

# KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

**Oddělení nukleární medicíny  
Centrální izotopová laboratoř**



**Inzulinu podobné a jiné růstové faktory a nádory**

**Autoreferát dizertační práce**

Plzeň 2011

Mgr. Radek Kučera

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE  
FACULTY OF MEDICINE IN PILSEN**

**Department of Nuclear Medicine  
Central Izotop Laboratory**

**Insulin like and other growth factors and tumors**

**Doctoral thesis summary**

Plzeň 2011

Mgr. Radek Kučera

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorandského studia v imunoanalytických laboratořích na oddělení nukleární medicíny FN Plzeň.

This doctoral thesis was performed as a part of full-time form of doctoral degree study in immunoanalytic laboratories of department of nuclear medicine FH Plzeň.

**Uchazeč/Candidate:**

Mgr. Radek Kučera  
ONM, Klatovská nemocnice a.s.  
Plzeňská 569  
339 38 Klatovy

**Školitel/Supervisor:**

prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.  
ONM-OID FN Plzeň  
Dr. E.Beneše 13  
30599 Plzeň

**Oponenti/Oponents:**

prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FaF v Hradci Králové, UK  
Heyrovského 1203,  
500 05 Hradec Králové

doc. RNDr. Kristian Šafarčík, Ph.D.  
Katedra biomedicínckých oborů, LF, Ostravská univerzita  
Dvořákova 7  
701 03 Ostrava

Autoreferát byl odeslán dne/ Summary was sent on 15.7.2011

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací v oboru vnitřní lékařství se koná/ The defence of the doctoral thesis take a place on 24.8.2011

Místo obhajoby/ The place of defence: Šafránkův pavilon, LF v Plzni UK, Alej Svobody 31, Plzeň, 32318

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova /The doctoral thesis is accessible at dean's office of Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University: Husova 3, Plzeň, 30605

## OBSAH:

1	Úvod.....	4
2	Teoretická část.....	4
2.1	IGF .....	4
2.2	IGFBP.....	4
2.3	Receptory pro IGF.....	5
2.4	Signální dráhy IGF .....	5
2.5	IGF a jeho vliv na nádorovou transformaci buněk.....	7
2.5.1	Souhrnné tabulky inzulinu podobných růstových faktorů, vazebných proteinů a nádorů .....	7
2.6	Ostatní růstové faktory .....	9
2.6.1	HGF.....	9
2.6.2	EGF .....	9
2.6.3	TGF .....	9
2.6.4	VEGF .....	10
2.7	Nádorové markery .....	10
2.7.1	CEA.....	10
2.7.2	CA 15-3 .....	11
3	Cíl práce .....	11
4	Experimentální část .....	12
4.1	Metodika.....	12
4.1.1	Odběr vzorků.....	12
4.1.2	Použité imunoanalytické metody .....	12
4.2	Soubory pacientů.....	13
4.3	Statistické vyhodnocení.....	14
4.4	Výsledky.....	14
4.4.1	IGF1 a karcinom kolorekta, plic, prsu a prostaty .....	14
4.4.2	Nádorové markery, růstové faktory, IGFBP3 a nádory prsu .....	15
5	Diskuze.....	21
6	Závěr.....	24
7	Závěry pro klinickou praxi:.....	25
8	Perspektivy .....	25
9	Shrnutí .....	26
10	Summary .....	28
11	Literatura .....	30
12	Práce autora .....	33

# 1 Úvod

V posledních několika letech se velice často diskutuje vliv IGF a jejich vazebných proteinů na vznik a progresi nádorů. Již začátkem 80. let minulého století se objevily práce, které upozorňovaly na možnou spojitost zvýšené produkce inzulínu podobných růstových faktorů se zvýšeným výskytem nádorů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 IGF

Inzulínu podobné růstové faktory (IGF, insulin-like growth factors, dříve somatomediny) jsou peptidy, které se podílejí na řízení růstu, metabolismu, přežívání a diferenciaci buněk a jsou regulovány růstovým hormonem (GH). IGF1 a IGF2 se skládají z malých peptidů, které jsou z 50% homologní s proinzulínem. Oba typy IGFs jsou syntetizovány v mnoha fetálních a dospělých tkáních. IGFs jsou obsaženy i v mateřském mléce.

IGFs mají své specifické vazebné proteiny (IGFBP, insulin-like growth factor binding proteins). Až 95 % IGFs cirkuluje v krvi vázáno na specifické vazebné proteiny. Funkcí vazebného proteinu je prodloužit poločas rozpadu faktorů růstu v oběhu na několik hodin. IGF1 je bazický peptid s nízkou molekulovou hmotností 7 649 Da. Je tvořen jednoduchým řetězcem o 70 aminokyselinách. IGF1 je produkován ve velkém množství v játrech (přibližně 10 mg / den). Tato je pevně řízena růstovým hormonem (GH) (Dupont J., 2002). IGF1 je produkován lokálně i v mnoha jiných tkáních např. ledvin, srdce, plic, tukové tkáni a tkáních různých žláz. IGF1 je produkován také chondroblasty, fibroblasty a osteoklasty. Na orgánové úrovni IGFs účinkují autokrinním i parakrinním mechanismem, a jsou schopny komunikovat s ostatními místně produkovánými růstovými faktory a steroidními hormony (Maor S., 2007). Stručnou charakteristiku IGF ukazuje tabulka 1.

**Tab1: IGF**

Růstový faktor	Molekulová hmotnost	Počet AK	Fyziologická funkce
<b>IGF1</b>	7 649 Da	70	Řízení růstu, metabolismu, přežívání a diferenciacie buněk <i>v postnatálním vývoji</i>
<b>IGF2</b>	7 400 Da	67	Řízení růstu, metabolismu, přežívání diferenciacie buněk <i>v prenatalním vývoji</i>

### 2.2 IGFBP

IGF1 a IGF2 mají své specifické vazebné proteiny (IGFBP, insulin-like growth factor binding proteins).

IGFBPs se nacházejí v různých tělních tekutinách, jako je krevní sérum, plodová voda a mozkomíšni mok. IGFBPs jsou syntetizovány v játrech anebo jsou syntetizovány i různými typy nádorových buněk. IGFBPs mohou být regulovány, mimo jiné i tím, že IGF1 a IGF2 podporují přímo proteolytickou degradaci některých IGFBPs (IGFBP4) do fragmentů, které nevážou IGFs, a tím IGFs vlastně zvyšují svojí vlastní dostupnost v biologických tekutinách. IGFBPs zvyšují poločas IGFs v séru a inhibují nebo podporují působení IGFs vazbou na receptory cílových buněk. Navíc tyto vazebné proteiny fungují jako zásobárna IGFs v mezibuněčném prostoru. Některé IGFBPs brání in vitro růstu buněk. Buňky malobuněčného

karcinomu plic produkují vazebné proteiny pro IGFs, které se liší od těch nalezených v játrech a placentě. To podporuje teorii, že by mohly fungovat jako prostředníci v autokrinní nebo parakrinní IGFs regulaci růstu těchto nádorových buněk.

Stručnou charakteristiku IGFBP ukazuje tabulka 2.

**Tab2: IGFBP**

vazebný protein	mol. hm. (kDa)	vazebná afinita	Výskyt
<b>IGFBP1</b>	34	IGF1, IGF2	placenta, plodová voda
<b>IGFBP2</b>	27	IGF2	mozkomíšní mok
<b>IGFBP3</b>	53	IGF1, IGF2	<b>Sérum</b>
<b>IGFBP4</b>	26	IGF1, IGF2	Osteoblasty
<b>IGFBP5</b>	23	IGF1, IGF2 nízká afinita	ledviny, osteoblasty
<b>IGFBP6</b>	22,8	IGF2	mozkomíšní mok

*IGFBP7 (mac25), váže IGF1 a IGF2, nádorový supresor*

*IGFBP8 (CTGF) tkáňový pojivový růstový faktor, váže IGF2, proliferace kostních buněk*

## 2.3 Receptory pro IGF

Účinek IGF1 a IGF2 na buňku se odehrává prostřednictvím receptorů. IGF1 se také váže s receptorem pro inzulin (IR) a naopak. Heterologní ligand má však k receptoru 100x nižší afinitu. IGF2 má schopnost vázat se s vysokou afinitou na své receptory, ale též na receptory pro inzulin a receptory pro IGF1 (IGF1R). Dále se IGFs mohou vázat na hybridní receptory tvořené z poloviny IR a z poloviny IGF1R podjednotkou (Nakae J., 2001).

Stručnou charakteristiku receptorů pro IGF ukazuje tabulka 3.

**Tab3: Receptory pro IGFs**

receptor	struktura	vazebná afinita	přenos signálu
<b>IGF1R</b>	dimer 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ podjednotky	IGF1, IGF2	<b>ANO</b>
<b>IGF2R</b>	monomer	IGF2	<b>NE</b>
<b>IR</b> (IR-A, IR-B)	dimer 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ podjednotky	IGF1, IGF2	<b>ANO</b>
<b>IR/IGF1R</b> (IR-A/IGF1R, IR-B/IGF1R)	dimer 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ podjednotky	IGF1, IGF2	<b>ANO</b>

## 2.4 Signální dráhy IGF

Po úspěšném navázání na receptor pokračuje přenos signálu uvnitř buňky po signální dráze, což je vlastně kaskáda enzymů a jejich substrátů (Schéma1).

Po aktivaci IGF1R dochází prostřednictvím adaptorového proteinu inzulin receptorový substrát (IRS1) k aktivaci dvou hlavních kaskád. První je signální dráha PI3K/PKB

(fosfatidylinositol-3-kináza/ proteinkináza B) a druhá kaskáda je signální dráha ERK (extracellular signal regulated kinases), která patří mezi několik MAP kinázových drah (MAPK mitogen activated protein kinases).

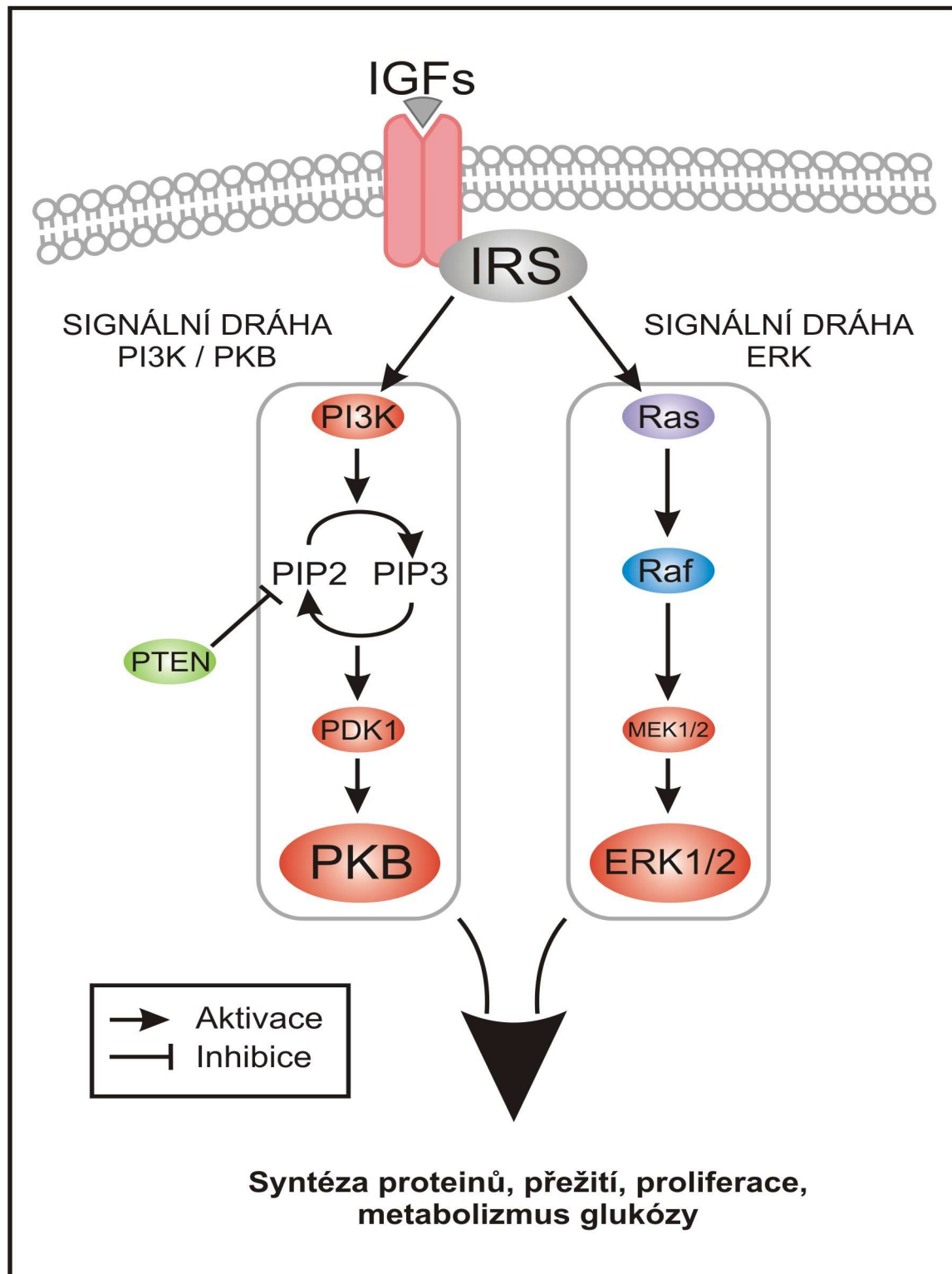


Schéma 1: Mechanismus účinku IGFs

## 2.5 IGF a jeho vliv na nádorovou transformaci buněk

Z mechanismu účinku IGF1 a IGF2 na buňky se usuzuje, že vysoké sérové hladiny IGFs zvyšují riziko vzniku nádorů a svým dalším působením zvyšují proliferaci a riziko maligního zvratu. Naproti tomu vysoké hladiny sérových vazebných proteinů IGFbps, zejména dominantního sérového vazebného proteinu IGFBP3, by měly riziko snižovat a růst buněk omezovat.

Základní podmínky přenosu signálu shrnuje Tabulka 4:

**Tab4: Základní předpoklady pro přenos signálu**

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>přítomnost funkčních receptorů</b></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>neporušená tyrosin kinázová (TK) doména</b></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>fosforylace TK domény</b></li></ul>

Exogenní overexprese IGF1R ve fibroblastech vede ke vzniku vysoce transformovaného fenotypu, který způsobuje tvorbu nádorů u nahých myší. Na druhou stranu, zablokování IGF1R signální dráhy pomocí IGF1R protilátek vede ke značnému snížení progresse melanomu, karcinomu prsu, karcinomu tlustého střeva, neuroblastomu a jiných nádorových buněk. Rizikové faktory nádorové transformace v souvislosti s produkcí a mechanismem účinku IGFs shrnuje Tabulka 5:

**Tab5: Rizikové faktory nádorové transformace**

<i>Extracelulární rizikové faktory</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>lokální extrahepatální produkce IGFs</b></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>autokrinní a parakrinní funkce IGFs</b></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>zvýšená sérová hladina IGFs</b></li></ul>
<i>Intracelulární rizikové faktory</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>mutace v signální dráze</b></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>genové mutace</b></li></ul>

### **2.5.1 Souhrnné tabulky inzulinu podobných růstových faktorů, vazebných proteinů a nádorů**

Souhrnně ukazují vztah nádorových diagnóz a inzulinu podobných růstových faktorů a jejich vazebných proteinů tabulky 6 a 7. Tabulka 6 ukazuje vztah sérových hladin inzulinu podobných růstových faktorů a vazebných proteinů. Tabulka 7 ukazuje vztah nádorových diagnóz a tkáňové exprese inzulinu podobných růstových faktorů a IGF1 receptoru.



**Tab6: Souhrnná tabulka vztahu sérových hladin IGF, IGFBP a nádorových diagnóz**

Diagnóza	IGF1	IGF2	IGFBP3	jiný IGFBP
Kolorektální adenom	↑	×	↑, ↑↓	↓ IGFBP1
Kolorektální karcinom	↑↓	×	↑↓	↓ IGFBP1
Endometriální karcinom	↑↓	↑↓	↓	×
Karcinom prsu	↑	×	↑↓	×
Ovariální karcinom	↑	×	↓	×
Karcinom děložního čípku	×	↑	↓	×
Karcinom prostaty	↑	×	↓	×
Karcinom žaludku	↑↓	×	↑↓	×
Hepatocelulární karcinom	↓	×	×	×
Karcinom pankreatu	↑↓	×	↑↓	↓ IGFBP1
Adenom štítné žlázy	↓	×	×	×
Karcinom plic	↑	↑↓	↓	×
Melanomy	↑	×	×	×
Akutní lyfoblastická leukémie	↓	↓	↓	↑ IGFBP2
Akutní myeloidní leukémie	×	×	×	×
Sarkomy	↓	↑	↓	×

**Vysvětlivky:**

↑ - zvýšená hladina, ↓ - snížená hladina, ↑↓ - nalezeny zvýšené i snížené hladiny  
 × - údaje nenalezeny

**Tab7: Souhrnná tabulka lokální produkce IGF, lokální exprese IGF1R a nádorových diagnóz**

Diagnóza	IGF1	IGF2	IGF1R
Kolorektální adenom	×	×	↑
Kolorektální karcinom	×	×	↑
Endometriální karcinom	×	×	↑
Karcinom prsu	×	×	↑
Ovariální karcinom	↑	↑	↑
Karcinom děložního čípku	×	↑	×
Karcinom prostaty	↑	×	↑
Karcinom žaludku	×	×	↑
Hepatocelulární karcinom	×	↑	↑
Karcinom pankreatu	×	×	↑
Adenom štítné žlázy	×	×	↑
Karcinom plic	↑	↑	↑
Melanomy	×	×	↑
Akutní lyfoblastická leukémie	×	×	↑
Akutní myeloidní leukémie	↑	×	↑
Sarkomy	×	×	↑

**Vysvětlivky:**

↑ - zvýšená tkáňová produkce či exprese, ↓ - snížená tkáňová produkce či exprese  
 × - údaje nenalezeny

## 2.6 Ostatní růstové faktory

### 2.6.1 HGF

HGF (Hepatocyte growth factor, hepatocytární růstový faktor) je parakrinně produkovaný růstový faktor, který působí na růst, pohyblivost a diferenciaci buněk. Je vylučován mezenchymálními buňkami a funguje jako multifunkční cytokin v buňkách především epiteloidního původu. Jeho schopnost stimulovat mitogenezi a invazivitu mu dává centrální roli v angiogenezi, tumorogenezi a regeneraci tkání. Je vylučováno jako neaktivní polypeptid a je štěpen serinovými proteázami na 69-kDa alfa řetězec a 34-kDa beta-řetězce. Disulfidický můstek mezi alfa a beta řetězcem vytváří aktivní, heterodimerickou molekulu. Účinek HGF na buňku je zprostředkován receptorem pro růstový faktor hepatocytů (HGFR) nebo též zvaný MET (Gallagher J.T., 2000).

MET je membránový receptor, který je nezbytný pro embryonální vývoj a hojení ran. HGF je jediný známý ligand MET receptoru. Při stimulaci MET růstovým faktorem HGF dojde ke spuštění kaskády MET signální dráhy, což vyvolává řadu biologických reakcí, které společně vedou k výsledku, známém jako invazivní růst. MET vyvolává růst nádoru, tvorbu nových cév (angiogeneze), které dodávají nádoru živiny a metastázy se šíří do dalších orgánů. Signální dráha MET je deregulována v mnoha typech lidských nádorů včetně rakoviny ledvin, jater, žaludku, prsu a mozku (Kemp L.E., 2006).

Na základě současných poznatků byly vyvinuty blokátory MET receptoru, které se již klinicky používají v onkologické léčbě, především v indikacích pro gastrointestinální a renální karcinom.

### 2.6.2 EGF

EGF (Epidermal growth factor, epidermální růstový faktor) je růstový faktor, který hraje důležitou roli v regulaci buněčného růstu, proliferace a diferenciaci. Lidský EGF je protein o molekulové hmotnosti 6045Da tvořený 53 aminokyselinami a třemi intramolekulární disulfidickými můstky. EGF se nachází v lidských krevních destičkách, makrofázích, moči, slinách, mléku a plazmě. EGF účinek na buňky je umožněn specifickým receptorem EGFR. Tento receptor, jinak také označován HER1 patří do skupiny receptorů, které jsou společně pro více růstových faktorů. HER1 může být využíván i růstovými faktory jako je TGF $\alpha$ . EGFR je exprimován na povrchu řady nádorů. V současné době jsou v klinickém použití inhibitory EGFR a používají se především v léčbě karcinomu v oblasti hlavy, krku a metastazujícího kolorektálního karcinomu. Tyto léky dokáží kromě blokace receptoru tlumit i autokrinní produkci TGF $\alpha$  a VEGF v buňce (Dvořák B., 2004).

### 2.6.3 TGF

TGF (Transforming growth factor, transformující růstový faktor) slouží k označení dvou tříd polypeptidových růstových faktorů, TGF $\alpha$  a TGF $\beta$ . Dvě třídy TGF však nejsou strukturálně ani geneticky příbuzné a působí prostřednictvím různých receptorů. Navíc, ne vždy vyvolávají buněčnou transformaci. TGF $\alpha$  hraje klíčovou roli v transformaci lidských buněk na některé druhy nádorů. Je syntetizován v makrofázích, mozkových buňkách a keratinocytech a napomáhá vývoji epitelu. TGF $\alpha$  patří do skupiny EGF proteinů. TGF $\beta$  existuje ve třech známými lidských podtypech: TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 a TGF $\beta$ 3. Tyto tři subtypy hrají důležitou roli v etiopatogenezi onemocnění pojivové tkáně známé jako Marfanův syndrom a při rozvoji některých druhů nádorů (Matt P., 2009). Dále hrají klíčovou roli při regeneraci tkání, buněčné

diferenciaci, embryonálním vývoj a regulaci imunitního systému. Všechny proteiny skupiny TGF byly původně charakterizovány jejich schopností navodit onkogenní transformaci v určitém systému buněčné kultury, jako např. ve fibroblastech krysích ledvin. Přidáním TGF do normální kultury fibroblastů ledviny potkanů vyvolává u buněk těchto tkání nekontrolovatelné množení a růst (Runyan CE., 2005).

Účinky této třídy růstových faktorů jsou zprostředkovány dvěma různými typy receptorů. TGF $\alpha$  využívá typ HER receptorů společně s EGF. TGF $\beta$  využívá odlišného typu receptorů nazývaného TGFBR. Tento receptor se skládá ze dvou podtypů TGFBR1 s TGFBR2. Interakce s receptorem začíná vazbou na TGFBR2 podjednotku, čímž se aktivuje podjednotka IGFBR1, signál prostupuje membránou a šíří se dále do buňky. Celá TGF $\beta$  signální dráha zasahuje svými účinky až na úroveň transkripce. TGF $\beta$  signální dráha je zapojena do celé řady buněčných procesů a následně je velmi silně regulována. Tento druh receptorů váže celou skupinu podobných ligandů, do které patří BMP (Bone morphogenetic proteins), GDF (Growth and differentiation factors), AMH (Anti-müllerian hormone), Activiny, Inhibiny (Nelson SM., 2007).

## 2.6.4 VEGF

VEGF (Vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor) je protein produkovaný buňkami a stimuluje vasculogenezi a angiogenezi. VEGF je název celé podskupiny růstových faktorů. Je to součást systému, který obnovuje přísun kyslíku do tkání v případě, že krevní oběh nedostatečně zásobuje tkáň kyslíkem. Normální funkcí VEGF je tvorba cév během embryonálního vývoje, novotvorba cév po zranění svalů a kolaterálních cév pro překonání míst s neprůchodným cévním řečištěm (Shah DK., 2010). Také nádory nemohou růst bez dostatečného prokrvení. Buňky nádorů jsou schopné za podpory VEGF růst a metastazovat. Produkce VEGF může být vyvolána v buňkách, které mají nedostatek kyslíku. Účinek VEGF umožňují VEGF receptory na endotelových buňkách. Na základě znalostí o fungování signální dráhy pro VEGF byly vyvinuty léky blokující VEGF receptory (Brown, DM., 2009). Tyto léky jsou již v klinickém použití a využívají se v onkologické léčbě především generalizovaného karcinomu ledvin a gastrointestinálních stromálních tumorů.

## 2.7 Nádorové markery

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

### 2.7.1 CEA

OSN-E

Sérový CEA patří k základním markerům studovaným u různých nádorových lokalizací. Jde o onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů o molekulové hmotnosti 180–200kDa. Za fyziologických podmínek je CEA produkován ve vyvíjejícím se embryu.

V dospělosti je omezeně syntetizován epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. CEA patří do imunoglobulinové genové rodiny a podílí se pravděpodobně na procesu adheze a metastazování buněk. CEA má v současné době význam především při stagingu a monitorování kolorektálních karcinomů, karcinomů plic, prsu, močového měchýře a dalších malignit. Z klinických zkušeností vyplývá, že se nedá použít ani pro screening ani pro primární nebo diferenciální diagnostiku nádorových onemocnění. V průběhu maligního procesu je produkován CEA nádorovou tkání, jeho hladiny se výrazně zvyšují především ve vztahu k celkové hmotě nádoru. Vzhledem k odbourávání játry a vylučování ledvinami je jeho hladina zvýšena u nemaligních postižení těchto orgánů (hepatitida, selhání ledvin atd.). Hladinu CEA může též zvyšovat Crohnova choroba, střevní polypy, onemocnění plic, pankreatitida, kouření (Žaloudík L., 1999).

### **2.7.2 CA 15-3**

Jde o glykoprotein o molekulové hmotnosti 290 kDa, antigen polymorfního epiteliálního mucinu (PEM), nazývaný rovněž MUC1. V dospělosti je syntetizován v epiteliálních buňkách vývodů mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů.

V současné době se CA15-3 využívá především k monitorování nemocných s karcinomem prsu. Koncentrace CA 15-3 koreluje se stadiem onemocnění. Při 90 % specificitě dosahuje senzitivita u neléčených nemocných pouze 20 - 40 %, u metastazujících nádorů až 80 %.

Relaps onemocnění bývá charakterizován senzitivitou CA 15-3 dosahující 60 - 90 %.

Stanovení CA 15-3 umožňuje předpovědět návrat onemocnění s předstihem několika měsíců před detekcí dostupnými zobrazovacími metodami. Dynamika změn po terapii obvykle koreluje s terapeutickým efektem. Stanovení nelze použít pro screening nemocných s karcinomem prsu a stanovení primární nebo diferenciální diagnózy. Sérovou hladinu CA 15-3 mohou zvyšovat benigní onemocnění prsu, benigní nádory trávicího ústrojí, jaterní cirhóza, akutní a chronická hepatitida, chronická renální insuficience, chronická bronchitida a pneumonie (Topolčan O., 2007).

## **3 Cíl práce**

Cíl:

Sledovat vztah růstových faktorů popř. jejich vazebných proteinů u nádorů z několika různých pohledů.

Pracovní hypotéza:

Umožní růstové faktory nebo jejich vazebné proteiny zlepšit diagnostiku a odhad prognózy nádorového onemocnění?

## 4 Experimentální část

### 4.1 Metodika

Hodnotil jsem sérové hodnoty analytů u dvou souborů pacientů.

První soubor čítal celkem 681 pacientů. U každého pacienta jsem vzal první měření hladiny IGF1 a rozdělil je na skupiny podle diagnózy. Vyloučil jsem pacienty s diabetem, protože diabetes může ovlivňovat produkci IGF1. Podle histologického nálezu jsem pacienty rozdělil do 4 skupin podle zjištěných diagnóz (tabulka 9). Pacienty v jednotlivých skupinách jsem porovnal s normálními hodnotami laboratoře s ohledem na věk. Hladiny IGF1 s věkem klesají, při statistickém vyhodnocení je nutné vzít v úvahu věk pacientů. Po statistickém zpracování vznikly 3 skupiny pacientů: snížená hladina, normální hladina a zvýšená hladina IGF1 (tabulka 10 a 11). Získané hodnoty jsem pak porovnal s údaji vyhledanými v literatuře (tabulka 12).

Ve druhé části jsem se věnoval souboru 100 žen s nádory prsu. Zejména jsem se zaměřil na porovnání a statistické vyhodnocení analytů u benigních a maligních nádorů. Byly měřeny hodnoty nádorových markerů CEA a CA15-3, IGF1, IGFBP3 a růstové faktory HGF, EGF, TGF a VEGF jako součást panelu růstových faktorů komerčně dostupného v systému multiplexové analýzy Luminex. Co se týče měřených hodnot, do své práce jsme vzal poslední měření příslušného analytu před operací a první měření, 1 týden po operaci. Hodnotil jsem změny hladin jednotlivých analytů před operací a po operaci. Především jsem se zaměřil na rozdíly mezi skupinami se zhoubným a nezhoobným nádorovým onemocněním. Ze souborů žen jsem vyloučil pacientky s diabetem. Sérové hladiny růstových faktorů a zjeména IGF1 mohou být diabetem ovlivněny, chtěl jsme tedy předejít ovlivnění výsledků tímto onemocněním. Výsledky ukazuje tabulka 14.

Dále jsem vyhledal v dostupné dokumentaci údaje o klinickém hodnocení pacientek a rozdělil skupinu s maligní nádorovou diagnózou do čtyř podskupin podle zjištěného stadia onemocnění. Protože se předoperační a pooperační hladiny jednotlivých analytů významně nelišily, zabýval jsem se v podrobnějším rozdělení pouze hladinami předoperačními.

Výsledky je možné vidět v tabulkách 15 – 22. Zjištěné výsledky jsem vynesl do grafů 1 - 8.

#### 4.1.1 Odběr vzorků

Vzorky žilní krve byly odebírány náběrovým systémem VACUETTE firmy Greiner Bio-one, Rakousko. Krev byla centrifugována při 1700xg po dobu 10 min. Získané sérové vzorky byly bez odkladu zamrazeny a uchovávány při -80°C. Vzorky byly rozmrazeny pouze 1x a to před vlastní analýzou.

#### 4.1.2 Použité imunoanalytické metody

Pro stanovení IGF1 v séru byla použita radioizotopová souprava IRMA IGF1 firmy IMMUNOTECH, Francie. Stanovení IGFBP3 bylo provedeno soupravou IRMA IGFBP3 firmy DiaSource, Belgie. Sérové hladiny CEA a CA 15-3 byly stanoveny analytickým systémem DxI firmy Beckman Coulter (USA). Pro stanovení růstových faktorů HGF, EGF, TGF a VEGF byl použit multiplexový panel xMAP Luminex systém od firmy MERCK (USA).

Immunoradiometrická stanovení (IRMA) patří mezi nekompetitivní imunoanalytická stanovení. V obou použitých IRMA soupravách je využit princip fixace jedné protilátky na

pevnou fází (plastovou stěnu zkumavky). Po přidání séra s analytem (antigenem) se tento váže na protilátku fixovanou na stěně zkumavky. Po promytí a odstranění nenavázaného zbytku antigenu je přidána druhá protilátka (tracer) značená I<sup>125</sup>. Po odmytí nenavázaného traceru následuje měření vázané radioaktivity. Vázaná radioaktivita je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku (Ekins RP., 1979).

Analytický systém DxI je založen na principu imunoenzymatické chemiluminiscenční analýzy. Dvě monoklonální protilátky reagují se dvěma epitopy analytu (antigenu). Jedna protilátka je vázána na magnetických částicích, druhá na sobě nese alkalickou fosfatázu. Po inkubaci následuje magnetická separace a promytí. Pak je přidán chemiluminiscenční substrát a po reakci s alkalickou fosfatázou následuje luminometrické měření. Světlo vytvořené touto reakcí je přímo úměrná koncentraci analytu (Price CP., 1997).

Principem multiplexové imunoanalýzy je vazba antigenu na protilátku navázanou na povrch barevně kódovaných mikrokuliček. Množství navázané látky je stanoveno díky druhé protilátce spojené s fluorescenční molekulou. Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru, který určuje jedním laserem spektrální kód kuličky (druh analytu) a druhým laserem množství navázané druhé protilátky (kvantitu analytu). Koncentrace jednotlivých analytů jsou vypočteny na základě standardních kalibračních křivek. Tento postup kombinující imunoanalýzu a průtokovou cytometrii umožňuje stanovení teoreticky až 100 analytů v jediném alikvotu vzorku o objemu 10–50 mikrolitrů (Vrzalová J., 2009).

## 4.2 Soubory pacientů

První soubor čítal celkem 681 pacientů. Jednalo se o sérové vzorky, které byly zpracovány v Imunoanalytické laboratoři ve FN v Plzni za období let 2000 – 2008. V tomto souboru byly obsaženy výsledky pacientů s kolorektálním karcinomem, karcinomem plic, prsu a prostaty. Věkové rozložení pacientů uvádí tabulka 8.

**Tab8: Rozložení věku pacientů v souboru hodnot IGF1:**

<b>Diagnóza</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>Medián věku (roky)</b>	<b>Min - Max (roky)</b>
<b>Kolorektální karcinom</b>	<b>401</b>	<b>67</b>	<b>23 – 87</b>
<b>Karcinom plic</b>	<b>71</b>	<b>62</b>	<b>44 – 78</b>
<b>Karcinom prsu</b>	<b>121</b>	<b>57</b>	<b>16 – 82</b>
<b>Karcinom prostaty</b>	<b>88</b>	<b>66</b>	<b>50 – 81</b>

Druhý soubor obsahoval výsledky pacientek s nádorem prsu. Soubor jsem rozdělil na dvě podskupiny podle typu nádoru – maligní a benigní. První podskupina čítala 89 žen s maligním nádorem prsu. Druhá podskupina obsahovala 21 žen s benigním nádorem prsu, většinou fibroadenomem. Vzorky patientských sér byly zpracovány v Imunoanalytické laboratoři ve FN v Plzni v období let 2008 – 2010. Věková charakteristika obou podskupin žen v době stanovení diagnózy je obsažena v tabulce 13.

**Tab13: Rozložení věku pacientek v souborech nádorů prsu:**

<b>Diagnóza</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>Medián věku (roky)</b>	<b>Min - Max (roky)</b>
<b>Maligní</b>	<b>89</b>	<b>65</b>	<b>28 – 84</b>
<b>Benigní</b>	<b>21</b>	<b>42</b>	<b>17 - 71</b>

Pokud se podíváme na věkové složení jednotlivých skupin, je patrný signifikantní věkový rozdíl mezi oběma skupinami ( $p < 0,0001$ ). Skupina s benigním nádorovým onemocněním je mladší s mediánem věku 42 let než skupina s maligním nádorem s mediánem věku 65 let. Věkový rozdíl mezi oběma skupinami jsem musel vzít v úvahu při vyhodnocování hladin IGF1, které se s věkem snižuje.

### 4.3 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení byl použit software SAS 9.2 (Statistical Analysis Software verze 9.2).

U souboru pacientů s karcinomem kolorekta, plíc, prsu a prostaty byly vypočítány absolutní a relativní četnosti zvýšených a snížených koncentrací IGF1 s intervalem spolehlivosti 95%. Podíl zvýšené/snížené koncentrace IGF1 byl srovnán binomickým testem s 5%. Byly spočítány souhrnné statistiky (průměr, medián, min, max) pro daný věk a IGF1. Pro porovnání distribuce koncentrací IGF1 mezi diagnózy byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test.

U souborů žen s nádory prsu byly spočítány souhrnné statistiky (průměr, medián, min, max) pro daný věk a jednotlivé analyty. Pro porovnání koncentrací analytů u maligních a benigních diagnóz byl použit Wilcoxonův test.

### 4.4 Výsledky

#### 4.4.1 IGF1 a karcinom kolorekta, plíc, prsu a prostaty

Tabulka 9 uvádí mediány koncentrací a dosažené minimální a maximální koncentrace IGF1 ve skupinách jednotlivých diagnóz bez věkového rozlišení.

**Tab9: Diagnózy a rozložení hodnot IGF1 u pacientů bez věkového rozlišení:**

<b>Diagnóza</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>Medián koncentrace (ng/ml)</b>	<b>Min - Max (ng/ml)</b>
<b>Kolorektální karcinom</b>	<b>401</b>	<b>148</b>	<b>2 - 559</b>
<b>Karcinom plíc</b>	<b>71</b>	<b>227</b>	<b>47 - 483</b>
<b>Karcinom prsu</b>	<b>121</b>	<b>186</b>	<b>24 - 474</b>
<b>Karcinom prostaty</b>	<b>88</b>	<b>192</b>	<b>47 - 481</b>

Výsledky statistického zpracování a porovnání s normálními hodnotami pro 95% populace ukazují tabulka 10 a 11.

**Tab10: Diagnózy a rozložení hodnot pacientů se stanoveným IGF1**

<b>Diagnóza</b>	<b>Snížená hladina</b>	<b>Normální hladina</b>	<b>Zvýšená hladina</b>	<b>Celkem pacientů</b>
<b>Kolorektální karcinom</b>	<b>65</b>	<b>280</b>	<b>56</b>	<b>401</b>
<b>Karcinom plíc</b>	<b>3</b>	<b>41</b>	<b>27</b>	<b>71</b>
<b>Karcinom prsu</b>	<b>9</b>	<b>98</b>	<b>14</b>	<b>121</b>
<b>Karcinom prostaty</b>	<b>8</b>	<b>51</b>	<b>29</b>	<b>88</b>
<b>Celkem pacientů</b>	<b>85</b>	<b>470</b>	<b>126</b>	<b>681</b>

**Tab11: Diagnózy a rozložení hodnot pacientů se stanoveným IGF1**

<b>Diagnóza</b>	<b>Snížená hladina (%)</b>	<b>Normální hladina (%)</b>	<b>Zvýšená hladina (%)</b>
<b>Kolorektální karcinom</b>	<b>16</b>	<b>70</b>	<b>14</b>
<b>Karcinom plic</b>	<b>4</b>	<b>58</b>	<b>38</b>
<b>Karcinom prsu</b>	<b>8</b>	<b>81</b>	<b>12</b>
<b>Karcinom prostaty</b>	<b>9</b>	<b>58</b>	<b>33</b>

V tabulkách je vidět, že procenta zvýšených hodnot u všech diagnóz statisticky významně převyšují 5%.

Nejvyšší procento zvýšených hodnot je u nádorů plic (38%) následované nádory prostaty (33%). Nejméně výrazné zvýšení je u nádorů prsu (12%).

Pokud se podíváme na skupinu kolorektálního karcinomu, tak vidíme, že statisticky významné je jak zvýšení (14%), tak rovněž i snížení (16%).

**Tab12: Porovnání hodnot IGF1 s literaturou**

<b>Diagnóza</b>	<b>Snížená hladina (%)</b>	<b>Normální hladina (%)</b>	<b>Zvýšená hladina (%)</b>	<b>Trendy z literatury</b>
<b>Kolorektální karcinom</b>	<b>16</b>	<b>70</b>	<b>14</b>	↑↓
<b>Karcinom plic</b>	<b>4</b>	<b>58</b>	<b>38</b>	↑↓
<b>Karcinom prsu</b>	<b>8</b>	<b>81</b>	<b>12</b>	↑
<b>Karcinom prostaty</b>	<b>9</b>	<b>58</b>	<b>33</b>	↑(↑↓)

Při porovnání s literaturou (tabulka 12) vykazovali pacienti v souboru kolorektálního karcinomu shodu se souhrnnými výsledky z literatury. Téměř stejné procento hodnot IGF1 bylo jak snížené, tak zvýšené.

U karcinomu plic jsem našel významně vyšší procento zvýšených hodnot oproti sníženým hodnotám.

Hodnoty IGF1 v našem souboru karcinomu prsu vykazovaly statisticky nepřilíš významnou převahu zvýšených hodnot.

U karcinomu prostaty jsem v literatuře našel pouze několik málo studií, kde bylo zvýšení nepřesvědčivé, proto jsou symboly pro současnou přítomnost zvýšených a snížených hladin uvedeny v závorkách. Soubor z FN Plzeň vykazoval významnou přítomnost zvýšených hladin IGF1.

#### **4.4.2 Nádorové markery, růstové faktory, IGFBP3 a nádory prsu**

Výsledky shrnuje tabulka 14. Jsou zde uvedeny předoperační a pooperační hodnoty jednotlivých analytů u obou souborů žen (maligní i benigní nádor) a statistické zhodnocení.



**Tab14: Porovnání hladin jednotlivých analytů u maligních a benigních nádorů prsu před operací a po operaci**

Analyt (jednotky)	Počet pacientů	Průměr	Median	Min.	Max.	ρ-value Wilcoxon test
<b>CEA před operací</b> (μg/l)	89	2,32	1,50	0,50	33,7	0,5753
<b>CEA před operací</b>	21	1,75	1,20	0,50	5,10	
<b>CEA po operaci</b>	67	1,95	1,10	0,50	25,3	0,6793
<b>CEA po operaci</b>	13	1,54	1,25	0,50	5,30	
<b>CA153 před operací</b> (kIU/l)	89	14,1	11,0	10,0	78,0	0,2878
<b>CA153 před operací</b>	21	11,7	11,0	10,0	17,0	
<b>CA153 po operaci</b>	67	13,5	10,0	10,0	81,0	0,9777
<b>CA153 po operaci</b>	13	12,0	12,0	10,0	16,0	
<b>IGF1 před operací</b> (ng/ml)	81	175	166	24,0	384	0,6292*
<b>IGF1 před operací</b>	21	248	237	92,0	521	
<b>IGF1 po operaci</b>	67	153	145	18,0	341	0,1997*
<b>IGF1 po operaci</b>	13	256	221	81,0	708	
<b>IGFBP3 před oper.</b> (ng/ml)	89	3618	3683	2203	6637	0,4223
<b>IGFBP3 před operací</b>	21	3898	3739	2182	7121	
<b>IGFBP3 po operaci</b>	67	3575	3475	2042	6480	0,1087
<b>IGFBP3 po operaci</b>	13	4054	3842	2614	6213	
<b>HGF před operací</b> (pg/ml)	85	3370	2676	262	21838	0,0016
<b>HGF před operací</b>	21	1799	1597	248	6861	
<b>HGF po operaci</b>	66	3572	2764	393	11135	0,0046
<b>HGF po operaci</b>	13	1871	1363	654	3531	
<b>EGF před operací</b> (pg/ml)	86	327	279	33,2	2115	0,1393
<b>EGF před operací</b>	21	366	342	105	776	
<b>EGF po operaci</b>	66	312	199	45,4	848	0,8480
<b>EGF po operaci</b>	13	297	218	122	626	
<b>TGFα před operací</b> (pg/ml)	86	22,2	14,0	4,9	142	0,3567
<b>TGFα před operací</b>	21	16,9	12,2	3,6	66,8	
<b>TGFα po operaci</b>	66	25,7	17,4	4,4	127	0,7762
<b>TGFα po operaci</b>	13	24,6	19,7	7,4	63,3	
<b>VEGF před operací</b> (pg/ml)	86	1441	322	16,0	10362	0,2024
<b>VEGF před operací</b>	21	3656	1009	16,0	15332	
<b>VEGF po operaci</b>	66	1359	533	16,0	12656	0,1334
<b>VEGF po operaci</b>	13	2956	1084	16,0	10000	

Vysvětlivky: **maligní nádor**, **benigní nádor**, statisticky významné

\*hodnoty ρ-value po adjustaci na věk

Protože, jak jsem uvedl v metodické části, se předoperační a pooperační hladiny jednotlivých analytů významně nelišily, zabýval jsem se v podrobnějším rozdělení pouze hladinami předoperačními.

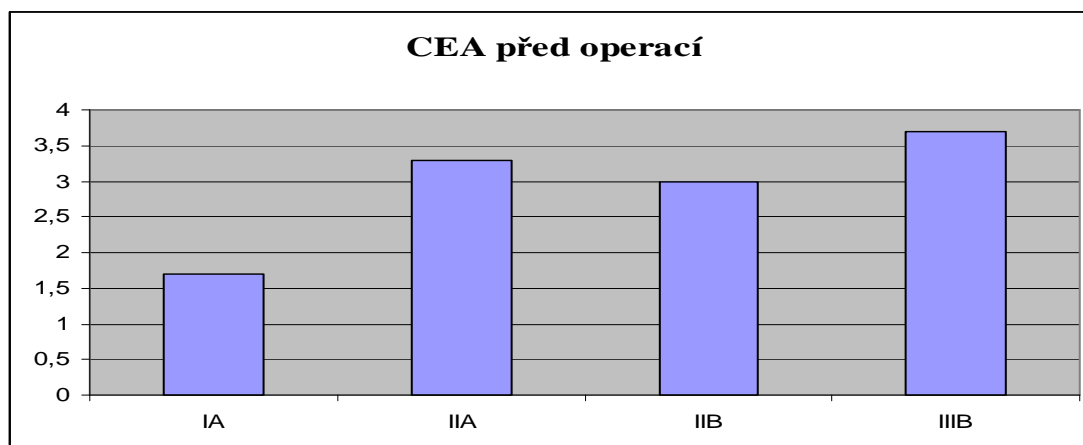
Výsledky po rozdělení do jednotlivých podskupin je možné vidět v tabulkách 15 – 22. Pro větší názornost jsem zjištěné výsledky vynesl i do grafů 1 - 8.

**Tab15: Přehled hladin CEA u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	48	1,7	1,4	0,5	7,4
IIA	22	3,3	1,3	0,5	33,7
IIB	12	3,0	2,4	0,9	7,3
IIIB	3	3,7	3,7	2,8	4,6

hodnoty koncentrací CEA v µg/l

**Graf1:**

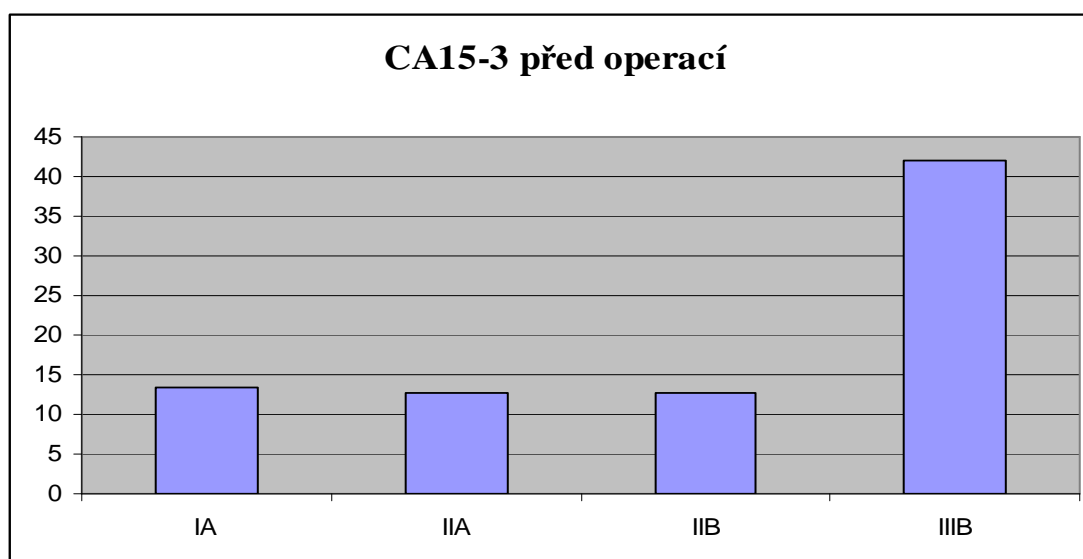


**Tab16: Přehled hladin CA15-3 u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	48	13,3	11,5	10,0	26,0
IIA	22	12,8	11,0	10,0	24,0
IIB	12	12,8	10,5	10,0	20,0
IIIB	3	42,0	30,0	18,0	78,0

hodnoty koncentrací CA15-3 v kIU/l

**Graf2:**

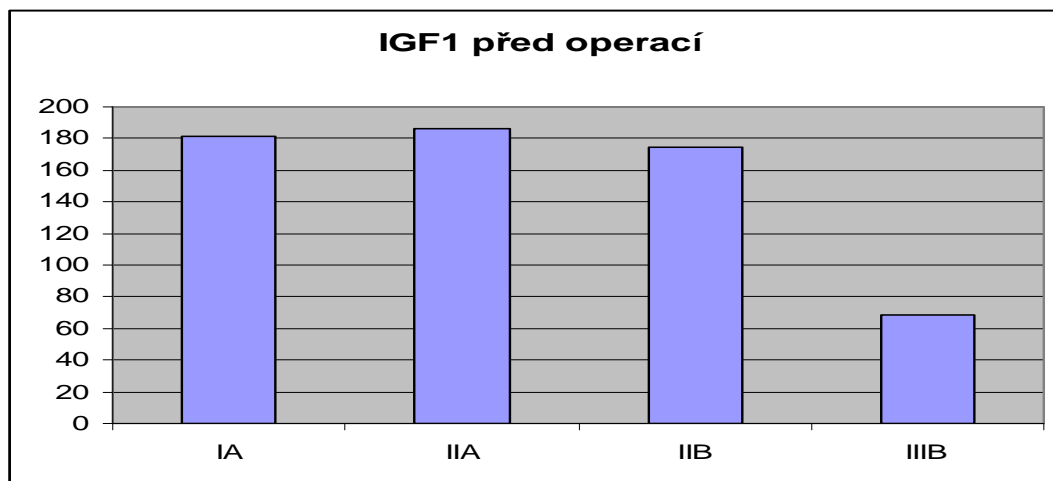


**Tab17: Přehled hladin IGF1 u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	48	181	168	24	369
IIA	22	186	162	71	384
IIB	12	175	180	32,0	381
IIIB	3	69,7	51,0	48,0	110

hodnoty koncentrací IGF1 v ng/ml

**Graf3:**

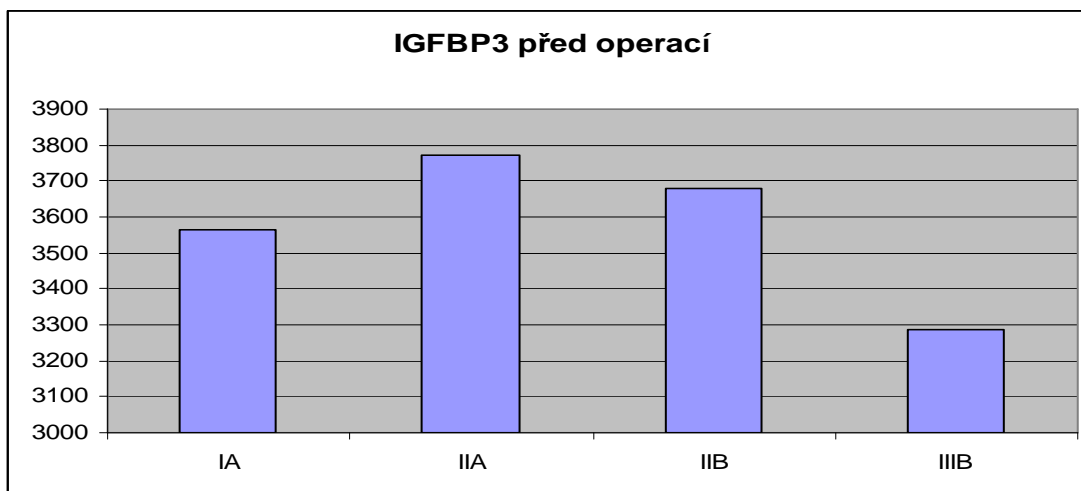


**Tab18: Přehled hladin IGFBP3 u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	48	3564	3645	2532	4864
IIA	22	3770	3703	2719	6637
IIB	12	3678	3866	2203	4802
IIIB	3	3286	3142	2616	4100

hodnoty koncentrací IGFBP3 v ng/ml

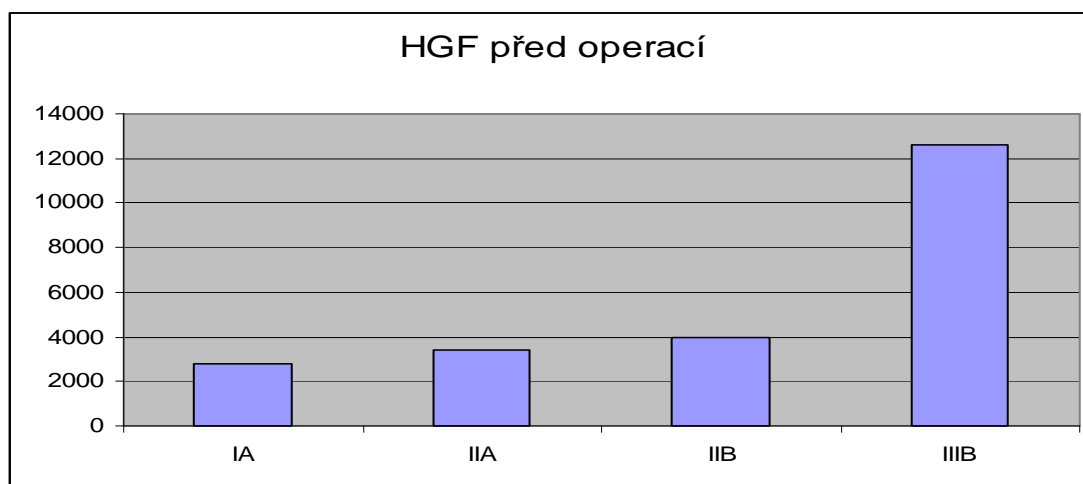
**Graf4:**



**Tab19: Přehled hladin HGF u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	47	2796	2748	323	7893
IIA	20	3396	2236	1004	13783
IIB	12	4002	2988	262	15856
IIIB	2	12585	12585	3331	21838

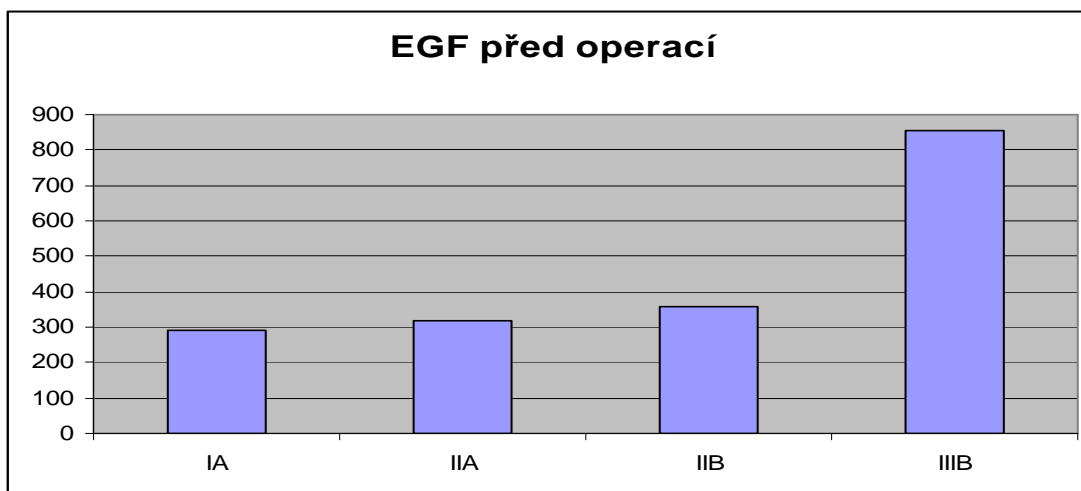
hodnoty koncentrací HGF v pg/ml

**Graf5:****Tab20: Přehled hladin EGF u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	47	293	237	33	1924
IIA	20	319	356	104	632
IIB	12	360	318	87,8	738
IIIB	3	854	266	183	2115

hodnoty koncentrací EGF v pg/ml

**Graf6:**

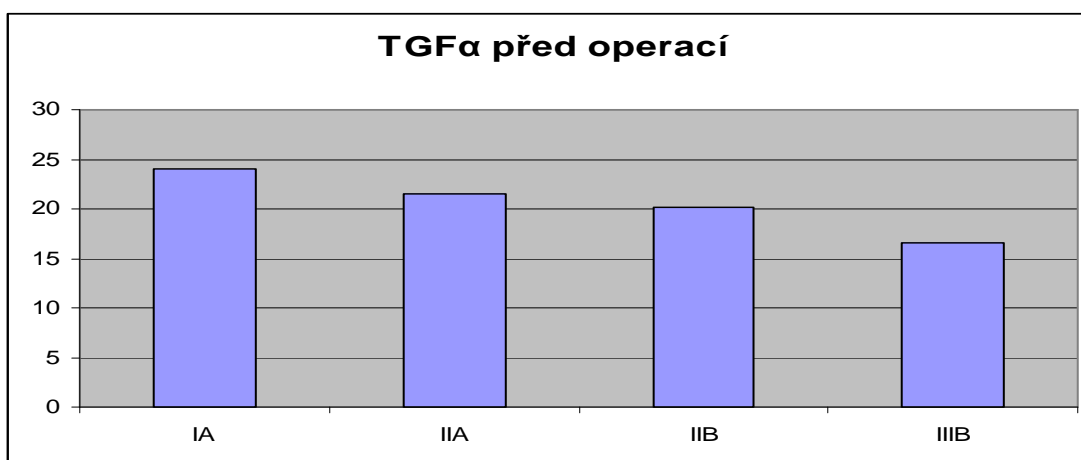


**Tab21: Přehled hladin TGF $\alpha$  u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	47	24,0	12,8	4,9	141
IIA	20	21,5	16,8	5,0	59,0
IIB	12	20,1	16,9	7,5	47,1
IIIB	3	16,5	12,1	8,5	29,0

hodnoty koncentrací TGF $\alpha$  v pg/ml

**Graf7:**

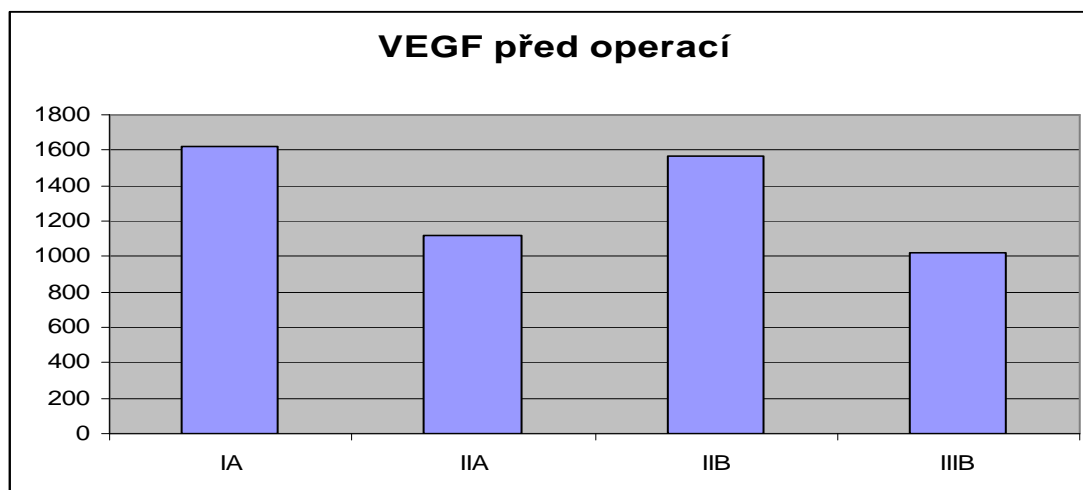


**Tab22: Přehled hladin VEGF u Ca prsu před operací**

Stadium	Počet pacientů	Průměr	Median	Min	Max
I	47	1624	365	16	10362
IIA	20	1117	704	31,8	4006
IIB	12	1565	246	85,1	10165
IIIB	3	1017	269	91,5	2690

hodnoty koncentrací VEGF v pg/ml

**Graf8:**



## 5 Diskuze

Když jsem sestavoval tabulky, které je možné vidět na závěr teoretické části, pochopil jsem, že hledat závislosti mezi sérovými hladinami IGF1 a nádory nebude lehké. Tabulky jsem dokončil v lednu tohoto roku, takže údaje v nich obsažené jsou dosti aktuální. Zabýval jsem se pouze výsledky studií publikovaných od roku 2005. Ve vztahu sérových hladin a nádorů (tabulka 6) se nedají vysledovat žádné obecné závislosti mezi sérovými hladinami IGF, IGFBP a nádory. Je proto nutné zabývat se každou diagnózou odděleně. U konkrétních diagnóz je možné již vysledovat určité trendy.

Pokud pokročíme při honocení vztahu systému IGF k nádorům na úroveň tkáňovou (tabulka 7), zjistíme, že obecným rysem, který se při sumarizaci výsledků potvrdil, je tkáňová exprese IGF1 receptoru. Tato exprese je znakem progresu nádorového onemocnění a negativním prognostickým faktorem. Buňky takto vybavené intenzivně rostou a jsou odolné vůči apoptóze. Tkáňovými expresemi jsem se však dále ve své práci nezabýval. Mým cílem bylo zhodnotit vztah sérových hladin.

Díky mnohaleté úzké spolupráci imunoanalytické laboratoře s dalšími pracovišti FN v Plzni jsem měl k dispozici velký soubor pacientů k hodnocení sérových koncentrací IGF1 a též poměrně velké množství výsledků s IGFBP3.

Ve skupině s kolorektálním karcinomem se podle literatury nedala vysledovat žádná závislost se změnami hladin IGF1. Náš soubor se choval stejně. Vyskytovaly se zde zvýšené, snížené i normální hodnoty. Jedinou prokazatelnou závislostí tedy zůstává skutečnost, že u pacientů s akromegálií nacházíme zvýšené množství adenomatózních polypů tlustého střeva.

V důsledku zvýšených hladin růstového hormonu mají tyto pacienti též zvýšené hladiny IGF1. V několika nezávislých studiích byl jasně prokázán zvýšený výskyt těchto polypů při pravidelných endoskopických vyšetřeních. U pacientů, u kterých není růstová porucha tohoto typu přítomna, není možné vysledovat žádnou závislost mezi hladinami IGF1 a nádory tlustého střeva.

V podskupině s nádory plic ve skupině z naší laboratoře převažovaly vyšší hodnoty nad nižšími hodnotami, což úplně nekoresponduje s trendy nalezenými v literatuře. Pokud se na celou záležitost podíváme podrobněji, nacházeli se v naší skupině pacienti s nádory převážně ve vyšším stadiu, kteří byli nabráni v souvislosti s chirurgickým výkonem prováděným na chirurgické klinice. Ve studiích, které byly k dispozici, byly hodnoceny hladiny IGF1 a

IGFBP3 při prvozáchytech plicních nádorů. Dále bylo jednoznačně prokázáno, že v nádorové tkáni byla zvýšená parakrinní produkce IGF1 a přítomno velké množství IGF1 receptorů. Parakrinní produkce se ale promítá do celkových sérových hladin jen nepatrně a tudíž zvýšené sérové hladiny IGF1 nalezené u pokročilejších stadií plicních nádorů nemohou být se zvýšenou produkcí IGF1 ve tkáních spojovány.

U podskupiny s nádorem prsu pouze lehce převažovaly zvýšené hladiny nad sníženými. Studiu systému IGF1 u nádorů prsu byla věnována v odborné literatuře velká pozornost. Studie byly provedeny na velkých souborech žen v různých částech světa. Studie s největšími počty žen ukázaly, že vyšší hladiny IGF1 přispívají ke zvýšení rizika nádoru prsu. V souboru, který jsem měl k dispozici, nebyl tento trend tak výrazný.

U podskupiny s karcinomem prostaty se v souboru z naší laboratoře vyskytla převaha zvýšených výsledků nad sníženými. V literatuře výrazně převažují názory, že zvýšené hladiny IGF1 mají souvislost se rakovinou prostaty, ale zejména s pokročilejšími fázemi. Což je podobný závěr jako u nádorů plicních, ovšem zcela opačný než u nádorů tlustého střeva a prsu, kde se předpokládá spíše souvislost s časnějšími stadii nádorů. Zajímavým a do té doby neznámým postupem bylo hodnocení poměru IGF1/PSA, který byl v jedné studii (Djavan B., 1999) použit ohledně predikce rizika karcinomu prostaty a autoři překvapivě vyzdvihovali jeho výpovědní hodnotu. Já jsem však podobné hodnocení u svého souboru pacientů neprováděl, protože jsem přesvědčen o tom, že současné hodnocení s využitím jednotlivých frakcí PSA je dnes „zlatým standardem“ a další cesta směřuje k dalšímu vylepšení a zpřesnění této metodiky (Klečka J., 2010).

Ve druhém oddílu experimentální části jsem se zaměřil na skupinu žen s nádory prsu. Karcinom prsu je nejčastější typ nádoru u žen a podle statistik WHO postihuje 1/5 žen. Mortalita má tendenci mírného, ale vytrvalého vzestupu s velkými variacemi mezi jednotlivými zeměmi, které jsou v rámci statistik WHO sledovány. I když se terapeutické možnosti nádoru prsu každý rok zlepšují a na trh jsou uváděny nové generace onkologických léčiv, včasná diagnostika výrazně zvyšuje šance na úspěšnou léčbu a přežití pacientek. Ke správné strategii léčby přispívá i zjištění typu nádoru a jeho agresivity. Ve své práci jsem si položil otázku, zda by nebylo možné použít růstové faktory pro rychlejší orientaci v klinickém stavu pacientek ještě před biopsií a histologickým vyšetřením. Skupina žen sledovaná v tomto druhém oddílu experimentální části byla odlišná od skupiny hodnocené v prvním oddílu. Výsledky byly shromažďovány od roku 2008 a do studie jsem cíleně zařadil pouze ty ženy, u kterých bylo možné dohledat histologické a jiné údaje. Tím, že jsou ženy sledovány ve specializované ambulanci chirurgické kliniky, je zajištěna přesnost a dostupnost klinických údajů. Bylo tedy možné rozdělit soubor dle diagnózy na skupinu benigních nádorů (fibroadenomů) a maligních nádorů. Porovnáním hladin analytů v těchto skupinách bylo možné zjistit, zda se nějak významně liší. Náběry před operací a po operaci byly provedeny proto, že jsem si chtěl být jist, zda nebudou hladiny analytů operačním zákrokem nějak ovlivněny. Koncentrace všech analytů v séru se ale operací významně nezměnily. Mohl jsem tedy přikročit k vyhodnocení výsledků v obou skupinách žen.

Nádorové markery jsem se rozhodl použít pro porovnání přínosu růstových faktorů v nádorové diagnostice proto, že chování nádorových markerů je v klinické praxi již dobře zmonitorováno a jejich současné místo v nádorové diagnostice je víceméně jasné. Porovnáním výsledků nádorových markerů a růstových faktorů jsem tedy mohl zjistit, jak se v jednotlivých indikacích liší a zda jsou růstové faktory přínosnější či ne. Rozlišení maligní formy nádoru od benigní formy je s použitím klasických nádorových markerů stále poněkud problematické. Ve většině případů u benigních nádorů nacházíme též lehce zvýšené hladiny nádorových markerů a dále existuje celá řada faktorů, které

nespecificky zvyšují hladiny těchto analytů (jaterní cirhóza, akutní a chronická hepatitida, chronická renální insuficience, chronická bronchitida a pneumonie, kouření) a tím ještě více snižují praktickou využitelnost nádorových markerů k rozlišení benigních a maligních nádorů v časných stádiích. Porovnáme-li hodnoty nádorových markerů mezi skupinou s maligní a benigní diagnózou, zjistíme, že žádný signifikantní rozdíl ani u CEA a ani u CA15-3 nebyl nalezen.

Podle v současné době uznávané teorie by měly být zvýšené hladiny IGF1 rizikovým faktorem pro vznik a vývoj nádorů a vysoké hladiny hlavního vazebného sérového proteinu IGFBP3 by měly mít účinky spíše kanceroprotektivní (Svobodová Š., 2011). Naše výsledky tedy na první pohled nepotvrzují tuto teorii. Pokud se zaměříme na to, zda by mohl být IGF1 spolu s IGFBP3 nějak nápomocen k rozlišení benigních a maligních nádorů, musíme odpovědět, že ne. IGF1 je produkován v játrech a jeho zvýšené hladina v séru není přímým následkem rozvoje nádorového onemocnění, spíše jednou z příčin vzniku nádoru samotného. Na vzniku nádoru se samozřejmě též může podílet zvýšená parakrinní produkce IGF1 ve tkáních (Tomizawa M., 2010). Tato produkce se však na celkových hladinách IGF1 v séru projeví jen nepatrně. Důležitým bodem v hodnocení IGF1 byla adjustace na věk. Produkce IGF1 se s věkem snižuje. Pokud jsem nevzal v úvahu věkové hledisko, dostával se rozdíl mezi maligní a benigní skupinou do statisticky významných hodnot, což by však bylo v tomto případě vzhledem k rozdílnému věkovému složení obou skupin nesprávné hodnocení. Růstový faktor HGF se dá podle výsledků řady studií považovat za marker progresu metastatického procesu u karcinomu prsu. Naše zjištění ohledně HGF je v souladu s těmito názory. Hladiny HGF jsou výrazně vyšší u maligních nádorů (přibližně dvojnásobné) než u benigních. Po statistickém hodnocení vychází u předoperačních hodnot  $p=0,0016$  a pooperačních hodnot  $p=0,0046$ .

Růstový faktor EGF patří k nejdůležitějším růstovým faktorům působícím regulaci růstu, proliferace a diferenciaci buněk. Dokonce se již v onkologické praxi používají léky blokující EGF receptor. Jednou z indikací je i léčba karcinomu prsu. Tyto léky představují nejnovější generaci onkologických léků a jsou do nich vkládány velké naděje. Léky na blokování EGF receptoru mohly být vyvinuty díky tomu, že se podařilo dobře zmapovat celou signální dráhu EGF (Avnet S., 2010). Navzdory tomuto velkému přínosu EGF pro léčbu nádorů, není úloha EGF v nádorové diagnostice příliš jasná. V našem souboru žen se EGF neukázal jako vhodný marker jak pro odlišení benigních a maligních tumorů, tak pro monitorování úspěšnosti léčby. Maximální předoperační hladiny byly sice u skupiny pacientek s maligním nádorem vyšší než u benigních diagnóz, ale průměr i medián hodnot EGF byl vyšší u skupiny s benigním nádorovým onemocněním.

TGF $\alpha$ , v našem případě TGF $\alpha$  hraje důležitou roli v regeneraci tkání a regulaci imunitního systému. Na druhou stranu je TGF $\alpha$  schopen vyvolat onkogenní transformaci v určitých buněčných kulturách. Pacientky s vysokými hladinami TGF $\alpha$  měli progresi onemocnění než pacientky s nižší hladinou. Což tedy opravňuje k vytvoření teorie, že maligní nádory by měly být spojeny s vyššími hladinami TGF $\alpha$ . V našich souborech pacientek jsme však nic takového nezjistili. Sérové hodnoty TGF $\alpha$  nebyly signifikantně odlišné u maligních a benigních nádorů a též na operační zákrok nereagovaly.

Úloha VEGF v organismu spočívá v napomáhání obnovy a novotvorby cév včetně vaskularizace nádorové tkáně. Zvýšené hladiny VEGF jsou považovány za signál růstu a agresivity nádoru. V našem případě se toto nepotvrdilo. Rozdíly mezi benigním a maligním nádorovým onemocněním nebyly statisticky významné.

Nyní podrobněji o skupině žen s maligní nádorovou diagnózou.

Oba nádorové markery CEA a CA15-3 potvrdily dosavadní klinické zkušenosti a se závažností stadia se jejich hladiny zvyšovaly.



V analýze dle stadií se ukázal zajímavý vývoj hladin IGF1, který koresponduje s teorií, která byla vyslovena v souvislosti s nádory kolorekta a také prsu, a to že vysoké hladiny IGF1, které podporují nádorovou transformaci buněk jsou přítomny především v časných stadiích nádoru prsu a v pozdějších stadiích hladina IGF1 klesá. Hladiny IGFBP3 by měly spíše snižovat riziko nádorového zvratu. V mém případě hladiny IGFBP3 kopírovaly vývoj hladin IGF1. Což se dá pravděpodobně přičítat tomu, že se snižující hladinou IGF1 se snižují též nároky na množství jeho hlavního sérového vazebného proteinu a proto i hladiny IGFBP3 klesají.

Růstový faktor HGF pozitivně koreloval se závažností nádorového onemocnění. Toto je v souladu s nálezem v dostupné literatuře.

Růstový faktor EGF výrazně stoupl až v poslední podskupině s nejzávažnějším nádorovým stadiem. Tento vývoj je v souladu s představou EGF jako prorůstového působku.

Hladiny TGF $\alpha$  negativně korelovaly se závažností nádorového onemocnění. Což zapadá do obrazu TGF $\alpha$  jako nádorového onkogenu. Poté, co TGF $\alpha$  přispěje svou měrou k nádorové transformaci, význam jeho role se v dalším vývoji nádorového onemocnění snižuje.

Růstový faktor VEGF nevykazoval žádnou korelaci se stadiem nádorového onemocnění. Při potřebě jeho působení je VEGF produkován přímo ve tkáních, kde je nižší přívod kyslíku, než je aktuální potřeba. Autokrinní a parakrinní produkce se v sérových hladinách VEGF neprojevuje.

## 6 Závěr

- 1) Bylo vyšetřeno IGF1 u souboru 681 pacientů s následujícími typy nádorů: karcinom kolorekta, plic, prsu a prostaty.
- 2) Dále bylo vyšetřeno 100 žen s benigním a maligním nádorem prsu.
- 3) HGF je jediným růstovým faktorem který má statisticky významně vyšší sérové hladiny u maligních nádorových diagnóz než u benigních.
- 4) Růstový faktor HGF pozitivně koreluje se závažností nádorového onemocnění.
- 5) Při hodnocení IGF1 je nutné brát v úvahu věkové hledisko a při věkově odlišných skupinách získané výsledky adjustovat na věk. Pokud se věkové hledisko nevezme v úvahu může dojít k nesprávné interpretaci výsledků.
- 6) IGF1 u nádorů kolorekta má přibližně stejné procento zvýšených i snížených výsledků, což koreluje se závěry z literatury.
- 7) U nádorů prostaty jsem zjistil výraznou převahu zvýšených hodnot IGF1. Tento nález souhlasí se závěry z literatury.
- 8) U nádorů plic převažovaly výrazně vyšší hodnoty IGF1 což nekorresponduje s nálezy v literatuře.
- 9) U nádorů prsu lehce převažovaly vyšší hodnoty IGF1 nad nižšími. V dostupné literatuře byla převaha vysokých hodnot výrazně vyšší.
- 10) Sérová variabilita hladin IGF1 je značná a u každého typu nádoru se vyvíjí jiným způsobem.
- 11) Nádorové markery není možné použít k diferenciální diagnóze benigních a maligních nádorů.
- 12) Sérové hladiny růstových faktorů a IGFBP3 se po operaci signifikantně nemění.
- 13) Nádorové markery korelují se závažností onemocnění.
- 14) IGF1 společně s IGFBP3 dosahují vyšších hladin v časnějších stadiích nádoru prsu a ve vyšším stadiu onemocnění se jejich hladina snižuje.

- 15) Růstový faktor EGF pozitivně koreluje se závažností nádorového onemocnění, závislost však není tak lineární jako u HGF.
- 16) Sérové hladiny TGF $\alpha$  negativně korelují se závažností nádorového onemocnění.
- 17) Sérové hladiny VEGF nikterak nekorelují se závažností nádorového onemocnění.
- 18) Multiplexová analýza xMAP Luminex se ukazuje jako velice přínosná při sledování etiopatologie nádorových onemocnění. Umožňuje sledovat především vzájemné vztahy mezi jednotlivými markery biologické aktivity. Snižuje spotřebu biologického materiálu, je rychlá a finančně výhodná .

## **7 Závěry pro klinickou praxi:**

1. Sledování růstových faktorů není vhodné pro rutinní diagnostiku.
2. Pouze HGF se jeví perspektivním diagnostickým a prognostickým markerem.
3. Naprosto významnou a nezastupitelnou roli však mají růstové faktory a IGFBP3 ve zkoumání procesů v lidském těle na buněčné úrovni. Protože již známe fungování celých signálních drah je možné použít růstové faktory též jako vhodné indikátory při ověřování zformulovaných teorií o působení různých látek přímo na buňku (fyziologické růstové a metabolické procesy, jejich poruchy, působení léku a jiných chemických látek apod.). Též je možné, že přes velké množství nashromážděných výsledků z mnoha studií, nám přece jen unikají určité souvislosti, které mohou být objeveny v budoucnu a růstové faktory nabydou vyššího významu i v každodenní klinické praxi.

## **8 Perspektivy**

Práce bude pokračovat retrospektivním vyhodnocením dat ve vztahu k „disease free“ intervalu a přežití pacientů po uplynutí 3 let od detekce primárního tumoru.

Práce je podkladem pro další prospektivní studii, ve které bude vyhodnocen větší počet sledovaných parametrů a především optimálně stanoveny, zařazovací a vyřazovací kritéria pro pacienty do studie.

Práce je východiskem pro budoucí prospektivní studie zaměřené především na predikci efektu operační léčby či chemoterapie a na využití parametrů biologické aktivity pro stanovení prognózy.

## 9 Shrnutí

V posledních několika letech se velice často diskutuje vliv IGF a jejich vazebných proteinů na vznik a progresi nádorů. Již začátkem 80. let minulého století se objevily práce, které upozorňovaly na možnou spojitost zvýšené produkce inzulínu podobných růstových faktorů se zvýšeným výskytem nádorů.

Cílem mé práce bylo podívat se na vztah inzulínu podobných růstových faktorů popř. jejich vazebných proteinů a nádorů z několika různých pohledů, zhodnotit jejich význam a pokusit se určit místo IGF a IGFBP v současné nádorové diagnostice.

Práce samotná je rozdělena do dvou částí, do teoretické části a části praktické. V teoretické části jsem vysvětlil fungování systému IGF v našem organismu a dále se zaměřil na dosavadní zjištění role systému IGF u jednotlivých nádorových diagnóz. V praktické části, kterou jsem rozdělil na dva oddíly, jsem nejprve studoval velký soubor pacientů s různými nádorovými diagnózami, poté jsem se věnoval souboru žen s nádorem prsu.

### Teoretická část

Inzulínu podobné růstové faktory (IGF, insulin-like growth factors) jsou peptidy, které se podílejí na řízení růstu, metabolismu, přežívání a diferenciaci buněk a jsou regulovány růstovým hormonem (GH). IGF jsou syntetizovány v játrech a vyskytují se v séru a dalších tělních tekutinách. Dále je známa jejich extrahepatální produkce a působení autokrinním a parakrinním mechanismem.

IGFBP (insulin-like growth factor binding proteins) se nacházejí v různých tělních tekutinách, jako je krevní sérum, plodová voda a mozkomíšní mok IGFBP jsou syntetizovány v játrech anebo jsou syntetizovány i různými typy nádorových buněk. IGFBP zvyšují poločas IGFs v séru a inhibují nebo podporují působení IGFs vazbou na receptory cílových buněk. Navíc tyto vazebné proteiny fungují jako zásobárna IGFs v mezibuněčném prostoru.

Účinek IGF1 na buňku se odehrává prostřednictvím receptorů. Po úspěšném navázání na receptor pokračuje přenos signálu uvnitř buňky po signální dráze, což je vlastně kaskáda enzymů a jejich substrátů.

### Experimentální část

#### IGF1 a karcinom kolorekta, plic, prsu a prostaty

Tento soubor čítal celkem 681 pacientů. Jednalo se o vzorky patientských sér, které byly zpracovány v Imunoanalytické laboratoři ve FN v Plzni za období let 2000 – 2008. Podle histologického nálezu jsem pacienty rozdělil do 5 skupin. Hodnoty jsem porovnal s normálními hodnotami laboratoře a poté srovnal s trendy s literatury.

#### Nádorové markery, růstové faktory, IGFBP3 a nádory prsu

Porovnával jsem dva soubory pacientek. První soubor čítal 89 žen s maligním nádorem prsu. Druhý soubor obsahoval 21 žen s benigním nádorem prsu, většinou fibroadenomem. Vzorky patientských sér byly zpracovány v Imunoanalytické laboratoři ve FN v Plzni v období let 2008 – 2010. Především jsem se zaměřil na rozdíly mezi skupinami se zhoubným a nezhooubným nádorovým onemocněním. Dále jsem hodnotil změny hladin všech analytů ve skupině žen s maligním nádorem prsu rozděleným na podskupiny podle stadia onemocnění.

### Závěr

- 1) Bylo vyšetřeno IGF1 u souboru 681 pacientů s následujícími typy nádorů: karcinom kolorekta, plic, prsu a prostaty.
- 2) Dále bylo vyšetřeno 100 žen s benigním a maligním nádorem prsu.
- 3) HGF je jediným růstovým faktorem který má statisticky významně vyšší sérové hladiny u maligních nádorových diagnóz než u benigních.
- 4) Růstový faktor HGF pozitivně koreluje se závažností nádorového onemocnění.
- 5) Při hodnocení IGF1 je nutné brát v úvahu věkové hledisko a při věkově odlišných skupinách získané výsledky adjustovat na věk. Pokud se věkové hledisko nevezme v úvahu může dojít k nesprávné interpretaci výsledků.
- 6) IGF1 u nádorů kolorekta má přibližně stejné procento zvýšených i snížených výsledků, což koreluje se závěry z literatury.
- 7) U nádorů prostaty jsem zjistil výraznou převahu zvýšených hodnot IGF1. Tento nález souhlasí se závěry z literatury.
- 8) U nádorů plic převažovaly výrazně vyšší hodnoty IGF1 což nekoresponduje s nálezy v literatuře.
- 9) U nádorů prsu lehce převažovaly vyšší hodnoty IGF1 nad nižšími. V dostupné literatuře byla převaha vysokých hodnot výrazně vyšší.
- 10) Sérová variabilita hladin IGF1 je značná a u každého typu nádoru se vyvíjí jiným způsobem.
- 11) Nádorové markery není možné použít k diferenciální diagnóze benigních a maligních nádorů.
- 12) Sérové hladiny růstových faktorů a IGFBP3 se po operaci signifikantně nemění.
- 13) Nádorové markery korelují se závažností onemocnění.
- 14) IGF1 společně s IGFBP3 dosahují vyšších hladin v časnějších stádiích nádoru prsu a ve vyšším stadiu onemocnění se jejich hladina snižuje.
- 15) Růstový faktor EGF pozitivně koreluje se závažností nádorového onemocnění, závislost však není tak lineární jako u HGF.
- 16) Sérové hladiny TGF $\alpha$  negativně korelují se závažností nádorového onemocnění.
- 17) Sérové hladiny VEGF nikterak nekorelují se závažností nádorového onemocnění.
- 18) Multiplexová analýza xMAP Luminex se ukazuje jako velice přínosná při sledování etiopatologie nádorových onemocnění. Umožňuje sledovat především vzájemné vztahy mezi jednotlivými markery biologické aktivity. Snižuje spotřebu biologického materiálu, je rychlá a finančně výhodná .

### Závěry pro klinickou praxi

- 1) Sledování růstových faktorů není vhodné pro rutinní diagnostiku.
- 2) Pouze HGF se jeví perspektivním diagnostickým a prognostickým markerem.
- 3) Naprosto významnou a nezastupitelnou roli však mají růstové faktory a IGFBP3 ve zkoumání procesů v lidském těle na buněčné úrovni. Protože již známe fungování celých signálních drah je možné použít růstové faktory též jako vhodné indikátory při ověřování zformulovaných teorií o působení různých látek přímo na buňku (fyziologické růstové a metabolické procesy, jejich poruchy, působení léku a jiných chemických látek apod.). Též je možné, že přes velké množství nashromážděných výsledků z mnoha studií, nám přece jen unikají určité souvislosti, které mohou být objeveny v budoucnu a růstové faktory nabydou vyššího významu i v každodenní klinické praxi.

## 10 Summary

The interaction between growth factors and cancer incidence and development has been discussed recently. First works suggesting possible connection between increased production of insulin like growth factors with an increased incidence of tumors came already from early 80s of the last century.

The aim of my work was focused on evaluation of possible relation between insulin like growth factors or their binding proteins and tumors from different perspectives, to assess their significance and try to determine what role the IGFs and IGFBPs may play in the current tumor diagnostics.

The work itself is divided into two parts, the theoretical and practical ones. In the theoretical part, I summarized the action of IGF in human body and also focused on previous findings on the role of IGF system in cancer diagnoses. In the practical part, divided into three subsections, I focused on investigation of relations in a large set of patients with different cancer diagnoses, in a group of women with breast cancer and, finally, I focused on changes of IGF1 levels during follow-up.

### **Theoretical part**

Insulin-like growth factors (IGF) are peptides, that participate on growth regulation, metabolism regulation, cell survival and differentiation. They are regulated by growth hormone (GH). IGFs are synthesized in liver and they also occur in various body fluids. Their extrahepatic production, as well as their autocrine and paracrine mechanism has been already described.

IGFBPs occur in different body fluids like serum, amniotic fluid and cerebrospinal fluid. IGFBPs are synthesized in liver but can be also synthesized by cancer cells. IGFBPs increase the half-life of IGFs in serum and inhibit or stimulate IGFs action by binding to the target cells receptors. These binding proteins serve to create a storage pool of IGFs in intercellular space.

Effect of IGF1 on cell is mediated by receptors. Signal transduction follows the successful binding to the receptor via signal intracellular pathway – i.e. cascade of enzymes and its substrates.

### **Experimental part**

#### **IGF1 and colorectal, lung, breast and prostate carcinoma**

There were 681 patients in the group. Evaluation was done on patient serum samples processed in Immunodiagnostic Laboratory of the University Hospital in Pilsen. Samples were obtained between years 2000 and 2008. Patients were divided into five groups according to the histological findings. Obtained values were compared with normal laboratory values and then compared with data in literature.

#### **Tumor markers, growth factors and breast tumors**

Two groups of patients were compared. The first group consisted of 89 women with malignant breast cancer. The second group covered 21 women with benign breast tumor, mostly fibroadenoma. Patient serum samples were processed in immunodiagnostic laboratory of the University Hospital in Pilsen in the period 2008-2010. In particular, I focused on the differences between the groups with malignant and benign tumors, but I also evaluated the changes in levels of all analytes in the group of women with malignant breast cancer and in subgroups divided by the stage of disease.

### **Conclusion**

- 1) was investigated IGF1 in a group of 681 patients with the following tumor types: colorectal cancer, lung, breast and prostate.
- 2) was further examined 100 women with benign and malignant breast tumors.
- 3) HGF is the only growth factor that is statistically significantly higher serum levels in malignant tumors than in benign diagnoses.
- 4) The growth factor HGF positively correlated with the severity of cancer.
- 5) In evaluating IGF1 is necessary to take into account the age aspect and in different age groups, the results obtained adjustovat of age. If age does not take into account the aspect may be an incorrect interpretation of results.
- 6) IGF1 in tumors colorectal cancer has increased approximately the same percentage as the reduced results, which correlates with the findings from the literature.
- 7) For prostate cancer, I have found a significant preponderance of elevated IGF1. This finding agrees with the conclusions from the literature.
- 8) In the case of lung tumors predominated significantly higher values of IGF1 which does not correspond with the findings in the literature.
- 9) In the case of breast cancer slightly higher values prevailed over the lower IGF1. The available literature was the ascendancy of high levels considerably higher.
- 10) Serum levels of IGF1 variability is significant for each type of tumor develops in another way.
- 11) Tumor markers can not be used for differential diagnosis of benign and malignant tumors.
- 12) Serum growth factors and IGFBP3 after surgery does not change significantly.
- 13) Tumour markers correlate with the severity of the disease.
- 14) together with IGF1 IGFBP3 reach higher levels in earlier stages of breast cancer and higher stage disease, their level decreases.
- 15) growth factor EGF positively correlated with the severity of cancer, addiction is not as linear as HGF.
- 16) Serum TGF $\alpha$  negatively correlated with the severity of cancer.
- 17) Serum levels of VEGF in no way correlate with the severity of cancer.
- 18) Luminex xMAP multiplex analysis proves to be very helpful in tracking etiopatologie cancer. Allows you to track particular mutual vrtahy between markers of biological activity. Reduces biological material is quick and convenient.

### **Conclusion for clinical practice**

- 1) Monitoring of growth factors is not suitable for routine diagnostics.
- 2) Only HGF appears to be promising diagnostic and prognostic marker.
- 3) absolutely important and irreplaceable role, however, are growth factors and IGFBP3 in the investigation of processes in the human body at the cellular level. Because we already know the functioning of entire signaling pathways can be used also as growth factors suitable indicators to verify the theory formulated on the performance of various substances on cell (physiological growth and metabolic processes, their disorders, drug exposure and other chemical substances, etc.). It is also possible that despite the large amount of accumulated results from many studies, we still escape a connection that can be discovered in the future and growth factors aid is in the higher meaning in everyday clinical practice.

## 11 Literatura

All-Ericsson C, Girnita L, Seregard S, Bartolazzi A, Jager MJ, Larsson O., Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* ;43(1):1-8., 2002

Avnet S, Sciacca L, Salerno M, Gancitano G, Cassarino MF, Longhi A, Zakikhani M, Carboni JM, Gottardis M, Giunti A, Pollak M, Vigneri R, Baldini N., Insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor II as additional treatment targets in human osteosarcoma, *Cancer Res.*;69(6):2443-52., 2009

Brown, David M.; Michels, Mark; Kaiser, Peter K.; Heier, Jeffrey S.; Sy, Judy P.; Ianchulev, Tsontcho; "Ranibizumab versus Verteporfin Photodynamic Therapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Results of the ANCHOR Study". *Ophthalmology* 116 (1): 57–65., 2009

Djavan B, Bursa B, Seitz C, Soeregi G, Remzi M, Basharkhah A, Wolfram R, Marberger M., Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), IGF-1 density, and IGF-1/PSA ratio for prostate cancer detection., *Urology.*;54(4):603-6. 1999

Dupont J, LeRoith D., Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction, *Horm Res.* 55 Suppl 2:22-6. Review, 2001

Dvorak B., "Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis". *Clinics in perinatology* **31** (1): 183–92., 2004

Ekins RP., Assay design and quality control. In: *Radioimmunoassay* (ed Bizollon, C.A.), 239-255, (Elsevier / North Holland, Amsterdam), 1979

Gallagher, J.T., Lyon, M., "Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens". In Iozzo, M, V.. *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions.* Marcel Dekker Inc. New York, pp. 27–59, 2000

Gotlieb WH, Bruchim I, Gu J, Shi Y, Camirand A, Blouin MJ, Zhao Y, Pollak MN., Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer, *Gynecol Oncol.*;100(2):389-96., 2006

Gray SG, Eriksson T, Ekström C, Holm S, von Schweinitz D, Kogner P, Sandstedt B, Pietsch T, Ekström TJ., Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas, *Br J Cancer.*;82(9):1561-7., 2000

Kemp LE, Mulloy B, Gherardi E., "Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors.". *Biochem. Soc. Trans.* 34 (Pt 3): 414–7., 2006

Kim SY, Toretsky JA, Scher D, Helman LJ., The role of IGF-1R in pediatric malignancies, *Oncologist.*;14(1):83-91 Review, 2009

- Klecka J, Holubec L, Pesta M, Topolcan O, Hora M, Eret V, Finek J, Chottova-Dvorakova M, Babjuk M, Novak K, Stolz J., Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis., *Anticancer Res.*;30(2):665-70, 2010
- Kutsukake M, Ishihara R, Momose K, Isaka K, Itokazu O, Higuma C, Matsutani T, Matsuda A, Sasajima K, Hara T, Tamura K., Circulating IGF-binding protein 7 (IGFBP7) levels are elevated in patients with endometriosis or undergoing diabetic hemodialysis., *Reprod Biol Endocrinol.* 2008 Nov 19;6:54.
- Liu X, Jiang W, Aucejo F, Kim R, Miller C, Byrne M, Lopez R, Yerian L., Insulin-like growth factor I receptor  $\beta$  expression in hepatocellular carcinoma., *Hum Pathol.* Jun;42(6):882-91. Epub 2011 Feb 2., 2011
- Maor S, Mayer D, Yarden RI, Lee AV, Sarfstein R, Werner H, Papa MZ., Estrogen receptor regulates insulin-like growth factor-I receptor gene expression in breast tumor cells: involvement of transcription factor Sp1, *J Endocrinol.*;191(3):605-12., 2006
- Maor S., Yosepovich A, and all., Elevated insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) levels in primary breast cancer tumours associated with BSCA1 mutations., *Cancer Lett* 257:236-43, 2007
- Martins AS, Mackintosh C, Martín DH, Campos M, Hernández T, Ordóñez JL, de Alava E., Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor, *Clin Cancer Res.* ;12(11 Pt 1):3532-40, 2006
- Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, Holm T, Van Erp C, Loch D, Carlson OD, Griswold BF, Fu Q, De Backer J, Loeys B, Huso DL, McDonnell NB, Van Eyk JE, Dietz HC; Circulating transforming growth factor- $\beta$  in Marfan syndrome., *GenTAC Consortium. Circulation.*;120(6):526-32., 2009
- Nakae J., Kido Y., Accili D., Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors, *Endocrine Rev* 22:818-35, 2001
- Nekulová M, Simícková M, Pecen L, Eben K, Vermousek I, Stratil P, Cernoch M, Lang B., Early diagnosis of breast cancer dissemination by tumor markers follow-up and method of prediction, *Neoplasma.*;41(2):113-8., 1994
- Nelson SM, Yates RW et al., "Serum anti-Mullerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles—implications for individualization of therapy". *Human Reproduction* 22 (9): 2414–2421., 2007
- Oh A, List HJ, Reiter R, Mani A, Zhang Y, Gehan E, Wellstein A, Riegel AT., The nuclear receptor coactivator AIB1 mediates insulin-like growth factor I-induced phenotypic changes in human breast cancer cells, *Cancer Res.*;64(22):8299-308., 2004
- Price CP., and Newman DJ., (eds), *Principles and Practice of Immunoassay* 2nd edn, (Macmillan, London), 1997



Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC., "The role of internalization in transforming growth factor beta1-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells". *J. Biol. Chem.* 280 (9): 8300–8., 2005

Ryan CJ, Haqq CM, Simko J, Nonaka DF, Chan JM, Weinberg V, Small EJ, Goldfine ID., Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in local and metastatic prostate cancer, *Urol Oncol.*;25(2):134-40., 2007

Shah DK, Menon KM, Cabrera LM, Vahratian A, Kavoussi SK, Lebovic DI., "Thiazolidinediones decrease vascular endothelial growth factor (VEGF) production by human luteinized granulosa cells in vitro". *Fertil. Steril.* 93 (6): 2042–7, 2010

Sutherland BW, Knoblaugh SE, Kaplan-Lefko PJ, Wang F, Holzenberger M, Greenberg NM., Conditional deletion of insulin-like growth factor-I receptor in prostate epithelium, *Cancer Res.*, May 1;68(9):3495-504, 2008

Svobodova S, Topolcan O, Holubec L Jr, Levy M, Pecen L, Svacina S., Parameters of biological activity in colorectal cancer., *Anticancer Res.*;31(1):373-8., 2011

Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T., Insulin-like growth factor-I receptor in proliferation and motility of pancreatic cancer, *World J Gastroenterol.*;16(15):1854-8., 2010

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.*;27(4A):1921-4., 2007

Vorwerk P, Mohnike K, Wex H, Röhl FW, Zimmermann M, Blum WF, Mittler U., Insulin-like growth factor binding protein-2 at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia and the prediction of relapse risk., *J Clin Endocrinol Metab.*;90(5):3022-7., 2005

Vrzalova J, Prazakova M, Novotny Z, Topolcan O, Casova M, Holubec L Jr., Test of ovarian cancer multiplex xMAP technology panel, *Anticancer Res.*;29(2):573-6., 2009

Weiss S, Henle P, Bidlingmaier M, Moghaddam A, Kasten P, Zimmermann G., Systemic response of the GH/IGF-I axis in timely versus delayed fracture healing, *Growth Horm IGF Res.*;18(3):205-12., 2008

Zaloudik J, Lauerova L, Janakova L, Talac R, Simickova M, Nekulova M, Mikulikova I, Kovarik J, Sheard M., Significance of pre-treatment immunological parameters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver, *Hepatogastroenterology.*;46(25):220-7., 1999

## 12 Práce autora

### ČLÁNKY:

System IGF a nádory,  
Kučera R., Topolčan O.  
In Vitro Diagnostika, Str.10-13, Číslo17/2011

#### *Článek v tisku:*

IGF System and Colorectal, Lung and Prostate Cancer,  
Kucera R., Svobodova S., Narsanska A., Vrzalova J., Treskova I., Fuchsova R., Spisakova M., Kydlicek T., Treska V., Pecen L., Topolcan O., Pazdiora P.  
ANTICANCER RESEARCH  
International Journal of Cancer Research and Treatment  
ISSN: 0250-7005  
Manuscript reference:13626-K

#### *Článek v tisku:*

Growth Factors and Breast Tumors, Comparison of Selected Growth Factors with Traditional Tumor Markers,  
Narsanska A., Kucera R., Svobodova S., Vrzalova J., Treskova I., Fuchsova R., Spisakova M., Kydlicek T., Treska V., Pecen L., Topolcan O., Pazdiora P.  
ANTICANCER RESEARCH  
International Journal of Cancer Research and Treatment  
ISSN: 0250-7005  
Manuscript reference:13674-N

#### *Článek v tisku:*

Vitamin D and Colorectal, Breast, Prostate and Lung Cancer. Pilot study.,  
Pazdiora P., Svobodova S., Fuchsova R., Prazakova M., Vrzalova J., Narsanska A.,  
Kucera R., Strakova M., Treskova I., Pecen L., Treska V., Holubec L.,<sup>jr.</sup>, Pesek M., Finek J.,  
Topolcan O.  
ANTICANCER RESEARCH  
International Journal of Cancer Research and Treatment  
ISSN: 0250-7005  
Manuscript reference:13662-P

### PŘEDNÁŠKY:

Setkání uživatelů RIA a imunochemických systémů Beckman Coulter  
30.1. – 1.2.2011 Teplice nad Bečvou  
System IGF a nádory,  
Kučera R., Topolčan O.

XXXII. Imunoanalytické dny  
8.- 10.4.2011 Karlovy Vary  
IGF a jeho vazebné proteiny jako rizikový faktor vzniku zhoubných nádorů,  
Kučera R., Topolčan O.

World distributors meeting Beckman Coulter

Prague 10<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> May 2011

The importance of IGF for the creation and development of the cancer,

Kucera R., Topolčan O.

**POSTERY:**

XXII. Imunoanalytické dny

9.- 11.5.2001 Jihlava

Monoklonální inzulin a C-peptid - srovnání s polyklonálními metodami,

Kučera R., Topolčan O.