1.2 Recesivní poruchy antionkogenů

Antionkogeny (supresorové geny) lze definovat jako geny, jejichž inaktivace má za následek maligní transformaci. Tumor supresní gen p53 kóduje fosfoprotein s molekulovou hmotností 53 kDa a sestává z 393 aminokyselin. Biologicky nejdůležitější typ wild-type p53 je pozorován v případě genové stability. V tomto kontextu p53 má sklon vyvolat zastavení buněčného cyklu ve fázi z G1 do S fáze a tak poškození DNA. Mutace p53 jsou nejčastěji dokumentovanou genetickou alterací v lidském těle. Při poškození DNA ionizujícím zářením, kancerogeny, mutageny nebo radio- či chemoterapií, se nemutovaná, funkční forma, tzv. wild-type p53 váže na specifickou sekvenci DNA a indukuje tak transkripci inhibitoru kterým je protein p21^{waf1}. V buňkách s velkým poškozením DNA indukuje p53 transkripci apoptotického genu bax, čímž aktivuje apoptózu. Toto využívá radio a chemoterapie u tumorů s nemutovaným p53 – poškodí DNA a p53 pak zajistí opravu DNA, nebo je působení terapie cytostatické – je zastavena proliferace vlivem p21^{waf1}, nebo cytotoxicí – indukcí transkripce apoptotického genu bax. U tumorů s mutovanou formou p53 (např. často bronchogenní

karcinom) pak tato dráha není funkční, a je předpoklad nižší účinnosti radio a chemoterapie. Indukce DNA reparační, apoptóza a inhibice proliferace jsou mechanismy, kterými p53 zajišťuje, že mutace genu a jiné poruchy genomu vedoucí ke kancerogenezi nebudou předávány do dalších generací buněk a tím fixovány. Proto byl tento antionkogen označen jako strážce genomu (guardian of the genome). Genová mutace p53 je nejčastěji dokumentovanou mutací humánních tumorů. Incidence této alterace se pohybuje mezi 44-73% u malobuněčného a 34-82% u nemalobuněčného plicního karcinomu [31,32,33].

3.2.1.2.1 Cadheriny

Mezi supresorové geny patří také geny kódující cadheriny. Jsou známy 4 skupiny adhezivních molekul, které zprostředkují adheze buněk navzájem nebo k extracelulární matrix. Jsou to cadheriny, integriny, selektiny a imunoglobuliny. Cadheriny jsou podle tkáňové distribuce děleny do několika podskupin. E-cadherin (epiteliální) je transmembránovým glykoproteinem. Jeho molekuly tvoří Ca^{2+} dependentní dimery, jejichž extracelulární části spojují navzájem sousedící epitelové buňky a vytváří strukturu podobnou zipu. Jejich intracelulární domény jsou vázány pomocí cytoplasmatických molekul zvaných kateniny k aktinovým filamentům cytoskeletu. Jsou to katenin α , β , γ a p120. β -katenin váže také cytoplasmatickou doménu EGFR. Pro zachování mezibuněčných spojů je nutná správná funkce všech komponent celého cadherinkateninového komplexu. Při vazbě EGF na jeho receptor (EGFR) dochází k autofosforylaci receptoru, která aktivuje jeho tyrozinkinázovou aktivitu na β -kateninu. Tato fosforylace β -kateninu vede k disociaci cadherinkateninového adhezivního komplexu. Zrušení mezibuněčných adhezí nádorových buněk a jejich uvolnění se uplatňuje v procesu invazivity a metastazování včetně bronchogenního karcinomu. Existují klinické studie, které u maligních tumorů včetně NSCLC prokázaly korelaci mezi expresí E-cadherinu a kateninů s klinickopatologickými rysy např. diferenciací, invazivitou (posuzováno dle pT), invazí do cév, metastazováním a přežitím) [34,35,36]. Z uvedeného je zřejmé, že se funkční β -katenin pozitivně uplatňuje v mezibuněčných kontaktech. Jeho příslušný gen však nelze řadit mezi antionkogeny, protože β -katenin zastává v buňce také funkci cytoplasmatického přenašeče signálu (transdukčního faktoru) podporující mitogenezi a z tohoto pohledu by se jeho gen mohl řadit i k protoonkogenům.

Zmíněné molekuly jsou lákavým cílem možné protinádorové léčby nejlépe v časných stádiích. V experimentech *in vitro* vedly transfekce (translace) genů kódujících E-cadherin nebo kateniny do buněk s defektem těchto genů ke změně invazivního fenotypu na neinvazivní [36,38]. Navíc inzulin like growth factor I (IGF-1), tamoxifen, paclitaxel,

kyselina retinová aj. zvýšily např. transkripci E-cadherinu, α , β , γ – kateninu a také lokalizaci β -kateninu v adhezivním komplexu.

3.2.1.3 Reparační geny

V lidské buňce se denně tvoří tisíce náhodných změn v DNA, z nichž pouze malé procento ročně zůstává stabilní a přechází do DNA dceřiných buněk. Ostatní změny jsou eliminovány procesem DNA reparaace, který je zajišťován produkty reparačních genů. Při poškození bází (např. při jejich deaminaci či alkylaci) dochází k tzv. bázové excizní opravě. Modifikovaná báze je vyštěpena DNA- glykosylázou, cukr-fosfátový zbytek je pak odstraněn endonukleázou (fosfodiesterázou), DNA polymeráty vyplní mezeru nukleotidy komplementárními k nepoškozenému řetězci a DNA ligáza pak spojí nový nukleotid s okolním řetězcem. Při větším poškození DNA (vytvoření kovalentní vazby báze s velkým uhlovodíkem, jakým je např. benzpyren, či při tvorbě pyrimidinových dimerů vznikajících v důsledku UV světla) se uplatňuje nukleotidová excizní oprava, při které je poškozená sekvence nukleotidů vyštěpena specifickou endonukleázou. Vzniklý volný prostor je pak doplněn opět DNA-polymerázou a DNA-ligázou.

V případě mutací či jiných změn postihujících tyto reparační geny je reparační systém defektní a dochází k akumulaci chyb v celé řadě důležitých genů včetně protoonkogenů a nádorově supresorických genů. Příkladem takového onemocnění je HNPCC (hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome).

3.2.1.4 Apoptóza

Termín byl poprvé užit r. 1972 (Kerr) a popisuje morfologicky definovanou, programovou, buněčnou smrt. Apoptóza probíhá v několika stádiích s charakteristikami : zvrásnění buněčného povrchu (membrane blebbing), ztrátu objemu, kondenzaci chromatinu v jaderné membráně, fragmentaci jádra a rozpuštění buňky v několik ultrastrukturálních fragmentů nazývaných apoptotická tělíčka (apoptotic bodies). Komplex působení určitých onkogenů a tumorozních supresorových genů rezultuje v geneticky regulovanou a tedy programovou smrt buňky. Apoptóza je tedy cílený, samodestrukční mechanismus buněk v němž zanikající buňka sama hraje aktivní úlohu. Stejně jako mechanismy proliferace a diferenciacie, je apoptóza považována za kritický bod buněčné kontroly, která může být modulována fyziologicky buňkou samotnou nebo vnějším prostředím. Je také regulačním mechanismem počtu buněk v průběhu onkogeneze.

Existují velké rozdíly mezi apoptózou a nekrotózou, z nichž největší je účinnost, s jakou jsou apoptotické buňky rozeznány a fagocytovány. Časná fagocytóza následovaná nitrobuněčnou degradací apoptotických buněk makrofágy, brání buď přímému poškození sousedních buněk nebo indukci zánětlivé odpovědi, která vzniká při uvolňování makromolekul z umírajících buněk (charakteristický znak nekrotózy *in vivo*).

Tanaka et al. stanovili prognostický význam apoptozy indexem. Apoptotický index (5/1000-25/1000) byl signifikantní faktor predikující špatnou prognózu, lepší prognózu má skupina apoptotickým indexem <5/1000), menší proliferací index. Skupina s vysokým indexem >25/1000 vykazovala nejlepší prognózu, neboť buněčná smrt – apoptóza již převyšovala proliferaci [39]

Defekty v procesech podílejících se na kontrole programované smrti buněk mohou prodloužit životní cyklus buněk, čímž přispívají k neoplastické buněčné expanzi, která je nezávislá na buněčném dělení. Selhání normálních apoptotických drah rovněž přispívá k procesu karcinogeneze tvorbou tolerantního prostředí pro genetickou nestabilitu a akumulaci bodových mutací, umožňuje nefunkčnost kontrolních bodů buněčného cyklu, které by normálně indukovaly apoptózu, redukuje závislost na kyslíku a živinách a podporuje rezistenci k cytotoxickým protinádorovým látkám a radiaci [40].

Samostatná nekontrolovaná proliferace není ještě dostatečnou zárukou expanzivního růstu nádoru v hostitelském organismu. Apoptóza je právě jedním z nejsilnějších korektorů poruch buněčného dělení. Poškození genomu buňky, které ji učiní nevhodnou pro další život, vyvolá kaskádu změn, která dovede buňku až k buněčné smrti. Geny regulující apoptózu byly objeveny u nematod, konkrétně u *Caenorhabditis elegans*, a jsou to tyto tři : ced 3 (u člověka existuje nejméně 13 homologů tohoto genu, jejichž produkty se nazývají caspázy 1-13), ced 4 (jediný, dosud identifikovaný homolog jeho proteinu u savců je Apaf 1) a ced 9 (u člověka existuje nejméně 17 homologů proteinu CED -9 představovaných Bcl-2 rodinou proteinů). Efektorovými molekulami apoptózy jsou **caspázy** (cysteine-aspartic-acid-proteases) štěpící reparační enzymy DNA a aktivující endonukleázy, jež se účastní štěpení DNA. K aktivaci endonukleáz je nutná přítomnost iontů Ca^{2+} v cytoplasmě. Kalcium rovněž aktivuje enzymy zvané kalpiny, které odbourávají membránové proteiny a strukturu cytoskeletu. Z apoptotické buňky tak vznikají apoptotická tělíška (cytoplasmatickou membránou obalený jaderný a cytoplasmatický materiál), která jsou následně fagocytována makrofágy.

Exogenní aktivace apoptózy je prostředkována cestou membránových receptorů, tzv. receptorů smrti (TNFR, Fas/CD95) obsahujících cytoplasmatické „domény smrti“ (death domain-DD). Při vazbě příslušných ligand (TNF, FasL) se pak na tyto DD váže svou DD

transdukční faktor Fadd/Mort-1, který obsahuje i „doménu efektoru smrti“ (death effector domain-DED) vázající se s homologními oblastmi DED caspáz-8 a -10, které jsou tímto aktivovány.

Bylo prokázáno, že všechna cytotidně působící cytostatika využívají zmíněné apoptotické dráhy při výsledné realizaci svého cytotoxického účinku. Defekty apoptotických faktorů nebo převaha antiapoptotických faktorů pak může být příčinou rezistence na cytostatika.

3.2.1.5 Senescence

Podobným a přibližně stejně účinným regulátorem replikace je mechanismus senescence, tedy stárnutí buňky. Lidské buňky se totiž nemohou dělit neustále. Po několika desítkách dělení se tento proces zpomalí a po 60–70 děleních se zcela zastaví. Za kontrolu replikace jsou zodpovědné koncové repetitivní sekvence chromozomů TTAGGG zvané telomery. Telomery se při každém dělení zkracují o několik desítek dvojic nukleotidů, dosažení kritické délky telomer je signálem k zastavení replikace. Tento mechanismus může být blokován několika způsoby. Pro nádorové buňky je typické, že jsou schopny obnovovat délku telomer např. patologickou aktivitou enzymu telomerázy, což dává takovým buňkám neomezený potenciál replikace. Indukce apoptózy a inhibice telomerázy představují možné terapeutické cíle [30].

3.3 Lokální invazivita karcinomu, angiogeneze

Ani buňky vymykající se kontrole replikace a reparace genetického materiálu, včetně mechanismu programované smrti nemají ještě zaručen úspěch týkající se vzniku autonomního nádoru. Schopnost nádorové tkáně zajistit si metabolické a exkreční nároky prostou difúzí je limitována desetinami milimetru, nádor přesahující objem 1mm^3 si proto musí zjednat přístup k cévnímu systému procesem nazvaným angio resp. neoangiogeneze. Mechanismus angiogeneze je u každého organismu přísně kontrolovaným dějem, který umožňuje programovaný růst tkání a nezbytnou řízenou reparaci poškozených tkání. V případě nádorového bujení může být neoangiogeneze spuštěna poruchou rovnováhy mezi angiogenními aktivátory a inhibitory[41]. Typickými aktivátory angiogeneze jsou hypoxie, hypoglykémie a faktory angiogenin, angiopoetin, TGF- α , TNF- α , VEGF resp. jejich receptory. Proces angiogeneze na druhé straně blokují intra a extracelulární inhibitory (angiostatin, endostatin, trombospondin, interferony α a β , PAI-1).

Matrix metaloproteinázy (MMPs) byly například původně považovány pouze za aktivátory angiogeneze, které svým proteolytickým účinkem na bazální membránu endotelí a

extracelulární matrix podporují mobilitu endotelií a vytváří prostor pro nově vznikající cévy. Studie ale prokázaly dvojí působení u mnoha druhů metaloproteináz [42,43,44]. Byla totiž objevena navíc jejich schopnost mobilizovat či aktivovat některé proangiogenní faktory, ale i angiogenní inhibitory [45,46].

Z významu angiogeneze pro růst a metastazování nádorů vyplývá i fakt, že její inhibice může být jednou z léčebných modalit u zhoubných nádorových onemocnění. Probíhající výzkum je zaměřen na testování jak přirozených inhibitorů angiogeneze (např. angiostatin, endostatin), tak i inhibitorů angiogenních faktorů (monoklonální protilátky proti VEGF, inhibitory VEGF receptoru). Funkci receptorů pro VEGF lze blokovat i použitím metod genové terapie („protisměrné“ oligonukleotidy proti mRNA pro VEGF nebo ribozymy).

3.4 Metastatický potenciál

Kromě lokální invazivity tumoru je druhým základním atributem maligního nádoru metastatický potenciál. Tento jev je ve svém důsledku příčinou valné většiny úmrtí na novotvar, protože lokální růst tumoru jsme schopni ovlivnit většinou trvale nebo alespoň dočasně, např. radikální operací, ozářením nebo chemoterapií. Metastatický proces je projevem systémového selhání organismu a jako takový musí být léčen.

Bylo již výše zmíněno, že za intercelulární integritu diferencovaných tkání jsou zodpovědné různé typy adhezivních molekul. Cadheriny byly uvedeny v souvislosti s antionkogeny, integriny zprostředkovávají ve větší míře vazbu mezi buňkami a extracelulární matrix a změny jejich exprese mají analogické důsledky. Na interakcích cirkulujících buněk se podílejí selektiny, které spolu s CD 44 iniciují adhezi buněk (včetně metastatických) k endotelu. V procesu migrace nádorových buněk podpůrnou tkání, v transportu bazální membránou a v narušování intercelulárních vazeb se uplatňuje celá řada enzymů degradujících buněčnou membránu i extracelulární matrix, přičemž klíčovou roli v tomto procesu hrají MMPs.

Významnou úlohu v nádorovém růstu a protinádorové obraně má přirozená protinádorová imunita hostitele. Její humorální složka je zodpovědná především za rozpoznání resp. označení nádorové tkáně. Efektorová složka je převážně buněčná, lymfocyty, makrofágy a specifická cytolyza za účasti komplementu. Za selhání resp. nižší efektivitu imunitních kontrolních mechanismů karcinogeneze může být zodpovědná řada dějů : selekce neantigenních nebo hypoantigenních nádorových klonů, zvýšená nabídka resp. vysycení receptorů efektorových buněk při nadměrné cytolyze a degradaci buněčných membrán, redukce či ztráta přirozených antigenů stimulujících cytotoxickou imunitní odpověď a řada dalších. [30]

3.5 Nádorové antigeny

Většina nádorových buněk je charakterizována snížením sumárního množství přirozených antigenů všech typů. To zajišťuje špatnou identifikaci nádoru vlastním imunitním systémem a projevuje se možností dlouhodobého přežívání nádorových buněk. Na druhé straně takřka u všech experimentálních nádorů indukovaných fyzikální, chemickou, nebo biologickou - virovou cestou a i u většiny „spontánních“ zvířecích nádorů byly v jejich parenchymových buňkách nalezeny neoantigeny specifické pro nádorovou buňku.

Obecně byly antigeny nalezené na nádorových buňkách nazvány *nádorově specifickými antigeny (TSA)*, pokud byla jejich přítomnost prokázána výlučně na nádorových buňkách. *S nádorem spojenými (asociovanými) antigeny (TAA)*, nazýváme antigenní struktury přítomné na nádorových buňkách a za jistých okolností prokazatelné i na některých netransformovaných buňkách.

3.5.1.CEA

CEA – karcinoembrionální antigen je dosud obecně nejpoužívanější marker. Byl objeven r. 1965 (Gold a Freedman) u adenokarcinomu tračníku [47]. Původně se pokládal za marker specifický pro gastrointestinální nádory, ale brzy byl zjištěn i u jiných nádorů včetně bronhogenního, ale i jiných plicních onemocnění. Mírně elevován může být detekován u kuřáků, pacientů s benigními tumory, zánětlivých plicních onemocněními, dále s jaterní cirhózou, s hepatitidou, zánětlivým onemocněním pankreatu, s Crohnovou chorobou, či ulcerózní kolitidou [48]. Rovněž některá benigní onemocnění mléčné žlázy mohou syntetizovat tento antigen (fibroadenomy, fibrocystická choroba). CEA, neboli CEACAM 5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5) patří mezi onkofetální antigeny. Jde tedy o glykoproteid s molekulovou hmotností 180-200 kDa a elektroforetickou aktivitou v oblasti β -globulínů. Lidská CEA genová rodina sestává z 29 genů umístěných na chromosomu 19, z nichž 18 je aktivně transkribováno [49,50]. Na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce [51,52].

Za fyziologických podmínek je CEA produkce pozorována ve vyvíjejícím se embryu, kde je syntetizovaný v epitelálních buňkách, a to především na jejich membránách. Ve fetálním séru je prokazatelný od 8. týdne těhotenství.

V séru zdravých jedinců se v postfetálním životě nevyskytuje, nebo jsou jeho koncentrace velmi nízké. Nachází se případně v glykokalix buněčné membrány a je uvolňován do tělních tekutin (sérum, pleurální výpotek, ascites). Zvýšené sérové koncentrace se vyskytují asi u třetiny nemocných s bronchogenním karcinomem všech morfologických typů, spíše u nemalobuněčných karcinomů (NSCLC). U mezoteliomu se vyskytuje méně často a tak může být užitečný v diferenciální diagnostice karcinomatозních výpotků, protože mezoteliom bývá nezhřídkla obtížně odlišitelný od plicního adenokarcinomu [53].

Hladiny CEA nad 50 ng/ml jsou téměř vždy spojeny s projevem vzdálených metastáz. Změny nádorové masy v průběhu léčby jsou doprovázeny změnami sérových koncentrací CEA v 80% nemocných. Stanovení CEA je vhodné pro všechny typy plicních nádorů [53]. Celkově, literárně udávaná senzitivita CEA pro bronchogenní karcinom osciluje od 17-78% [54,55].

3.5.2 CA 19-9

Antigen **CA 19-9** patří k tumor-asociovaným onkofetálním antigenům. Je to specifická protilátka, odpovídá modifikované determinantě krevních skupin typu Lewis. Jeho výskyt je charakteristický pro adenokarcinomy. 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 [56]. *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* [57]. 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 malignitami GIT, především tračníku, kde má senzitivitu 18-58%. Jeho poločas v cirkulaci je asi 5 dní. Ač se jedná o jeden z nejpoužívanějších onkomarkerů pro NSCLC má však nízkou senzitivitu a nebývá využíván [58].

3.5.3 NSE

Neuron specifická enoláza je enzym (39kDa), který katalyzuje konverzi 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát v glykolytickém metabolickém cyklu a je standardně přítomen v buňkách všech orgánů. Molekuly enolázy jsou sumery tří imunologicky rozlišitelných podjednotek: α , β a γ . Homodimer α - α se vyskytuje ve většině tkání, zatímco β podjednotka se vyskytuje

výhradně ve svalech. γ podjednotka je exprimována v neurálních neuroendokrinních nádorech a tkáních ve formě γ - γ a γ - α sumerů [59]. Významná množství γ podjednotky se nachází rovněž v hladkých svalech, a to včetně hladkého svalstva bronchů, a dále v pneumocytech II. typu ve formě dimerů α - γ . Standardní radioimunoeseje a imuhistochemické metody s použitím protilátek proti γ podjednotce enolázy nemohou rozlišit různé sumery enzymu, a tak detekce γ -enolázy těmito technikami není specifická pro nervovou tkáň nebo pro neuroendokrinní tumory. Zastoupení jednotlivých izoenzymů α - γ a γ - γ lze detekovat pomocí elektroforetické separace. Tak je umožněna přesná diagnostika neuroendokrinní diferenciace bronchogenního karcinomu a nazývá se neuron specifická enoláza NSE nikoli tedy samostatná γ podjednotka. Vyskytuje se především u malobuněčného karcinomu a karcinoidu, ale i u jiných plicních tumorů s rysy neuroendokrinní diferenciace. Je tedy vysoce senzitivní u SCLC a v různě menší míře i u NSCLC, tento fakt podporuje hypotézu posledních let, že všechny plicní karcinomy jsou ze společného buněčného původu a neuroendokrinní diferenciace může být různě zastoupena ve všech subtypech tumorů [59].

Celková senzitivita NSE pro bronchogenní karcinom je udávána 21,3-79%, bez závislosti na histologii [60,61]. Pro NSCLC senzitivita osciluje mezi 11% a dokonce 66.7%, kumulativně však jen 21,4% [58,62,63]. U malobuněčného karcinomu plic – SCLC je důležitým markerem, zde dosahuje senzitivity 74,1-80% [62,64,65,66,67]. Zvýšené sérové koncentrace NSE se vyskytují ve všech případech malobuněčného karcinomu, u „limited disease“ v 39-59% a u „extensive disease“ v téměř 87% [68]. NSE je možno detekovat i v tekutině bronchoalveolární laváže. Stanovení NSE v mozkomíšním moku může být užitečné při podezření na mozkové metastázy. Z hlediska klinické praxe je důležité upozornit na termolabilitu NSE, vzorek musí být dopraven do laboratoře nejdéle do 1 hod po odběru. Po dobu transportu a uskladnění je třeba uchovávat vzorek při teplotě do 4 °C.

3.5.4 TK

Thymidinkinasa (TK), neboli plným názvem ATP: thymidin-5'-fosfotransferasa je přesně definovaný enzym. Patří k enzymům syntézy DNA, které jsou charakteristické pro proliferující tkáň. V G1/S fázi buněčného cyklu je zvýšena 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 metylační 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 [69].

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 [70,71]. Zvýšená produkce TK je typická rovněž pro některá virová, zánětlivá a revmatická onemocnění. Biologický poločas je asi dva dny. Pro NSCLC má sice nižší specifitu, ale její význam spočívá především v časně detekci progresu onemocnění [71].

3.6 Cytokeratiny

Další skupinou onomarkerů jsou degradační produkty rozpadu buněk, tedy jejich kostry – cytoskeletu. Cytoskelet buněk je tvořen vláknitými elementárními strukturami, které se mimo jiných funkcí podílí na vytvoření dynamického skeletu buňky. Rozlišují se tři základní komponenty cytoskeletu : mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediální filamenta. Liší se jednak tloušťkou vláken, jednak proteiny, ze kterých jsou složeny. Mikrotubuly jsou tvořeny vždy jedinou bílkovinou – tubulinem, mikrofilamenta aktinem. Proteiny intermediálních filament se liší podle druhů buněk, určitý typ diferencované buňky obsahuje určitý typ proteinů. Také v buňkách různých morfoloických typů plicních nádorů byly detekovány i různé typy proteinů intermediálních filament. Mezi rozpadové produkty cytoskeletu, především intermediálních filament, patří cytokeratiny. Dosud bylo popsáno minimálně 20 různých lidských cytokeratinů s molekulovou vahou od 40-68 kDa, vyskytujících se v buňkách normálního epitelu i nádorových, odvozených z těchto tkání. Veliké množství cytokeratinu bylo zjištěno u dobře diferencovaného epidermoidního karcinomu, zatímco menší množství keratinu bylo nalezeno u málo diferencovaných epidermoidních forem, včetně nemalobuněčného plicního karcinomu. Obvykle se jednalo o keratiny spíše s nižší molekulovou vahou (44,45, 54 kDa) neobsahující cytokeratin 63 kDa. Také adenokarcinomy a velkobuněčný karcinom obvykle neobsahují cytokeratin 63 kDa, naproti tomu u mesoteliomu je tento protein téměř vždy. Jiné typy intermediálních filament, neurofilamenta, jsou prokazována u malobuněčného karcinomu. Vimentin je prokazován ve variabilním množství u adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu, pravidelně vykazuje pozitivitu i mezoteliom. Desmin se u primárních plicních karcinomů nevyskytuje, je prokazován hlavně

v mesenchymálních nádorech. Na rozdíl od cytokeratinů samotných jsou fragmenty intermediárních filament rozpustné v séru a mohou tak být v séru detekovány a kvantifikovány.

3.6.1 CYFRA 21-1

Protože je známo, že především cytokeratin 19 se ve větší míře vyskytuje v buňkách plicních nádorů, byla vypracována metoda stanovení tohoto cytokeratinu užitím dvou monoklonálních protilátek proti dobře charakterizovaným epitopům ve vodě rozpustných fragmentů cytokeratinu 19. Tento marker se nazývá **CYFRA 21-1** nebo jen CYFRA. Podle dosud provedených studií je senzitivita metody pro bronchogenní karcinom udávána 22,7-69,6 % [72,73]. Některé studie prokazují, že pro rozlišení mezi benigním a maligním pleurálním výpotkem má CYFRA vyšší diagnostickou hodnotu než CEA [58,74,75].

3.6.2 TPA

Tkáňový polypeptidický antigen (**TPA**) byl prokázán Bjorklundem (1957) jako antigen epiteliálních buněk karcinomů. Tedy vzniklý smícháním mnoha různých tumorů a produkcí imunitního séra proti směsi. Je to polypeptid, jehož struktura odpovídá směsi fragmentů cytokeratinů [76]. TPA je determinovaný původní polyklonální protilátkou, odpovídá solubilním fragmentům cytokeratinů. Molekulová hmotnost těchto fragmentů je asi 40 kDa. Protilátky proti TPA reagují proti cytokeratinům 8, 18. TPA 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 vázán na rozdíl od diferenciačních antigenů spíše buněčnou aktivitou než s objemem nádorové hmoty. Tato aktivita může reflektovat nejen proces dělení buněk, ale i apoptózu, ev. degradaci tkáně a nekrózu [76].

3.6.3 TPS

Antigen s velice podobnou charakteristikou, definovaný však na podkladě monoklonální protilátky, byl nazván **TPS** (tkáňový polypeptidický specifický antigen). Dalšími experimenty byly definovány typy cytokeratinů, jejichž fragmenty se uvolňují do séra. Imunohistochemická nebo kvantitativní analýza tkáňového TPA či TPS dosud nevedla k jednoznačným závěrům o jeho úloze, což odpovídá zřejmě složitému procesu fragmentace

této cytoskeletální složky a její roli při buněčném dělení. Například poločas eliminace TPA je asi 7 dní. Fyziologicky je TPA, TPS produkce pozorována v trofoblastu placenty. Lze jej prokázat i v intenzivně se dělících epitelích 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.

Jak bylo řečeno TPA i TPS, ale i CYFRA 21-1 patří mezi cytokeratiny, tedy středně silná cytoskeletální filamenta, vyskytující se ve většině epitelových buněk. Každý typ buněk je charakteristický pro složení cytokeratinů. TPA identifikuje cirkulující fragmenty cytokeratinu 8 a 18, zatímco CYFRA 21-1 odráží fragmenty cytokeratinu 19. Zároveň je možné díky své chemické povaze markery TPA i TPS řadit mezi skupinu antigenů, což dokazuje složitost a nejednostnost dělení nádorových markerů [75].

3.6.4 MonoTotal

Roku 2005 byl komerčně připraven nový cytokeratinový marker, původně RIA imunoanalýzou detekující fragmenty cytokeratinu 8, 18 a 19. Jako ostatní cytokeratiny vykazuje vyšší senzitivitu pro epidermoidní karcinomy. Do jisté míry se dá považovat za směsný marker TPA a CYFRA 21-1. Jeho využití bylo zatím zkoumáno v problematice karcinomu jícnu. Hraniční hodnota (cut off) je stanovena na < 75 U/l, přičemž medián hodnot u tohoto karcinomu činil 378 U/l [77]. U pacientů s lokalizovaným onemocněním byl medián 305 U/l, zatímco pacienti s metastatickým postižením měli medián hodnot 771 U/l. V problematice NSCLC byl MonoTotal testován a prezentován prozatím jedinou studií, vykazující medián hodnot pacientů na III. stádiu (IIIa a IIIb) 603 U/l [78].

Za prognostické markery obecně lze označit např. i LD, ALP, albumin, sérovou hladinu sodíku, hemoglobinu, CRP ale klasické onkomarkery resp. jejich kombinace jsou senzitivnější [58,79].

3.7 Matrixové metaloproteinázy a jejich inhibitory

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou skupinou vysoce konzervovaných (stabilních či diferencovaných laboratorních) endopeptidáz, které mají schopnost degradovat většinu komponent bazální membrány. Matrixové metaloproteinázy se prostřednictvím remodelace, resp. destrukce extracelulární matrix (ECM) uplatňují při procesech migrace nádorových buněk [80,81,82]. Prostřednictvím změny extracelulární matrix metaloproteinázami mohou pak buňky také přejít do proliferace, apoptózy nebo patologické morfogeneze. MMPs mohou

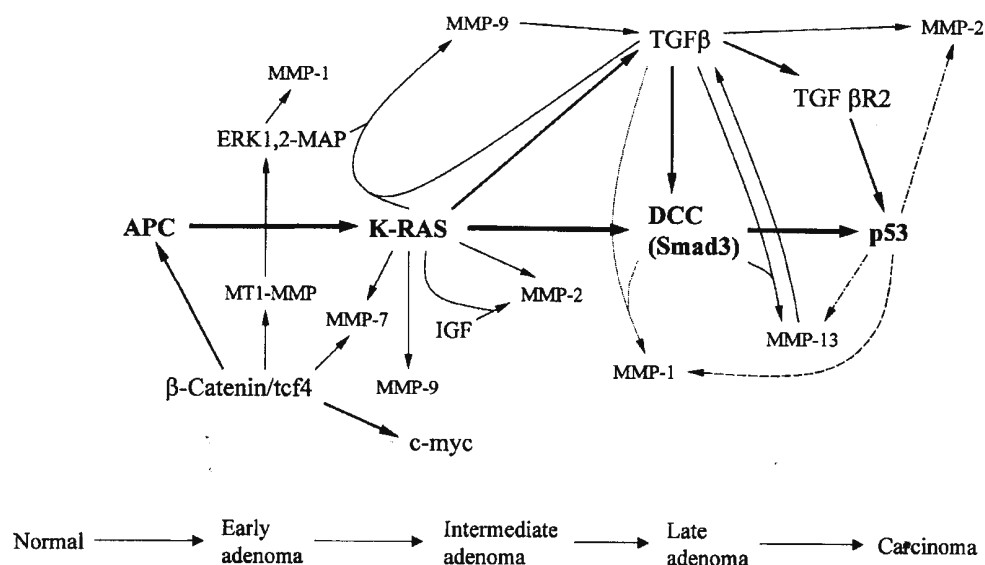
také měnit aktivitu např. růstových faktorů a jejich receptorů [83]. V konečném důsledku mohou vést i ke změnám genových expresí (viz obrázek 7). Jejich fyziologická a patologická funkce se projevuje již v modulaci extracelulární matrix během embryogeneze, ovariálního cyklu nebo při zánětu a nemocech jako revmatická artritída, fibróza jater, ledvin [84]. Účastní se dále i na procesu degradace bazální membrány (BM) ve vztahu k nádorové invazivitě – viz obrázek 8 [85,86,87,88].

V současnosti je známo již více než 28 lidských matrixových metaloproteináz a nové jsou stále stanovovány. Klasifikace a nomenklatura MMPs je založena na kombinaci substrátové aktivity *in vitro*, aminokyselinové sekvenci a proteinové struktury. Některé matrixové metaloproteinázy zachovávají historické číslování. Typy MMPs nevázané na membránu jsou klasifikovány podle jejich substrátové aktivity: kolagenázy (MMPs 1, 8, 13 a 18), želatinázy (MMP-2 a MMP-9), stromelysiny (MMPs 3, 10 a 11), matrilysiny (MMP-7 a MMP-26), makrofágová elastináza (MMP-12), enamelysin (MMP-20), membránové MMPs (MT-MMPs; MMPs 14-17, 24 a 25) a v posledně objevené matrixové metaloproteinázy (MMPs 19, 21, 23, 27 a 28) jsou zatím ve skupině nezařazené, přehled ukazuje tabulka 3. Studie jednotlivých matrixových metaloproteináz ukázaly zvýšenou expresi některých MMPs (např. MMP-2, MMP-7, MMP-9) nejen ve tkáni brochogenního karcinomu, ale i jiných patologických plicních procesech jako COPD, ARDS, TBC či sarkoidoza [89,90,91].

Tabulka 3 : Přehled matrixových metaloproteináz s jejich substrátovou specificitou.

Matrixové metaloproteinázy			
Skupina	druh	zkratka	primární substrát
kolagenázy	intersticiální kolagenáza	MMP-1	kolagen typu I, II, III, VII, VIII, IX, gelatin
	neutrofilní kolagenáza , kolagenáza 2	MMP-8	kolagen typu I, II, III
	kolagenáza 3	MMP-13	aggrekan, kolagen I, II, II, gelatin
	xenopus kolagenáza	MMP-18	
gelatinázy	gelatináza A	MMP-2	kolagen typu IV, V, VII, X, elastin, fibronectin, gelatin, prokolagenáza-3
	gelatináza B	MMP-9	kolagen typu IV, V, elastin, gelatin
stromelyziny	stromelyzin-1	MMP-3	kolagen typu III, IV, V, IX, kolagenáza 1, entaktin, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglykany
	stromelyzin-2	MMP-10	kolagen typu III, IV, V, IX, fibronectin, gelatin, laminin, proteoglykany
	stromelyzin-3	MMP-11	fibronectin, laminin, a-1-proteinase inhibitor
matrilyziny	matrilyzin	MMP-7	kolagen typu IV, elastin, entaktin, fibronectin, gelatin, laminin, tenascin
	matrilyzin-2	MMP-26	fibrinigen, fibronectin
Elastázy	metaloelastázy	MMP-12	elastin, fibrinigen, fibronectin
metaloproteinázy membránového typu	MT1-MMP	MMP-14	kolagen I, II, III, fibronectin, prokolagenáza-3, progelatináza A, proteoglykany
	MT2-MMP	MMP-15	progelatináza A
	MT3-MMP	MMP-16	kolagen III, fobronectin, gelatin
	MT4-MMP	MMP-24	
	MT5-MMP	MMP-25	progelatináza A
	enamelyzin	MMP-20	
neklasifikované metaloproteinázy		MMP-19	
		MMP-23	
		MMP-27	vitronectin
		MMP-28	epilysin

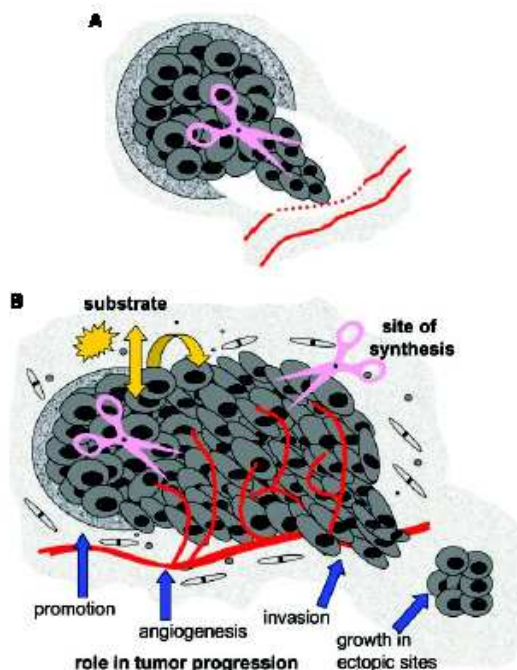
Obrázek 7 : Mechanismy působení MMPs na genové mutace antionkogenu p53 [82].



obrázek 8 :

A : časná fáze účinku MMPs u karcinomů. MMPs (znázorněny nůžkami) byly klasicky vnímány jako produkty buněk nádoru, degradující bazální membránu a ECM komponenty zdravé tkáně a tím urychlující tumorozní buněčnou invazi.

B : současný pohled na roli MMPs u karcinomů je více komplexní. MMPs se uplatňují víceúrovňově na tumorozní progresi. Působí i na zrání karcinomu, angiogenezi a založení a rozvoji metastatických lézí ve vzdálených orgánech. Bylo prokázáno, že MMPs jsou syntetizovány nejen tumorozní buňkou, ale i okolní stromální buňkou, mezi jinými fibroblasty a zánětlivými buňkami. Zároveň se zjistilo, že MMPs rozpouští povrchy buněk látkovou cestou, působky ovlivňují i buněčné vlastnosti, jako jsou růst, apoptoza a migrace [88].



Regulace matrixových metaloproteináz probíhá na několika úrovních, na úrovni jejich transkripce, aktivace a prostřednictvím specifických tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs) [83]. V této regulaci se uplatňuje především skupina enzymů označovaných jako tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs). Do současnosti byly nalezeny 4 tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4 [92]. TIMP-2 se váže specificky nekovalentní vazbou na pro-form MMP-2 a inhibuje jeho enzymatickou aktivitu[93]. TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7. Bylo zjištěno, že zvýšené exprese TIMP-1 a TIMP-2 *in vivo* potlačuje metastázy, také však byla zjištěna zvýšená exprese TIMP-1 v nádorové tkáni [94,95].

4. Cíl disertační práce

V souvislosti s rozvojem poznatků molekulárně genetických pochodů prokázaných při maligní transformaci buňky se do popředí zájmu dostávají i prognostické faktory-nádorové markery. Ty je a bude snaha využít k včasné diagnostice, jako predikce přežití či k průkazu recidivy maligního onemocnění. Právě na skupinu prognostických parametrů je zaměřena tato disertační práce. Tedy na zhodnocení významu v současnosti užívaných klasických onkomarkerů a především matrix metaloproteináz i jejich inhibitorů v problematice pacientů operovaných pro NSCLC.

Cílem je tak vypracování prognostického indexu celkového (overall surviving-OS) a bezpříznakového přežití (disease free interval-DFI) pacientů po operaci pro NSCLC využitím uvedených markerů stanovením nejen v séru, ale i přímo v plicní tkáni. Tato práce si klade za cíl dosáhnout stanovení vztahu onkomarkerů ke :

1. stádiu onemocnění (stádia TMN klasifikace)
2. histologickém podtypu NSCLC (epidermoidní-dlaždicobuněčný karcinom vs. adenokarcinom)
3. prognóze nádorového onemocnění (celkovému a bezpříznakovému přežití)
4. nenádorovým (benigním) plicním onemocněním

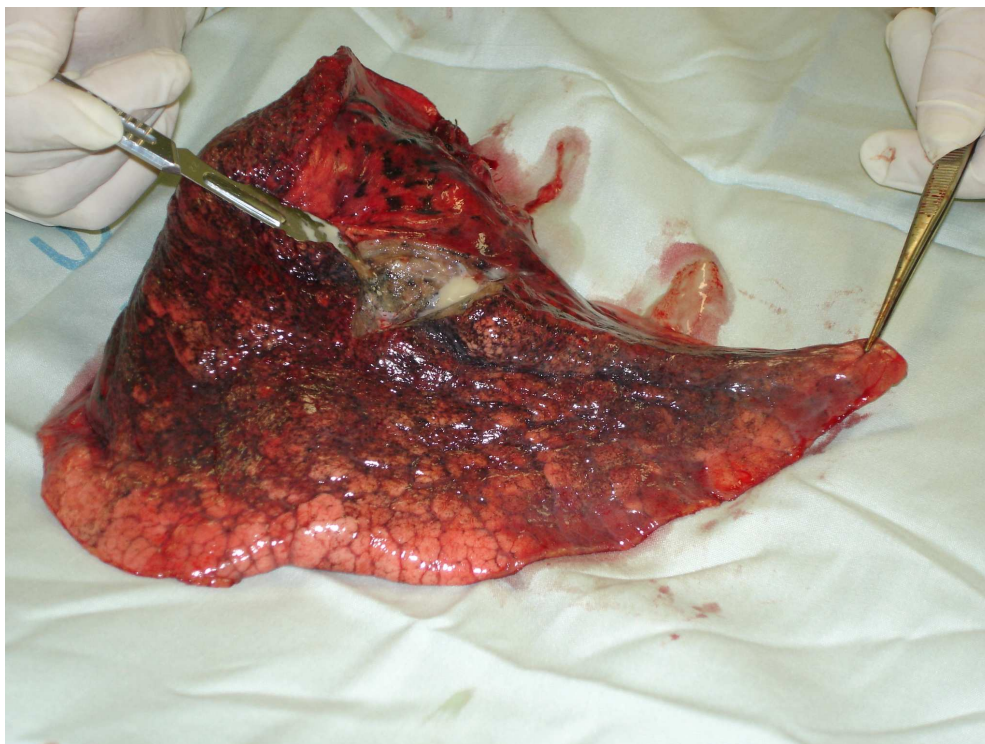
5. Metody zpracování biologického materiálu

Na našem chirurgickém pracovišti pacientům s NSCLC standardně provádíme techniku anatomické plicní resekce v rozsahu lobektomie, bilobektomie, pneumonektomie, případně i bronchoplastické výkony. Cílem je kompletní plicní resekce s rozsahem lymfadenektomie odpovídající systematickému samplingu [96]. Stanovení markerů jsme prováděli využitím širokého spektra metod imunoanalytické laboratoře plzeňské fakultní nemocnice a rovněž pomocí polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) v laboratoři plzeňské lékařské fakulty UK. Do studie jsme navrhovali každého pacienta operovaného na naší klinice pro nemalobuněčný plicní karcinom, který neměl v osobní anamnéze jiné maligní onemocnění, ve věku do 75 let. Pacienty vyššího věku jsme vyřadili z důvodů již vysoké morbidity, resp. komplikací pooperačního průběhu, z jiných příčin než jen NSCLC. Rovněž jsme nezařadili nemocné, kteří s tímto sledováním písemně nesouhlasili. Ze sestavy jsme vyloučili i dva nemocné, kteří zemřeli krátce po operaci na chirurgické komplikace.

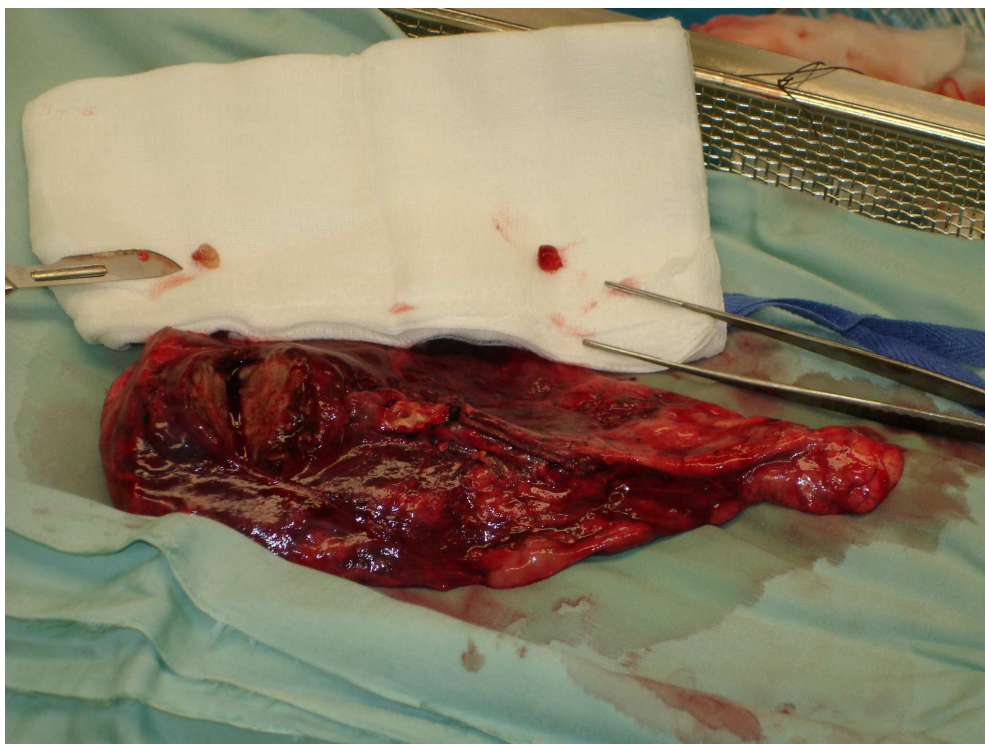
5.1 Odběr biologického materiálu

Odběr biologického materiálu jsme prováděli ze séra předoperačně (den před operací) a následně v půlročních intervalech, jinak je případně uvedeno v jednotlivých, následujících kapitolách. Odběr vzorku tkáně byl proveden vždy záhy po dokončení lobektomie či pneumonektomie z tkáně tumoru, skalpelem – viz obrázek 9 a 10. Komparativně jsme odebírali (ještě před odběrem tkáně nádoru k eliminaci možné kontaminace) i tkáň z makroskopicky zdravé části laloku, resp. plíce, která byla resekována. Množství vzorku odebrané tkáně se rozměry pohybovalo v rozmezí maximálně cca 10x10x10 mm – viz obrázek, s dostačující hmotností tkáně cca 100 mg. Několik vzorků tkáně s benigní histologií jsme získali odběrem z tumoru před operací histologicky neověřeným a v definitivním histologickém závěru NSCLC resp. plicní karcinom nebyl prokázán. Další vzorky s benigní diagnózou jsme získali oddělením části tkáně při diagnostických operacích pro nejčastěji intersticiální plicní proces, vždy s písemným souhlasem pacienta.

obrázek 9 : Odběr vzorku tumoru (již s centrálním rozpadem).



obrázek 10 : ukázka velikosti odebrané tkáně tumoru a nádorem nepostižené části plic.



5.2 RT-PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce) je velice citlivá metoda, která dokáže amplifikovat a prokázat příslušnou DNA sekvenci i z velmi malého množství původních molekul (teoreticky jen z několika původních DNA molekul). Sledování exprese genů na úrovni mRNA se v současnosti nejčastěji provádí metodami založenými právě na PCR. Princip spočívá ve vizualizaci signálu specifických oligonukleotidů, jejichž sekvence specificky odpovídá sekvenci sledovaného genu. Tímto způsobem lze sledovat, zda je sledovaný gen aktivní či ne, nebo v případě kvantitativní PCR, jaká je jeho aktivita vůči jinému genu (relativně) nebo jaký počet kopií genu se nachází ve vzorku (absolutně). Nejčastěji v laboratorní praxi používaným genem (housekeeping gene), vůči kterému se exprese zkoumaného genu vztahují, je GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Základní zde využívanou vlastností housekeeping genu je jeho výskyt ve všech tkáních rovnoměrně. Metodami založenými na PCR se také sledují změny v kvalitě DNA, tzn. jedno či více bodové mutace, delece, inserce [29].

PCR je metoda *in vitro* amplifikace specifických úseků molekul DNA. Princip vychází z pochodů vlastních molekule DNA a probíhajících při její replikaci, uzpůsobených podmínkám *in vitro*. Dochází k amplifikaci úseku molekuly DNA ohraničené dvěma primery, která probíhá ve třech krocích: denaturace DNA (dochází k rozestupu vláken dvoušroubovicové molekuly DNA), hybridizace primerů (primery, syntetické oligonukleotidy, se připojují ke komplementární sekvenci jednoho z řetězců templátové DNA), syntéza nových vláken (termostabilní DNA polymeráza prodlužuje primery a syntetizuje tak dle templátu nové vlákno). Tyto kroky se cyklicky opakují 20-40x. Výsledkem PCR je vytvoření dostatečného množství kopií sledované sekvence DNA pro analýzu nebo další zpracování. Analýza produktů PCR se nejčastěji provádí elektroforeticky v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Porovnáním sledovaných fragmentů DNA se standardou lze určit délku fragmentů, a tím ověřit jeho správnost.

Základem metody je tak PCR reakce probíhající ve 4 oddělených směsích. Každá obsahuje navíc jeden typ modifikovaného deoxynukleotidu, který ukončí syntézu nového vlákna v místě jednoho typu deoxynukleotidu. Po elektroforetické analýze v polyakrylamidovém gelu a autoradiografii získáváme obraz čtyř pruhů, z nichž každý tvoří fragmenty zakončené jedním ze čtyř modifikovaných deoxynukleotidů. Odečtením fragmentů lišících se o jeden deoxynukleotid nám typ modifikovaného deoxynukleotidu říká primární strukturu sekvenovaného fragmentu. Modernější metody používají modifikované deoxynukleotidy značené odlišnými fluorescenčními barvami. Výsledná sekvence DNA fragmentu je odečtena

v jedné dráze gelu na automatickém sekvenčním přístroji a pomocí počítače je následně zpracována.

Reverzní transkripce spojená s PCR (RT-PCR) je technika umožňující stanovit buněčnou expresi konkrétního genu. Molekula mRNA (produkt genu) se přepíše reverzní transkriptázou na molekulu cDNA (komplementární DNA), která se amplifikuje PCR a analyzuje výše zmiňovanými technikami. Informaci o míře exprese specifické mRNA přináší kvantitativní RT-PCR, jejímž účelem je určit nebo přibližně stanovit množství výchozího templátu ve vzorku, to znamená množství specifické mRNA. [29,97,98]

K izolaci celkové RNA je dostačující odběr a uskladnění v zamražení (na -20°C) asi 100 mg tkáně. Ke stanovení celkové RNA pak stačí již cca 3 μg izolované celkové RNA (Superscript III Reverse Transcriptase, Life Technologies, USA; oligo d(T)21).

5.3 Imunoanalytické metody

Imunoanalytické metody ELISA, RIA a IRMA patří k metodám, jejichž podstatou je vzájemná reakce specifické vazebné látky (binder) s látkou, které koncentraci určujeme (ligand). Podle typu vazebné látky se rozlišují tři hlavní skupiny metod využívající vazbu ligandu:

- a) Metody receptorové analýzy, ve kterých jsou specifickou vazebnou látkou tkáňové hormony. Například estrogenové a progesteronové receptory v tkáni karcinomu mléčné žlázy.
- b) Metody kompetitivní vazby na sérový protein.
- c) Imunoanalytické metody, ve kterých jsou vazebnou látkou specifické protilátky.

Ve většině metod využívajících vazby ligandu, neprobíhá jednoduchá reakce vazebné látky s ligandem, ale kompetitivní reakce mezi neznačeným ligandem (jehož koncentraci stanovujeme) a indikátorem označeným ligandem (o známé koncentraci) na obsazení omezeného počtu vazebných míst na vazebné látce (např. protilátka). Tyto metody se proto nazývají kompetitivními metodami využívající vazbu ligandu. Pokud při vlastním určení musí být všechna vazebná místa obsazena ligandem, shrnují se také pod společný název saturační metody. Použití ligandu značeného indikátorem potom umožňuje určit množství stanovovaného ligandu. Pokud se pro značení ligandu používají rádionuklidové indikátory, mluvíme o radioimunoanalýze /RIA/. Pokud se na označení ligandu použije enzym, hovoříme o enzymoimunoanalýze /EIA/. Při fluoroimunoanalýze /FIA/, se ligand označuje intenzivně fluoreskujícími látkami /např. fluoresceinem/, při luminiscenční imunoanalýze /LIA/ luminiscenčními látkami /např. deriváty luminolu/. Důležitými imunologickými metodami jsou ty, ve kterých se indikátorem neznačí ligand, ale protilátka. Při označení

protilátky radionuklidem se hovoří imunoradiometrické analýze /IRMA/. V současnosti jednou z nejužívanějších metod v imunoenzymometrické analýze je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Měřeným signálem po ukončení interakce ligand a protilátek je enzymová aktivita. Na stěnách zkumavky je imobilizován antigen, na který se váží specifické protilátky přítomné v testovaném vzorku tělní tekutiny. Navázání specifických protilátek na antigen je vizualizováno protilátkami proti lidským imunoglobulinům značenými enzymem. Po promytí je do zkumavky přidán roztok chromogenního substrátu nebo substrátu a chromogenu a výsledná enzymová reakce vyhodnocena fotometricky [29,99]

Pomocí imunohistochemických metod se zjišťuje přítomnost hledaného antigenu na histologickém řezu. Princip spočívá v nanesení specifické protilátky na histologický řez, ta se naváže na hledaný antigen, pokud je přítomen a vizualizuje. Vizualizace může být založena na fluorescenční detekci. Specifická protilátka je v tomto případě konjugována s vhodným flourochromem. V ultrafialovém světle flourescenčního mikroskopu tak fluorochrom září a ukazuje místo, kde je protilátka, tudíž i polohu hledaného antigenu. Dalším způsobem vizualizace přítomnosti protilátky je její konjugace s vhodným enzymem. Po přidání substrátu katalyzuje enzym barevnou reakci. Nejčastěji používaným enzymem pro konjugaci s protilátkou jsou peroxydázy, méně často alkalická fosfatáza. Výsledkem reakce je barevný produkt lokalizovaný v místě hledaného antigenu [100].

5.3.1 Luminex[®] xMAP[®] technologie

Luminex[®] xMAP[®] technologie – je založena na již existujících imunoanalytických principech – průtokové cytometrii, tradiční imunoanalýze, využití laseru, které jsou navzájem kombinovány. Technologie umožňuje rychlé a přesné stanovení až 100 analytů současně během jedné reakce, procesu. Luminex[®] stanoví jemně barevně značená tělíska, resp. mikročástice, které reagují se specifickou zkoumanou látkou, markerem vazbou antigenu na protilátku navázanou na povrch spektrálně kódovaných mikročástic. Množství navázané látky je stanoveno díky druhé protilátce spojené s fluorescenční molekulou. Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru, který určuje jedním laserem spektrální kód kuličky (druh analytu) a druhým laserem množství navázané druhé protilátky (kvantitu analytu). Koncentrace jednotlivých analytů jsou vypočteny na základě standardních kalibračních křivek. Tento postup kombinující imunoanalýzu a průtokovou cytometrii umožňuje stanovení teoreticky až 100 analytů v jediném alikvotu vzorku o objemu 10–50 mikrolitrů. Výhodami této technologie tak je především redukce nákladů na stanovení, díky vícenásobnému stanovení. Je dostačující minimální množství stanovovaného materiálu, srovnatelné s dokonce

vícenásobnou PCR reakcí. Tento princip tak zkracuje čas stanovení i tím, že technologie je založena na stanovení a reakci v tekutém médiu, která probíhá rychleji než ostatní reakce.

5.4 Popis užitých statistických metod

Předem je zvolena hladina významnosti. Stanovuje se na hranici 0,05 (5%). To znamená, že až v 1 z 25-ti případů můžeme mít chybně zamítnutou nulovou hypotézu o shodě a přijímáme nepravdivou hypotézu o rozdílu. Říkáme tedy, že rozdíly existují, ale ve skutečnosti tomu tak není. Výsledek daného statistického testu je tzv. p-value (statistická významnost), resp. zamítnutí nulové hypotézy. Ta je závislá jak na rozdílu zkoumaného parametru, na daném a samozřejmě i na počtu pacientů v daných skupinách. Čím jsou skupiny menší (mají menší počet pacientů), tím větší rozdíl v hodnotách markerů musí být, aby byla p-value dostatečně nízká pro zamítnutí nulové hypotézy. Platí to i naopak, někdy jsou skupiny tak velké, že i klinicky nevýznamný rozdíl je statistickým testem :statisticky významný“ (falešně pozitivní).

5.4.1 Stanovení celkového přežití (Overall Surviving-OS) a bezpříznakového přežití (disease free interval-DFI)

Kaplan-Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití (DFI) je matematický výpočet zkoumaných skutečností. K poklesu křivky může dojít pouze v případě, že událost nastala. Máme-li nějakou kategorickou proměnnou (tzv. „covariate“, např. pohlaví; TNM=I, II, III, IV; marker > 100 vs < 100, atd.), u které nás zajímá rozdíl v přežití (DFI) mezi jednotlivými „křivkami přežití“ je „Kaplan-Meierova křivka“ vhodným způsobem jasné grafické prezentace zkoumaných výsledků. Pro zamítnutí nulové hypotézy o shodě je spočten tzv. „**Wilcoxon test**“ a „**Log-rank test**“. Oba z výše uvedených testů testují nulovou hypotézu: rozdíl v přežití (DFI) mezi zkoumanými skupinami (např. TNM=I vs. II vs. III vs. IV) neexistuje oproti alternativní hypotéze (rozdíl mezi výše uvedenými skupinami existují). **Hazard Ratio** nabývá hodnot od 0 do nekonečna, kde právě HR=1 je tou mezní hodnotou, je-li riziko přežití ve zkoumané skupině vyšší než v základní skupině. Hazard Ratio předpokládá, že riziko je v čase konstantní, neroste s dobou sledování. Tento výpočet je proveden užitím tzv. **Coxova modelu** a opět je testována nulová hypotéza: riziko smrti (progrese) je u obou skupin shodné oproti alternativní hypotéze - riziko je mezi zkoumanými skupinami různé.

5.4.2 Hledání ideální hranice významnosti (cut off)

Za „optimální“ můžeme považovat takovou cut off, která má nejvyšší Hazard Ratio (tedy nejlépe rozděluje zkoumanou skupinu na dvě), nebo můžeme za „optimální“ prohlásit takovou cut off, která je první statisticky významná. V prvním kroku analýzy každého markeru se určí decily hodnot daného markeru. Pro dané cut off - vždy skupina pod cut off vs. nad cut off (toto pro všechny decily) počítáme univariační Coxův regresní model (vždy skupina marker < dané cut off vs. marker \geq dané cut off). V dalším kroku testujeme ještě hypotézu - zda lze vůbec prokázat nějaký vztah mezi hodnotou spojitě proměnné (zkoumaný marker) a endpointem (progrese, smrt). Tato hypotéza je testována užitím Coxova regresního modelu.

Výsledky disertační práce jsou prezentovány v samostatných oddílech (souborech), kdy ke každému je specifikována metodika prováděných vyšetření a velikost souboru. První oddíly jsou věnovány zkoumání sérových markerů (klasických, rozšířeného spektra a se zaměřením na cytokeratinové markery). Poslední oddíly jsou věnovány vyšetřením tkáňových expresí. Každý z oddílů má výsledky a diskuzi uvedeny samostatně. Shrnující diskuze a závěry je prezentována navíc souborně, s uvedením nových poznatků této práce.

6. Hodnocení klasických markerů (CYFRA 21-1, CEA, TK, TPS, NSE) imunoanalyticky

V úvodu naší víceleté studie problematiky onkomarkerů v pooperačním období pacientů s NSCLC jsme z prvních výsledků provedli hodnocení nejčastěji užívaných, *klasických*, onkomarkerů.

6.1 Metodika

Cílem této fáze bylo hodnotit nádorové markery (CYFRA 21-1, CEA, TK, TPS, NSE) při pooperačním sledování nádoru za účelem časné detekce recidivy nádorového onemocnění a na základě tohoto sledování se pokusit nalézt optimální kombinaci nádorových markerů pro predikci recidivy. Pacienti byli operováni během roku 2005 a následně 18 měsíců klinicky sledováni ve spolupráci s klinikou TRN v Plzni. Přesah klinického sledování o půl roku oproti laboratornímu byl záměrný. Vycházeli jsme z našich i literárních studií, kdy při follow up nádorů prsu nebo kolorekta vzestup nádorových markerů předcházel o 3 až 6 měsíců klinickou manifestaci progresu [101,102,103]. Jednalo se o prospektivně koncipovanou studii. Pacienty jsme rozdělili do skupiny remise a skupinu s jakoukoli známkou progresu (recidiva do pahýlu bronchu, ponechané části plic, vzdálená metastáza, resp. úmrtí na NSCLC). Stádium karcinomu bylo stanoveno předoperačně klinicky a upřesněno dle patologického závěru. Operovali jsme pacienty od stádia Ia do IIIb. Pro stanovení nádorových markerů jsme odebírali venózní srážlivou krev v následujících intervalech: v den operace (tj. předoperačně), jeden týden, půl a jeden rok po operaci. Ve studii jsme sledovali následující nádorové markery: onkofetální karcinoembryonální antigen (CEA), solubilní cytokeratinové fragmenty-fragment cytokeratinu 19 (CYFRA 21-1) a tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS), proliferační marker tymidinkinázu (TK) a neuronspecifickou enolázu (NSE). Přehled použitých metod, jednotky a hraniční hodnoty (cut off) pro jednotlivé markery jsou uvedeny v tabulce 4. Byla provedena základní deskriptivní statistika sérových hodnot uvedených markerů v závislosti na době odběru a klinickém stavu nemocných i histologickém subtypu NSCLC. Byly hodnoceny rozdíly hodnot markerů v daných obdobích mezi skupinami progresu versus remise dle absolutních (naměřených) hodnot a dle četnosti překročení cut off a tak stanoveno relativní riziko progresu (hazard ratio) pro hodnoty nádorových markerů nad cut off.

Statistická analýza byla provedena s užitím software CRAN Release 2.4.0. Významnost rozdílů byla hodnocena pomocí neparametrického Wilcoxonova testu, podrobnosti viz výše - kapitola 5.4.

Tabulka 4 : Přehled použitých metod, hraniční hodnoty (cut off) a jednotky pro jednotlivé markery.

Nádorový marker	Metodika	Výrobce	Cut off (jednotky)
TK	REA	Immunotech	6,0 (IU/l)
CEA	TRACE, LIA	Brahms, Beckman	3,5 (ng/ml)
CYFRA 21-1	TRACE, IRMA	Brahms, Shering	2,5 (ng/ml)
TPS	IRMA	IDL	90 (kIU/l)
NSE	TRACE,IRMA	Brahms,Immunotech	12,5 (ng/ml)

6.2 Výsledky

Soubor nemocných tvořilo 34 osob, 26 mužů a 8 žen, ve věku 52-75 let (medián věku 62,9 let). V 10 případech (29,4 %) se histologicky jednalo o adenokarcinom a v 24 (70,6 %) o epidermoidní karcinom. Patologické stádium Ia bylo v 5 případech (14,7%), stádium Ib ve 13 (38,2%), st. IIa ve 3 (8,8%), st. IIb v 6 (17,6%), st.IIIa v 4 (11,7%) a IIIb ve 3 případech (8,8%). 30 denní pooperační mortalita činila 5,5%, na chirurgické časné komplikace zemřeli dva nemocní, které jsme do hodnocení nezahrnuli. V souboru jsme provedli celkem 24 (70,6%) lobektomií, 8 (23,6%) pneumonektomií a 2 (6,8%) bilobektomie. 22 nemocných v remisi NSCLC a 12 nemocných s klinicky prokázanou recidivou, generalizací či úmrtím na základní onemocnění do 18 měsíců od operace. V tabulce 5 je uvedena základní deskriptivní statistika sérových nádorových markerů v závislosti na době odběru a klinickém stavu nemocných. V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty statistické významnosti: p-value (Wilcoxon Two-Sample Test), rozdílů hodnot daného markeru v daném období mezi skupinami progresu versus remise. V tabulce 7 je uvedeno relativní riziko progresu (hazard ratio) pro hodnoty nádorových markerů nad hraniční hodnoty (cut off). Sloupcové diagramy hodnot jednotlivých markerů ukazují obrázky 11-15.

Tabulka 5 : Hodnoty p-value (Wilcoxon Two-Sample Test), rozdílů hodnot daného markeru v daném období mezi skupinami remise vs. progresu. Tučně vyznačené statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$).

Nádorový marker	před operací	po operaci		
		týden	půl roku	rok
TK	0,9095	0,6654	0,5955	0,0176
TPS	0,0994	0,5460	0,6170	0,0378
CEA	0,3497	0,1654	0,1761	0,3247
NSE	0,4230	0,7674	0,4898	0,2148
CYFRA 21-1	0,0166	0,0125	0,4369	0,0179

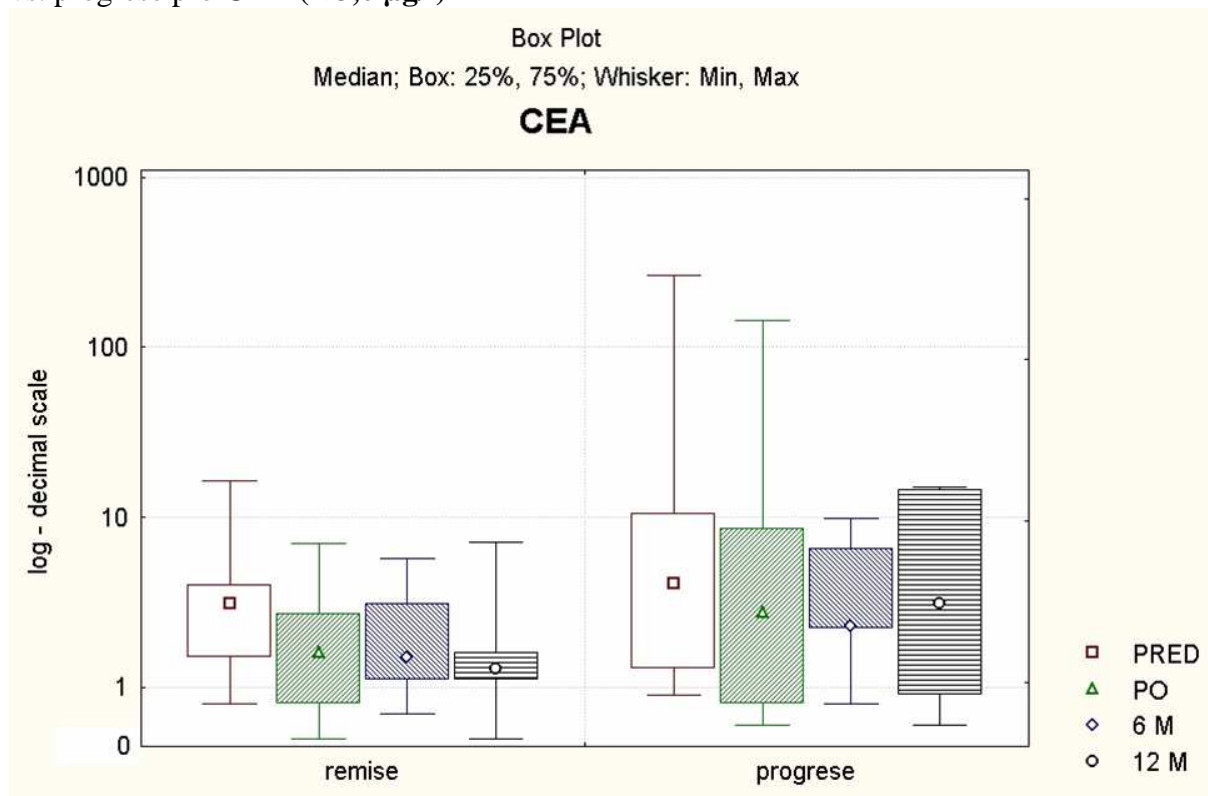
Tabulka 6 : Hazard ratio pro hodnoty nádorových markerů nad cut off. HR* hazard ratio, CI** confidenční interval, ND*** nehodnoceno (nedostatek dat).

Nádorový marker	HR* (CI**) p-value			
	před operací	týden od operace	půl roku po operaci	rok po operaci
TK	0,2 (0-2,6) p<0,2520	ND***	ND	ND
TPS	2,1 (0,4-9,3) p<0,4539	0,6 (0,1-3,6) p<0,0,6647	0,8 (0-10,5) p<0,4669	6,0 (0,5-77,7) p<0,2615
CEA	1,8 (0,4-7,6) p<0,4775	2,5 (0,5-13,4) p<0,3904	2,5 (0,4-16,0) p<0,3673	4,5 (0,5-37,4) p<0,2800
NSE	0,4 (0-4,1) p<0,6347	ND	ND	ND
CYFRA 21-1	8,1 (1,4-47,0) p<0,02	18,0 (1,6-191,5) p<0,0105	4,3 (0,6-31,9) p<0,2901	ND

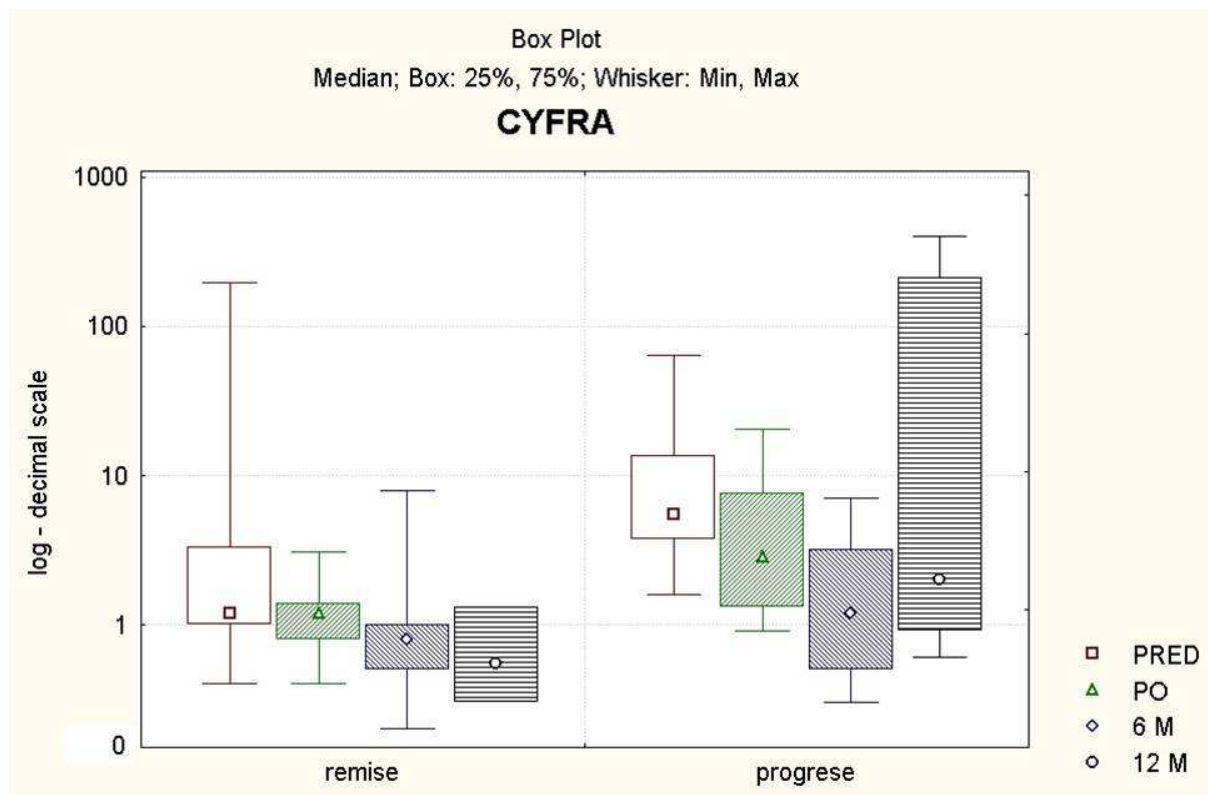
Tabulka 7 : Deskriptivní statistika sérových nádorových markerů v závislosti na době odběru a klinickém stavu nemocných.

Skupina pacientů	Období	Sérové hladiny nádorových markerů medián min. – max.				
		TK	TPS	CEA	NSE	CYFRA 21-1
Bez progresse n= 22	Před operací	6,8 2,2-24,8	45,0 10,0-172,0	3,10 0,8-16,4	5,6 1,1-27,3	1,2 0,4-195,1
	týden po operaci	20,0 11,8-47,1	151,0 17,0-468,0	1,6 0,5-7,0	5,6 3,3-10,7	1,2 0,4-3,1
	½ roku po operaci	6,3 2,7-22,0	35,0 10,0-180,0	1,5 0,7-5,7	5,6 0,1-9,8	0,8 0,2-7,9
	rok po operaci	6,0 2,8-21,1	35,0 10,0-156,0	1,3 0,5-7,1	5,5 1,1-10,5	0,6 0,4-1,9
S progresí n= 12	Před operací	7,5 2,0-25,1	133,0 18,0-277,0	4,1 0,9-264,0	6,3 4,4-22,6	5,5 1,6-64,6
	týden po operaci	27,7 6,8-38,2	144,5 21,0-218,0	2,8 0,6-144,0	5,7 3,6-11,1	2,9 0,9-20,4
	½ roku po operaci	8,9 3,2-15,0	44,0 10,0-135,0	2,3 0,8-9,9	6,5 2,5-29,7	1,2 0,3-7,0
	rok po operaci	8,9 8,0-34,4	86,0 33,0-1718,0	3,1 0,6-15,2	13,2 4,9-56,3	2,0 0,6-404,0

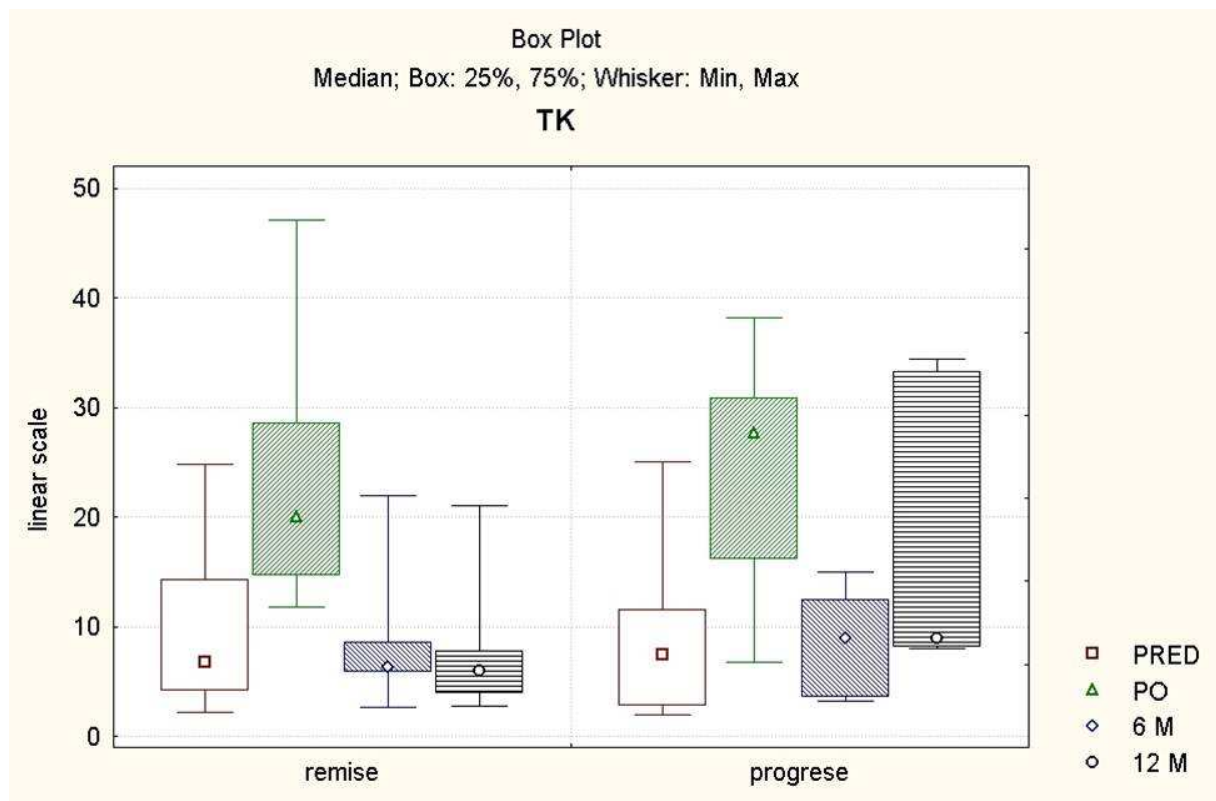
obrázek 11 : sloupcový diagram (min., 25%, median, 75% a max.) hodnot předoperačních (PRED), týden po operaci (PO), 6 měsíců (6 M) a rok po operaci (12 M), ve skupině remise vs. progresse pro **CEA** (< 3,0 µg/l)



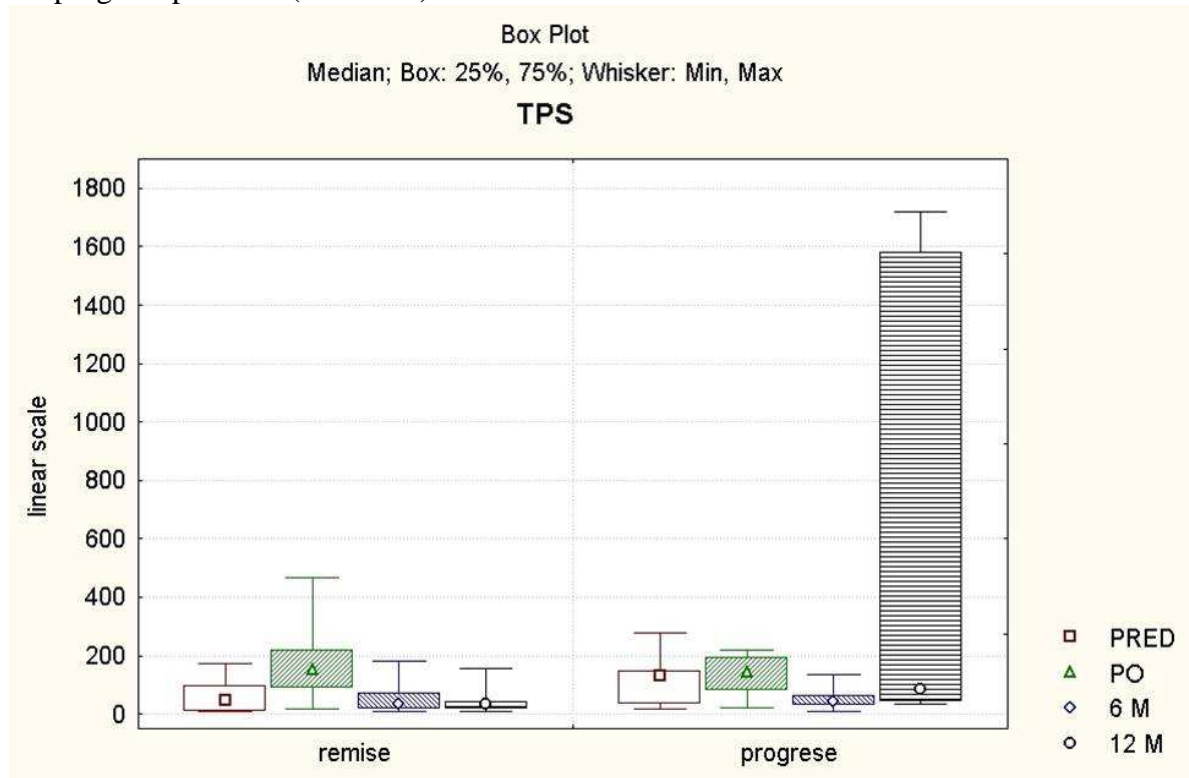
obrázek 12 : sloupcový diagram (min., 25%, median, 75% a max.) hodnot předoperačních (PRED), týden po operaci (PO), 6 měsíců (6 M) a rok po operaci (12 M), ve skupině remise vs. progresse pro **CYFRA 21-1** (< 2,5 µg/l)



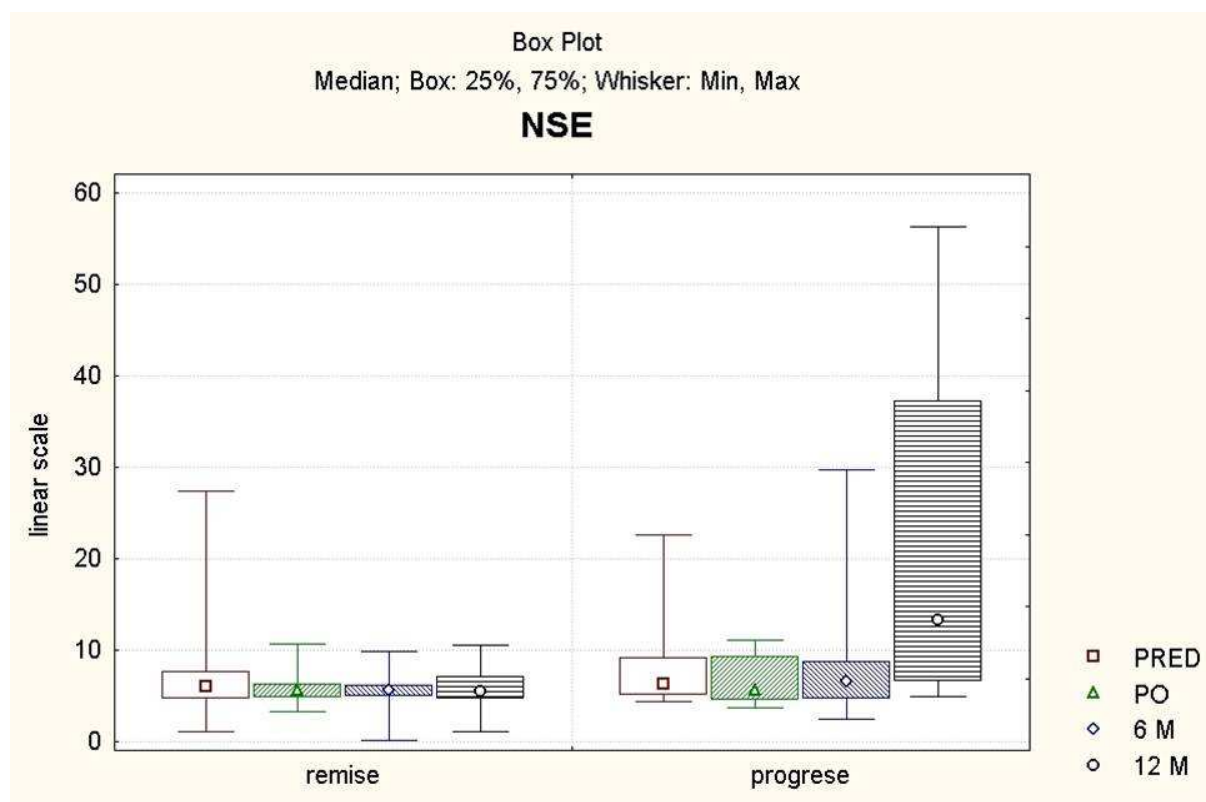
obrázek 13 : sloupcový diagram (min., 25%, median, 75% a max.) hodnot předoperačních (PRED), týden po operaci (PO), 6 měsíců (6 M) a rok po operaci (12 M), ve skupině remise vs. progrese pro TK (< 8,0 IU/l)



obrázek 14 : sloupcový diagram (min., 25%, median, 75% a max.) hodnot předoperačních (PRED), týden po operaci (PO), 6 měsíců (6 M) a rok po operaci (12 M), ve skupině remise vs. progrese pro TPS (< 90 IU/l)



obrázek 15 : sloupcový diagram (min., 25%, median, 75% a max.) hodnot předoperačních (PRED), týden po operaci (PO), 6 měsíců (6 M) a rok po operaci (12 M), ve skupině remise vs. progresse pro NSE (< 12,5 µg/l)



6.3 Diskuze

Na tomto souboru prezentujeme význam stanovení nádorových markerů pro monitoraci pooperačního follow up za účelem časně detekce recidivy nádorového onemocnění. [58,104]. Předoperačně jsme zjistili signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami (remise vs. progresse) pouze u markeru CYFRA 21-1 (viz tabulka 5).

V obou skupinách byl předoperačně nad normu zvýšen medián CEA a ve skupině s progresí byly navíc ještě nad normu zvýšeny mediány TK, TPS. Tyto rozdíly však nebyly statisticky signifikantní. Týden po operaci došlo v obou skupinách nemocných k poklesu CEA a navíc ve skupině nemocných s progresí i k poklesu CYFRA 21-1, i když medián zůstal mírně zvýšen nad normu. Obdobné změny dynamiky nádorových markerů (CEA) jsme dříve pozorovali u kolorektálního karcinomu a prokázali jsme, že jsou ukazatelem úspěšnosti chirurgického zákroku [105]. Kromě toho bezprostředně (týden) po operaci došlo v obou skupinách nemocných k výraznému zvýšení TK a TPS do oblasti patologických hodnot. Tento vzestup, jak jsme také dokumentovali v našich předchozích studiích, se vyskytuje jak u operací pro maligní nádorová onemocnění, tak u jakýchkoliv rozsáhlých operačních zákroků, např. pro

benigní onemocnění GIT [105,106]. Souvisí tedy s rozsahem operačního výkonu a pooperační regenerací tkáně, nikoliv s etiologií onemocnění. Z toho tak i vyplývá, že v rutinní praxi tyto markery nemá smysl bezprostředně po operaci hodnotit.

Při srovnání hladin námi sledovaných nádorových markerů v průběhu follow up jsme po půl roce mezi oběma skupinami signifikantní rozdíly neprokázali. Naproti tomu v období jeden rok po operaci se signifikantně lišily absolutní hodnoty TK, TPS a CYFRA 21-1 (viz tabulka 5). V tabulce 6 je hodnoceno relativní riziko přežití (hazard ratio) na základě vztahu absolutních hladin markeru k době přežití. Z tabulky vyplývá, že pro prognózu má význam pouze CYFRA 21-1. Prognostický význam CEA a CYFRA 21-1 byl opakovaně v literatuře popsán [107,108,109]. Na základě této studie zatím nelze stanovit optimální hraniční hodnotu (cut off), která by rozdělila nemocné na skupinu s příznivou a nepříznivou prognózou. Ze studie také vyplývá, že se nelze spolehnout na jeden nádorový marker, ale je třeba stanovovat nádorové markery v kombinaci. Potvrdilo se také, že existuje vztah mezi nádorovými markery CEA a CYFRA 21-1 a histologickým typem nádoru. Zvýšené hodnoty CYFRA 21-1 v období rok od operace predikují riziko recidivy ($p=0,0202$) u epidermoidní formy bronchogenního karcinomu a zvýšené hodnoty CEA rok po operaci ($p=0,0357$) představují riziko vzniku recidivy pro adenokarcinom. Tyto závěry jsou v souladu s výsledky jiných studií [110,111]. NSE není pro NSCLC vhodný marker, k elevaci dochází až v době již klinicky jasné recidivy, popř. u forem karcinomu s neuroendokrinní diferenciací [21].

Souhrně lze ke skupině klasických onkomarkerů říci, že vztah mezi nádorovými markery a prognózou nemocných po radikální resekci pro NSCLC byl prokázán především v období rok po operaci. Můžeme tak doporučit sledovat před operací markery TK, TPS, CEA a CYFRA 21-1, krátce po operaci (do půl roku) pouze CEA a CYFRA 21-1. V dalším průběhu follow up se pak jeví jako optimální sledovat stejně jako před operací TK, TPS, CEA a CYFRA 21-1 [112].

7. Stanovení markerů angiogeneze v séru Luminex[®] xMAP[®] technologií

Luminex[®] xMAP[®] technologie – je na již kombinaci stávajících imunoanalytických technologií (viz kapitola 5.3.1), která potřebuje minimální množství stanovovaného markeru, je rychlejší a především stanoví více parametrů současně.

Pilotní soubor hodnocení širokého spektra markerů angiogeneze byl realizován v průběhu roku 2006. Smyslem bylo i úvodem projektu vybrat vhodné markery a nepokračovat ve

vyšetřování ostatních. Hodnoceny byly markery TIMP-1, TIMP-2, MMP-1, MMP-9, MonoTotal, ICAM, VCAM, VEGF, IFN- γ , IGF-1, IL-4, IL-6, IL-8, MCP-1, PAI-1. Celkem bylo takto vyšetřeno 27 nemocných. V remisní skupině bylo 13 mužů a 2 ženy, v progresní skupině 8 mužů a 4 ženy, signifikantní rozdíl složení skupin nebyl prokázán (χ^2 test, p-value 0.2142). V souboru bylo 13 pacientů ve stádiu I (4 progrese, 9 remise), 7 ve stádiu II (3 progrese, 4 remise) a 7 ve stádiu III (5 progrese a 2 remise). Statisticky signifikantní rozdíl v rozložení těchto souborů nebyl prokázán (χ^2 test, p-value 0.2170). 15 (55,56%) pacientů bylo zařazeno do skupiny remise a 12 (44,44%) pacientů v následném 18 měsíčním sledování bylo zařazeno do skupiny progrese. Důvody k zařazení do progresní skupiny uvádí následující tabulka 8.

tabulka 8: příčina zařazení do progresní skupiny.

PROGRESE	počet pacientů	procenta (%)
exitus	4	33.33
generalizace	3	25.00
meta bronchu	1	8.33
meta mandibuly	1	8.33
meta mozku	1	8.33
meta plic	1	8.33
meta uzlin mediastina	1	8.33

Uvedení pacienti byli sledováni v průběhu 18 měsíců klinicky a byli jim v půlročních intervalech odebírány sérové vzorky, ke stanovení hodnot uvedených markerů multiplexovou analýzou.

Základní otázkou bylo, zda se liší hodnoty pacientů v progresi oproti hodnotám pacientů v remisi. Dále zda lze prokázat statistickou významnost v rozdílech hodnot před , po operaci a dalším pooperačním období. Dále zda jsou zřejmé rozdíly v hodnotách pacientů v podskupinách epidermoidní vs. adenokarcinom a zda se liší výsledky v závislosti na stádiu onemocnění.

7.1 Výsledky

Získané výsledky prezentují v přehledu tabulky 9-11.

tabulka 9 : stanovené hodnoty ve skupině PROGRESE, srovnání předoperačních a posledních naměřených hodnot (při poslední kontrole, po které byla prokázána recidiva, resp. generalizace, či následovalo úmrtí)

marker	PROGRESE, medián, předoperačně	PROGRESE, medián, poslední hodnoty	jednotky	Student's t test, p-value
TIMP-1	143,00	124,00	ng/ml	0,7266
TIMP-2	61,00	66,00	ng/ml	0,0703
MMP-1	620,62	716,08	pg/ml	0,7266
MMP-9	148,03	716,08	ng/ml	0,7266
MonoTotal	229,40	103,60	U/l	0,0703
ICAM	188,03	273,64	ng/ml	1,0000
VCAM	948,93	1068,71	ng/ml	0,2891
VEGF	357,78	362,82	pg/ml	0,7266
IFN- γ	3,20	3,20	pg/ml	1,0000
IGF-1	358,70	301,50	ng/ml	0,1250
IL-4	3,20	3,20	pg/ml	0,2500
IL-6	23,74	19,79	pg/ml	1,0000
IL-8	58,29	21,71	pg/ml	0,2891
MCP1	216,16	230,32	pg/ml	0,7266
PAI-1	33473,89	32464,89	pg/ml	0,7266

tabulka 10 : Srovnání posledních hodnot pacientů ve skupině REMISE a hodnot pacientů ve skupině PROGRESE. Tučně zvýrazněna statistická významnost.

marker	REMISE poslední hodnoty, medián	PROGRESE, medián, poslední hodnoty	jednotky	Wilcoxon two-sample test, p-value
TIMP-1	120,00	124,00	ng/ml	0,1924
TIMP-2	26,65	66,00	ng/ml	0,5373
MMP-1	272,12	716,08	pg/ml	0,1493
MMP-9	153,66	716,08	ng/ml	0,5967
MonoTotal	26,65	103,60	U/l	0,0077
ICAM	184,08	273,64	ng/ml	0,4461
VCAM	1342,28	1068,71	ng/ml	0,5184
VEGF	189,04	362,82	pg/ml	0,0774
IFN- γ	3,20	3,20	pg/ml	0,6987
IGF-1	307,30	301,50	ng/ml	0,8233
IL-4	3,20	3,20	pg/ml	0,5885
IL-6	69,97	19,79	pg/ml	0,5082
IL-8	22,91	21,71	pg/ml	0,2688
MCP1	193,37	230,32	pg/ml	0,3500
PAI-1	29290,45	32464,89	pg/ml	0,8365

tabulka 11 : Srovnání hodnot p-value rozdílů v získaných hodnotách pacientů skupiny REMISE vs. PROGRESE vzhledem ke stagingu, resp. histologii. Tučně statisticky významné výsledky.

marker	Kruskal-Wallis test, p-value, vztah ke stagingu	Wilcoxon two-sample test, p-value, vztah k histologické podskupině
TIMP-1	0,0329	0,0109
TIMP-2	0,5693	0,8938
MMP-1	0,2113	0,1364
MMP-9	0,7368	0,7491
MonoTotal	0,4681	0,0500
ICAM	0,8225	0,0709
VCAM	0,9318	0,9150
VEGF	0,1187	0,4900
IFNG	0,0047	0,3106
IGF-1	0,6173	0,4265
IL-4	0,6124	0,2956
IL-6	0,5310	0,2176
IL-8	0,7649	1,000
MCP1	0,5290	0,9574
PAI-1	0,2267	0,1184

7.2 Diskuze

Median hodnot expresí TIMP-1 v podskupině adenokarcinom 121,00 vs. pro epidermoidní karcinom 150,00 ng/ml vykazují staticky významný rozdíl ($p\text{-value} < 0,05$). Marker MonoTotal pro adenokarcinom 98,80 vs. pro epidermoidní karcinom 174,40 U/l také ($p\text{-value} < 0,05$). Statisticky významný rozdíl ($p\text{-value} < 0,05$) byl dále nalezen v hodnotách markerů v závislosti na stádiu onemocnění pouze v případě parametru TIMP-1, kdy median pro st. I : 151,00, st. II : 150,00 a st. III : 115,00 ng/ml.

Výsledky sérových hodnot markerů angiogeneze multiplexovou analýzou ukazují, že inhibitory metaloproteináz (v našem souboru to potvrzuje výsledek TIMP-1) jsou exprimovány ve vysokých hodnotách především v počátečních fázích růstu nádoru. Tehdy je předpoklad velké tendence tlumit produkci vlastních metaloproteináz, které provádí destrukci zdravé buněčné matrix, resp. přímo bazálních membrán buněk. Po dosažení určité velikosti resp. progrese nádoru se tato schopnost eliminuje a inhibitory metaloproteináz (TIMP-1) se chovají nezávisle, bez možnosti vlivu na působnost vlastních metaloproteináz. Závěry získané z uvedené široké skupiny sérových hodnot markerů jsme hodnotili z hlediska jejich senzitivity, vztahu k histologické podskupině NSCLC a stádiu onemocnění. Až na ojedinělé výjimky (MonoTotal, TIMP-1) jsme neprokázali statistickou významnost a proto se v další práci těmito parametry nezabývali a dále prověřovali jiné, především tkáňové parametry.

8. Srovnání imunoanalyticky stanovených sérových hodnot cytokeratinů se zaměřením na MonoTotal

8.1 Metodika

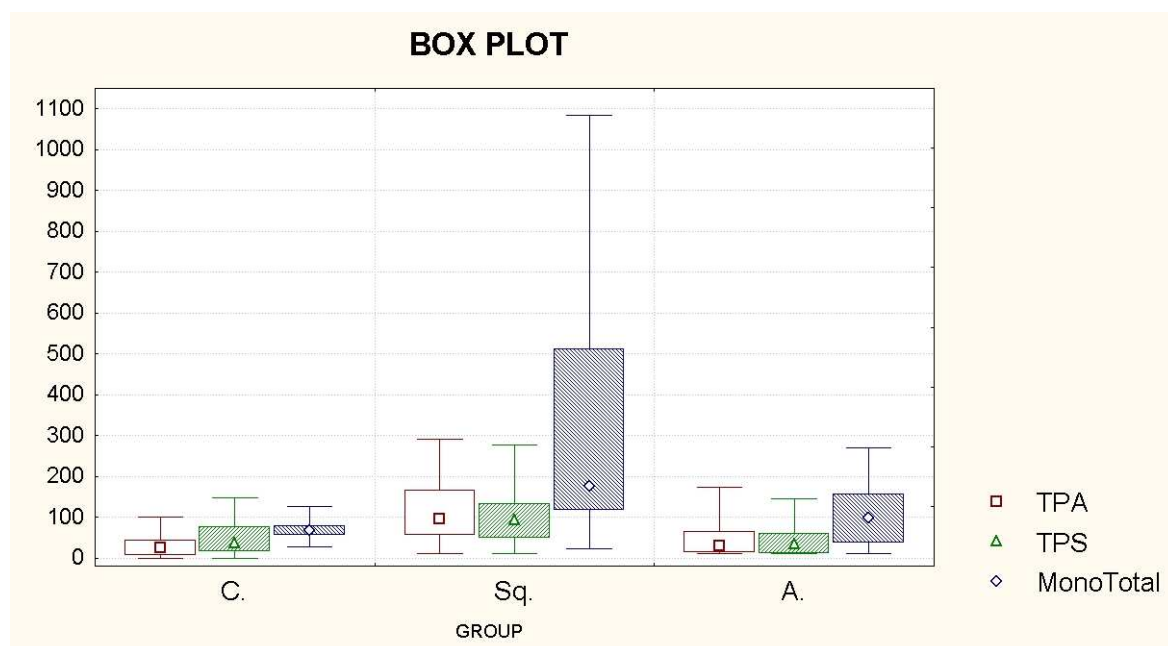
Dosavadní recenze nově prověřovaného markeru MonoTotal byly kladné a přínosné [78,113]. Proto jsme v rámci naší práce provedli ve spolupráci s klinikou tuberkulózy a respiračních (TRN) nemocí v Plzni prospektivní studii se zaměřením na cytokeratiny, speciálně právě na nový cytokeratinový marker MonoTotal. Hodnocený soubor čítal 125 nemocných léčených pro NSCLC, v celém spektru (stádium I-IV). Jednalo se o 87 případů epidermoidního karcinomu a 38 adenokarcinomu. Tento soubor byl komparován se souborem 54 pacientů léčených též na plicní klinice pro nemaligní onemocnění (nejčastěji exacerbovaná chronická obstrukční plicní nemoc a pneumonie). Uvedeným pacientům byla po přijetí do nemocnice ze sérového vzorku imunoanalyticky (metody IRMA resp. TRACE) stanovena (předléčebná) hladina cytokeratinových markerů TPS, TPA, CYFRA 21-1 a MonoTotal. Byla následně provedena standardní statistická deskripce, se stanovením průměru, mediánu, minima, maxima, kvartilů – viz obrázek 16.

8.2 Výsledky

tabulka 12 : mediány hodnot, ve skupině kontrolní (C), epidermoidní formy NSCLC (Sq) a adenokarcinomové (A). Statistická významnost *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

skupina	Median (min – max)			
	MT	TPS	TPA	CYFRA 21-1
kontrolní (C)	65 (26-125)	45 (0-146)	39 (0 -100)	1 (0.1-2.4)
NSCLC (Sq)	187*** (24-1008)	102** (10-277)	105*** (10-290)	5*** (0.9-65)
NSCLC (A)	109* (10-269)	44 (10-146)	41 (11-174)	1 (0.4-7.5)

obrázek 16 : kvartilový diagram (min., 25%, medián, 75% a max. hodnot) hodnot TPA, TPS a MonoTotal, ve skupině kontrolní (C), epidermoidní formě NSCLC (Sq) a adenokarcinomové (A).



tabulka 13 : Stanovení senzitivity při 95% specificitě a ploch pod ROC křivkou (AUC ROC curve) pro jednotlivé markery v podskupině epidermoidní karcinom (NSCLC Sq) a adenokarcinom (NSCLC A).

Tumor marker	NSCLC Sq		NSCLC A	
	senzitivita (při 95% specificitě)	AUC ROC curve	senzitivita (při 95% specificitě)	AUC ROC curve
MT	79	0,9193	52	0,6874
TPS	29	0,6764	22	0,4351
TPA	71	0,8137	44	0,6018
CYFRA 21-1	76	0,8860	22	0,6111

8.3 Diskuze

Pro všechny uvedené cytokeratinové markery je zřejmý rozdíl oproti kontrolní skupině podle očekávání především v podskupině epidermoidní formy NSCLC. Potvrzuje to obecně lepší senzitivitu cytokeratinových markerů pro epidermoidní formy karcinomů. Stroma těchto

karcinomů obsahuje více cytoskeletální složky než adenokarcinomy. V této histologické podskupině jsou všechny uvedené markery na statistické významnosti $p\text{-value} < 0.01$. Senzitivita MonoTotal je dokonce mírně vyšší než pro CYFRA 21-1 (MonoTotal 79%, CYFRA 21-1 76%) pro epidermoidní formu a i pro adenokarcinom dosahuje přes 50% (52%). Pro MonoTotal je navíc i ve skupině adenokarcinomu statistický rozdíl ($p < 0.05$) mediánů hodnot oproti kontrolní skupině pacientů s nemaligním onemocněním.

Takto prezentované výsledky jsou velmi povzbudivé. Je z nich zřejmá perspektiva parametru MonoTotal, s možnostmi využití při dispenzarizaci pacientů pneumoonkologem. Je nutno, ale připomenout, že jde o soubor pacientů ve všech čtyřech stádiích NSCLC, nikoli jen pacientů operovaných (tedy v nižších stádiích I a II).

9. Exprese mRNA MMP-7 a mRNA TIMP-1 ve tkáni NSCLC, úvodní studie

9.1 Úvod

Metaloproteinázy obecně hrají důležitou roli v procesu degradace extracelulární matrix a bazální membrány ve vztahu k nádorové invazivitě. Konkrétně MMP-7 štěpí kolagen IV, elastin, intaktin, fibronectin, želatinu, laminin a tenascin. Transkripční up-regulace exprese MMP-7 je kontrolována geny, které jsou důležité v časných stádiích karcinogeneze. TIMP-1 reguluje aktivitu MMP-7, má mitogení účinek a funguje jako inhibitor apoptózy.

Dosavadní práce hodnocení metaloproteináz a jejich inhibitorů v oblasti nemalobuněčného plicního karcinomu se MMP-7 nezabývají často, to bylo jedním z důvodů našeho výběru.

Častěji hodnocenými jsou MMP-2 a MMP-9 [114,115,116].

V první fázi našeho sledování a vyšetřování genových expresí přímo ve tkáních jsme zpracovali soubor 20 pacientů operovaných pro nemolobuněčný plicní karcinom. Jednalo se histologicky v 5 (25%) případech o adenokarcinom a 15 (75%) případech o epidermoidní karcinom. Odběr histologického materiálu byl proveden za výše uvedených podmínek, těsně po provedení plicní resekce. Odebírána byla část tkáně vlastního nádoru a část nádorem nepostižená plicní tkáň. Následně byly obě části zamrazeny a později zpracovány uvedenou RT-PCR metodikou. Z výsledků pak byla stanovena standardní statistická deskripce.

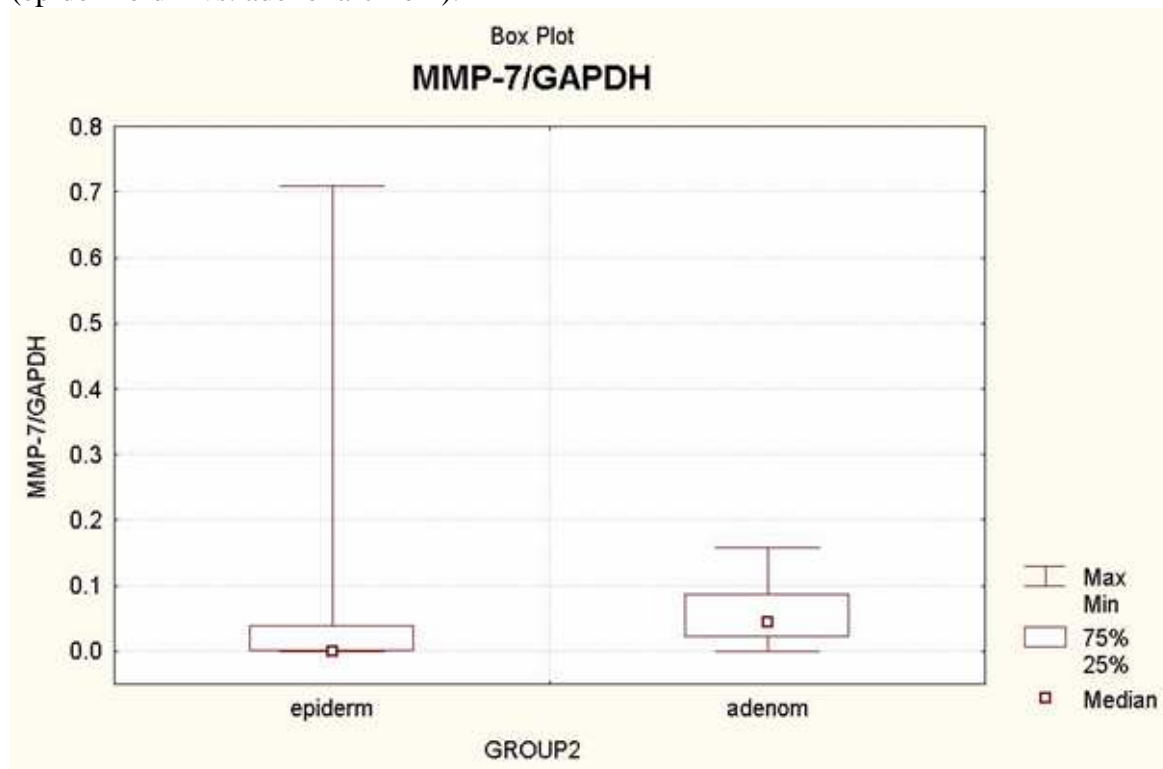
9.2 Výsledky

Následující tabulka 14 a obrázky (sloupcové grafy) 17-19 ukazující získané výsledky.

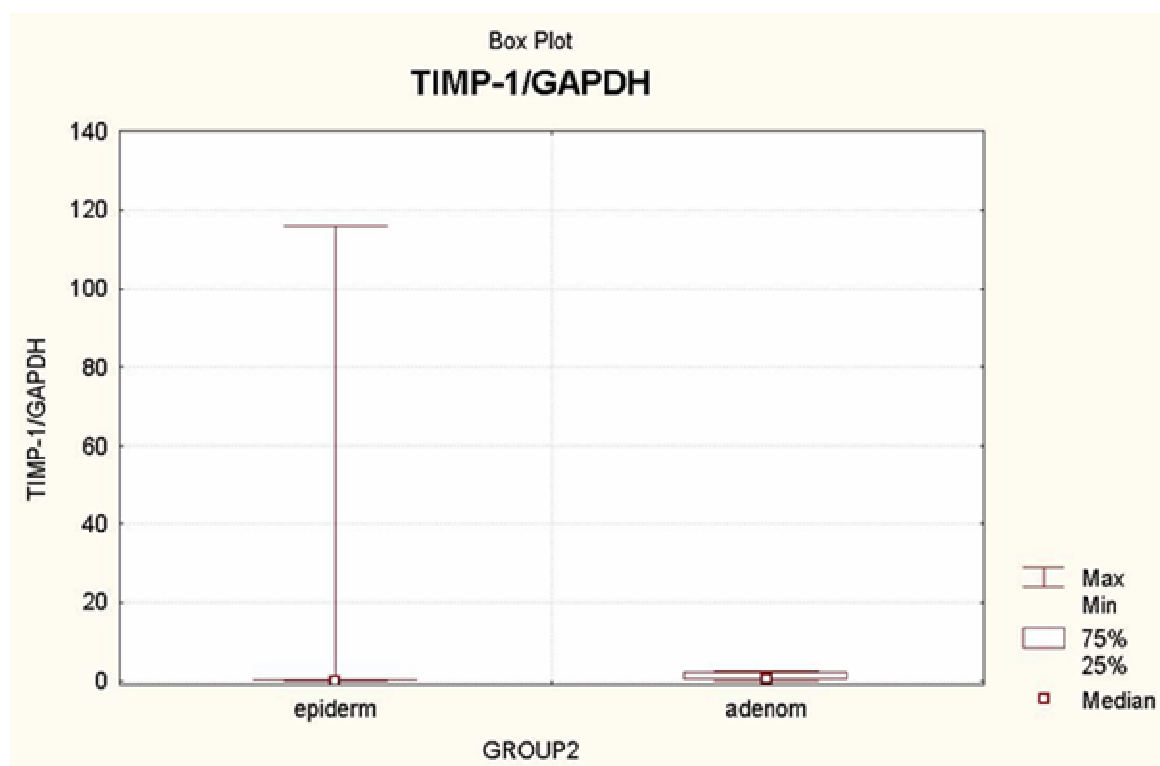
tabulka 14 : Median hodnot genové exprese MMP-7/GAPDH a TIMP-1/GAPDH

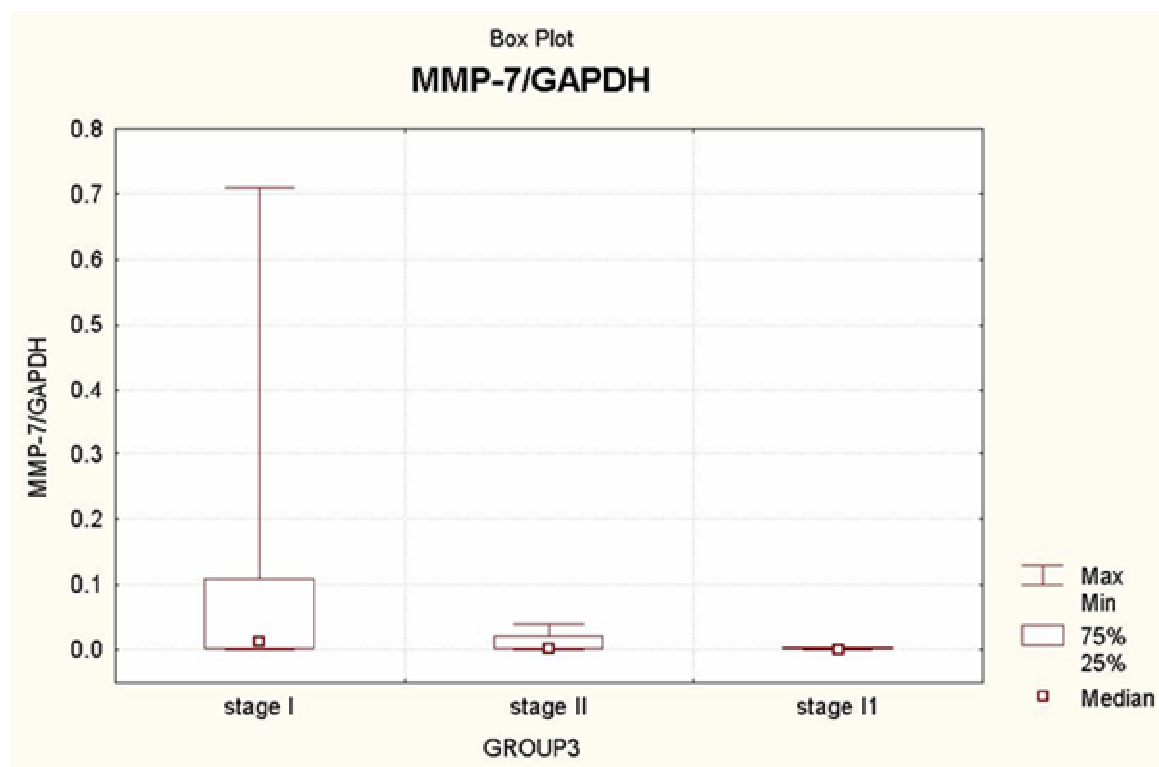
mRNA	nenádorová tkáň (n=20)	nádorová tkáň (n=20)
MMP-7/GAPDH	0,0001	0,0040
TIMP-1/GAPDH	0,0127	0,0018

obrázek 17: Expresa mRNA MMP-7 a TIMP-1 u histologických podskupin NSCLC (epidermoidní vs. adenokarcinom).

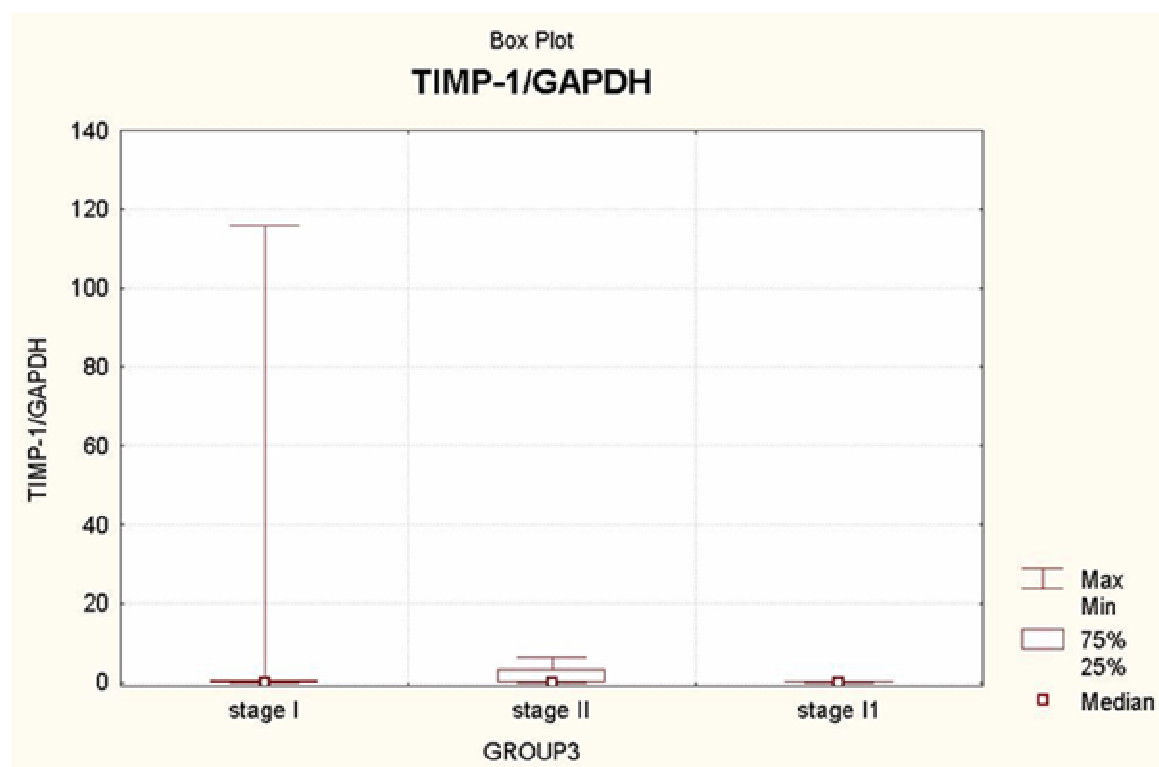


obrázek 18 : normalizovaná (poměrová k GAPDH) exprese MMP-7 v závislosti na stádiu (I-III) epidermoidní formy NSCLC.





obrázek 19 : normalizovaná (poměrová k GAPDH) exprese TIMP-1 v závislosti na stádiu (I-IIIa) epidermoidní formy NSCLC.



V tomto souboru jsme prokázali vyšší exprese mRNA MMP-7 přímo ve tkáni nádoru - NSCLC, než ve zdravé, nádorem nepostižené okolní plicní tkáni stejných pacientů. Naopak vyšší exprese mRNA TIMP-1 ve zdravé tkáni, než přímo ve tkáni postižení karcinomem - NSCLC. Exprese mRNA MMP-7 ani TIMP-1 nebyly statisticky rozdílné pokud jsme hodnotili samostatně podskupinu adenokarcinom vs. epidermoidní karcinom. V hodnocení závislosti exprese na stádiu onemocnění je patrný velký rozptyl získaných hodnot v prvních stádiích onemocnění, mediány hodnot byly však pro všechna obdobné, bez rozdílu mezi adenokarcinomem a epidermoidním karcinomem.

9.3 Diskuze

Naše výsledky jsou souhlasné s pracemi autorů Sasaki, Leinonen a Kawano, kteří rovněž prezentovali vyšší exprese MMP-7 ve tkáni nádoru, než v nenádorové tkáni, ovšem imunohistochemickým stanovením [117,118,119]. Současný stav poznatků v dané oblasti uznává roli, kterou v problematice růstu a progresu nádorového onemocnění hrají tkáňové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory (TIMPs) obecně [90]. V posledním období jsou práce prezentující tuto roli rovněž u bronchogenního karcinomu [120,121,122,123].

Naše výsledky především potvrzují vyvážené působení proteolytických enzymů a jejich inhibitorů, v našem případě MMP-7 a TIMP-1. Tedy, že proteolytický efekt metaloproteináz na bazální membrány zdravých buněk i intersticiální mezibuněčnou hmotu je inhibován do jisté míry a doby TIMPs. Zajímavou otázkou k dalšímu zkoumání je, zda hladina inhibitorů (TIMPs) je v nádorové tkáni též vyšší, než v okolní nenádorové tkáni. Tyto výsledky v menším souboru pacientů naznačily, že by tomu tak být mohlo [124]. Tyto výsledky snižuje fakt, že se jednalo o první studii, statisticky zatíženou možnou „chybou malých čísel“.

V následném zpracování většího souboru (viz kapitola 10) inverzní chování metaloproteináz a jejich inhibitorů (MMP-7 a TIMP-1) prokázáno nebylo. Vysvětlení se nabízí v teorii enzymatického „switch“. Tedy předpokladu inhibiční funkce TIMPs v počátečních stádiích růstu karcinomu a nárůstu exprese i okolní tkáni, který po dosažení určité velikosti a difference karcinomu je přepnut a dochází již ke ztrátě významu, resp. inhibičních schopností TIMPs. Inhibitory pak již nevykazují rozdílnou expresi v nádoru resp. mimo nádor. Tyto, tkáňové, výsledky byly narozdíl od sérových slibné, proto jsme v jejich odběru a hodnocení pokračovali i v dalším období a hodnotili ve větším souboru (viz kapitola 10).

10. Exprese metaloproteináz (MMP-7) a jejich inhibitorů (TIMP-1) v tkáni NSCLC vs. plicní tkáni pacientů s benigním onemocněním

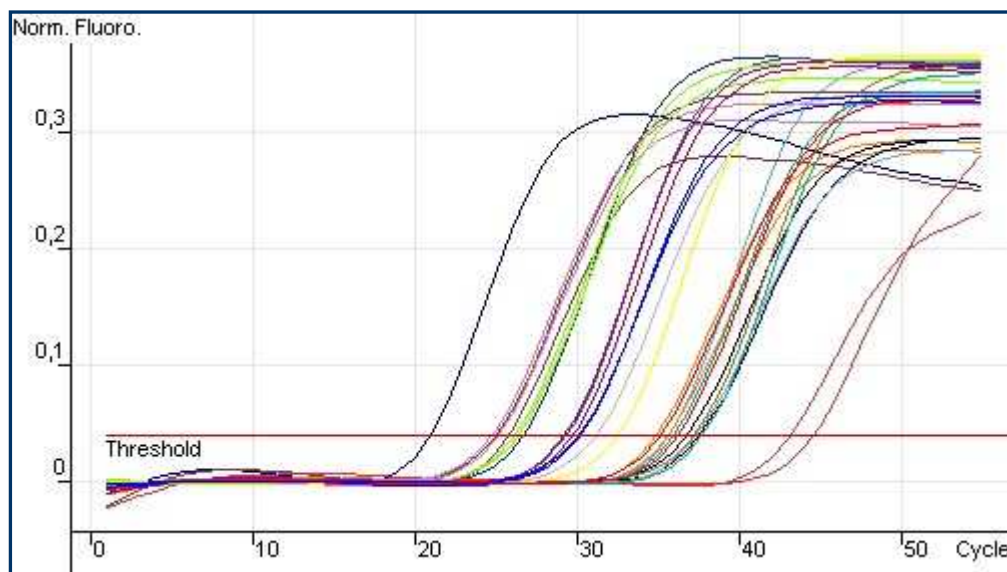
10.1 Cíl studie

Posouzení vztahu exprese mRNA MMP-7 a TIMP-1 ve tkáňových vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) pomocí RT real-time PCR k histologickému typu nádoru a stádiu onemocnění. Srovnání exprese ve vzorku karcinomu a okolní nenádorové plicní tkáni u stejného pacienta. Dále srovnání těchto expresí s expresí jiných pacientů s benigním plicním onemocněním.

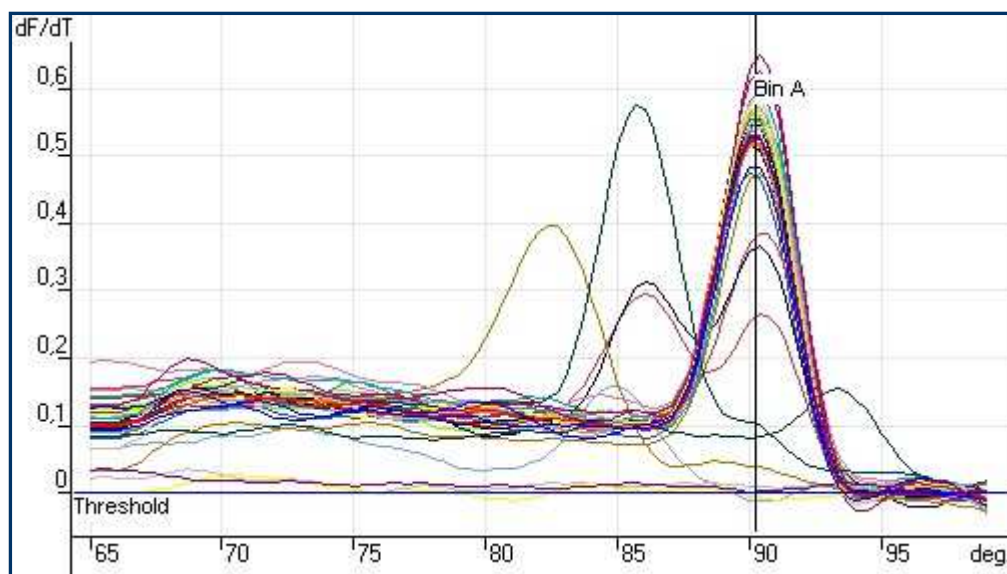
10.2 Metodika

K izolaci celkové RNA je dostačující odběr a uskladnění v zamražení (na -40°C) asi 100 mg tkáně. Ke stanovení celkové RNA pak stačí již cca 3 μg izolované celkové RNA (Superscript III Reverse Transcriptase, Life Technologies, USA; oligo d(T)21). Kvantifikace exprese mRNA MMP-7 a TIMP-1 a housekeeping genu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) byla provedena metodou RT real-time RT PCR. Fragменты získané PCR jsme vložili do vektoru pGEM (Promega Corporation, USA) a získali standardy o definovaném množství kopií. Interpretace výsledků : **Absolutní hodnoty** - kvantifikace byla provedena absolutně tj. počet kopií DNA, za použití klonovaných fragmentů jako standardů o známé koncentraci (počet kopií molekul / 3 μg RNA). **Normalizované hodnoty**- tytéž výsledky jsou uvedeny jako poměr exprese sledovaného genu a exprese tzv. housekeeping genu GAPDH (př. MMP-7/GAPDH). Příklad stanovení RT PCR exprese kopií (cDNA) genu TIMP-1 okazuje obrázek 20 a 21.

obrázek 20 : Záznamy PCR v reálném čase, stanovení cDNA genu TIMP-1



obrázek 21 : Teplotní křivka tání stanovení cDNA genu TIMP-1



10.3 Výsledky

Soubor pacientů činil 91 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) operovaných následně po sobě v letech 2006-2008, medián věku 62 let, (rozpětí 43-78 let). V zastoupení 66 mužů a 25 žen. Histologicky se jednalo ve 49 (54%) případech o epidermoidní karcinom, 36 (39%) o adenokarcinom a 6 (7%) ostatní. Zastoupení pacientů v souboru dle stádií ukazuje tabulka 15.

Tabulka 15 : Zastoupení pacientů v souboru dle stádií

stádium NSCLC	n (%)
IA	17 (19%)
IB	34 (39%)
IIA	4 (5%)
IIB	13 (15%)
IIIA	13 (15%)
IIIB	6 (7%)

Kontrolní skupinu tvořilo 12 pacientů operovaných pro benigní onemocnění (bulózní emfyzém) či chirurgicky biopsovaných pro intersticiální plicní proces nebo TBC.

Získané výsledky prezentují následující skupina tabulek 16 (celkem 16) a obrázky-grafy 22-25.

skupina tabulek 16 : nomarlizované a absolutní exprese MMP-7 a TIMP-1.

mRNA (absolutní hodnoty)	tkáň NSCLC (medián), n=91	nenádorová tkáň (medián), n=91	Wilcoxon Two-Sample Test, p-value
MMP-7	15543	4465	0,0003
TIMP-1	817982	201229	0,0018

mRNA (norm. hodnoty)	tkáň NSCLC (medián), n=91	nenádorová tkáň (medián), n=91	Wilcoxon Two-Sample Test, p-value
MMP-7	0,6787	0,1678	0,0002
TIMP-1	15,5793	4,7346	0,0099

mRNA (absolutní hodnoty)	tkáň NSCLC - epidermoidní (medián), n=49	nenádorová tkáň (medián), n=49	Wilcoxon Two-Sample Test, p-value
MMP-7	15543	4883	0,0198
TIMP-1	817982	178449	0,0366

mRNA (norm. hodnoty)	tkáň NSCLC - epiermoidní (medián), n=49	nenádorová tkáň (medián), n=49	Wilcoxon Two-Sample Test, p-value
MMP-7	0,1165	0,5694	0,0182
TIMP-1	7,5468	1,6799	0,2238

mRNA (absolutní hodnoty)	tkáň NSCLC - adenokarcinom (medián), n=36	nenádorová tkáň (medián), n=36	Wilcoxon Two-Sample Test, p-value
MMP-7	68815	3501	0,0046
TIMP-1	1482930	209354	0,0140

mRNA (norm. hodnoty)	tkáň NSCLC - adenokarcinom (medián), n=36	nenádorová tkáň (medián), n=36	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	0,0535	1,9618	0,0023
TIMP-1	4,0803	35,9028	0,0120

mRNA (absolutní hodnoty)	tkáň NSCLC – st. IA (medián), n=17	tkáň NSCLC – ostatní stádia (medián), n=74	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	5780	21726	0,4765
TIMP-1	966901	783252	0,6498

mRNA (norm. hodnoty)	tkáň NSCLC – st. IA (medián), n=17	tkáň NSCLC – ostatní stádia (medián), n=74	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	0,2288	0,6841	0,6034
TIMP-1	5,6409	16,2943	0,9957

mRNA (absolutní hodnoty)	NSCLC (medián), n=91	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	15543,00	2379,50	0,0086
TIMP-1	817981,75	276736,75	0,3440

mRNA (norm. hodnoty)	NSCLC (medián), n=91	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	0,6787165	0,0510184	0,0147
TIMP-1	15,5793620	12,4466469	0,8818

mRNA (absolutní hodnoty)	NSCLC epiderm (medián), n=49	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	15543,00	2379,50	0,0171
TIMP-1	817981,75	276736,75	0,3920

mRNA (norm. hodnoty)	NSCLC epiderm (medián), n=49	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	0,5693968	0,0510184	0,0411
TIMP-1	11,4482146	12,4466469	1,0000

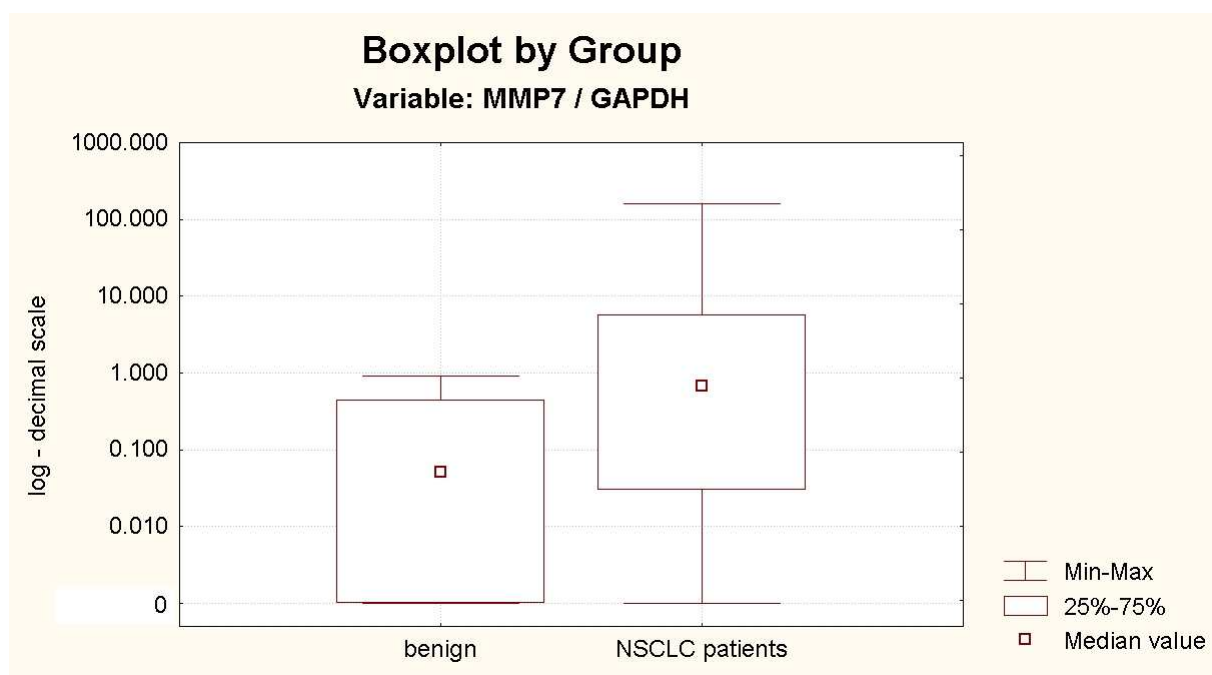
mRNA (absolutní hodnoty)	NSCLC adeno (medián) n=36	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	68814,50	2379,50	0,0135
TIMP-1	1482930,25	276736,75	0,3163

mRNA (norm. hodnoty)	NSCLC adeno (medián) n=36	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	1,9617845	0,0510184	0,0112
TIMP-1	35,9028221	12,4466469	0,5781

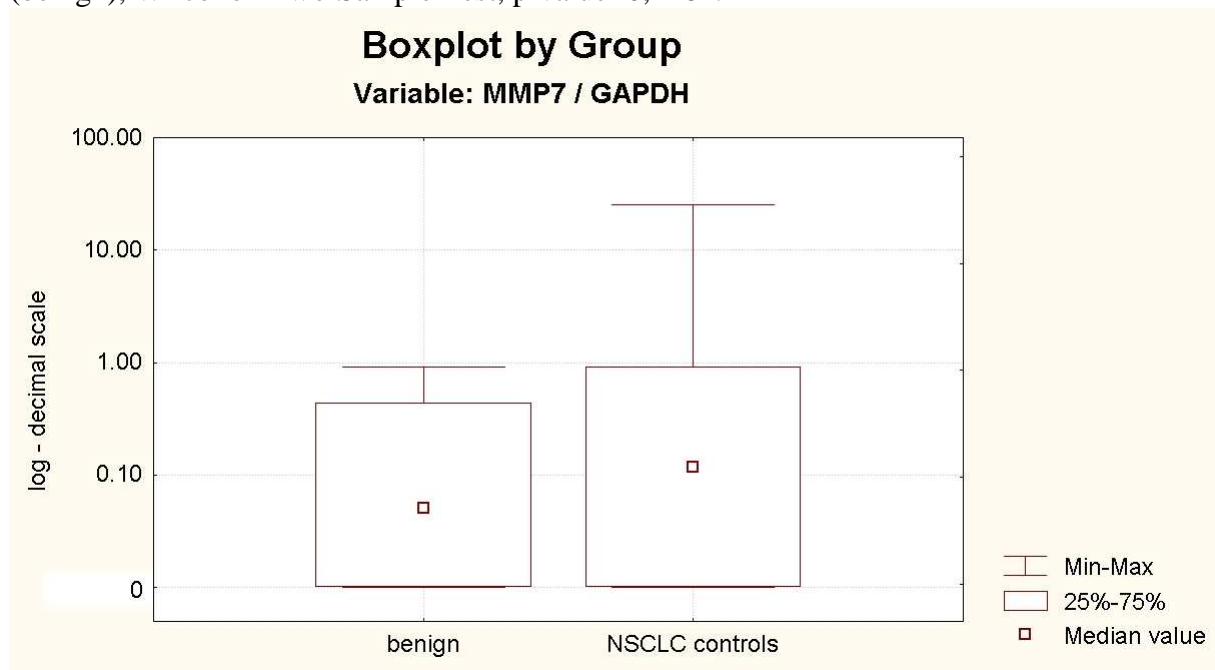
mRNA (absolutní hodnoty)	NSCLC kontrolní tkáň (medián) n=90	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	4464,50	2379,50	0,2164
TIMP-1	201228,75	276736,75	0,4150

mRNA (norm. hodnoty)	NSCLC kontrolní tkáň (medián) n=90	benigní onemocnění (medián), n=12	Wilcoxon Two- Sample Test, p-value
MMP-7	0,1177772	0,0510184	0,5722
TIMP-1	4,7345693	12,4466469	0,2576

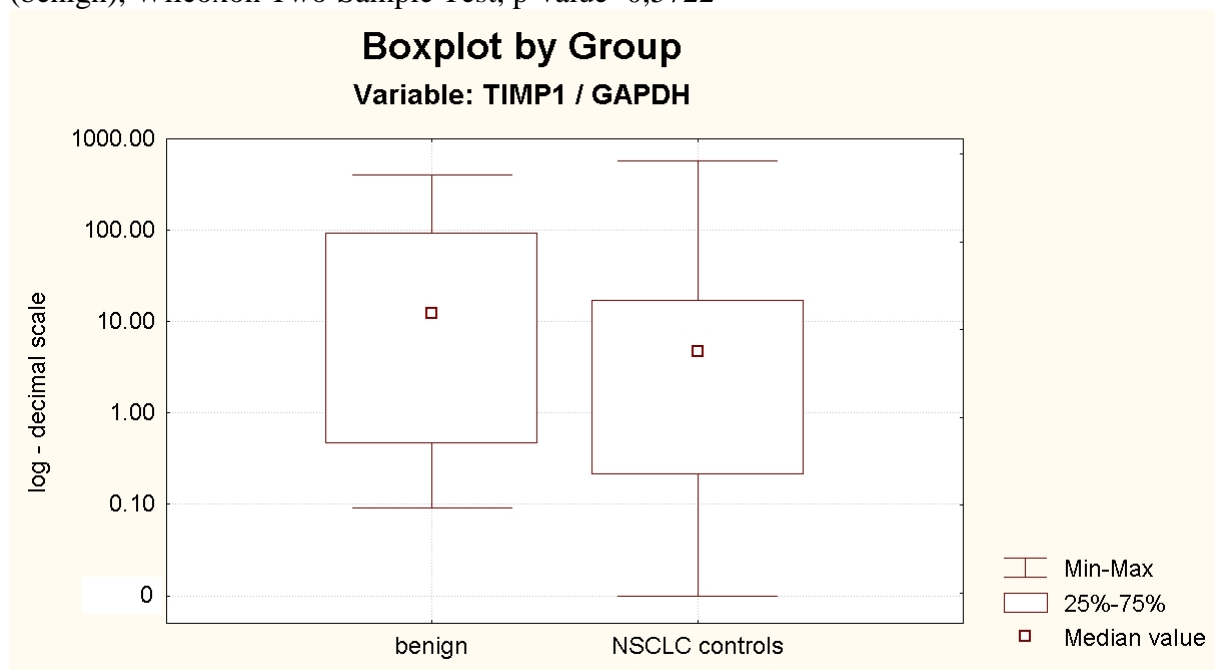
obrázek 22 : srovnání exprese normalizovaných hodnot MMP-7 v nádorové tkáni (NSCLC patients) a tkáni jiných pacientů s benigním onemocněním plic (benign), Wilcoxon Two-Sample Test, p-value=0,0147.



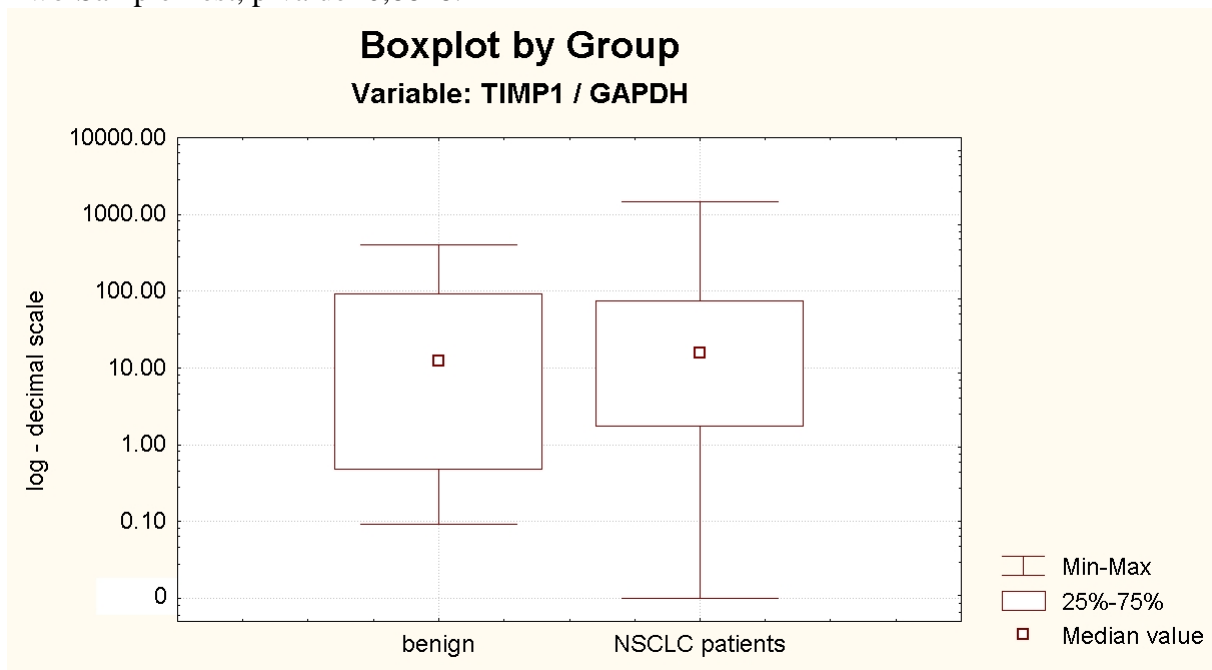
obrázek 23 : srovnání exprese normalizovaných hodnot MMP-7 v nenádorové plicní tkáni pacientů s NSCLC (NSCLC controls) a jiných pacientů s benigním onemocněním plic (benign), Wilcoxon Two-Sample Test, p-value=0,2164.



obrázek 24: srovnání exprese normalizovaných hodnot TIMP-1 v nenádorové tkáni pacientů s NSCLC (NSCLC controls) a jiných pacientů s benigním plicním onemocněním (benign), Wilcoxon Two-Sample Test, p-value=0,5722



obrázek 25 : srovnání exprese normalizovaných hodnot TIMP-1 přímo v nádorové tkáni (NSCLC patients) a jiných pacientů s benigním plicním onemocněním (benign), Wilcoxon Two-Sample Test, p-value=0,8818.



10.4 Závěry

Prokázali jsme statisticky signifikantně vyšší expresi MMP-7 a TIMP-1 v nádorové tkáni NSCLC celkově i jednotlivě v histologických podskupinách (epidermoidní Ca vs. adenokarcinom) oproti kontrolní nenádorové plicní tkáni u stejných pacientů.

Neprokázali jsme vztah mezi stádiem onemocnění Ia vs. ostatní pokročilejší stádia (Ib-IIIb).

Prokázali jsme signifikantně vyšší expresi MMP-7 v nádorové tkáni NSCLC oproti plicní tkáni nemocných s benigním plicním onemocněním. Naopak rozdíl v expresi TIMP-1 ve tkáni nádoru a benigní plicní tkáni nebyl prokázán.

Tyto výsledky dokazují významnou roli MMP-7 působících především v nádorové tkáni, potvrzující jejich buněčně destrukční funkci ve tkáni NSCLC. Naopak inhibitory metaloproteináz (TIMP-1) lze vysledovat se srovnatelnou expresí jak ve tkáni karcinomu, tak tkáni benigní. To potvrzuje jejich inhibiční funkci v benigní tkáni, která postupně (s mírou progresu tumoru) vymizí pokud je plicní tkáň postižena karcinomem. Pak dochází též ke zvýšení exprese TIMP-1 (viz srovnání exprese v tkáni nádoru a okolní tkáni u stejných pacientů).

11. Hodnocení celkového a bezpříznakového přežití dle tkáňové exprese metaloproteináz a jejich inhibitorů

11.1 Úvod a metodika

Závěrečným hodnocením navrženého tématu práce bylo zpracování celkového a bezpříznakového přežití v závislosti na tkáňové expresi metaloproteináz a jejich inhibitorů. To bylo provedeno v jednotlivých histologických podskupinách NSCLC. Z celkového souboru odebraných tkání byly odstraněny vzorky pacientů s benigními diagnózami a těch, kteří zemřeli na jinou příčinu než progresi NSCLC. Zpracovávali jsme pouze vzorky tkáně s karcinomem, nikoli kontrolní nenádorové tkáně. Při stanovení celkového přežití OS (overall survival) jsme jako hodnocenou událost zaznamenávali smrt z důvodů NSCLC. Smrt z jiných příčin, či stávající přežívání ač s generalizací nebylo hodnoceno jako pozitivní událost. Při stanovení bezpříznakového přežívání, DFI (disease free interval), jsme jako pozitivní událost zaznamenávali jakékoli přežití pacienta bez známek projevu NSCLC, jeho recidivy, generalizace, či úmrtí z důvodu NSCLC. Do této analýzy vstoupili pouze pacienti, kteří byli operováni v období let 2005-2007, tedy alespoň 6 měsíců od uzávěru databáze tak, aby byl soubor statisticky hodnotitelný.

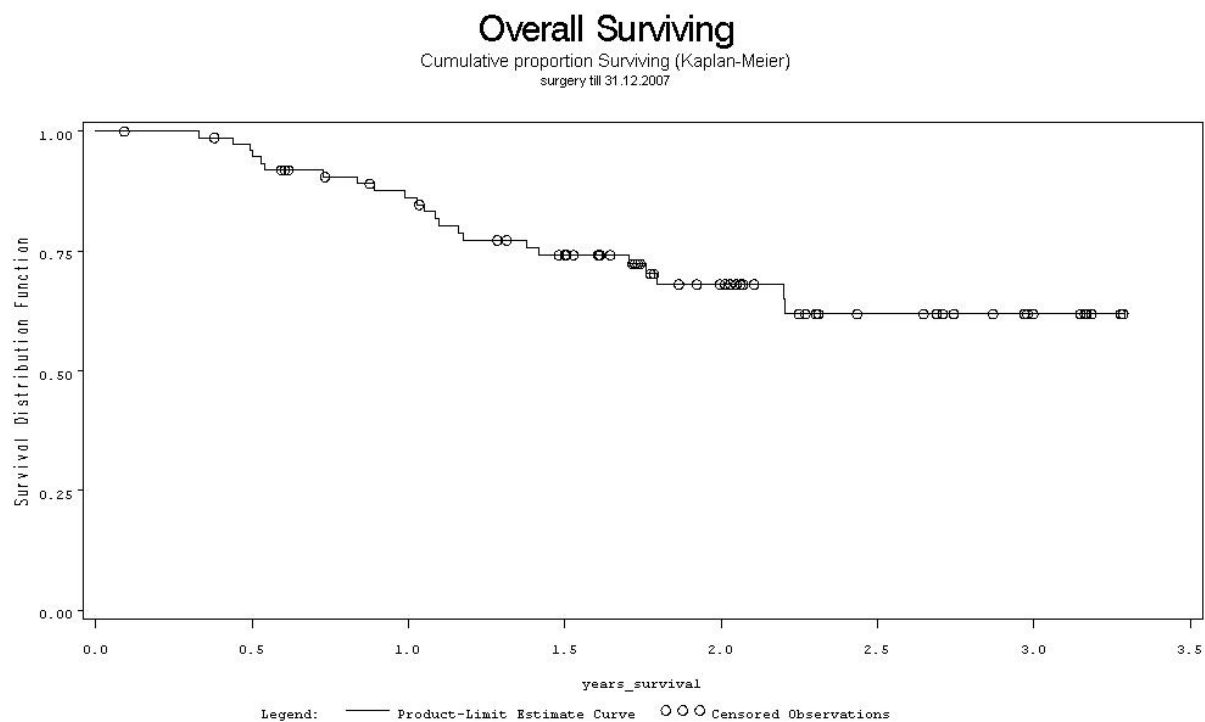
11.2 Výsledky

Celkem v souboru bylo takto vyšetřeno 76 pacientů, 44 (57.89%) s epidermoidním karcinomem, 28 (36.84%) s adenokarcinomem a 4 (5.26%) ostatní formy NSCLC (2x velkobuněčný typ, 1x adenosquamozní a 1x nediferencovaná forma NSCLC).

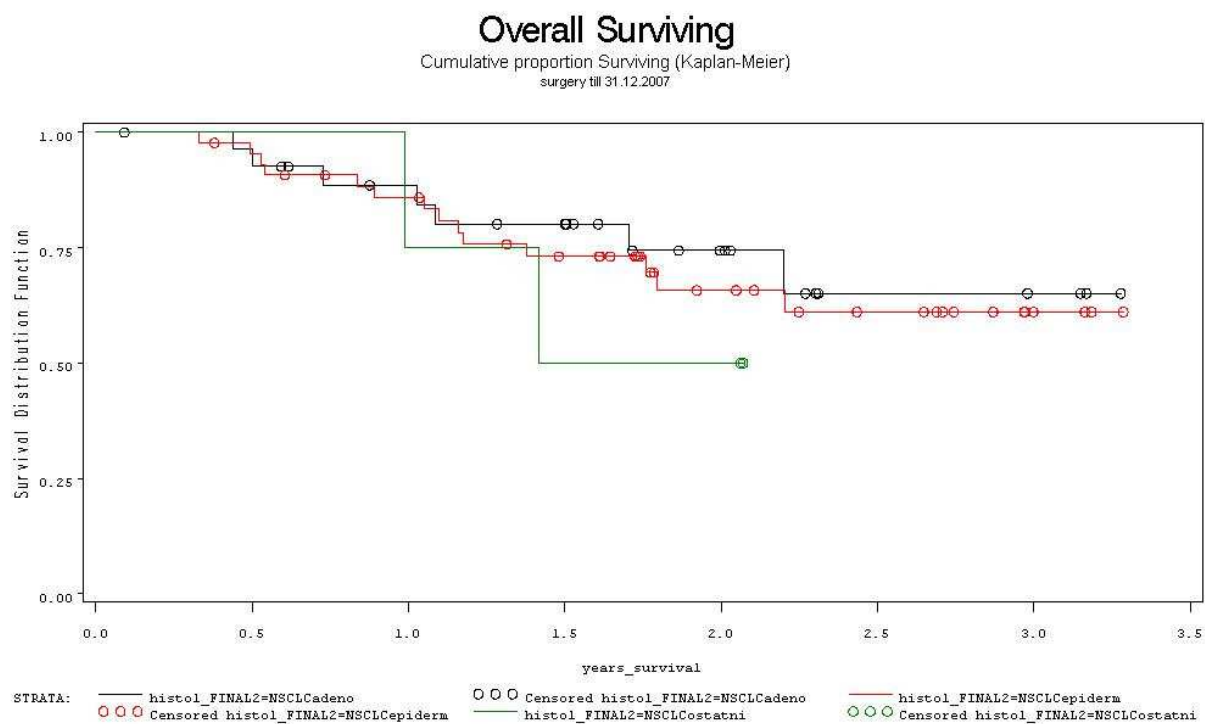
Medián sledování všech pacientů celkově činil 1,72 roku. Pro epidermoidní formu NSCLC medián sledování činil 1,74 roku, pro adenokarcinom medián sledování činil 1,65 roku. Medián přežití nebylo možné stanovit, protože v daném sledovaném období nezemřelo více jak 50 % nemocných. Celkové přežití ve skupině 76 pacientů, za období sledování 3,5 roku bylo 69.74 %. Zemřelo tedy 23 pacientů. V histologické podskupině adenokarcinomu z 28 pacientů zemřelo 7, přežití je tedy 75,00 % . V podskupině s epidermoidním karcinomem z 44 zemřelo 14, přežití tak činí 68,18 %.

11.2.1 Celkové přežití (OS), grafy

obrázek 26 : graf celkového přežití (OS) všech pacientů ve skupině NSCLC.



obrázek 27 : graf celkového přežití pacientů podle histologického typu

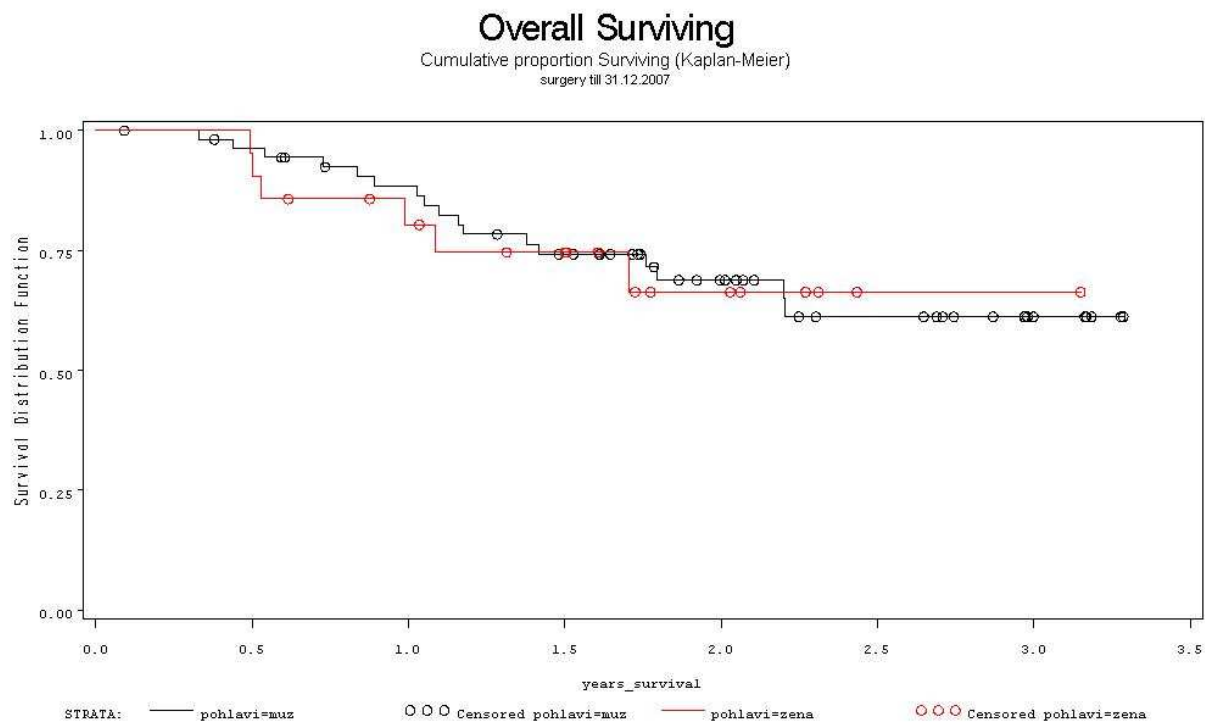


Testy shody celkového přežití pacientů podle histologického typu :

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,7065	2	0,7024
Wilcoxon	0,5280	2	0,7680

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

obrázek 29 : graf celkového přežití v závislosti na pohlaví – celá skupina NSCLC.

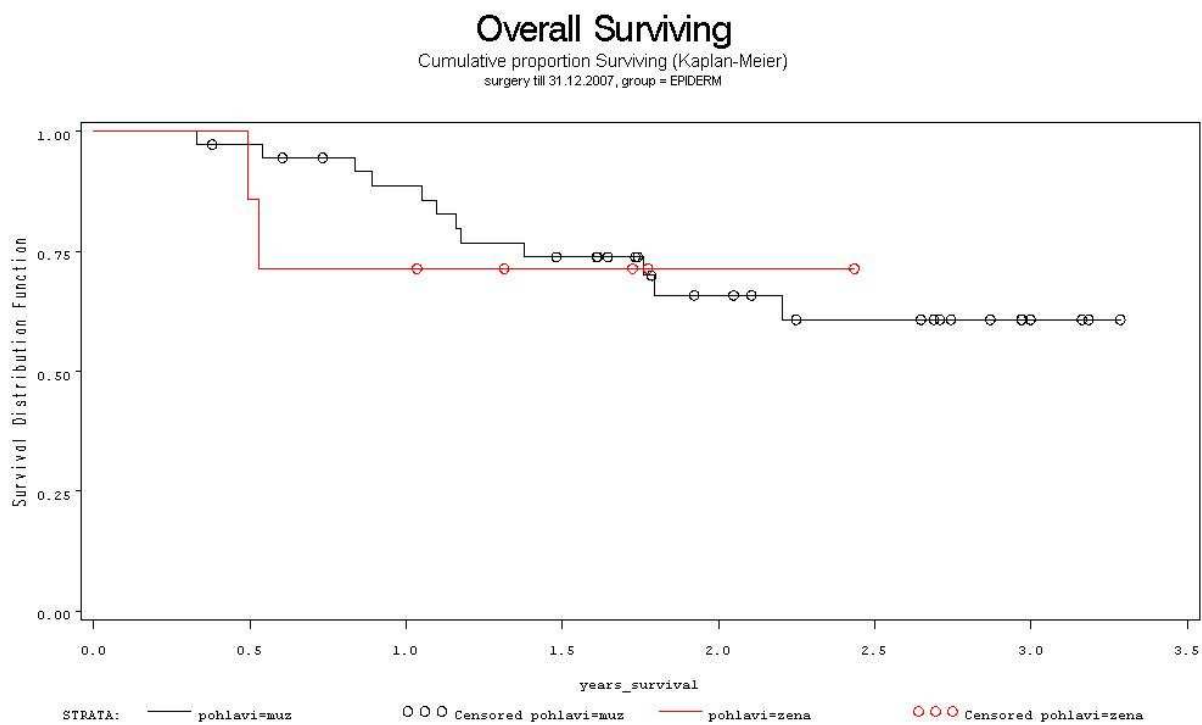


Testy shody celkového přežití v závislosti na pohlaví - celkově

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,0247	1	0,8750
Wilcoxon	0,1540	1	0,6948

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

obrázek 30 : graf celkového přežití v závislosti na pohlaví – ve skupině epidermoidní forma NSCLC

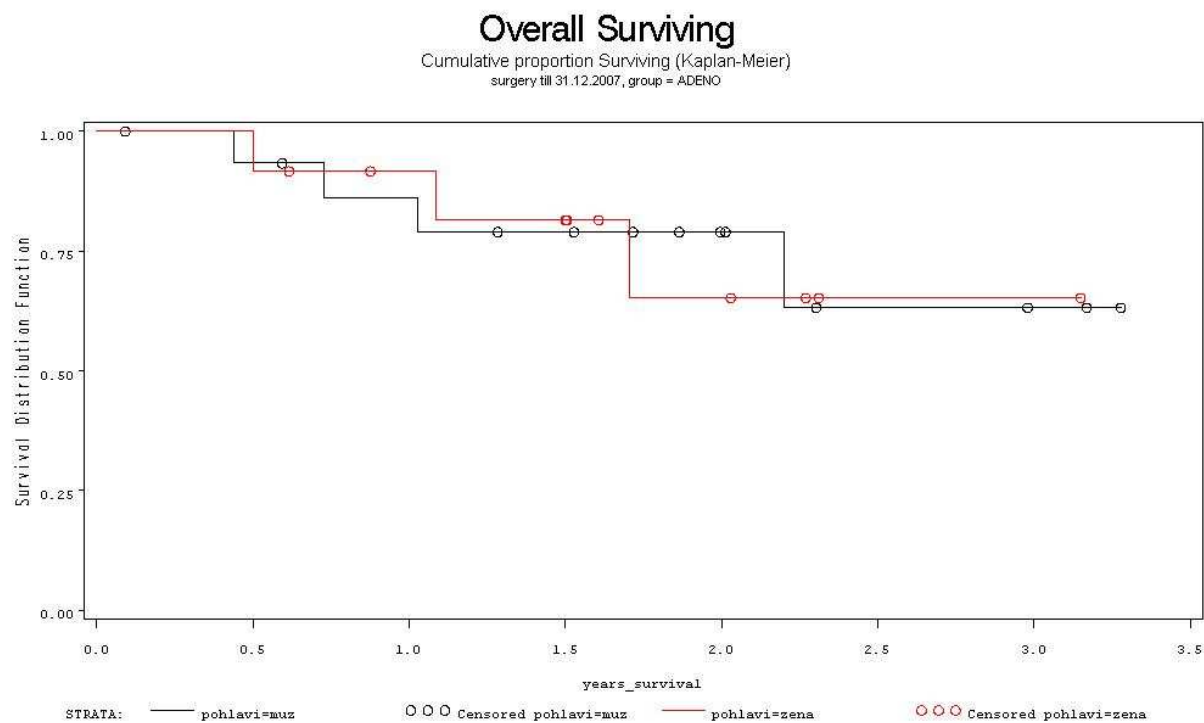


testy shody celkového přežití v závislosti na pohlaví – ve skupině epidermoidní forma NSCLC.

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,0654	1	0,7982
Wilcoxon	0,3461	1	0,5563

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

obrázek 31 : celkové přežití v závislosti na pohlaví ve skupině adenokarcinom



Testy shody celkového přežití v závislosti na pohlaví ve skupině adenokarcinom

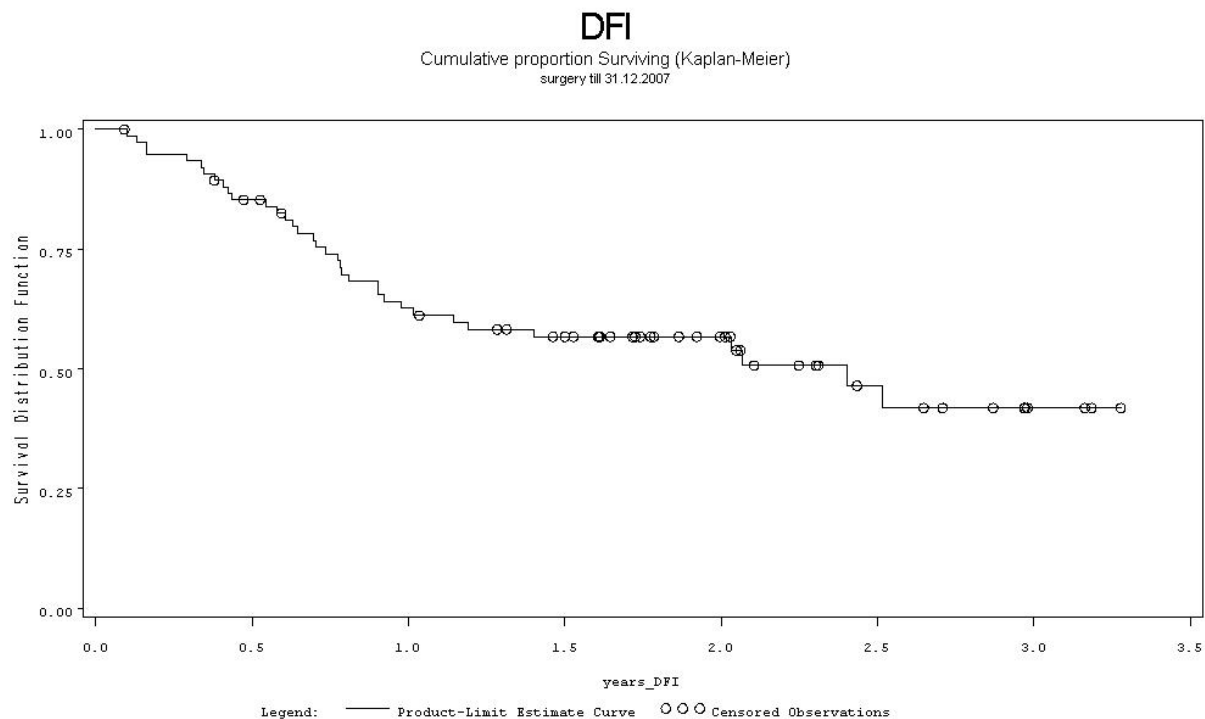
Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,0014	1	0,9703
Wilcoxon	0,0000	1	1,0000

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

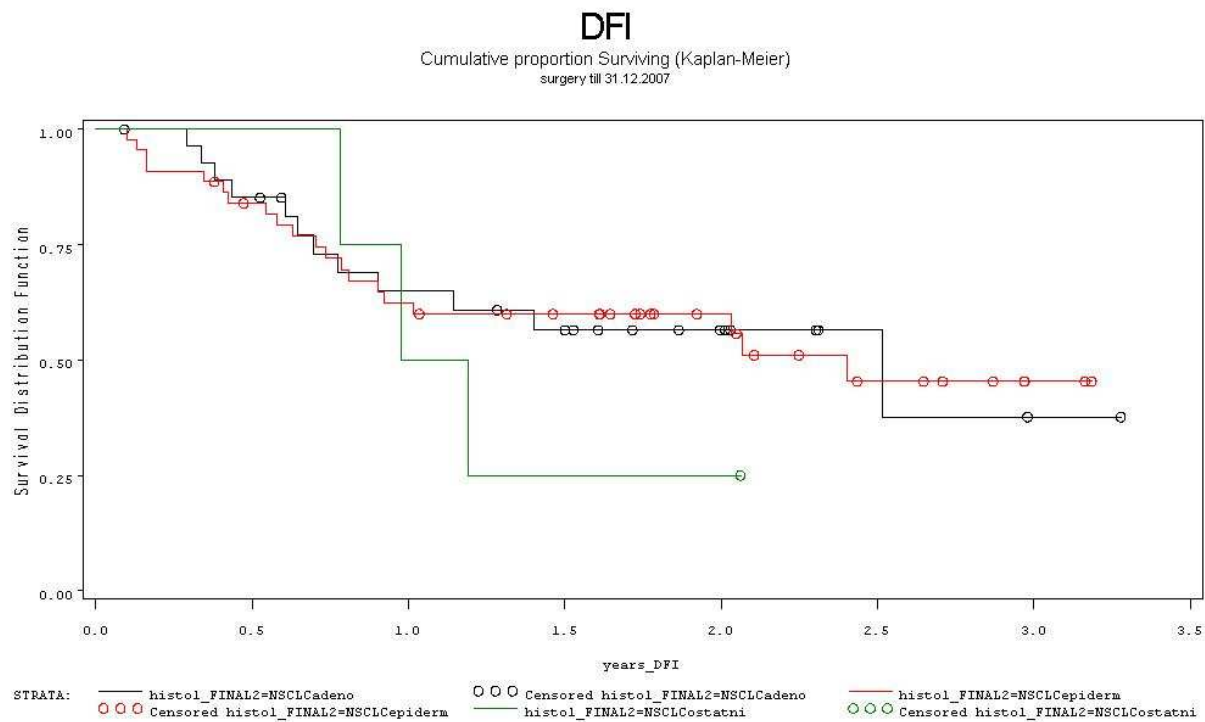
11.2.2 Bezpříznakové přežití (DFI), grafy

V celé skupině NSCLC. Z celku 76 pacientů 41 (53,95 %).

obrázek 32 : graf DFI v celé skupině NSCLC.



obrázek 33: graf DFI podle histologického typu NSCLC.



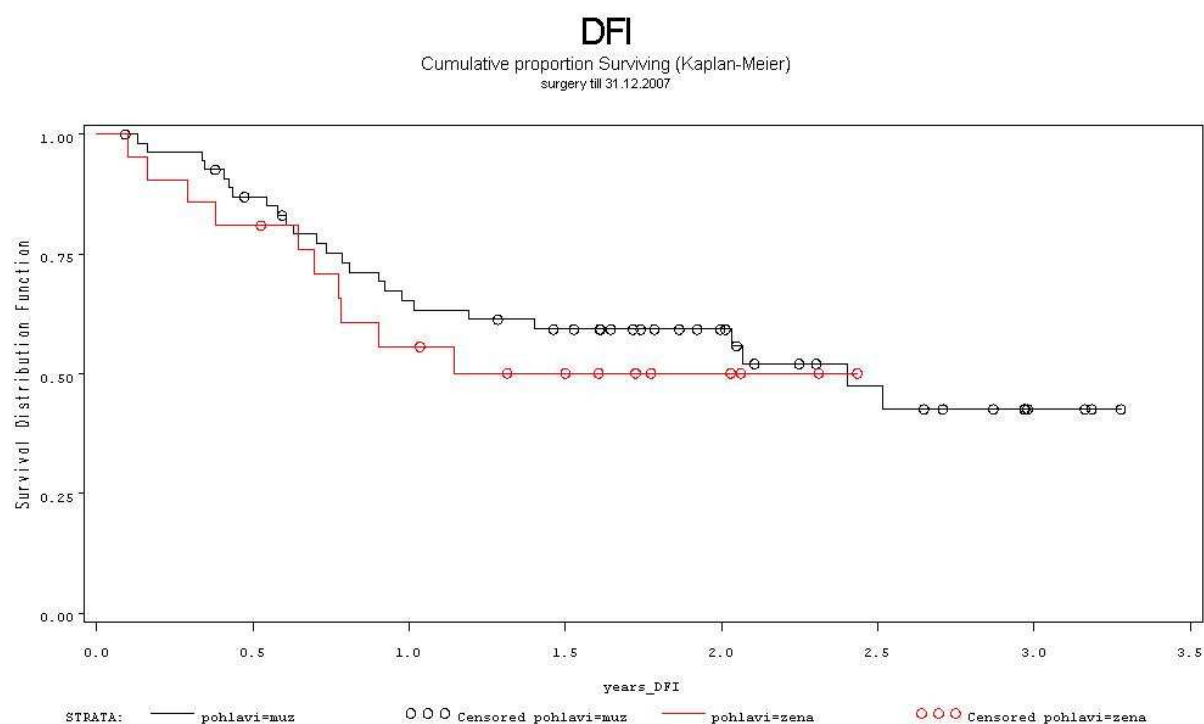
Bezpříznakově přežívá ve skupině epidermoidního karcinomu 24 (54,55 %) pacientů z 44, ve skupině adenokarcinomu 16 (57,14 %) z 28 a ve skupině ostatních forem NSCLC 1 (25,00 %) ze 4.

Testování shody DFI skupiny NSCLC celkově dle histologického typu

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,7065	2	0,7024
Wilcoxon	0,5280	2	0,7680

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

obrázek 34 : graf DFI ve skupině NSCLC celkově v závislosti na pohlaví.

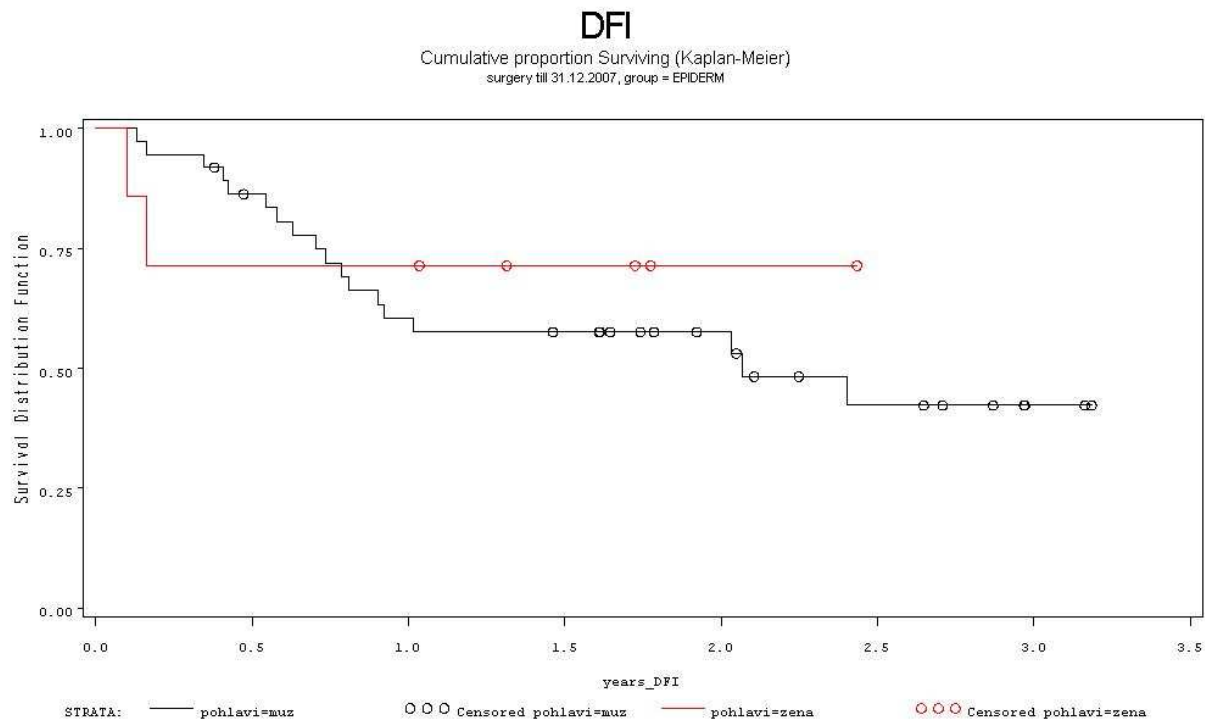


Testování shody DFI skupiny NSCLC celkově, dle pohlaví

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,4392	1	0,5075
Wilcoxon	0,7413	1	0,3892

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

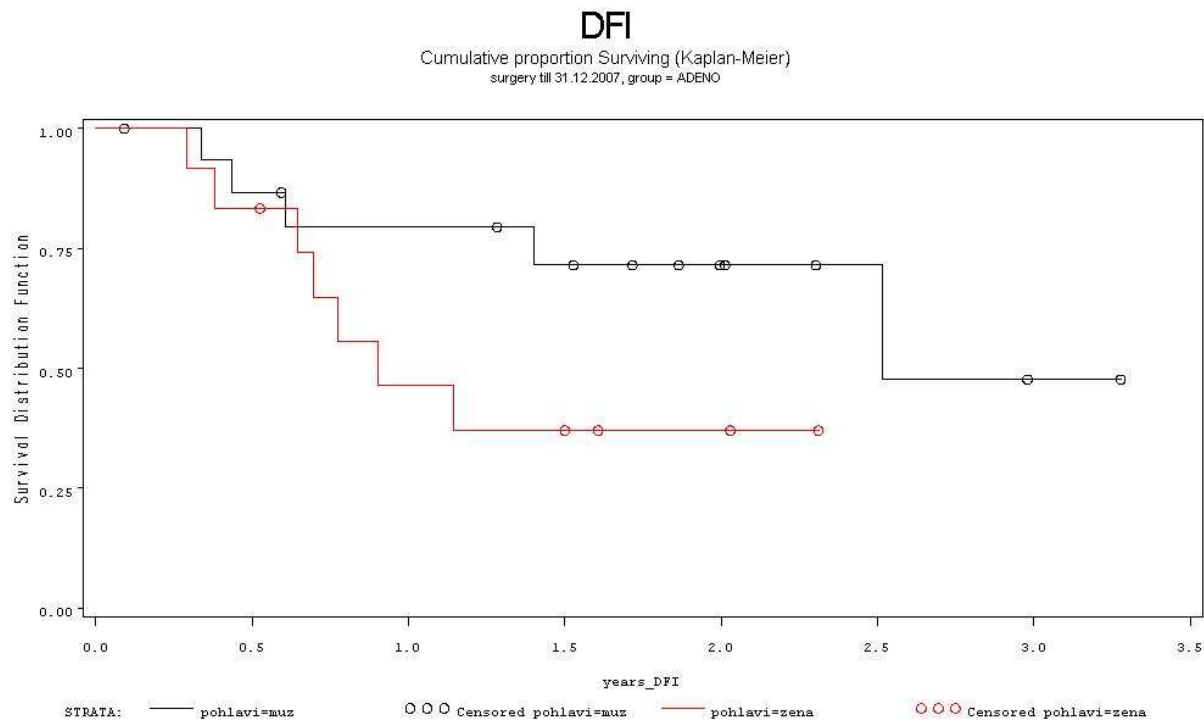
obrázek 35 : graf DFI v podskupině epidermodní karcinom NSCLC, v závislosti na pohlaví.



Testování shody v podskupině epidermodní karcinom NSCLC, dle pohlaví.

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,0654	1	0,7982
Wilcoxon	0,3461	1	0,5563

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

obrázek 36 : DFI v podskupině adenokarcinom NSCLC, v závislosti na pohlaví.

Testování shody v podskupině adenokarcinom NSCLC, dle pohlaví.

Test	χ^2	DF	χ^2 , p-value
Log-Rank	0,0014	1	0,9703
Wilcoxon	0,0000	1	1,0000

nebylo prokázáno, že by se přežití lišilo mezi výše uvedenými skupinami

11.2.3 Výsledky OS a DFI

tabulka 17 : výsledky hodnot počtu expresí uvedených markerů absolutně a normalizovaně (norm) ve vztahu k expresi genu GAPDH ve skupině NSCLC celkově.

marker celkově	n	chybějící	minimum	maximum	průměr	median
MMP-7	76	0	0	18274758,00	963533,95	11271,75
normMMP-7	76	0	0	159,6467022	8,2278295	0,5424238
TIMP-1	75	1	0	59798789,00	5240812,84	783252,50
normTIMP-1	76	0	0	1446,25	78,8237128	16,2943387
MMP-9	76	0	0	115186698	4341507,01	20769,75
normMMP-9	76	0	0	1980,43	46,1878352	0,4920193
TIMP-2	76	0	0	10874,50	644,2236842	135,7500000
normTIMP-2	76	0	0	0,0684263	0,0079924	0,0022591

tabulka 18 : výsledky hodnot počtu expresí uvedených markerů absolutně a normalizovaně (norm) ve vztahu k expresi genu GAPDH v podskupině epidermoidní karcinom.

marker epiderm	n	chybění	minimum	maximum	průměr	median
MMP-7	44	0	0	11179112,50	841581,14	10264,75
normMMP-7	44	0	0	74,0961769	4,4324287	0,4529056
TIMP-1	43	1	0	45675105,50	5377418,40	712008,00
normTIMP-1	44	0	0	527,7873106	51,6128222	4,5945113
MMP-9	44	0	0	115186698	6560546,45	115186698
normMMP-9	44	0	0	1980,43	61,2719663	0,4281388
TIMP-2	44	0	0	10874,50	738,5000000	165,0000000
normTIMP-2	44	0	0	0,0684263	0,0075764	0,0017357

tabulka 19 : výsledky hodnot počtu expresí uvedených markerů absolutně a normalizovaně (norm) ve vztahu k expresi genu GAPDH v podskupině adenokarcinom.

marker adeno	n	chybění	minimum	maximum	průměr	median
MMP-7	28	0	0	18274758,00	1232673,00	68814,50
normMMP-7	28	0	0	159,6467022	15,0485710	1,9617845
TIMP-1	28	0	0	59798789,00	5700132,48	2370741,00
normTIMP-1	28	0	0	1446,25	132,2075427	64,2682620
MMP-9	28	0	0	15750370,00	1195367,41	63073,00
normMMP-9	28	0	0	227,0420760	27,6757538	1,5573079
TIMP-2	28	0	0	4239,00	451,3571429	142,5000000
normTIMP-2	28	0	0	0,0549877	0,0091076	0,0057189

11.2.4 Výsledky stanovení ideální cut off

Hledání vhodného markeru pro hodnocení sledovaného souboru pomocí ideální cut off. Tou je nejmenší možná (nalezená) hodnota daného markeru vzhledem ke zkoumanému výsledku (celkové/bezpříznakové přežití), při které je již statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami pod/nad hodnotou cut off daného markeru (parametru). Výsledky jsou prezentovány v následujících tabulkách 20-25 výpočtem p-value pro jednotlivé decily celkového rozpětí hodnot expresí pro jednotlivé markery (výpočet viz kapitola 5.4.2). Následně pak hodnoceno ještě p-value – univaričním Coxovým regresním modelem.

tabulka 20 : hodnoty p-value (univariační Coxův regresní model) decilů absolutních a normalizovaných (norm) hodnot expresí uvedených markerů při hledání optimální cut off celkového přežití (**OS**) ve skupině NSCLC celkově. Tučně případně vyznačeny hodnoty statisticky významné (<0,05)

hodnocený marker	p-value pro jednotlivé decily									p-value – univariační Coxův regresní model
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
MMP-7	n	n	0,9604	0,7203	0,6013	0,3402	0,7731	0,7523	0,6478	0,5057
norm.MMP-7	n	n	0,8420	0,2163	0,9435	0,9744	0,6324	0,9949	0,8063	0,4314
MMP-9	n	n	0,9281	0,8213	0,8384	0,9387	0,3783	0,5521	0,7605	0,7819
norm.MMP-9	n	n	0,8850	0,4786	0,2003	0,3571	0,7428	0,9675	0,4024	0,1008
TIMP-1	n	0,1311	0,5430	0,5659	0,9695	0,4988	0,5510	0,2923	0,4123	0,6443
norm.TIMP-1	n	0,2178	0,4674	0,7049	0,9621	0,9125	0,8244	0,8316	0,6160	0,6026
TIMP-2	n	n	n	0,8381	0,6824	0,3242	0,9388	0,5039	0,1582	0,1458
norm.TIMP-2	n	n	n	0,7416	0,8499	0,6236	0,8558	0,8059	0,8755	0,6895

tabulka 21 : hodnoty p-value (univariační Coxův regresní model) decilů absolutních a normalizovaných (norm) hodnot expresí uvedených markerů při hledání optimální cut off bezpříznakového přežití (**DFI**) ve skupině NSCLC celkově. Tučně případně vyznačeny hodnoty statisticky významné (<0,05)

hodnocený marker	p-value pro jednotlivé decily									p-value – univariační Coxův regresní model
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
MMP-7	n	n	0,9242	0,7271	0,8517	0,7719	0,8274	0,6948	0,8364	0,4906
norm.MMP-7	n	n	0,7154	0,4842	0,3353	0,4515	0,4702	0,8131	0,7214	0,5126
MMP-9	n	n	0,9535	0,7314	0,6180	0,5425	0,8487	0,8450	0,9778	0,7767
norm.MMP-9	n	n	0,9076	0,4432	0,2665	0,0967	0,5892	0,8299	0,7332	0,5773
TIMP-1	n	0,7145	0,6270	0,4629	0,6627	0,9420	0,1796	0,0806	0,3955	0,7636
norm.TIMP-1	n	0,6819	0,6456	0,7712	0,7290	0,6095	0,5716	0,6609	0,6920	0,5472
TIMP-2	n	n	n	0,3015	0,1878	0,9181	0,9252	0,6364	0,1983	0,0433
norm.TIMP-2	n	n	n	0,3231	0,3863	0,5741	0,6934	0,7100	0,7103	0,4770

tabulka 22 : hodnoty p-value (univariační Coxův regresní model) decilů absolutních a normalizovaných (norm) hodnot expresí uvedených markerů při hledání optimální cut off celkového přežití (**OS**) v **podskupině epidermoidní karcinom**. Tučně případně vyznačeny hodnoty statisticky významné (<0,05).

hodnocený marker	p-value pro jednotlivé decily									p-value – univariační Coxův regresní model
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
MMP-7	n	n	0,2443	0,5333	0,2735	0,4119	0,2822	0,4015	0,6550	0,8425
norm.MMP-7	n	n	0,2443	0,0612	0,8684	0,8049	0,8468	0,4574	0,0719	0,7793
MMP-9	n	n	0,1059	0,1165	0,7149	0,5806	0,2526	0,3865	0,5725	0,8133
norm.MMP-9	n	n	0,1059	0,1663	0,7595	0,4388	0,5386	0,5322	0,6527	0,1001
TIMP-1	0,6143	0,6206	0,5659	0,1758	0,2156	0,1302	0,1583	0,4313	0,1610	0,0766
norm.TIMP-1	0,5596	0,6628	0,5551	0,6384	0,4777	0,2581	0,0381	0,4280	0,2913	0,4830
TIMP-2	n	n	n	0,2246	0,2941	0,6516	0,2145	0,1860	0,1628	0,1189
norm.TIMP-2	n	n	n	0,2297	0,6410	0,2670	0,5060	0,6194	0,1147	0,1431

tabulka 23: hodnoty p-value (univariační Coxův regresní model) decilů absolutních a normalizovaných (norm) hodnot expresí uvedených markerů při hledání optimální cut off bezpříznakového přežití (**DFI**) v **podskupině epidermoidní karcinom**. Tučně případně vyznačeny hodnoty statisticky významné (<0,05).

hodnocený marker	p-value pro jednotlivé decily									p-value – univariační Coxův regresní model
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
MMP-7	n	0,1273	0,3291	0,6881	0,8561	0,4897	0,4706	0,6838	0,2913	0,0680
norm.MMP-7	n	0,1273	0,3291	0,9729	0,5252	0,8475	0,9156	0,9448	0,8282	0,2847
MMP-9	n	0,1273	0,0670	0,2340	0,2017	0,2257	0,8257	0,8270	0,6807	0,2728
norm.MMP-9	n	0,1798	0,4065	0,4309	0,3636	0,3003	0,8989	0,6180	0,8282	0,9616
TIMP-1	n	n	0,2874	0,1846	0,3340	0,7024	0,6341	0,7431	0,6888	0,4105
norm.TIMP-1	n	n	0,9290	0,6627	0,5051	0,4568	0,3432	0,2750	0,4445	0,9978
TIMP-2	n	n	0,8509	0,1310	0,4187	0,3310	0,4063	0,1787	0,6807	0,4876
norm.TIMP-2	n	n	0,9988	0,2677	0,4483	0,6708	0,3193	0,2047	0,4445	0,2526

tabulka 24 : hodnoty p-value (univariační Coxův regresní model) decilů absolutních a normalizovaných (norm) hodnot expresí uvedených markerů při hledání optimální cut off celkového přežití (**OS**) v **podskupině adenokarcinom**. Tučně případně vyznačeny hodnoty statisticky významné (<0,05).

hodnocený marker	p-value pro jednotlivé decily									p-value – univariační Coxův regresní model
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
MMP-7	n	0,0397	0,3331	0,7994	0,5586	0,1598	0,9961	0,9948	0,9965	0,3235
norm.MMP-7	n	0,0397	0,3331	0,6816	0,7605	0,3749	0,2547	0,9925	0,9951	0,3122
MMP-9	n	0,0335	0,0374	0,2670	0,1406	0,3624	0,7409	0,6083	0,9961	0,4587
norm.MMP-9		0,0515	0,0989	0,1449	0,7319	0,4034	0,8711	0,9396	0,9963	0,5283
TIMP-1	n	n	0,1924	0,0382	0,0554	0,2204	0,0381	0,5781	0,8361	0,4752
norm.TIMP-1	n	n	0,3153	0,0963	0,0772	0,2204	0,3282	0,7215	0,9054	0,6901
TIMP-2	n	n	0,2585	0,2039	0,2652	0,1406	0,9962	0,9950	0,9965	0,1392
norm.TIMP-2	n	n	0,9803	0,1011	0,1512	0,1978	0,3110	0,9954	0,9962	0,1959

tabulka 25 : hodnoty p-value (univariační Coxův regresní model) decilů absolutních a normalizovaných (norm) hodnot expresí uvedených markerů při hledání optimální cut off bezpříznakového přežití (**DFI**) v **podskupině adenokarcinom**. Tučně případně vyznačeny hodnoty statisticky významné (<0,05).

hodnocený marker	p-value pro jednotlivé decily									p-value – univariační Coxův regresní model
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
MMP-7	n	n	0,4773	0,9827	0,6282	0,6392	0,9586	0,7575	0,4549	0,5473
norm.MMP-7	n	n	0,4773	0,4626	0,3467	0,3487	0,2293	0,9879	0,2203	0,7595
MMP-9	n	n	0,5228	0,3551	0,9987	0,9951	0,7311	0,9770	0,7476	0,8480
norm.MMP-9	n	n	0,5228	0,4994	0,9681	0,1632	0,3620	0,2236	0,3277	0,5887
TIMP-1	0,3908	0,3124	0,8120	0,1545	0,2683	0,1007	0,1750	0,2608	0,2195	0,1469
norm.TIMP-1	0,7160	0,5715	0,9690	0,9178	0,5806	0,4251	0,1429	0,5570	0,1352	0,1070
TIMP-2	n	n	n	0,0398	0,0807	0,4793	0,1620	0,4246	0,3092	0,0161
norm.TIMP-2	n	n	n	0,0500	0,2524	0,0519	0,0519	0,1159	0,3742	0,0438

11.3 Souhrn celkových výsledků NSCLC při hodnocení predikce OS a DFI

v rámci celé skupiny NSCLC (epidermoidní forma i adenokarcinom) pacientů nebyl prokázán statisticky významný vliv zkoumaného markeru na OS ani DFI .

11.4 Souhrn výsledků skupiny epidermoidní forma NSCLC při hodnocení predikce OS a DFI

Výsledky nejsou v rámci podskupiny NSCLC – epidermoidní karcinom jednoznačné. Na straně jedné byla nalezena pouze jedna statisticky významná cut off a na straně druhé se

zamítá nulová hypotéza o shodě u Coxova regresního modelu, kde byl marker TIMP-2 chápán jako spojitá veličina. Statistik se nicméně přiklání k existenci cut off hodnoty - 4. decil = 105 (hodnota TIMP-2). Tento vztah byl navíc prokázán jak v absolutních hodnotách, tak ve vztahu k GAPDH. Tedy, lze jej brát za skutečně nalezené cut off hodnoty. Ve skupině celkového přežití žádným ze spojitých Cox modelů nebyl vztah zkoumaného markeru prokázán a statistik považuje výsledek normTIMP-1 u analýzy celkového přežití spíše za falešně pozitivní.

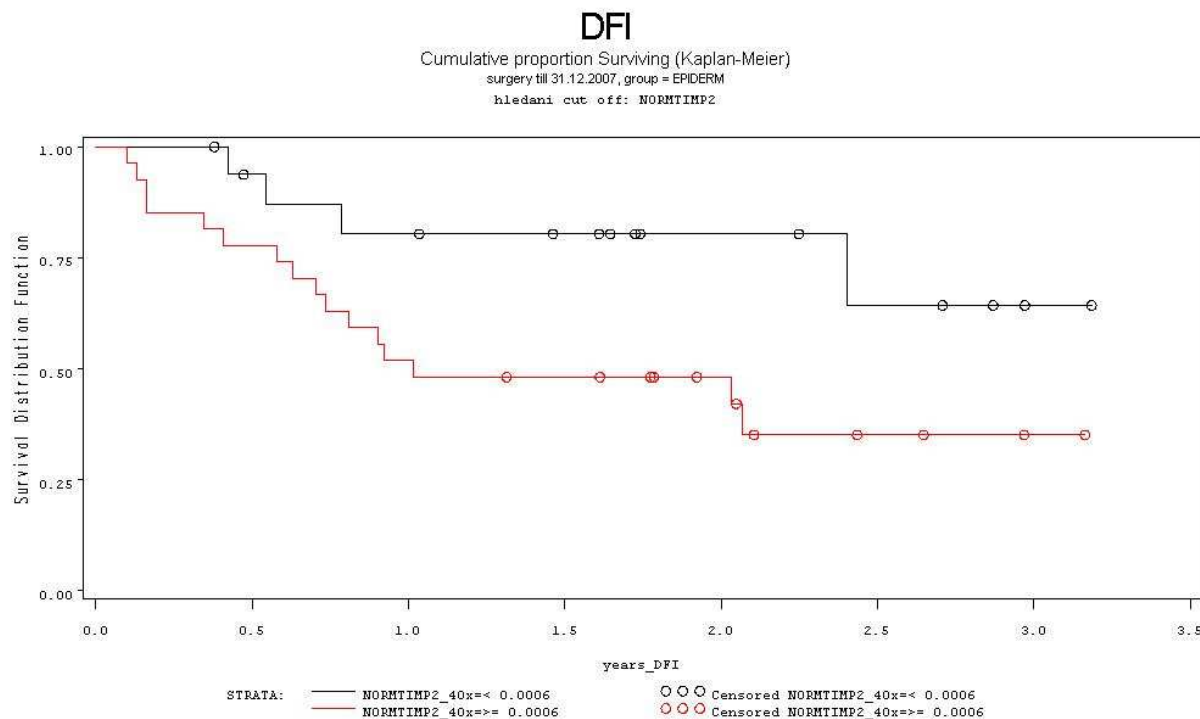
statisticky významné cut off podskupiny epidermoidní forma NSCLC, jsou :

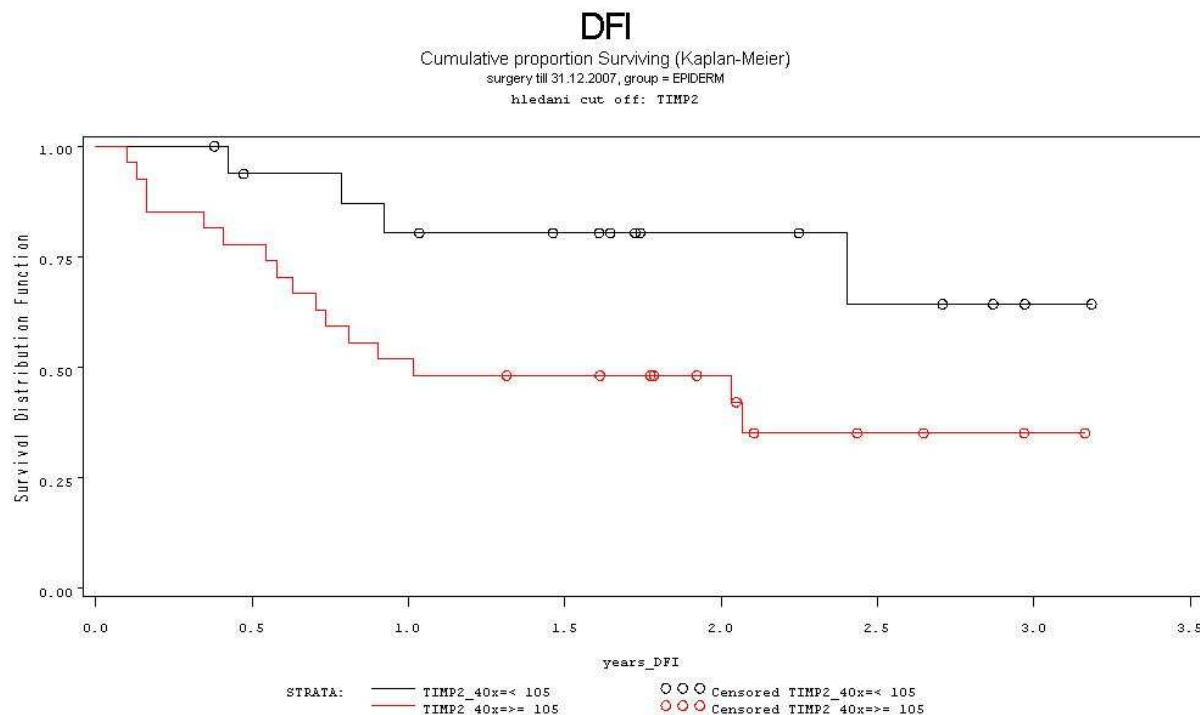
celkové přežití (OS)	cut off	HR	p- value
normTIMP-1	7. decil	3,070	0,0381

bezpříznakové přežití (DFI)

TIMP-2	4. decil	3,164	0,0398
normTIMP-2	4. decil	2,999	0,0500

obrázek 37 : vztah statisticky významné cut off exprese normTIMP-2 (0,006) a TIMP-2 (105). Znázornění rozdílu v bezpříznakovém přežití pacientů nad a pod touto hranicí.





11.5 Souhrn výsledků skupiny adenokarcinom NSCLC při hodnocení predikce OS a DFI

Vybrané statisticky významné cut off následující schéma :

NSCLC adeno

celkove preziti	cut off	HR	p-value
MMP7	2. decil	0,203	0,0397
normMMP7	2. decil	0,203	0,0397
TIMP1	4. decil	0,165	0,0382
MMP9	2.decil	0,193	0,0335
	3.decil	0,200	0,0374

Vzhledem k tomu, že žádným ze spojitých Cox modelů nebyl vztah zkoumaného markeru prokázán, považuje statistik tyto výsledky za falešně pozitivní. Také je zřejmé, že dle Hazard Ratio (nižší než 1) by znamenalo, že vyšší hodnota markeru (nad cut off) je inverzním faktorem vzhledem k danému výsledku (tedy lepší přežití u těch, kteří mají marker nad cut off). Ve vztahu k DFI nebyla dokonce žádná statisticky významná cut off nalezena. I vzhledem k velkému počtu provedených testů lze očekávat některé falešně pozitivní výsledky (čistě ze statistického hlediska) a toto byly pravděpodobně ony.

11.6 Diskuze

Celkové přežití ve skupině 76 pacientů, za období sledování 3,5 roku bylo 69.74 %. Zemřelo tedy 23 pacientů. V histologické podskupině adenokarcinomu z celkem 28 pacientů zemřelo 7, přežití je tedy 75,00 % . V podskupině s epidermoidním karcinomem z celkem 44 zemřelo 14, přežití tak činí 68,18 %. Statistickými testy nebyla prokázána rozdílnost v přežití jednotlivých podskupin.

Z celkem 76 pacientů 41 (53.95 %) přežívalo ve sledovaném 3,5 ročním období bezpříznakově. Z toho ve skupině epidermoidního karcinomu 24 (54,55 %) pacientů z 44, ve skupině adenokarcinomu 16 (57,14 %) z 28 a ve skupině ostatních forem NSCLC 1 pacient (25,00 %) ze 4. Opět nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami.

S výjimkou TIMP-2 v podskupině epidermoidní karcinom NSCLC v bezpříznakovém přežití, žádný z ostatních sledovaných markerů metaloproteináz resp. jejich inhibitorů (MMP-7, MMP-9, TIMP-1) nevykazuje statistickou významnost v hodnocení přežití. Potvrzuje to hypotézu o širokém uplatnění těchto markerů v proteolytických buněčných procesech, s širokou působností nejen pouze v oblasti nemalobuněčného plicního karcinomu. Role metaloproteináz a jejich inhibitorů se uplatňuje jistě i při zánětlivých či jiných benigních plicních onemocnění a je to jedním z důvodů, proč nelze tyto parametry použít nezávisle pro určení DFI resp. OS. Celkové a bezpříznakové přežití navíc ovlivňuje faktor radikality operačního výkonu a efektu adjuvantní pneumoonkologické léčby. Tyto vlivy působí nezávisle na předoperačním odběru hodnocených parametrů (MMPs a TIMPs) [90,115,116].

12. Shrnutí disertační práce

12.1 Diskuse

Stávající klinické zkušenosti a literární poznatky za nejčastěji užívané, klasické, nádorové markery v problematice NSCLC považují především CYFRA 21-1, CEA, TK, TPA a TPS [125]. Hodnotíme-li naše výsledky těchto markerů, tak jak ve skupině nemocných s progresí i bez progresu karcinomu po plicní resekci, byl předoperačně nadhraničně zvýšen medián CEA. Ve skupině s progresí byly navíc ještě zvýšeny mediány TK a TPS. Zde rozdíly však nebyly statisticky signifikantní (remise vs. progres). Záhy (týden) po operaci došlo v obou skupinách nemocných k poklesu mediánu CEA a navíc ve skupině nemocných s progresí i k poklesu CYFRA 21-1. Kromě toho ve stejném intervalu (týden) po operaci došlo v obou skupinách nemocných k výraznému zvýšení TK a TPS do oblasti patologických hodnot. Tento vzestup, jak bylo již dokumentováno v předchozích studiích, včetně našeho pracoviště, se vyskytuje jak u operací pro maligní nádorová onemocnění, tak u jakýchkoliv rozsáhlých operačních zákroků, např. pro benigní onemocnění GIT [106,126]. Souvisí tedy obecně s pooperační regenerací tkáně, nikoli jen s etiologií onemocnění. Z toho tak i vyplývá, že v rutinní praxi tyto markery nemá smysl bezprostředně po operaci (dny, týdny) hodnotit, nebo „doplňovat“ náběr pokud byl opomenut předoperačně.

Při srovnání hladin uvedených nádorových markerů v dalším pooperačním intervalu (půl roku) jsme mezi oběma skupinami signifikantní rozdíly neprokázali. Naproti tomu v období jeden rok po operaci se signifikantně lišily absolutní hodnoty TK, TPS a CYFRA 21-1.

Z našich výsledků dále vyplývá, že pro prognózu má význam pouze CYFRA 21-1 a CEA viz tabulka 5 . Význam CEA a CYFRA 21-1 v prognóze onemocnění byl vícekrát literárně potvrzen [107,108,119]. Po zhodnocení intervalu sledování naší studie zatím nelze stanovit optimální hraniční hodnotu (cut off), která by rozdělila nemocné na skupinu s příznivou a nepříznivou prognózou a proto se držíme laboratorně stanovených limitů. Ze závěrů dále plyne, že se nelze spolehnout na jeden nádorový marker, ale je třeba stanovovat nádorové markery v kombinaci. Potvrdilo se také, že existuje vztah mezi nádorovými markery CEA a CYFRA 21-1 ve vztahu k histologickému typu nádoru. Zvýšené hodnoty CYFRA 21-1 v období rok od operace predikují riziko recidivy ($p < 0,05$) u epidermoidní formy bronchogenního karcinomu a zvýšené hodnoty CEA rok po operaci ($p < 0,05$) představují riziko vzniku recidivy pro adenokarcinom [127,128,129]

I při tradičním užití klasických markerů je třeba postupovat se znalostí biodynamiky těchto parametrů. Především proliferační markery (TK, TPS) nelze využít v časném pooperačním období, tedy dříve než po půl roce, resp. až po roce. Rovněž nelze jich užít pokud je pacient hospitalizován pro např. respirační infekci, nebo zánětlivé onemocnění, kdy jsou nízké specifické. NSE není pro NSCLC vhodným parametrem a kromě pacientů s již i klinicky jasnou recidivou, popř. u forem karcinomu s neuroendokrinní diferenciací nedochází k elevaci těchto markerů [21]. Zůstává otázkou, zda se při progresi NSCLC zvýrazní neuroendokrinní složka těchto karcinomů, nebo neuroendokrinní složku v karcinomu má každá forma NSCLC a celkovým růstem nádorové hmoty dochází i k progresi její exprese. To předpokládají a konstatují autoři jiných studií [8,9]. Prognostický význam markerů je důležitý především v počátečním stádiu (st. I), kdy očekáváme dle stávajícího patologického hodnocení příznivý průběh, pětileté přežití 60-70%. Mylný staging IA, bez adjuvantní chemoterapie znamená pro nemocného výrazně horší přežití a elevace onkomarkerů je jedním z faktorů, které toto signalizují [129].

Nelze požadovat, aby výsledky markerů byly přímým vodítkem pro podání či nepodání adjuvantní chemoterapie, přesto především v pooperační dispenzarizaci je elevace markerů nad hranici normy, nebo nad předoperační hodnoty nutné brát v potaz jako negativní jev a indikaci dalšího dovyšetření (CT resp. PET CT) [130].

Velmi dobré laboratorní vybavení našeho pracoviště pro sérové i tkáňové stanovení hladin markerů nejen klasickými imunoanalytickými postupy, ale i RT-PCR nám umožnily prověřit vztah téměř libovolného spektra analytů k NSCLC. K vyšetření sérových hodnot jsme tak volili nejen výše komentované klasické onkomarkery (CYFRA 21-1, CEA, TK, TPS, NSE), tak i zatím krátce používané (MMPs a TIMPs), či nově testované parametry (MonoTotal, IFN- γ , IGF-1, IL-4, IL-6, IL-8, MCP1, PAI-1). V této poslední zkoumané skupině prozatím neprokazujeme vztah k pooperační prognóze pacientů s NSCLC. Závěry uvedené široké skupiny sérových hodnot markerů jsme vybrali v úvodní fázi naší práce a časně hodnotili jejich senzitivitu a vztah k histologii resp. stádiu onemocnění. Až na MonoTotal a TIMP-1 jsme neprokázali statistickou významnost a proto se v další práci těmi parametry nezabývali a prověřovali jiné, především tkáňové parametry. Souhrnně lze konstatovat, že jsme prokázali vztah mezi nádorovými markery a prognózou nemocných po radikální resekcii pro NSCLC především v období rok po operaci a déle. Optimálně můžeme tak doporučit sledovat před operací markery TK, TPS, CEA a CYFRA 21-1, krátce po operaci (do půl roku) pouze CEA a CYFRA 21-1. V dalším průběhu sledování se pak jeví jako vhodné hodnotit stejně jako před

operací celé spektrum, tedy TK, TPS, CEA a CYFRA 21-1. Nadějí do budoucna se jeví nově testovaný cytokeratinový marker MonoTotal [78,113].

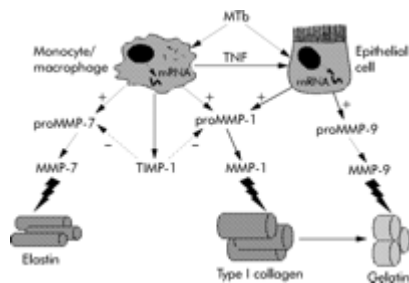
Plicní intersticiium představuje mechanickou kostru plicní tkáně, zatímco bazální membrána vyztužuje alveolární epiteliální buňky. Základní stavební plicní vlákna jsou kolagen typu I, který zajišťuje tahové napětí a elastin, který umožňuje roztažitelnost, resp. poddajnost. Elastinová vlákna jsou nejstabilnější a nejdéle i odolávají případné destrukci. Alveolární stěna je vystavená z kolagenu typu III, zatímco bazální membrána je vystlána především kolagenem typu IV. Velká kolagenní a elastinová vlákna jsou spojena různými malými fibrily, menšími vlákny. Popsaná mezivláknová síť nepodléhá destrukci jen jedním enzymem, ale více různými druhy, které kaskádou reakce rozvolní strukturu vláken. Pravděpodobně ta nejmenší vlákna nejnáze a nejdříve podléhají degradaci. Právě v tomto procesu degradace popsaných typů vláken se významně podílejí jednotlivé typy metaloproteináz [81,90,114,116].

MMPs sice působí výraznou destrukci infiltrované tkáně, ale sami především v počátečních procesech podléhají přesné regulaci. Regulována je již sama jejich genetická exprese, dále je regulována jejich aktivace z proenzymů a třetím typem regulace jsou specifické inhibitory – tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMPs). Z toho vyplývá, že poměr TIMPs/MMPs má vliv na rozsah ECM degradace [115]. Tento fakt byl jeden z hlavních důvodů, proč jsme v naší práci hodnotili vždy vztah hladin MMPs/TIMPs ve tkáni nádoru a v okolní nádorem nepostižené tkáni. Většina MMPs, není produkována normální, zdravou tkání, ale naopak tkání která odolává zánětu, nádoru, nebo již v ní probíhají reparační pochody. Produkci MMPs tak ovlivňují nejen TIMPs, ale i obecné cytokiny – jako interferon gama (INF- γ), interleukiny (IL-s), tumor necrosis factor (TNF). MMPs tak hrají důležitou roli v plicní imunitě, nejen nádorových onemocnění [89]. Uplatnění v buněčné imunitě spočívá v ovlivnění migrace a působení makrofágů a mezibuněčné komunikace.

Plicní povrch je exponován exogenním vlivům a pokud je poškozen, je nutná ECM remodelace a náprava. Podle dosavadních experimentálních prací na myším modelu má nepochybný význam MMP-9 [131]. Její deficit při plicním poškození bleomycinem znamená abnormální bronchiolizaci. Dále bylo například prokázáno, že inhibice metaloproteináz působí jako prevence extravazace lymfocytů do venul endotelia, na experimentu poranění myši plicní tkáně MMP-3 redukuje vyplavení neutrofilů [132]. Dá se tak v těchto případech označit působení MMPs jako negativní ovlivnění buněčné imunity.

Velice složitý a komplexní je proces mezibuněčné komunikace, probíhající interaktivně. MMPs podléhají ovlivnění cytokiny a chemokiny a naopak jejich aktivitu i sami ovlivňují. Například některé MMPs se ovlivňují navzájem s tumor necrosis factor α (TNF- α).

Je jisté, že tyto popsané děje se uplatňují nejen v tumorogenezi, ale i jiných plicních patologiích, především zánětlivých (vč. TBC) – viz obrázek 38 [89]. Tedy například při chronické obstrukční plicní nemoci, astmatu, sarkoidoze, tuberkulóze, pneumonii. S tímto ovlivněním výsledků je nutné pak počítat.



Obrázek 38 : schéma působení *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) na makrofágy/monocyty vede k jejich rozpadu, tak uvolnění přímo proenzymů metaloproteináz (MMP-1, MMP-9), tumor necrosis faktoru (TNF). Tak poškození membrán epiteliálních (alveolárních) buněk, další aktivaci metaloproteináz, inaktivaci jejich inhibitorů (TIMP-1) a důsledkem je destrukce vláken plicního intersticia [89].

Penetrace bazální membrány a degradace extracelulární matrix tak jsou základní procesy při progresi nádorových buněk do vzdálených orgánů. Matrixové metaloproteinázy MMPs, jsou jedny z enzymů, které to umožňují. Jedním z markerů, který zkoumá naše práce, je MMP-9 (92kDa, Typ IV kolagenázy či gelatináza B), která je schopna degradovat gelatin a kolagen typu IV, které jsou právě základními komponentami bazálních membrán. První práce v této oblasti však neprokázaly klinický význam a byly zklamáním [133]. Jednalo se však o porovnání všech stádií (I-IV) NSCLC, resp. obecně karcinomů. Tam zůstává mezinárodní klasifikace nádorových onemocnění TMN jistě nejdůležitějším prognostickým faktorem. Při hodnocení nižších stádií NSCLC, tedy právě těch resektabilních stádií I a II se jeví např. MMP-9 jako možný samostatný prognostický faktor, vedle právě pTMN. Tato studie se svým zaměřením podobala studii naší, čítala 147 po sobě následujících pacientů, kde byla provedena R0 resekce, tedy bez průkazu vzdálených metastáz (M1) či N3 lymfatického postižení. MMP-9 byly stanovovány imunohistochemicky, provedeno standardní statistické zpracování, a úmrtí na základní onemocnění bylo podkladem pro konstrukce Kaplan-Meier diagramů přežití. Práce byla navíc exaktní v tom, že odebrané vzorky tkáně byly diferencovány na ty, kde bylo < 5% nádorových buněk, kde > 95% nádorových buněk, jako homogenní nádorovou, resp. nenádorovou tkáň a ostatní jako tkáň nenádorovou. V této práci jako významný negativní prognostický faktor vychází elevace MMP-9 především ve skupině, kde je homogenní zastoupení převahy nádorových buněk [134].

Fakt, že byl ve zmíněné práci prezentován poměr vlastních nádorových buněk v odebrané tkáni je důležitý. Je nepochybné, že v makroskopicky odebrané nádorové tkáni nejsou

přítomy jen nádorové buňky, ale i buňky nemaligní a intersticiální tkáň. Tento fakt může zkreslovat absolutní výsledky expresí. Přesto pro klinickou aplikaci těchto závěrů považujeme odběr nádorové tkáně tímto způsobem za dostatečný. Izolace samostatných nádorových buněk by byla ještě technicky i finančně náročnější a ještě více by vzdálila možnost klinické aplikace, užití v praxi.

Naše výsledky potrzují, že MMPs i TIMPs ovlivňují proces tumorogeneze a následného metastazování. Nelze je však využít jako nezávislé predikční faktory celkového resp. bezpříznakového přežití. Je zřejmé, že inhibitory metaloproteináz (v našem souboru to potvrzuje výsledek TIMP-1) jsou exprimovány ve vysokých hodnotách především v počátečních fázích nádoru. Tehdy je velká tendence tlumit produkci metaloproteináz, které provádí destrukci zdravé buněčné matrix, resp. přímo bazálních membrán buněk. Po dosažení určité velikosti resp. progresu nádoru se tato schopnost eliminuje a inhibitory metaloproteináz (TIMP-1) se chovají nezávisle, resp. bez možnosti vlivu na působnost metaloproteináz.

Mechanismus proteolytického účinku MMPs a inhibičního účinku TIMPs je nepochybný. Dokladují to dobře i naše výsledky především vyšetřením přímo tkáňové exprese. Sérové výsledky nejsou dostatečně senzitivní a dynamika jejich změn není až na výjimky výrazná. Za přínos naší práce považujeme komparaci exprese MMPs a TIMPs v nenádorové tkáni resp. plicní tkáni jedinců bez maligního onemocnění, která je z pochopitelných důvodů obtížně získatelná. Minimální množství tkáně (100 mg) potřebné k RT-PCR zpracování a uskladnění bylo odebráno z malých tkáňových vzorků pacientů, kteří byli operováni pro diagnózu intersticiálního plicního procesu nebo pro bulozní emfyzém a byla jim tedy resekována část plicní tkáně. Se souhlasem pacientů jsme tak vytvořili soubor, který je velice cenný nejen hodnocením, které jsme provedli my, ale i jejich uchováním v zamraženém stavu do budoucna. Tak se skýtá dále možnost jejich zpracování a dalšího hodnocení.

Nevýhodou tkáňových vzorků zůstane fakt, že jsou odebratelné pouze v době operace. Tím se dala do jisté míry předpokládat i jejich minimální predikční schopnost, která je navíc ovlivněna jednak radikalitou operace a pak především pooperační adjuvantní léčbou. Tedy faktory, na kterých je odběr tkáně v průběhu operace nezávislý. Přesto především výsledky hodnocení TIMP-2 jsou velice slibné i za těchto podmínek. Domníváme se na základě našich výsledků, že hlavně míra schopností inhibice metaloproteináz je významným faktorem ovlivňujícím rychlost progresu a metastazování vlastního karcinomu. Po překročení určité limitní hranice dochází, pak k dalšímu již na TIMPs nezávislému růstu nádorové masy. Ač se neprokázala predikční schopnost ostatních ve tkáni odebraných markerů, za velice cenné považujeme alespoň prověření mechanismu jejich účinku při buněčné nádorové progresi. Tyto

závěry a výsledky mají však prozatím význam pouze pro oblast klinického výzkumu, než klinické praxe. Převoditelnosti do praxe brání hlavně celková cena vyšetření a s tím související zpožděné zpracování vzorků od operace (jedním činidlem většího počtu vzorků najednou). Optimální situace – odběr tkáně na histologické zpracování při operaci a současně malého vzorku k brzkému RT PCR stanovení hladin tkáňových paramerů a tak vyslovení prognostického indexu – tak zatím nedosahujeme.

Ze sérových markerů potvrzujeme využitelnost především CYFRA 21-1 pro epidermoidní karcinom a CEA pro adenokarcinom, v kombinaci s TK a TPS. Přínosným se nově ukazuje být i cytokeratinový marker MonoTotal. Nadále však platí, že pro NSCLC zůstává jako lepší prognostický faktor než markery stádium onemocnění, uzlinový staging, metastatické postižení. Až pak je asi možné zařadit onkomarkery. Tyto sice prakticky nemají význam při screeningu NSCLC, ale vhodně volenými kombinacemi, při znalosti předoperačních hodnot je lze úspěšně využívat při pooperační dispenzarizaci. Elevace onkomarkerů není v současném pohledu pneumonologů indikací k podání neoadjuvantní chemoterapie. Tou zůstává patologické stádium IB a vyšší, s ohledem na celkový stav nemocného. V dispenzarizačním období však platí, že elevace onkomarkerů potvrzená suspekci na progresi, resp. recidivu nádoru na CT, resp. PET CT obraze indikací k novému podání chemoterapie, resp. radioterapie jednoznačně je.

12.2 Závěr s uvedením nových poznatků

Z celého spektra námi vyšetřených markerů pro klinické využití pro NSCLC - odhad rozsahu malignity a prognózy - v současnosti má stále klinicky největší význam vyšetřování klasických onkomarkerů. Tedy hlavně CYFRA 21-1 (více senzitivní pro epidermoidní karcinom) a CEA (pro adenokarcinom) předoperačně i krátce pooperačně. Dále TK a TPS, které projevují rychlé, dynamické změny, odrážející obecně buněčnou proliferaci. Taková proliferace může být však podnícena jak nádorovou progresí, tak i nespecificky zánětlivým onemocněním, či procesy hojení v časném pooperačním období (až do asi půl roku od operačního výkonu). NSE není k monitoringu NSCLC vhodná, neboť k nárůstu markeru dochází až v terminální fázi onemocnění, navíc v závislosti na míře neuroendokrinní diferenciaci nemalobunčného karcinomu plic. Nově přínosným se jeví cytokeratinový onkomarker MonoTotal, senzitivní především pro epidermoidní formu nemalobunčného karcinomu plic.

Vyhodnocením tkáňových vzorků prokazujeme význam tkáňových metaloproteináz (MMP-7 a MMP-9) a hlavně jejich inhibitorů (TIMP-1 a TIMP-2) v růstu a progresi NSCLC.

Novým zjištěním je zejména laboratorní potvrzení domněnky role TIMPs jako nezávislých enzymů. V první fázi růstu karcinomu TIMPs inhibují produkci proteolytických enzymů, především metaloproteináz. Lze dokonce detekovat zvýšenou expresi TIMPs v okolní, nádorem nepostižené tkáni. Po dosažení určité velikosti nádoru dochází ke ztrátě regulačního vlivu na růst karcinomu a dále k nezávislé produkci TIMPs. Hladina exprese TIMPs klesá a je srovnatelná dokonce s expresí v plicní tkáni pacientů nepostižených NSCLC, resp. benigním plicním onemocněním. Tak je tomu přesto, že metaloproteinázy a jejich inhibitory (MMPs a TIMPs) nejsou jen enzymy resp. inhibitory karcinogeneze, ale i angiogeneze aj. Uplatňují se i v regulaci průběhu jiných nenádorových postižení plicní tkáně. Přesto u malého souboru námi vyšetřených pacientů s benigním plicním onemocněním (bulozní emfyzém, intersticiální plicní onemocnění) nedochází k takové elevaci TIMPs, jako v nádorové i okolní nenádorové plicní tkáni v časném stádiu NSCLC. Z etických důvodů, nebylo a není v našich možnostech získat ke komparaci plicní tkáň žijících zdravých jedinců.

Naše výsledky potvrzují předpoklad, že MMPs a TIMPs nejsou vzhledem k mechanismu svého účinku ideální pro předpověď celkového a bezpříznakového přežití. Jde o enzymy s širokým spektrem účinku. Navíc jsou tyto parametry stanovené v začátku léčby (v době operace) následně ovlivněny řadou faktorů. Především rozsahem, resp. radikalitou operace, dále rozsahem adjuvatní chemoradioterapie a odpovědí organismu na ni. V našem souboru 78 pacientů prokazujeme predikci pouze v případě TIMP-2 ve vztahu k bezpříznakovému přežití u epidermoidní formy karcinomu. Ojedinelé statistické významnosti jiných markerů nebyly potvrzeny dalšími statistickými testy. Právě rychlý růst exprese TIMPs (především TIMP-2) v časném stádiu karcinomu, která je vyšší než u benigních plicních onemocnění a dokonce prediktivní význam pro bezpříznakové přežití činí hlavně z inhibitorů metaloproteináz (TIMPs) nadějně markery pro další výzkum tkáňových expresí v nemalobuněčném karcinomu plic.

13. Seznam použité literatury

1. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2005, NOR ČR : Notvary 2002 ČR .
2. Bronchogenní karcinom : Nové trendy v diagnostice a terapii, Pešek M., Interní medicína pro praxi 9; 2005, str. 392-394.
3. Yano T., Yoikoyama H, Inouue T.: The first site of recurrence after complete resection in NSCLC. Comparison between pN0 disease and pN2 disease. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994, 108, 680-3.
4. Čapov I. et al. Chirurgie orgánových metastáz. Galén-Karolinum, 2008, 1. vydání, str. 99.

- 5.** Complete resection in lung surgery : proposed definition. Rami-Porta R, Wittekind Ch, Goldstraw P. *Lung Cancer*, 2005, vol 49, 25-33.
- 6.** Naruke T, Yoneyama T, Ogata T, Suemasu K. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978, 76, 832-839.
- 7.** Mountain CF. A new interantional staging system for lung cancer. *Chest* 1986, 89, 225-233.
- 8.** Pisters KMW, Le Chevalier T. Adjuvant Chemotherapy in Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 23, No 14, 2005, str. 3270-3278.
- 9.** Van Meerbeeck J, Schill PV, Kramer G, et al. A randomized trial of radical surgery versus thoracic radiotherapy in patients with stage IIIa-N2 non-small cell cancer (NSCLC) after response to induction chemotherapy (EORTC 08941). *Lung Cancer*, Vol. 49, Suppl 2, 2005, s. S4 No Pr5.
- 10.** Pešek M, Teřl M. Imunologická dignostika bronchogenního karcinomu. In: Pešek M. et al. *Bronchogenní karcinom*. Galén 2002; pp 51-55.
- 11.** Liška V, Třeška V, Korabečná M. Nádorová kmenová buňka – nový pohled v onkologii? *Rozhl Chir*. 2007 Oct;86(10):548-52.
- 12.** Haura E.B. Is repetitive wounding and bone marrow-derived stem cell mediated-repair an etiology of lung cancer development and dissemination? *Med Hypotheses*. 2006;67(4):951-6.
- 13.** Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
- 14.** Jain RK, Duda DG. Role of bone marrow-derived cells in tumor angiogenesis and treatment. *Cancer Cell*. 2003 Jun;3(6):515-6.
- 15.** Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggiero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005 Dec 8;438(7069):820-7.
- 16.** Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Dec;25(4):521-9.
- 17.** Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med*. 2007 Feb;13(2):72-81.
- 18.** Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JMJ. On mammary stem cells. *Cell Sci*, 2005 Aug 15;118(Pt 16):3585-94.
- 19.** Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3035-9.

- 20.** Rejthar A, Vojtěšek B.: *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha, Grada 2002.
- 21.** Seemann MD, Beinert T, Fürst H, Fink U. An evaluation of the tumour markers, carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin marker (CYFRA 21-1) and neuron-specific enolase (NSE) in the differentiation of malignant from benign solitary pulmonary lesions. *Lung Cancer*. 26; 1999; 3: 149-155.
- 22.** Vinolas N, Molina R, Fuentes R, et al. Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in non small cell lung cancer (NSCLC) patients as an aid in histological diagnosis and prognosis: Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Lung Cancer*. 29; 2000; Supplement 1 : 195.
- 23.** Lošťáková, V., Kolek, V., Lukeš, J.: Klinické hodnocení nádorových markerů CYFRA 21-1, NSE, TPS, TK u pacientů s podezřením na maligní onemocnění plic. *Stud. Pneumol. Phthiseol*. 2002, 62(1):14-18.
- 24.** Pujol J-L, Boher J-M, Grenier J, Quantin X. Cyfra 21-1. Neuron specific enolase and prognosis of non-small cell lung cancer: prospective study in 621 patients. *Lung Cancer*. 31; 2001; 2-3: 221-231.
- 25.** Passlick B, Thetter O, Pantel K et al. Bedeutung der regionalen lymphatischen Tumorzell dissemination bei Patienten mit resektablen nicht-kleinzelligen Bronchialcarcinom. *Chirurg* 1995; 66 : 780-6.
- 26.** Pantel K, Izbicki JR, Passlick B et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996; 347: 649-53.
- 27.** Klein J, Král V, Tichý T, Neoral Č, Bohanes T, Dráč P, Škarda J, Říhánková P, Grygárková T: Markers of tumor invasion as predictors of survival after resection of NSCLC. *Int J Cancer*, 2002, 99, 419-422.
- 28.** Jablonska M, a kol.: *Kolorektální karcinom, časná diagnóza a prevence*. Praha, Grada, 2000.
- 29.** Pešta M. Sledování biologické aktivity kolorektálního karcinomu metodou real-time PCR. *Disertační práce* 2004. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta Plzeň, 2.interní klinika.
- 30.** Dráč M. Prognostický význam matrix metaloproteináz v I. stádiu nemalobuněčného karcinomu plic. *Disertační práce* 2006, Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, I. chirurgická klinika.
- 31.** Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W et al.. Expression of p56 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 1991;6:1785-9.
- 32.** Igglo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AI. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;335:675-9.

- 33.** Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R. The p53 gene is very frequently mutated in small cell lung cancer with a nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 1991;6:1775-8.
- 34.** Klein J, Král V, Tichý T, Neoral Č, Bohanes T, Aujeský R, Kolek V: Snížená exprese E-cadherinu koreluje se zkráceným přežíváním po resekci plic pro karcinom ve stadiu I. *Stud Pneumol Phtiseol.* 2004, 64, 96-7.
- 35.** Sato H, Saijo Y, Ichima B et al. Prognostic value of nucleolar protein p120 in patients with resected lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 1999, 17, 2721-7.
- 36.** Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC, Theunissen ph. reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavourable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Resp Crit Care Med.* 1998, 157, 1319-23.
- 37.** Frixen UH, Behrens J, Sachs M et al.: E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991, 113,173-85.
- 38.** Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F: Genetic manipulation with E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion supressor role. *Cell*, 1991, 66, 107-19.
- 39.** Tanaka F, Kawano Y, Li M et al. Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:2728-36.
- 40.** Klener P.: *Klinická onkologie*, Galén Praha, 2002.
- 41.** Fontanini G, Bigini D, Vignati S et al. Microvessel count predict metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1995, 177, 57-63.
- 42.** Brooks PC, Clark RA, Cheres DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta3 for angiogenesis. *Science*, 1994, 264, 569-71.
- 43.** Kim Y, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer res*, 2000, 60, 5410-3.
- 44.** Sounni NE, Devy I, Hajitou A, Frankenne F, Munuaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM and Noel A: MT1.MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an upregulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J*, 2002, 16, 555-64
- 45.** Laack E., Scheffler A., Burkholder I., Boeters I., Andritzky B., Schuch G., Görn M., Vohwinkel G., Edler L., Fiedler W. and Hossfeld DK. Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, Volume 50, Issue 1, October 2005, Pages 51-58.

- 46.** Laack E., Kohler A., Kugler C., Dierlamm T., Knuffmann C., Vohwinkel G. and Niestroy A. et al., Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small cell lung cancer, *Ann. Oncol.* 13 (2002), pp. 1550–1557.
- 47.** Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *JExp Med* 1965;122:467-481.
- 48.** Schneider J. Evaluation eines Panels ausgewählter Tumormarker und der Fuzzy-Logik-Analyse zur Früherkennung von Lungentumoren in arbeitsmedizinischen Hochrisikokollektiven. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. 2002.
- 49.** Nishi M, Inazawa J, Inoue K, et al.: Regional chromosomal assignment of carcinoembryonic antigen gene (CEA) to chromosome 19 at band q13.2. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;54:77-81.
- 50.** Thompson J, Zimmermann W, Osthus-Bugat P, et al.: Long-range chromosomal mapping of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family cluster. *Genomics* 1992;12: 761-772.
- 51.** Nekulová M, Šimíčková M, Jabor A, Zámečník M, editoři: *Encyklopedie laboratorní medicíny 3.*, SEKK, Praha, 2003.
- 52.** Hammarstrom S: The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Sem Cancer Biol* 1999;9:67-81
- 53.** Topolcan O, Holubec L, Polivkova V, Svobodova S, Pesek M, Treska V, Safranek J, Hajek T, Bartunek L, Rousarova M, Finek J. Tumor markers in pleural effusions. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4A):1921-4.
- 54.** Jarvisalo J, Hakama M, Knekt P, Stenman UH, Leino A, Teppo L, et al. Serum tumor markers CEA, CA 50, TATI, and NSE in lung cancer screening. *Cancer* 1993; 71: 1982–1988.
- 55.** Plebani M, Basso D, Navaglia F, De Paoli M, Tommasini A, Cipriani A. Clinical evaluation of seven tumor markers in lung cancer diagnosis: Can any combination improve the results? *Br J Cancer* 1995; 72:170–173.
- 56.** Fabris C, Faletti E, Pirisi M, Soardo G, Toniuto P, Vituli D, Bertolotti N, Gonano F, Bartoli E: Nonspecific increase of serum carbohydrate antigen CA 19-9 in patients with liver disease associated with increased circulating levels of adhesion molecules, *din Chim Acta* 1995;243:25-33.
- 57.** Fujita J, Dobashi N, Ohtsuji Y, Ueda Z, Bandoh S, Yamadori I, Takahara J: Detection of large molecular weight cytokeratin 8 as a carrier protein of CA 19-9 in non-small-cell-lung cancer. *BrJ Cancer* 1999; 81:769-773.
- 58.** Schneider J. Tumor Markers in Detection of Lung Cancer *Advances in Clinical Chemistry.* 42; 2006: 1-41.

- 59.** Neuroendocrine and cytokeratin serum markers as prognostic determinants of small cell lung cancer *Lung Cancer*, Volume 39, Issue 2, February 2003, Pages 131-138 Jean-Louis Pujol, Xavier Quantin, William Jacot, Jean-Marie Boher, Jean Grenier and Pierre-Jean Lamy.
- 60.** Molina R, Agusti C, Mane JM, Filella X, Jo J, Joseph J, et al. CYFRA 21-1 in lung cancer: Comparison with CEA, CA 125, SCC and NSE serum levels. *Int J Biol Markers* 1994; 9:96–101.
- 61.** Pastor A, Menendez R, Cremades MJ, Pastor V, Llopis R, Aznar J. Diagnostic value of SCC, CEA and CYFRA 21-1 in lung cancer: A Bayesian analysis. *Eur Respir J* 1997; 10:603–609.
- 62.** Lorenz J, Gillmann-Blum D, Jensen M, Kreienberg R. Neuron specific enolase (NSE) and squamous cell carcinoma antigen (SCC) as serum markers in the diagnosis of bronchial carcinoma. *Pneumologie* 1990; 44:1259–1263.
- 63.** Chantapet P, Riatawan P, Lebnak P, Getngern P. Utility of serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor markers for non-small cell lung cancer. *J Med Assoc Thai* 2000; 83:383–391.
- 64.** Kakari S, Stringou E, Toumbis M, Ferderigos AS, Poulaki E, Chondros K, et al. Five tumor markers in lung cancer: Significance of total and ‘lipid’-bound sialic acid. *Anticancer Res* 1991; 11:2107–2110.
- 65.** Romanova LF, Khailenko VA, Kuznetsova LF, Davydov MI, Komov DV, Kulish VL, et al. Determining the level of the tumor marker-neuron-specific enolase in patients with neoplastic and non-neoplastic diseases. *Klin Med Mosk* 1991; 69:38–39.
- 66.** Burghuber OC, Worofka B, Scherthaner G, Vetter N, Neumann M, Dudczak R, et al. Serum neuron-specific enolase is a useful tumor marker for small cell lung cancer. *Cancer* 1990; 65:1386–1390.
- 67.** Ebert W, Dienemann H, Fateh-Moghadam A, Scheulen M, Konietzko N, Schleich T, et al. Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuron-specific enolase in lung cancer. Results of an international multicentre study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32:189–199.
- 68.** Voorzanger-Rousselot N and Garnero P. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses. *Cancer Treatment Reviews*, Volume 33, Issue 3, May 2007, Pages 230-283.
- 69.** Černá M.: Expres vybraných genů u kolorektálního karcinomu a jaterních metastáz. Disertační práce 2004. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta Plzeň, 2.interní klinika.
- 70.** Spyrtos F, Romain S, Rostaing-Puissant B, Daver A, Collona M, DeMartin PM, Bougnoux P, Bolla M: Standardization and quality control in the evaluation of proliferation parameters in T1T2, NON1, MO breast cancer: multicentric retrospective study. DNA synthesis enzyme activities. *Bull Cancer (Paris)* 1999;86:678-684.

- 71.** Broet P, Romain S, Daver A, Ricolleau G, Quillien V, Rallet A, Asselain B, Martin PM, Spyrtos F.: Thymidine kinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001;19:2778-87.
- 72.** Pina TC, Zapata IT, Lopez JB, Perez JL, Paricio PP, Hernandez PM. Tumor markers in lung cancer: Does the method of obtaining the cut - oV point and reference population influence diagnostic yield? *Clin Biochem* 1999; 32:467–472.
- 73.** Toumbis M, Rasidakis A, Passalidou E, Kalomenidis J, Alchanatis M, Orphanidou D, et al. Evaluation of CYFRA 21-1 in malignant and benign pleural eVusions. *Anticancer Res* 1996; 16:2101–2104.
- 74.** Marcus D. Seemann, Thomas Beinert, Heinrich Fürst and Ulrich Fink. An evaluation of the tumour markers, carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin marker (CYFRA 21-1) and neuron-specific enolase (NSE) in the differentiation of malignant from benign solitary pulmonary lesions *Lung Cancer*, Volume 26, Issue 3, December 1999, Pages 149-155.
- 75.** Niels Reinmuth, Burkhard Brandt, Michael Semik, Wolf-Peter Kunze, Richard Achatzy, Hans H. Scheld, Petra Broermann, Wolfgang E. Berdel, Hans N. Macha and Michael Thomas Prognostic impact of Cyfra21-1 and other serum markers in completely resected non-small cell lung cancer *Lung Cancer*, Volume 36, Issue 3, 1 June 2002, Pages 265-270.
- 76.** Bjorklund B: Tissue polypeptide antigen (TPA): Biology, biochemistry, improved assay methodology, clinical significance in cancer and other conditions, and future outlook. *Antibiot Chemother* WS;22:16-31.
- 77.** Brattström D, Wagenius G, Sandström P, Dreilich M, Bergström S, Goike H, Hesselius P, Bergqvist M. Newly developed assay measuring cytokeratins 8, 18 and 19 in serum is correlated to survival and tumor volume in patients with esophageal carcinoma. *Dis Esophagus.* 2005;18(5):298-303.
- 78.** Eriksson P, Brattström D, Hesselius P, Larsson A, Bergström S, Ekman S, Goike H, Wagenius G, Brodin O, Bergqvist M. Role of circulating cytokeratin fragments and angiogenic factors in NSCLC patients stage IIIa-IIIb receiving curatively intended treatment. *Neoplasma.* 2006;53(4):285-90.
- 79.** Fabrice Barlési , Céline Gimenez , Jean-Philippe Torre , Christophe Doddoli , Julien Mancini, Laurent Greillier , François Roux and Jean-Pierre Kleisbauer. Prognostic value of combination of Cyfra 21-1, CEA and NSE in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Respiratory Medicine*, Volume 98, Issue 4, April 2004, Pages 357-362
- 80.** Ondo K., Sugio K., Yamazaki K., Yamaguchi M., Yano T., Yoshino I. and Maehara Y. The significance of serum active matrix metalloproteinase-9 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, Volume 46, Issue 2, November 2004, Pages 205-213.
- 81.** Passlick B., Siel W., Seen-Hibler R., Wöckel W., Thetter O., Mutschler W. and Pantel K. Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000), pp. 3944–3948.

- 82.** Junker K. Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* 33 (2001), pp. 17–24.
- 83.** 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.
- 84.** Kugler A.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* 1999 Mar-Apr;19(2C):1589-92.
- 85.** Fingleton BM, Heppner Goss KJ, Crawford HC, Matrisian LM.: Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS* 1999; 107: 102-110
- 86.** Stamenkovic I.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415-433.
- 87.** Curran S, Murray GI.: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 2000 Aug;36(13 Spec No):1621-30.
- 88.** Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science.* 2002 Mar 29;295(5564):2387-92. Review.
- 89.** Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax.* 2006 Mar;61(3):259-66. Epub 2005 Oct 14. Review.
- 90.** Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers *Biochimie*, Volume 87, Issues 3-4, March-April 2005, Pages 287-297.
- 91.** Coussens L.M., Fingleton B. and Matrisian L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, *Science* 29 (2002), pp. 2387–2392.
- 92.** Nagase H, Woessner JF Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999. Jul 30;274(31):21491-4.
- 93.** 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.
- 94.** 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.
- 95.** Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R.: Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer.* 1995 Nov 27;63(5):680-7.

- 96.** Safránek J, Vodicka J, Spidlen V, Klecka J, Simánek V, Houdek K. [Incidence and management of prolonged air leak following pulmonary lobectomy] *Rozhl Chir.* 2008 Apr;87(4):176-9.
- 97.** Bustin SA.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
- 98.** Corbett research: Protocol for DNA Amplification Detection in Real-Time PCR Using Sybr-green I Intercalating Dye; 2001.
- 99.** Kausitz, J.: Radioimunoanalýza v onkologii. LF UK Plzeň, 1995.
- 100.** Adam Z. et al.: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, Grada, Praha 2003.
- 101.** Berglund A, Molin D, Larsson A, Einarsson R, Glimelius B. Tumour markers as early predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. *Ann Oncol.* 2002 Sep;13(9):1430-1437.
- 102.** Rosen M, Chan L, Beart RW, Vukasin P, Anthone G. Follow-up of colorectal cancer: a meta analysis. *Dis Colon Rectum.* 1998; 41: 1116-1126.
- 103.** Tampellini M, Berruti A, Bitossi R, Gorzegno G, Alabiso I, Bottini A, Farris A, Donadio M, Sarobba MG, Manzin E, Durando A, Defabiani E, De Matteis A, Ardine M, Castiglione F, Danese S, Bertone E, Alabiso O, Massobrio M, Dogliotti L. Prognostic significance of changes in CA 15-3 serum levels during chemotherapy in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Aug;98(3):241-8.
- 104.** Vinolas N, Molina R, Fuentes R, et al. Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in non small cell lung cancer (NSCLC) patients as an aid in histological diagnosis and prognosis: Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Lung Cancer.* 29; 2000; Supplement 1 : 195.
- 105.** Topolcan O, Holubec L Jr, Finek J, Stieber P, Holdenrieder S, Lamerz R, Holubec Sen L, Svobodova S, Visokai V, Lipska L. Changes of thymidine kinase (TK) during adjuvant and palliative chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1831-3.
- 106.** Finek J, Holubec L Jr, Topolcan O, Salvat J, Pikner R, Holdenrieder S, Stieber P, Lamerz R, Holubec Sen L, Svobodova S, Visokai V, Helmichova E. Clinical relevance of tumor markers for the control of chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1655-8.
- 107.** Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, Tsubota N. Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease. *Ann Thorac Surg.* 2004 Jul;78(1):216-21.
- 108.** Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, Tokunaga T, Ito M. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell

lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer*. 2004 Aug 15;101(4):803-9.

109. Zemaitis M, Sakalauskas R, Malakauskas K, Muley T, Fischer JR, Lahm H. Clinical and prognostic significance of tumor markers cytokeratin 19 fragment carcinoembryonic antigen, and neuron-specific enolase in lung cancer. *Medicina*. 2005;41(7): 566-76.

110. Nisman B, Lafair J, Heching N, Lyass O, Baras M, Peretz T, Barak V. Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1, and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma: does the combined use of cytokeratin markers give any additional information? *Cancer*. 1998 May 15;82(10):1850-9.

111. Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, Tsubota N. Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease. *Ann Thorac Surg*. 2004 Jul;78(1):216-21.

112. Šafránek J., Topolčan O., Holubec L., Pešek M., Třeška V., Klečka J., Špidlen V., Vodička J., Šimánek V. Predikce recidivy nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) po radikální operaci využitím onkomarkerů. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*, 67, 2007, č.5, s.194-197.

113. Brattström D, Wagenius G, Sandström P, Dreilich M, Bergström S, Goike H, Hesselius P, Bergqvist M. Newly developed assay measuring cytokeratins 8, 18 and 19 in serum is correlated to survival and tumor volume in patients with esophageal carcinoma. *Dis Esophagus*. 2005;18(5):298-303.

114. Yamamura T., Nakanishi K., Hiroi S., Kumaki F., Sato H., Aida S. and Kawai T. Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase-2 in nonsmall cell lung carcinomas. *Lung Cancer*, Volume 35, Issue 3, March 2002, Pages 249-255.

115. Hoikkala S., Pääkkö P., Soini Y., Mäkitaro R., Kinnula V. and Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue MMP-2/TIMP-2-complex are better prognostic factors than serum MMP-2, MMP-9 or TIMP-1 in Stage I-III lung carcinoma. *Cancer Letters*, Volume 236, Issue 1, 8 May 2006, Pages 125-132.

116. Jumper C., Cobos E. and Lox C. Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment, *Respir. Med.* 98 (2004), pp. 173-177.

117. Sasaki H, Yukiue H, Moiriyama S, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M, Kiriya M, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res*. 2001 Dec;101(2):242-7.

118. Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, Johansson R, Ropponen K, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinases 7 and 9 in non-small cell lung cancer Relation to clinico-pathological factors, beta-catenin and prognosis. *Lung Cancer*. 2006 Jan 16;: 14 -19.

- 119.** Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1997 May;28(5):613-622.
- 120.** Yamamura T, Nakanishi K, Hiroi S, Kumaki F, Sato H, Aida S, Kawai T. Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase-2 in nonsmall cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2002 Mar;35(3):249-55.
- 121.** Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G, Niestroy A, Dahlmann N, Peters A, Berger J, Fiedler W, Hossfeld DK. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002 Oct;13(10):1550-7.
- 122.** Jumper C, Cobos E, Lox C. Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. *Respir Med* 2004 Feb;98(2):173-7.
- 123.** Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, Klein C, Passlick B, Pantel K. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003 Feb 20;103(5):647-51.
- 124.** Safranek J., Holubec L., Topolcan O., Pesta M., Klecka J., Vodicka J., Finek J., Kormunda S., and Pesek M. Expression of mRNA MMP-7 and mRNA TIMP-1 in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research* 2007 Jul-Aug;27(4C):2953-6.
- 125.** Brundage MD, Davies D, Mackillop MB. Prognostic factors in non-small cell lung cancer-a decade of progress. *Chest* 2002; 122: 1037-57. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses *Cancer Treatment Reviews*, Volume 33, Issue 3, May 2007, Pages 230-283 N.
- 126.** Topolcan O, Holubec L Jr, Finek J, Stieber P, Holdenrieder S, Lamerz R, Holubec Sen L, Svobodova S, Visokai V, Lipska L. Changes of thymidine kinase (TK) during adjuvant and palliative chemotherapy. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1831-3.
- 127.** Thomas Muley, Timea-Helene Fetz, Hendrik Dienemann, Hans Hoffmann, Felix J.F. Herth, Michael Meister, Werner Ebert. Tumor volume and tumor marker index based on CYFRA 21-1 and CEA are strong prognostic factors in operated early stage NSCLC Lung Cancer, Volume 60, Issue 3, June 2008, Pages 408-415.
- 128.** Hisashi Suzuki, Shigemi Ishikawa, Hiroaki Satoh, Hiroichi Ishikawa, Mitsuaki Sakai, Tatsuo Yamamoto, Masataka Onizuka, Yuzuru Sakakibara . Preoperative CYFRA 21-1 levels as a prognostic factor in c-stage I non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Volume 32, Issue 4, October 2007, Pages 648-652.
- 129.** Katsunari Matsuoka, Shinichi Sumitomo, Nariyasu Nakashima, Daisuke Nakajima, Noriyuki Misaki. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Volume 32, Issue 3, September 2007, Pages 435-439.

- 130.** Hamada C., Tanaka F., Ohta M., Fujimura S., Kodama K., Imaizumi M., Wada H. Meta-analysis of postoperative adjuvant chemotherapy with tegafururacil in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncology* 2005; 23:4999-5006.
- 131.** Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, et al. Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest* 1998;102:1321-31.
- 132.** Faveeuw C, Preece G, Ager A. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 2001;98:688-95.
- 133.** Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000;19:6642-50.
- 134.** Sieneel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, Klein C, Passlick B, Pantel K. *Int J Cancer*. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. 2003 Feb 20;103(5):647-51.

14. Seznam zkratek

ALL	Akutní lymfocytární leukemie
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrom
BM	Bazální membrána
CA 125	Mucinózní antigen CA 125
CA 15-3	Mucinózní antigen CA 15-3
CA 19-9	Mucinózní antigen CA 19-9
CA 242	Mucinózní antigen CA 242
CA 50	Mucinózní antigen CA 50
CDK	Cyklin dependentní kinázy
CEA	Karcinoembryonální antigen
CML	Chronická myeloidní leukemie
COPD	Chronical obstructive Pulmonary Disease
CYFRA 21-1	Cytokeratinový marker CYFRA 21-1
DED	Death effector domain
DFI	Disease free interval – bezpříznakové přežití
ECM	Extracelulární matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome
HTLV-1	Virus T – leukémie a její odpovídající lymfom.
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-I	Inzulin like growth factor I
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LDH	Laktátdehydrogenáza
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
MMPs	Matrix metaloproteinázy (více druhů)
MonoTotal	Cytokeratinový marker
NSCLC	Non-small-cell Lung Cancer, nemalobuněčný plicní karcinom
NSE	Neuron specifická enoláza
OS	Overall survival – celkové přežití
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PET-CT	Positronová emisní tomografie v kombinaci s CT
PSA	Prostase-specific antigen
RAS	Protein RAS (p21)
ROC	Receiving operative curves (křivka statistického grafu)
RT-PCR	Reverzní transkripce spojená s PCR
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction - RT polymerázová řetězová reakce
SCLC	Small-cell Lung Cancer, malobuněčný plicní karcinom
TGF α , PDGF	Růstové faktory protoonkogenů
TIMPs	Tkáňové inhibitory matrix metaloprozeináz (více druhů)
TK	Tymidinkináza
TNFR	Receptor TNF- α
TNF- α	Tumor necrosis factor
TPA	Tkáňový polypeptidový antigen
TPS	Tkáňový specifický polypeptidový antigen
VCAM	Vascular cell adhesive molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

15. Literatura a prezentace autora k tématu disertační práce

Publikace v odborných časopisech

Safranek J., Holubec L., Topolcan O., Pesta M., Klecka J., Vodicka J., Finek J., Kormunda S., and Pesek M. Expression of mRNA MMP-7 and mRNA TIMP-1 in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research* 2007 Jul-Aug;27(4C):2953-6.

Šafránek J., Topolčan O., Holubec L., Pešek M., Třeška V., Klečka J., Špidlen V., Vodička J., Šimánek V. Predikce recidivy nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) po radikální operaci využitím onkomarkerů. *Studia Pneumologica et Phthisiologica*, 67, 2007, č.5, s.194-197.

Topolcan O, Holubec L, Polivkova V, Svobodova S, Pesek M, Treska V, **Safranek J**, Hajek T, Bartunek L, Rousarova M, Finek J. Tumor markers in pleural effusions. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4A):1921-4.

Abstrakta přednášek a posterů

NSCLC tumor markers, view of surgeon. Šafránek J., Špidlen V., Vodička J., Klečka J., Šimánek V., Topolčan O., Holubec L., Pešta M. CECHTUMA, 31.5-1.6. 2006, Praha. *Přednáška.*

Pooperační dynamika sérových nádorových markerů (CEA, CYFRA 21.1, NSE, TK, TPS) pacientů s NSCLC. Šafránek J., Špidlen V., Vodička J., Klečka J., Šimánek V., Topolčan O., Holubec L., Pešta M. 13th Congress of the Slovak and Czech Pneumologic and Phthisiologic Societies, 15.-18. června 2006, Hradec Králové. *Poster.*

Mají nádorové markery prognostický význam u nemocných radikálně operovaných pro nemalobuněčný plicní karcinom ? Šafránek J., Holubec L., Topolčan O., Klečka J., Špidlen V., Vodička J., Šimánek V., Fínek J., Časová M., Pešek M. XXXI. Brněnské onkologické dny. 23.-25. dubna 2007. *Přednáška.*

Nádorové markery v pooperační prognóze NSCLC, Šafránek J., Holubec L., Topolčan O., Klečka J., Špidlen V., Vodička J., Šimánek V., XV Západočeské pneumoonkologické dny, 8-9. 11. 2007, Darová. *Přednáška.*

Predictors of Prolonged Air Leak (PAL) After Pulmonary Lobectomy. Safranek J., Vodicka J., Houdek K., Treska V., Topolcan O., Holubec L. European Respiratory Society 18 th Annual Congress 2008, October 4-8, 2008, Berlin. *Přednáška.*

Cytoceratins in Lung Cancer.: O. Topolcan, M. Prazakova, L. Holubec jr, M. Casova, J. Safranek, .Vrzalová, S. Kormunda, M.Pešek. XXIII IATMO Conference, Italy, 19th, 20th, 21st October 2007, *Poster.*

Expres mRNA MMP-7 a mRNA TIMP-1 v nádorové tkáni NSCLC. 13th Congress of the Slovak and Czech Pneumologic and Phthisiologic Societies, 15.-18. června 2006, Hradec Králové. *Přednáška.*

Quantitative assesment of matrix metalloproteinasis 7 (MMP-7) and tissue inhibitor of MMP-7 (TIMP1) in NSCLC tissue samples. Safranek, J., Klecka, J., Spidlen, V., Pesta, M., Topolcan, O. European Respiratory Society 16 th Annual Congress 2006, September 2-6, 2006, Munich. *Přednáška.*

Post operative dynamism of NSCLC tumor markers (CEA, CYFRA 21.1, NSE, TK, TPS). Safranek, J., Topolcan, O., Klecka, J., Spidlen, V., Vodicka, V., Simanek, V. European Respiratory Society 16 th Annual Congress 2006, September 2-6, 2006, Munich. *Poster.*

Predictive and prognostic importance of tumor markers at patients with non-small cell lung carcinoma undergoing radical surgery. Topolcan O., Safranek J., Klecka J., Spidlen V., Svobodova S., Holubec L., Vodicka V., Treska V., Simanek V., Pesek M. XI. International Symposium on Biology and clinical usefulness of tumor markers. 21 – 24 February 2007, Barcelona (Spain). *Poster.*

Monototal vs. other cytokeratin markers in NSCLC. Safranek J., Treska V., Topolcan O., Holubec L. European Respiratory Society 18 th Annual Congress 2008, October 4-8, 2008, Berlin. *Poster.*

Grantová studie související s projektem

autor je spoluřešitelem grantového projektu *IGA MZČR 9343-3 : Využití biologické aktivity nádoru pro prognózu a optimalizaci léčby nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC).* na léta 2007-2009.

16. Souhrn

VYUŽITÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ V POOPERAČNÍ PROGNÓZE NEMALOBUNĚČNÉHO KARCINOMU PLIC.

Úvod :

V klinické praxi NSCLC jsou stále nejčastěji užívanými prognostickými parametry stádium onemocnění, postižení lymfatických uzlin hilu či mediastina. Tyto faktory nejsou dostatečné a proto se hledají nové prognostické parametry – onkomarkery. Zatím uplatnění onkomarkerů pro NSCLC je hlavně k monitoraci efektu léčby popřípadě detekci relapsu karcinomu. Práce je zaměřena na zhodnocení významu markerů pro NSCLC.

Metodika :

Celkový soubor zahrnuje 125 pacientů, kteří byli operováni pro NSCLC v letech 2004-2007. Postupně byly hodnoceny dílčí skupiny pacientů. Sérové markery CYFRA 21-1, CEA, TK, TPS, NSE imunoanalyticky u 34 pacientů. Sérové parametry angiogeneze Luminex[®] xMAP[®] technologií u 27 pacientů. Imunoanalyticky stanovené sérové hodnoty cytokeratinů u 125 pacientů. Expresse metaloproteináz (MMP-7, MMP-9) a jejich inhibitorů (TIMP-1, TIMP-2) v tkáni NSCLC u 91 pacientů vs. plicní tkáni pacientů s benigním onemocněním (12 pacientů). Na závěr hodnocení OS a DFI dle tkáňové exprese metaloproteináz a jejich inhibitorů v souboru 76 pacientů. Srovnání bylo prováděno v klinické skupině progresu a remise.

Výsledky :

Hodnoty p-value, rozdílů sérových hodnot daného markeru mezi skupinami remise vs. progresu, rok a délka od operace činí pro TK=0,0176; TPS=0,0378; CYFRA 21-1=0,0179. Významný je rozdíl sérových hodnot pacientů ve skupině remise vs. progresu pro cytokeratinový marker MonoTotal (p= 0,0077). V podskupině adenokarcinomu je významný rozdíl (p< 0,05) mediánů hodnot oproti skupině pacientů s benigním onemocněním.

Významné jsou rozdíly v absolutních i normalizovaných hodnotách tkáňových expresí MMP-7 i TIMP-1 (p=0,003, resp 0,0018) mezi tkání NSCLC a benigní plicní tkání.

Hodnota exprese TIMP-2 v operačně odebrané tkáni epidermoidní formy NSCLC je statisticky významný (p=0,0398, resp. 0,0500) faktor bezpříznakového přežití, ostatní hodnocené parametry nikoli.

Závěr :

Z vyšetřených markerů má stále klinicky největší význam vyšetření klasických onkomarkerů, především CYFRA 21-1, nově MonoTotal (senzitivní pro epidermoidní karcinom) a CEA (pro adenokarcinom). Dále TK a TPS, které projevují rychlé, dynamické změny dle klinického stavu. Práce potvrzuje význam metaloproteináz (MMP7, MMP-9 a TIMP-1 a TIMP-2) v růstu a progresi NSCLC. Rychlý růst exprese TIMPs (především TIMP-2), z nich činí nadějně markery pro budoucí výzkum.

17. Summary

USE OF TUMOR MARKERS IN POSTOPERATIVE PROGNOSIS OF NON-SMALL-CELL LUNG CANCER

Introduction:

The most frequently used prognostic parameters in clinical practice of NSCLC are disease stadium and affection of hilar or mediastinal lymph nodes. These phactors are not sufficient and therefore new prognostic parameters - tumor markers - are being searched for. Tumor markers regarding NSCLC have mainly been used so far to monitore effects of medical treatment or detection of carcinoma recurrency. The study concentrates on assessment of tumor markers significance for NSCLC.

Methods:

The total group includes 125 patients operated on for NSCLC in the years 2004-2007. Single groups of patients were assessed successively. Serum markers CYFRA 21-1, CEA, TK, TPS, and NSE were assessed in an immunoanalytical way in 34 patients: Serum parameters of angiogenesis through Luminex[®] xMAP[®] technology were assessed in 27 patients. Serum values of cytokeratins were assessed in an immunoanalytical way with 125 patients. Expressions of metalloproteinases (MMP-7, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) were assessed in NSCLC tissue with 91 patients and in lung tissue with 12 patients with benign pulmonary disease. Finally, OS and DFI were assessed in accordance with tissue expression of metalloproteinases and their inhibitors with a group of 76 patients. Comparison was executed in clinical groups of progression and remission.

Results:

A year or longer time after a surgery, p-values, values of differences of serum values of given markers between remission and progression groups are following: for TK=0,0176 for TPS=0,0378 and for CYFRA 21-1=0,0179. A significant difference was detected in serum values of the remission group patients compared to the progression group of patients for the cytokeratin marker MonoTotal (p= 0,0077). In the adenocarcinoma group there was a significant difference of median values (p< 0,05) detected compared to the group of benign pulmonary disease patients. Significant are differences of both absolute and normalized values of the tissue expressions of MMP-7 and TIMP-1 (p=0,003; 0,0018 resp.) between NSCLC tissue and benign lung tissue. The expression value of TIMP-2 of squamous form of NSCLC tissue taken during a surgery is a statistically significant (p=0,0398; 0,0500 resp.) factor of disease free interval, whereas other assessed parameters are not.

Conclusion:

Regarding all the tested markers, the most clinically significant are classical tumor markers, predominantly CYFRA 21-1, recently MonoTotal (sensitive for squamous carcinoma), and CEA (for adenocarcinoma). Other significant markers are TK and TPS which show fast and dynamic changes according to clinical state. This study confirms the significance of metalloproteinases (MMP7, MMP-9, and TIMP-1 and TIMP-2) from the point of view of growth and progression of NSCLC. Rapid growth of TIMPs (mainly TIMP-2) expression makes these markers promising for future research.