

**KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**Oddělení nukleární medicíny
Centrální izotopová laboratoř**

Inzulinu podobné a jiné růstové faktory a nádory

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

Plzeň 2011

Mgr. Radek Kučera

Děkuji mému školiteli prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi, CSc. za jeho užitečné rady a vedení a všem kolegům za jejich ochotnou spolupráci a pomoc s laboratorními i klinickými problémy. Zvláštní poděkování patří mé rodině a přátelům za jejich trpělivou podporu.

OBSAH:

	Motto.....	4
1	Úvod.....	5
2	Teoretická část.....	7
2.1	IGF.....	7
2.2	IGFBP.....	8
2.3	Receptory pro IGF.....	10
2.4	Signální dráhy IGF.....	12
2.5	IGF a jeho vliv na nádorovou transformaci buněk.....	14
2.6	IGF a vybrané nádorové diagnózy.....	16
2.6.1	Nádory kolorekta.....	16
2.6.2	Nádory prsu.....	18
2.6.3	Endometriální karcinom.....	19
2.6.4	Ovariální karcinom.....	20
2.6.5	Karcinom děložního čípku.....	21
2.6.6	Karcinom prostaty.....	21
2.6.7	Karcinom žaludku.....	22
2.6.8	Nádory jater.....	23
2.6.9	Karcinom pankreatu.....	24
2.6.10	Poruchy a nádory štítné žlázy.....	24
2.6.11	Nádory plic.....	25
2.6.12	Rakovina kůže.....	25
2.6.13	Leukémie.....	26
2.6.14	Sarkomy.....	26
2.6.15	Souhrnné tabulky inzulinu podobných růstových faktorů, vazebných proteinů a nádorů.....	27
2.7	Ostatní růstové faktory.....	29
2.7.1	HGF.....	29
2.7.2	EGF.....	29
2.7.3	TGF.....	30
2.7.4	VEGF.....	31
2.8	Nádorové markery.....	31
2.8.1	CEA.....	31
2.8.2	CA 15-3.....	32
3	Cíl práce.....	33
4	Experimentální část.....	34
4.1	Metodika.....	34
4.1.1	Odběr vzorků.....	35
4.1.2	Použité imunoanalytické metody.....	35
4.2	Soubory pacientů.....	36
4.3	Statistické vyhodnocení.....	37
4.4	Výsledky.....	38
4.4.1	IGF1 a karcinom kolorekta, plic, prsu a prostaty.....	38
4.4.2	Nádorové markery, růstové faktory, IGFBP3 a nádory prsu.....	40
5	Diskuze.....	49
6	Závěr.....	54
7	Závěry pro klinickou praxi.....	55
8	Perspektivy.....	56
9	Literatura.....	57

Motto:

Je to velká shovívavost přírody, že nás nechává tak dlouho naživu.

Michel de Montaigne

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 inzulinu podobných růstových faktorů se zvýšeným výskytem nádorů.

Od té doby bylo provedeno mnoho experimentů a mnoho studií zabývajících se vztahem IGF a nádorů. Z úrovně séra se postupem času podařilo postoupit na mapování výskytu IGF ve tkáních, dále se podařilo zjistit, že na buněčné úrovni je účinek zprostředkován specifickým receptorem, který je umístěn na povrchu buňky. V neposlední řadě se podařilo postoupit až na úroveň genovou a zjistit lokaci genů, které kódují IGF, jeho vazebné proteiny a receptor. Postupem času se podařilo podrobně zmapovat celou „cestu“ IGF, od jeho syntézy, přes putování v séru, vazbu na receptor a jednotlivé složky buněčné signální dráhy IGF, receptorem počínaje a účinkem uvnitř buňky konče.

Tyto poznatky nám umožnily udělat si představu o fungování systému IGF a jeho roli v růstu, diferenciaci a přežívání buňky. Ve svém konečném důsledku vedla tato znalost i k vývoji nejnovější generace onkologických léčiv.

Přes významné úspěchy ve výzkumu fungování systému IGF, není místo IGF v nádorové diagnostice příliš jasné. Prozatím nespornou indikací pro vyšetřování IGF jsou poruchy růstu, kde v řídicí ose růstu spadá IGF přímo pod regulační vliv růstového hormonu (GH).

Problematika IGF a dalších růstových faktorů a jejich vztahu k nádorům je velice rozsáhlá a něšlo proto věnovat se všem nádorovým diagnózám. Do své práce jsem proto vybral ty nádorové diagnózy, se kterými máme v imunoanalytické laboratoři FN Plzeň největší zkušenosti.

Svoji práci jsem rozdělil na část teoretickou a experimentální.

V teoretické části jsem se pokusil vysvětlit čtenářům fungování osy IGF v organismu a vliv IGF na nádorovou transformaci buněk. Též jsem se pokusil provést zhodnocení dosavadních literárních poznatků o vztahu IGF k jednotlivým nádorovým diagnózám. Dále jsem se věnoval ostatním růstovým faktorům, které se objevují v experimentální části a v neposlední řadě též nádorovým markerům.

Experimentální část jsem rozdělil na dvě části. V každé části jsem se pokusil podívat na problematiku IGF a nádorové diagnostiky z trochu jiného úhlu.

V první části se věnuji zhodnocení velkého souboru pacientů, který jsme shromažďovali několik let. Rozdělení tohoto souboru podle diagnóz a porovnání nalezených skutečností se závěry z literatury, které jsem zjistil v teoretické části.

Ve druhé části jsem se věnoval souboru žen s nádory prsu. K dispozici jsem měl dvě skupiny žen. První skupina s maligním nádorem a druhá skupina s benigním nádorem. Porovnal jsem výsledky panelu růstových faktorů, IGFBP3 a dvou nádorových markerů u obou těchto skupin a zhodnotil význam jednotlivých analytů pro diferenciální diagnózu mezi maligním a benigním nádorovým onemocněním. Dále jsem podrobněji vyhodnotil skupinu s maligní nádorovou diagnózou, kterou jsem rozdělil do podskupin podle závažnosti nádorového onemocnění.

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). Účinek v buňkách je zprostředkován vlastním IGF1 receptorem. Nejvyšší koncentrace nacházíme u dětí v pubertě. V pozdějších letech jejich hladiny klesají, přibližně o 10 procent za každých 10 let. Nejnižší hladiny se vyskytují ve stáří. Normální hladiny v séru u zdravých lidí se pohybují od 150 do 250 µg/l. Syntézu IGF1 zvyšují hormony štítné žlázy a mírně též prolaktin. Estrogeny a kortikoidy naopak omezují produkci IGF1. Sekrece IGF1 nezávisí jenom na účinku růstového hormonu, ale také na výživě. Po dobu hladovění hladina IGF1 klesá a nereaguje ani na podání GH. Hladina IGF1 je vhodným ukazatelem realimentace při malnutričních stavech. Snížené hladiny IGF1 jsou pozorovány po odstranění hypofýzy. Z diagnostického hlediska je IGF1 přínosným vyšetřením zejména při sledování akromegalií a deficitu růstového hormonu. Jeho výhodou je to, že na rozdíl od sekrece GH, která probíhá pulsně, je jeho hladina v séru dlouhodobě konstantní. U akromegalie jsou hladiny zvýšené a u deficitu GH jsou hladiny IGF1 snížené. Důležitost IGF1 pro růst a vývoj organismu byl zkoumán na zvířecích modelech narušením genu pro IGF1 tzv. K.O. (knock out) metodou. IGF1 K.O. myši vykazovaly ve srovnání s normálními jedinci o 40% sníženou porodní

hmotnost, velmi vysokou perinatální úmrtnost, opožděnou osifikaci, málo rozvinuté svalstvo a plicní tkáň, stejně jako neplodnost (Powell-Braxton L., 1993).

IGF2 je neutrální peptid o molekulové hmotnosti 7400 Da, jehož řetězec je tvořený 67 aminokyselinami. IGF2 je strukturálně blízký IGF1, ale je méně závislý na regulaci GH. Účinek je zprostředkován specifickým IGF2 receptorem. IGF2 byl dlouho považována za plodovou formu IGF1. Dnes již víme, že je toto rozdělení překonané, avšak přesto je nesporné, že IGF2 hraje velmi důležitou roli během embryogeneze. Normální hladiny v séru u zdravých lidí se pohybují od 400 do 900 µg/l.

Byly prováděny studie s cíleným narušením genu pro IGF2. IGF2 K.O. myši měly o 40% nižší porodní hmotnost ve srovnání s normálními jedinci (DeChiara TM., 1990). Tyto myši se vyvinuly v normální jedince s trpasličím vzrůstem.

Stručnou charakteristiku IGF ukazuje tabulka 1.

Tab1: IGF

Růstový faktor	Molekulová hmotnost	Počet AK	Fyziologická funkce
IGF1	7 464 Da	70	Řízení růstu, metabolismu, přežívání a diferenciacie buněk <i>v postnatálním vývoji</i>
IGF2	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 mozkomíšní 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.

V současné době je známo nejméně šest různých IGFBPs, které se liší v jejich vazebné účinnosti.

Všeobecně vžitá je řada IGFBP1 až IGFBP6, přičemž dominantní vazebný protein v séru je IGFBP3.

IGFBP1 se nachází převážně v placentě a plodové vodě. Zvýšené hladiny se nacházejí u novorozenců. Nižší hladiny pak u ostatní populace. IGFBP1 má stejnou afinitu k IGF1 i IGF2. IGFBP2 se nachází především v mozkomíšním moku a má vysokou vazebnou afinitu k IGF2. IGFBP3 je hlavní sérový IGF vázající protein. IGFBP3 vykazuje podobnou afinitu k IGF1 a IGF2. IGFBP3 inhibuje sekreci FSH (folikuly stimulující hormon). Výrazně snížené hladiny IGFBP3 jsou pozorovány u pacientů s nedostatkem růstového hormonu zatímco

výrazně zvýšené hladiny jsou pozorovány u pacientů s vysokými hladinami růstového hormonu (např. akromegalie). IGFBP4 je převládající vazebná bílkovina IGFs v lidských osteoblastech. Je totožná s bílkovinou známou jako inhibitor růstu buněk rakoviny tlustého střeva (colon cancer cell growth inhibitor). IGFBP4 je cílem působení IGFBP4 specifické proteázy, indukované IGFs. Tato posttranslační úprava IGFBP4 zvyšuje tkáňovou dostupnost IGF1 a IGF2. IGFBP5 se vyskytuje nejvíce v ledvinách, ale také např. v osteoblastech.

IGFBP5 vykazuje poměrně nízké afinity k IGF1 a IGF2. To zvyšuje mitogeneze v přítomnosti IGF1 nebo IGF2 a ale také v nepřítomnosti exogenních nebo endogenních IGFs, díky snadnému uvolňování z vazby na IGFBP5 a následné interakci s receptorem. IGFBP6 se vyskytuje v mozkomíšním moku a má vysokou vazebnou afinitu k IGF2.

V literatuře můžeme dále najít i IGFBP7 a IGFBP8.

Název IGFBP7 navrhl v roce 1996 Oh a jeho tým jako označení pro bílkovinu mac25 popsanou již v roce 1993 Murphym. V roce 1996 u ní byla totiž zjištěna schopnost vázat IGF1 a IGF2. V porovnání s IGFBP3 je však afinita IGFBP7 k IGF1 a IGF2 100x nižší. Vysoká exprese IGFBP7 (mac25) byla zjištěna ve stárnoucích epiteliálních buňkách mléčné žlázy. Na druhou stranu IGFBP7 téměř chybí v estrogen receptor pozitivní tkáni karcinomu prsu. Autoři označují IGFBP7 jako nádorový supresor.

Označení IGFBP8 bylo navrženo v roce 1997 pro lidský tkáňový pojivový růstový faktor CTGF (connective tissue growth factor) po zjištění, že tento faktor má zachovaný IGFBP motiv a s nízkou afinitou váže IGFs. IGFBP8 byl nalezen v lidské kostní tkáni. Tento protein má mnohem vyšší afinitu k IGF2 než k IGF1 a potencuje proliferační vliv IGF2 na kostní buňky.

Stručnou charakteristiku IGFBP ukazuje tabulka 2.

Tab2: IGFBP

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

Receptory IGFs patří do skupiny receptorových protein tyrosin kináz (PTK), které fosforylují své substrátové bílkoviny na tyrosinových zbytcích. Patří sem receptory pro většinu peptidických růstových faktorů, které se uplatňují v regulaci růstu a diferenciaci buněk.

IGF1 receptor (IGF1R, CD221) je transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 350 kDa. Skládá se ze dvou α podjednotek a dvou β podjednotek. Zatímco α řetězce jsou lokalizovány extracelulárně a váží IGFs, β řetězce procházejí membránou do buňky. IGF1R je ze 60 % homologní s receptorem pro inzulin. Po vazbě ligandu na receptor dojde k autofosforylaci tyrozinu na β subjednotce. Některé práce naznačují, že IGF1 a IGF2 působí na buňku prostřednictvím IGF1R (Riedemann J., 2006). Po navázání ligandu na vnější straně membrány dojde ke konformačním změnám receptoru, které vedou k aktivaci kinázové domény. Tato dále katalyzuje fosforylaci klíčových aminokyselinových zbytků receptoru samotného a následně dochází k fosforylaci jeho cílových proteinů, které přenáší signál dál do

buňky. IGF1R je životně důležitý pro přežití buněk, což dokládá IGF1R K.O. (knock out) fenotyp u myši. Narušení IGF1R genu vyústilo ve více než 50% snížení hmotnosti K.O. zvířat oproti normální populaci. Tato zvířata zemřela v bezprostředním poporodním období na respirační selhání. U těchto zvířat byly též zjištěny generalizované vývojové abnormality, hypoplazie, abnormální kožní formace, opožděný vývoj kostí a abnormální morfologie centrálního nervového systému.

Hlavním cílovým proteinem pro inzulínové a IGF1 receptory je IRS1 (inzulín receptorový substrát 1). Narušení genu kódujícího IRS1 vedlo u myši k 50% snížení intrauterinního růstu, poruchám glukózové tolerance a snížení vychytávání glukózy. Při neexistenci IRS1 přebírá funkci cílového substrátu alternativní substrát IRS2. Tento protein se imunologicky liší od IRS1.

IGF2 receptor (IGF2R, CD222) je monomerní protein o molekulové hmotnosti 250 kDa. Jedná se o vazebný protein s vysokou afinitou pro IGF2 a velmi nízkou afinitu k IGF1 a nulovou afinitou k inzulínu. Cytoplazmatická doména receptoru nemá vlastní tyrosinkinázovou aktivitu a nemá schopnost přenášet signál. Dostupné důkazy nasvědčují tomu, že IGF2R není zapojen do vnitrobuněčné signalizace. IGF2 receptor cíleně váže IGF2 a tím snižuje biologickou dostupnost vysoce mitogenního IGF2. Některé z účinků IGF2 jsou zprostředkovány především isoformním inzulínovým receptorem IR-A. IGF2R je shodný s kation nezávislým manóza-6-fosfát (M6P) receptorem. Je to vlastně multifunkční proteinový receptor, který váže IGF2 na povrchu buněk a manózou-6-fosfátem (M6P) označené proteiny v Golgiho aparátu uvnitř buňky. IGF2/M6PR jsou zmutované nebo úplně chybí v buňkách několika druhů rakoviny, což vede k názoru, že IGF2/M6PR má roli nádorového supresoru (Renahan AG., 2004).

Inzulínový receptor existuje ve dvou isoformách IR-A a IR-B. IR-A je vyjádřen především v centrálním nervovém systému, krve tvorných buňkách, plodové tkáni a různých nádorových buňkách. IR-B je vyjádřen především v tukové tkáni, játrech a svalech.

Hybridní receptory vázající IGFs jsou složeny z jedné poloviny z IR a z druhé poloviny z IGF1R. Vzhledem k isoformám IR mohou tedy existovat IR-A/IGF1R a IR-B/IGF1R.

Některým bílkovinám vázajícím se s IGFs chybí funkce receptoru a byly nalezeny v séru.

Tyto proteiny modulují činnost IGFs. Některé z nich také mají stimulační růstové účinky *in vitro*, jiné růst inhibují.

Rozpustné receptory a vazebné proteiny byly nalezeny i na IL1, IL2, IL4, IL6, IL7, TNF- α a IFN- γ . Tyto proteiny pravděpodobně fungují jako regulátory cytokinů tím, že zabrání vazbě na receptor nebo vystupují jako transportní proteiny.

Stručnou charakteristiku receptorů pro IGF ukazuje tabulka 3.

Tab3: Receptory pro IGFs

receptor	struktura	vazebná afinita	přenos signálu
IGF1R	dimer 2 α , 2 β podjednotky	IGF1, IGF2	ANO
IGF2R	monomer	IGF2	NE
IR (IR-A, IR-B)	dimer 2 α , 2 β podjednotky	IGF1, IGF2	ANO
IR/IGF1R (IR-A/IGF1R, IR-B/IGF1R)	dimer 2 α , 2 β podjednotky	IGF1, IGF2	ANO

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).

Signální dráha PI3K/PKB je mimořádně důležitá intracelulární signální dráha, která je zapojena do řady normálních buněčných procesů podílejících se na proliferaci, metabolismu, růstu a přežití buněk. Abnormality této dráhy, způsobené izoformami a mutacemi různých regulačních komponent, vedou k některým formám nádorových onemocnění. Ústřední komponentou této dráhy je heterodimer PI3K tvořený regulační podjednotkou p85 a katalytickou podjednotkou p110, které nacházíme běžně pozměněné mutacemi u nádorových onemocnění. Aktivace PI3K vede ke zrušení inhibičního účinku regulační podjednotky p85 s následnou aktivací katalytické podjednotky p110, která obratem přeměňuje membránový fosfatidylinositol-3,5-bifosfát (PIP2) na trifosfátovou formu (PIP3). PIP3 následně indukuje fosforylaci PKB prostřednictvím proteinu PDK1. Komplex PI3K je za normálních okolností negativně regulován specifickou fosfatázou PTEN. PTEN působí jako negativní regulátor PI3K dráhy tím, že hydrolyzuje PIP3 na PIP2.

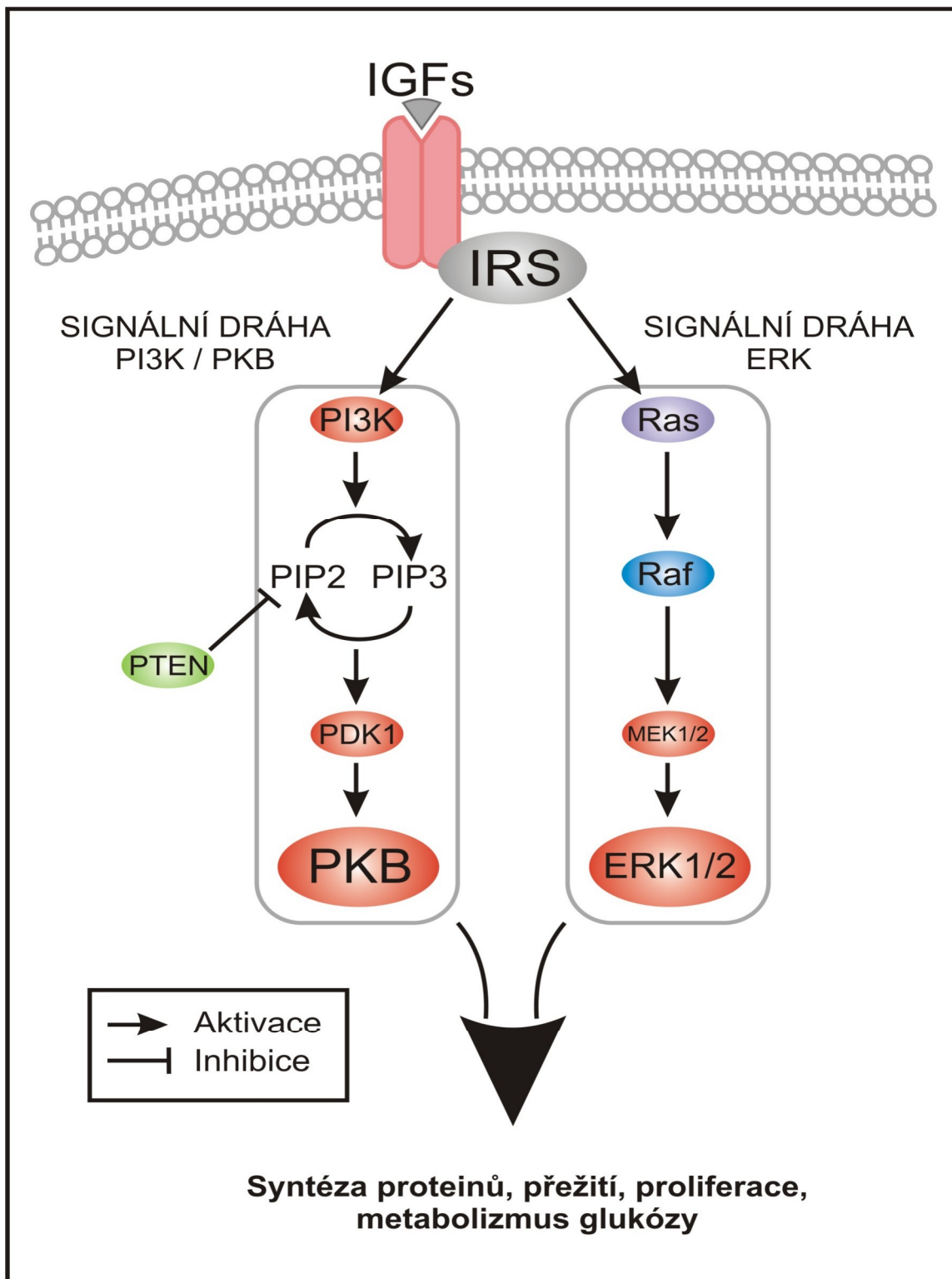


Schéma 1: Mechanismus účinku IGFs

Biologický účinek IGFs je zprostředkován IGF1 receptorem (IGF1R). IGF1 a IGF2 se váží na extracelulární doménu IGF1R. Tyrosin kinasové receptory po aktivaci autofosforylují na cytoplasmatické doméně a přes aktivaci adaptorového proteinu inzulin receptorového substrátu (IRS1/2) se aktivují dvě hlavní signální kaskády. Signální dráha PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza)/PKB (proteinkináza B) a signální dráha ERK (extracellular signal regulated kinases), která je jednou z několika MAP kinázových drah (MAPK mitogen activated protein kinases).

V důsledku ztráty funkce PTEN mutací nebo epigenetickou modifikací se ale mohou vyskytnout alterace vedoucí k hyperaktivaci PI3K. Ztráta funkce PTEN podporuje akumulaci PIP3, která vede k deregulaci přenosu signálu přes kaskádu PI3K/PKB.

PKB se účastní ještě řady dalších signálních kaskád a zasahuje tedy do celé řady buněčných dějů (proteosyntéza, přežívání, proliferace, glukózový metabolismus apod.) (Monti S., 2007). Aktivace deregulované signální dráhy PI3K/PKB poskytuje buňce signály pro neomezený růst a přežití.

Druhá signální dráha je kaskáda ERK (extracellular signal regulated kinases). Po aktivaci IRS1 se signál přenáší přes GTPasu Ras a kinázy Raf a MEK, které konečně vedou k aktivaci MAP kinázy, konkrétně ERK. ERK patří mezi první prozkoumané MAP kinázy savčích buněk. Skupina enzymů nazývaných MAP kinázy reguluje expresi genu a případně proliferaci a diferenciaci buňky.

Složitost IGFs signalizace dokládá fenotyp myši s chybějícím genem pro IGF1R. Například chybění tohoto genu v buňkách prostaty vedlo k aktivaci ERK dráhy a způsobilo buněčné proliferace a hyperplazie. Toto zjištění dokazuje, že MAP kinázové dráhy jsou aktivovány dalšími IGF1R nezávislými mechanismy. Dále přítomnost IGF1R signální dráhy usnadnila růst nádorů s poruchou činnosti enzymu p53 (enzym regulující apoptózu) (Sutherland BW., 2008).

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.

Nezávisle na hladinách IGFs je možné prohlásit, že nádorová transformace buněk je možná v případě přítomnosti funkčních IGF1R. Klíčovou úlohu IGF1R v onkogenní transformaci dokládají výsledky pokusů, které ukazují, že fibroblasty získané z myších embryí, ve kterých byla narušena homologní rekombinace (buňky R-), nemohou být změněny působením některým z řady známých onkogenů. Znovuzavedení funkčního IGF1R činí buňky opět vnímavé k transformační činnosti onkogenů. Nicméně existují některé výjimky,

kteří dokládají transformaci buněk R- prostřednictvím cest nezávislých na IGF1R (Liu X., 2011).

Základní podmínky přenosu signálu shrnuje Tabulka 4:

Tab4: Základní předpoklady pro přenos signálu

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

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.

Zajímavé je, že schopnost onkogenů způsobit transformaci, závisí na jejich schopnosti fosforylace IGF1R. Neporušená tyrosin kinázová doména je zásadní podmínkou toho, aby IGF1R vykonával své silné antiapoptotické a transformační činnosti (Peterson JE., 1996). Spolu s narůstajícími znalostmi o fungování systému IGFs se začaly prověřovat teorie o odpovědnosti IGFs za vznik některých maligních onemocnění. Zpočátku malé prospektivní epidemiologické studie neprokázaly spojení mezi zvýšenými hladinami IGF1 a nádory. Nicméně některé v poslední době provedené rozsáhlé studie prokázaly, že vysoké cirkulující koncentrace IGF1 a nízké hladiny IGFBP3 jsou spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny. Negativní korelace mezi úrovní IGFBP3 a rizikem rakoviny je v souladu s ochrannou rolí IGFBP3 (tj. vysoké koncentrace IGFBP3 vedou ke snížení hodnot volného IGF1). Některé studie však i přes svoji rozsáhlost nepřinesly jasné potvrzení vztahu IGFs, jejich vazebných proteinů a nádorů.

Též jako významná se ukázala autokrinní či parakrinní role IGFs. Zvýšení místní produkce IGF1 nebo IGF2 nebo jejich kombinace byly zjištěny u různých nádorových onemocnění a většinou pozitivně korelovaly s progresí nádorů (Samani AA., 2007). Co se týče exprese IGF1R je jejich prognostický význam pro riziko nádorových onemocnění prozatím nejasný v důsledku rozporných výsledků některých studií (Schnarr B., 2000). Tyto rozpory mohou být způsobeny rozdílnými metodikami včetně techniky konzervace tkání, velikostí vzorků a způsobem analýzy dat.

Jiná situace nastává, hodnotíme-li vztah IGF1R k nádorovým metastázám. IGF1R

signalizace hraje důležitou roli v klíčových fázích metastatického procesu jako je buněčná adheze, migrace, angiogeneze a podpora růstu vzdálených metastáz. Další in vivo studie ukázaly, že funkční poruchy IGF1R přispívají jednak k potlačení růstu primárního nádoru a především výrazně napomáhají poklesu nádorových metastáz. Buňky karcinomu tlustého střeva bez přítomného funkčního IGF1R na jejich cytoplasmatických membránách nevytvořily jaterní metastázy po přímém vstříkovaní do jater, což naznačuje, že IGF1R může regulovat vznik nádorových metastáz nezávisle na růstu nádoru.

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>
• lokální extrahepatální produkce IGFs
• autokrinní a parakrinní funkce IGFs
• zvýšená sérová hladina IGFs
<i>Intracelulární rizikové faktory</i>
• mutace v signální dráze
• genové mutace

2.6 IGF a vybrané nádorové diagnózy

2.6.1 Nádory kolorekta

Celá řada studií se věnuje vztahu cirkulujícího IGF a kolorektálního adenomu.

Studie prováděné na dostatečně velkých souborech pacientů však nedocházejí k jednoznačným výsledkům.

Poměrně rozsáhlá multietnická studie ([Le Marchand L., 2010](#)) měřila plazmatické hladiny C-peptidu jako markeru sekrece inzulínu a sérové hladiny IGFs a jejich vazebných proteinů u 554 nemocných pacientů s adenomem a 786 kontrol s normální endoskopií. Vysoké plazmatické hladiny C-peptidu a nízké hladiny IGFBP1 byly statisticky významně spojeny s rizikem kolorektálního adenomu. Tato studie naznačuje, že hyperinzulinémie působí jako etiologický faktor v kolorektální karcinogenezi.

Zajímavé výsledky přineslo sledování hladin IGF1 v závislosti na opakovaném výskytu kolorektálního adenomu. Sérové hladiny IGF1 byly měřeny při prvním záchytu adenomu u 299 mužů. IGF1 hladiny byly významně pozitivně asociovány s přítomností adenomů. V kontrastu s tímto zjištěním byly koncentrace IGF1 nepřímo spojené s opakovaným nálezem kolorektálního adenomu. Autoři vyslovují teorii, že jakmile je odstraněn adenom, vyšší koncentrace IGF1 snižují pravděpodobnost vzniku nových lézí v konečniku ([Jacobs CL., 2008](#)). Jiní autoři prokázaly u primárního adenomu zvýšení rizika u vysokého IGF1, snížení rizika u vysokého IGFBP3. U opakovaného výskytu adenomu však zjistili autoři nejdelší intervaly opakovaného výskytu u vysokých hladin IGFBP3 i IGF1 (Flood A., 2008). Autoři studie zabývající se hodnocením vztahu rizika vzniku adenomů a sérových hladin IGFBP3 a rizika vzniku adenomů a tkáňové exprese IGFBP3 mRNA nezjistili žádný významný vztah mezi sérovými hladinami IGFBP3 a rizikem adenomu, ale našli negativní korelaci mezi nižší tkáňovou expresí IGFBP3 mRNA a rizikem adenomů ([Keku TO., 2008](#)). Studie zabývající se expresí IGF1R jako základního prvku pro fungování signální dráhy IGFs přinesly zajímavá zjištění. Starší studie uvádí zvýšení IGF1R exprese během progresu z kolorektálního adenomu přes adenokarcinom a metastázy. IGF1R exprese korelovala se stadiem onemocnění. Novější studie na toto téma uvádí, že IGF1R je vyjádřen ve vysoké míře v časných stádiích nádorové aberace. U pokročilých nádorů s nízkou diferenciací byly nalezeny nízké exprese IGF1R (Allison AS., 2007). Další autoři nenašli žádnou korelaci mezi expresí IGF1R a dlouhodobou prognózou ve studii 86 metastáz kolorektálního karcinomu (Shiono S., 2006).

U pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem platí samozřejmě stejné teoretické předpoklady ohledně rizika při vzniku a následně při růstu jako u adenomu.

U pacientů s kolorektálním karcinomem, bylo zjištěno, že vyšší sérové hladiny IGFBP3 se nacházejí u pacientů s delším přežitím (Haydon AM., 2006). Jiní autoři poukazují na spojitost vyšší plazmatické hladiny IGFBP1 a vyšší míry přežití, zatímco hladiny IGF1 a IGFBP3 neměly žádný vztah k délce přežití pacientů (Wolpin BM, 2009).

Samostatnou kapitolou jsou pacienti s akromegalií. Zvýšená produkce růstového hormonu (GH) u těchto pacientů způsobuje též zvýšení plazmatických hladin IGF1. U pacientů s akromegalií se vyskytují ve zvýšené míře adenomatózní polypy tlustého střeva. Pacienti s akromegalií mají dvojnásobně zvýšené riziko vzniku karcinomu tlustého střeva (Renehan AG., 2008), ovšem bezprostřední souvislost se zvýšením hladin IGF se neprokázala.

U pacientů léčených GH se vzhledem na mechanismus působení IGF uvažovalo o možném zvýšeném riziku nádorů střevní sliznice (Jenkins PJ., 2006). Zvýšení rizika pro vznik nádorů tlustého střeva u pacientů léčených GH se však neprokázalo.

2.6.2 Nádory prsu

Nádory prsu patří k těm nádorům u kterých je fungování IGF systému nejvíce prostudováno. Pokud porovnáme celou signální soustavu IGFs u pacientek s karcinomem prsu a u zdravých žen, tak vidíme, že mnoho součástí osy IGFs vykazuje změny a to jak v krevním oběhu pacientek s rakovinou, tak i v nádorové tkáni samotné.

V posledních letech bylo provedeno množství studií s velkými počty nemocných i zdravých žen nebo se někteří autoři zaměřili na souhrnné hodnocení výsledků z více studií. Závěry však jsou do jisté míry kontroverzní.

Někteří autoři nacházejí pozitivní korelaci mezi zvýšenými hladinami IGF1 a IGFBP3 a rizikem karcinomu prsu u žen před menopauzou (Renehan AG., 2004, Sugumar A., 2004).

Kohortová studie provedená v Austrálii, která zahrnovala 423 případů rakoviny prsu a 1901 kontrol, ukázala, že zvýšená hladina IGF1 a IGFBP3 byla pozitivně spojena s rizikem rakoviny prsu u pacientek starších než 50 let, ale ne u mladších žen (Baglietto L., 2007).

Evropská studie The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), která analyzovala data od 1081 pacientek s rakovinou prsu a 2098 zdravých žen, došla k závěru, že vysoké hladiny IGF1 nebo IGFBP3 jsou spojeny se 40% zvýšením rizika rakoviny prsu u žen starších než 50 let, ale ne u mladších žen (Rinaldi S., 2006).

Kohortová studie osob v různých oblastech Japonska ukázala nevýznamnou roli IGF1 v riziku karcinomu prsu. Vyšší hladiny IGFBP3 snižovaly riziko u žen před menopauzou, u žen po menopauze se žádný vztah k diagnóze prokázat nepodařilo (Sakauchi F., 2009).

Čínští autoři provedly hodnocení dat z více než stovky studií. Na základě tohoto zhodnocení došli k závěru, že zvýšené sérové hladiny IGF1 pozitivně korelují se zvýšeným rizikem karcinomu prsu (Chen B., 2009).

Americká studie populace žen do 45let zkoumala závislost hladin IGF1, IGFBP1, IGFBP3, GH a rizika rakoviny prsu, ale žádné statisticky významné závislosti nalezeny nebyly (Schernhammer ES., 2006).

Kromě epidemiologických dat se experimentální důkazy též dotýkají role IGF systému v etiologii rakoviny prsu. Aktivace IGF1R chrání buňky rakoviny prsu před apoptózou. Gen

IGF1R je vysoce vyjádřený v buňkách karcinomu prsu. Přesný biologický význam však není úplně jasný. Nižší výskyt IGF1R nacházíme v benigních lézích a normální prsní tkáni, v porovnání s maligní tkání. Nicméně ve vysokých koncentracích byl nalezen IGF1R v tkáních dobře a středně diferencovaných karcinomů prsu, ale v mnohem nižších koncentracích u špatně diferencovaných karcinomů. Někteří autoři se domnívají, že vysoké hladiny IGF1R zhoršují prognózu, zatímco jiní považují vysokou úroveň IGF1R za příznivý prognostický ukazatel.

Hladiny IGF1R byly signifikantně vyšší u nádorů s genetickou mutací supresorového genu BRCA1 (breast cancer 1) ve srovnání s nádory bez této mutace (Maor S., 2006, 2007).

Hladiny některých komponent signální kaskády IGF, včetně IGF1R, byly častěji zvýšené v normální a nádorové tkáni u žen se silnou rodinnou anamnézou rakoviny prsu než u žen bez této anamnézy.

Zajímavým zjištěním je, že v buňkách získaných z biopsií nádorů prsu je možné vysledovat expresi určitých genů jako výsledek působení signální kaskády IGF1. Exprese IGF1 indukovaných genů významně koreluje s agresivitou nádoru. Nádorové buňky bylo možno rozdělit do dvou skupin. Ve skupině s vyšší expresí IGF indukovaných genů bylo přežití významně kratší než ve skupině s expresí nižší (Rajski M., 2010). Tato zjištění podporují teorii, kterou vyslovují někteří autoři i v souvislosti s nádory kolorekta.

ER (estrogen receptor) pozitivní klony buněk měly zvýšenou úroveň IGF1R, klony ER negativní měly úroveň sniženou.

Vysoké hladiny IGF1R vedly k recidivě karcinomu prsu po radioterapii a mohou též přispívat k rozvoji resistance na léčbu Herceptinem (trastuzumab - monoklonální protilátka proti HER2 receptoru) (Werner H., 2010).

Zablokování IGF1R vede ke snížení proliferace nádorových buněk karcinomu prsu.

2.6.3 Endometriální karcinom

U endometriálního karcinomu byla provedena řada studií, při kterých byly měřeny cirkulující hladiny IGF1, IGF2, IGFBP1 a IGFBP3. Výsledky jsou protichůdné.

Starší studie popisuje vyšší hladiny IGF1 a nižší koncentrace IGFBP1 u žen s karcinomem endometria po menopauze. Menší studie s 84 pacientkami s karcinomem a 84 kontrolami došla k závěru, že riziko karcinomu endometria bylo pozitivně spojeno s hladinami IGF2 v séru a nepřímo spojeno s koncentrací IGF1 (Petridou E., 2003). Další studie popisuje pozitivní korelaci IGF2 a negativní IGFBP3 (Oh A., 2004).

Ve studii s poměrně velkým souborem 288 pacientek s karcinomem endometria a souborem 392 kontrolních žen nebyla nalezena žádná korelace mezi rizikem rakoviny a koncentracemi IGF1, IGFBP1 a IGFBP3 (Weiderpass E., 2003).

V některých studiích byl dokonce nalezen inverzní vztah IGF1 a rizika karcinomu endometria, to znamená, že pacientky s nejvyššími hladinami IGF1 měly riziko nejnižší a opačně (Gunter MJ., 2008). Dále ve studii s 405 pacientkami s rakovinou endometria a 297 kontrolními zdravými ženami byl karcinom endometria nepřímo spojen s koncentrací IGF2 a IGFBP3 v séru (Lacey JV., 2004).

Nově popsaný vazebný protein pro IGFs IGFBP7 (protein mac25) byl též zkoumán ve vztahu k endometriálnímu karcinomu, ale žádná závislost nalezena nebyla (Kutsukake M., 2008).

V souladu s ústřední rolí IGF1R v karcinomu endometria byly nalezeny významně zvýšené exprese IGF1R (McC Campbell AS., 2006) a IGF1R mRNA v biopsiích endometriálních karcinomů.

2.6.4 Ovariální karcinom

Studie zabývající se vztahem sérových hladin IGFs, IGFBPs a rizikem rakoviny vaječnicků přinášejí rozporné výsledky.

Část autorů uvádí, že zvýšené hladiny IGF1 zvyšují riziko ovariálního karcinomu (Lukanova A., 2002, Peeters PH., 2007), zatímco vyšší hladiny IGFBP3 toto riziko mírně snižují.

Určitým předělem se zdá být věk cca 55 let. Hodnocení hladin IGF1 u žen starších než 55 let nepřineslo žádné změny rizika v závislosti na hladinách IGF1 a IGFBP3. Na druhou stranu, v několika retrospektivních studiích byly koncentrace IGF1 v séru u žen s maligním nádorem vaječnicků nižší než u kontrolní skupiny.

Při experimentech in vitro na klonech nádorových buněčných linií karcinomu vaječnicků byla prokázána autokrinní produkce IGF1 a IGF2 a tvorba IGF1R. Vznikla tím tzv. autokrinní růstová smyčka.

RNA analýzy odhalily přítomnost IGF1 a IGF1R mRNA ve 100% čerstvě izolovaných nádorových vzorků. Studie mapující úlohu IGF2 zjistila výrazně vyšší IGF2 mRNA ve 109 vzorcích nádorové tkáně vaječnicků ve srovnání s osmi vzorky normální tkáně. Kromě toho byla vysoká IGF2 genové exprese spojena s pokročilým stadiem onemocnění a kratším přežitím. Zablokování IGF1R vede ke snížení proliferace buněk karcinomu ovarií (Gotlieb WH., 2006).

2.6.5 Karcinom děložního čípku

U karcinomu děložního čípku byly nalezeny zvýšené hladiny IGF2 a normální hladiny IGF1. Zvýšené hladiny IGF2 může blokovat IGFBP5. Autoři též popisují zvýšenou expresi mRNA po stimulaci linií nádorových buněk epidermálním růstovým faktorem (EGF). Na základě těchto výsledků autoři vyslovili teorii zkříženého působení systémů IGF a EGF. Autokrinní produkce IGF2 může zprostředkovat mitogenní účinek EGF v buňkách rakoviny děložního čípku. V následné studii (Steller MA., 1996) zjistili autoři zvýšenou expresi IGF1R v primárních kulturách nádorových buněk děložního čípku ve srovnání s normálními buňkami děložního čípku.

Významnou roli autokrinní produkce IGF2 v patogenezi karcinomu děložního čípku potvrzuje studie bioptických vzorků nádorové a normální tkáně. Ve tkáni karcinomu děložního čípku byly nalezeny významně zvýšené hladiny oproti normální tkáni. Autoři také našli významný vztah mezi IGF2 hladinami u nádorů a metastáz v pánevních lymfatických uzlinách. Zajímavé je, že malá ložiska maligních buněk v lymfatických uzlinách byla odhalena na základě zvýšeného nálezu IGF2. Dále byly sérové hladiny IGF2 a IGFBP3 hodnoceny u zdravých žen, u pacientek s intra epiteliální neoplazií (CIN) děložního hrdla a karcinomem děložního hrdla. Koncentrace IGF2 byly zvýšeny u žen s CIN a karcinomem děložního čípku, v porovnání s normálními hladinami u zdravých žen a u úspěšně léčených pacientek s rakovinou děložního čípku a CIN. Koncentrace IGFBP3 vykazovaly výrazný pokles v pokročilém stádiu onemocnění. Též byla nalezena pozitivní korelace mezi vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem C (VEGF-C) a IGF2 a negativní korelace mezi IGFBP3 a VEGF-C (Mathur SP., 2005).

2.6.6 Karcinom prostaty

Množství údajů naznačuje, že signální systém IGFs hraje důležitou roli při vzniku a progresi karcinomu prostaty, i když závěry řady studií nejsou úplně jednotné.

Vyšší hladiny IGF1 v oběhu zvyšují riziko karcinomu prostaty (Monti S., 2007, Chen B., 2009), zatímco vyšší koncentrace IGFBP3 riziko snižují (Chen B., 2009). Další studie ukázala, že cirkulující hladiny IGF1 a IGFBP3 byly signifikantně vyšší u pacientů s karcinomem prostaty oproti zdravým mužům (Shi R., 2001).

Zajímavým zjištěním je, že poměr IGF1/PSA měl lepší výpovědní hodnotu ohledně predikce rizika karcinomu prostaty než samotné měření hladin PSA nebo IGF1 (Djavan B., 1999).

Dále je nutné uvést, že hladiny IGF1 a IGFBP3 byly prediktory pokročilé fáze karcinomu prostaty, ale nikoliv časně fáze (Rowlands MA., 2009).

Na druhou stranu některé studie nenašly korelaci mezi koncentrací IGF1, IGFBP3 v séru a rizikem rakoviny. Dokonce i studie na rozsáhlém souboru pacientů (727 případů rakoviny prostaty a 887 zdravých kontrol) dospěla k závěru, že neexistuje jasná souvislost mezi hladinou IGF1, IGFBP3 a karcinomem prostaty (Weiss S., 2008).

Studie zaměřené na mechanismus vzniku karcinomu prostaty poukazují na významnou roli autokrinní produkce IGF1. Karcinom prostaty vyvolaný vysokými dávkami testosteronu u potkanů byl podporován zvýšenou autokrinní produkcí IGF1. Exprese transgenů IGF1 u myší vedla k aktivaci IGF1R a spontánní tvorbě tumorů prostaty. Studie 54 bioptických vzorků prostaty našla výraznou upregulaci IGF1R na úrovni proteinů i mRNA v primárním karcinomu prostaty v porovnání s benigním tumorem prostaty. Též byla nalezena zvýšená exprese IRS1 (inzulin receptorového substrátu) v maligních biopsiích. Ve 12 spárovaných biopsiích primárního karcinomu prostaty a následné kostní metastázy byla zjišťována exprese IGF1R, IRS1 a PTEN. Ve 4 případech byla úroveň exprese IGF1R a IRS1 nižší u metastáz než v primárních nádorů. Ve 3 těchto metastázách nebyla prokázána přítomnost PTEN. Tento nález byl poměrně neobvyklý, protože v 8 z 12 případů byla zjištěna exprese IGF1R a IRS1 v primární i metastatické biopsii.

Studie zaměřená na hledání IGF1R ve zmrazených tkáňových řezech prostaty našla zvýšený výskyt IGF1R v normální prostatické tkáni, ve tkáni karcinomu prostaty a metastáz, ale nenalezla téměř žádné IGF1R ve tkáni benigních tumorů prostaty (Ryan CJ., 2007).

2.6.7 Karcinom žaludku

U pacientů s karcinomem žaludku byly hodnoceny sérové hladiny v čase zjištění diagnózy. Hladiny IGF1 byly snižené, hladiny IGF2 lehce zvýšené a hladiny IGFBP3 nevykazovaly žádný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou (Yi HK., 2001). V novější studii 210 případů rakoviny žaludku nepřineslo hodnocení sérových hladin IGF1, IGF2, a IGFBP3 zjištění žádných významných závislostí co se týče rizika karcinomu žaludku (Yatsuya H., 2005). V Japonsku byl zjištěn jeden případ vysoké sérové hladiny IGF2 u pacienta trpícího karcinomem žaludku s jaterními metastázami.

Při hodnocení role IGFs signální cesty v souvislosti s karcinomem žaludku bylo zjištěno, že IGFs signalizace podporuje růst a přežití buněk karcinomu žaludku. Xenotransplantát lidských buněk karcinomu žaludku do peritonea myši byl sledován po aplikaci rekombinantního adenoviru, který způsobí expresi okleštěného IGF1R, který nepřenáší signál do buňky. Zablokováním signální dráhy IGFs došlo u myši k výraznému zvýšení apoptózy indukované radioterapií a chemoterapií. Zvýšená exprese IGF1R ve tkáních karcinomu žaludku je negativním prognostickým faktorem (Matsubara J., 2008).

2.6.8 Nádory jater

Téměř všechny hepatocelulární karcinomy se objevují v souvislosti s chronickým poškozením jater, zánětem a zvýšeným dělením hepatocytů. Následující regenerační procesy a fibróza vedou k cirhóze jater, při níž se zvyšuje frekvence mutací v hepatocytech a případně vzniká maligní bujení. U pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC) byl v anamnéze nalezen zvýšený výskyt hepatitidy B a C (HBV a HCV). V případech HCC vyvolané HBV i HCV byla prokázána zvýšená exprese IGF2. U HCV pozitivní cirhózy jater, byla HCV replikace významně spojena s expresí IGF2.

V buněčných liniích lidských hepatomových buněk byla prokázána vysoká koncentrace IGF2 v důsledku autokrinní produkce.

Studie souboru 53 pacientů s metastazujícím HCC odhalila výrazně nižší sérové koncentrace IGF1 v porovnání s kontrolami.

Ve studii bioptických vzorků pacientů s HCC byla snižená exprese IGFBP1, IGFBP3, a IGFBP4. V další studii 11 pacientů s hepatoblastomem byla, s výjimkou dvou případů, snižená exprese IGFBP1 v nádorové tkáni oproti normální jaterní tkáni stejného jedince (Gray SG., 2000). V této studii bylo dále zjištěno snížení IGFBP2 v hepatoblastomové tkáni. Autoři formulovali teorii, že z důvodu snížené exprese IGFBPs je zvýšená nabídka biologicky aktivních IGFs a tyto pak potencují proliferační účinky. V lidské linii hepatomových buněk byla mitogenní aktivita exogenně přidaných IGFs snížena přítomností IGFBP1 – IGFBP4. Nejvyšší inhibiční účinek byl přičítán IGFBP3. Přídavek rekombinantního lidského IGFBP3 inhiboval růst lidských hepatomových buněk.

Co se týče role receptorů růstových faktorů, tak jeden z produktů viru HBV, protein HBx, aktivuje transkripci a může způsobit zvýšení exprese genů IGF1R. Role supresorového IGF2/M6PR je v genezi HCC nejasná. Některé americké studie prokazují narušení vazebné

funkce IGF2/M6PR v buňkách HCC v důsledku genetických mutací. Jiným studiím se však genetické změny genu pro IGF2/M6PR odhalit nepodařilo.

Na zvířecích modelech byla zkoumána role IGFs signální dráhy u HCC. Byly zaznamenány zvýšené hladiny IGF2 u HCC s metastatickým potenciálem u myší. Inhibice IGF2 resp. jeho receptoru IGF1R, zhoršuje migraci a invazivnost myších buněk HCC. Kromě toho, inhibice IGF1R také narušuje schopnost buněk HCC metastazovat do plic. Tyto nálezy naznačují, že IGF1R signalizace hraje důležitou roli v šíření nádoru (Chen B., 2009).

2.6.9 Karcinom pankreatu

Ve čtyřech amerických prospektivních kohortních studiích bylo zhodnoceno 144 případů rakoviny slinivky břišní. Byly hodnoceny sérové hladiny IGF1, IGFBP1, IGFBP3 a C-peptidu jako ukazatele produkce inzulínu. Nízké sérové hladiny IGFBP1 byly významně spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny slinivky (Wolpin BM., 2007). Ve finské studii hodnotili autoři vztah IGF1 a IGFBP3 k rakovině pankreatu u mužů kuřáků (Stolzenberg-Solomon 2004). Bylo hodnoceno 93 případů adenokarcinomů u finských mužů - kuřáků ve věku 50-69 let. Sérové hladiny IGF1 a IGFBP3 byly srovnávány s hladinami u 400 náhodně vybraných kontrol. Sérové koncentrace IGF1 a IGFBP3 ani molární poměr IGF1/IGFBP3 nebyl významně spojen s adenokarcinomem pankreatu.

Při studiu IGF1R a jeho signální dráhy ve vztahu k rakovině slinivky byly do tkáňových kultur buněk karcinomu pankreatu přidány specifické inhibitory IGF1R a PI3K. Došlo tím k zablokování přenosu signálu v kaskádě PI3K/PKB. Oba inhibitory způsobily apoptózy v rakovinných buňkách (Tomizawa M., 2010).

2.6.10 Poruchy a nádory štítné žlázy

Hladiny IGF1 a IGFBP3 byly zkoumány v souvislosti s poruchami štítné žlázy. Vysoké sérové koncentrace IGF1 jsou spojeny se strumou, s uzly ve štítné žláze viditelnými na ultrazvuku a se sníženým TSH. U hladin IGFBP3 nebyly nalezeny žádné vazby v souvislosti s poruchami funkce štítné žlázy.

U adenomů štítné žlázy jsou popisovány nižší sérové hladiny IGF1 ve srovnání se zdravou populací (Veselý D., 2004).

Zvýšená exprese IGF1R koreluje u nádorů štítné žlázy se špatnou prognózou (Chakravarty G., 2009). U IGF1R nacházíme zjevnou souvislost mezi jejich expresí a diferenciací nádorových

buněk. U dobře a středně diferencovaných karcinomů nacházíme významnou expresi těchto receptorů zatímco u anaplastických karcinomů již exprese chybí. Tento jev autoři vysvětlují tím, že u anaplastických buněk je aktivováno dostatečné množství signálních prorůstových drah a dráha zprostředkovaná IGF1R již není zapotřebí.

2.6.11 Nádory plic

Ve studii provedené v Luisianě v roce 1999 byla sledována sérová hladina IGF1, IGF2 a IGFBP3 u 204 pacientů s nově diagnostikovanou rakovinou plic a u 218 kontrolních osob. Vysoké hladiny IGF1 byly spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny. Izolované hodnocení hladin IGFBP3 neukázalo žádnou spojitost s rizikem rakoviny plic. Pokud bylo IGFBP3 hodnoceno společně s IGF1, byly vysoké hladiny IGFBP3 spojeny s nižším rizikem rakoviny plic. Hladiny IGF2 neměly žádnou souvislost s rizikem rakoviny plic.

Novější studie zabývající se sérovými hladinami IGF1 a IGFBP3 ve vztahu k riziku nádorů plic zjistila, že zvýšené hladiny IGF1 riziko významně nemění, ale vyšší hladiny IGFBP3 riziko snižují (Chen B., 2009).

U rizika plicních nádorů hraje významnou roli autokrinní a parakrinní působení IGFs. Při zkoumání vzorků bronchiální tkáně bylo zjištěno, že hladiny IGF1 a IGF2 byly výrazně vyšší ve vzorcích tkáně s vysokým obsahem dysplazií než v těch, které obsahovaly pouze běžný epitel (Kim SY., 2009). Tento nález ještě umocňuje zvýšená exprese IGF1R na buňkách dysplazií. Transformaci buněk výrazně potlačuje inaktivace IGF1R a tím inhibice účinku IGF1.

Zajímavé výsledky poskytla studie z nedávné doby, kdy se autoři zaměřili na zkoumání role IGF1R při vzniku a rozvoji plicního nádoru. Na zvířecím modelu transgenních myší se autorům podařilo zvýšenou expresí IGF1R vyvolat změny v plicní tkáni, které vedly k rozvoji nádorů. Při blokaci IGF1R nedošlo k pozitivní odpovědi u všech nádorů, ale menší část pokračovala nadále v růstu. Tyto nálezy naznačují, že některé nádory, které jsou iniciovány overexpresí IGF1R mohou dalšími mutacemi získat nezávislost na IGF1R signalizaci ([Linnerth NM., 2009](#)).

2.6.12 Rakovina kůže

Buňky melanomů reagují v časném nádorovém stadiu na stimulaci pomocí IGF1 zvýšeným přežitím, migrací a růstem. V pozdně primárních nebo metastatických lézích již není reakce

na stimulaci IGF1 příliš výrazná . Ve studii zkoumající 36 biopsií melanomů byla vysoká exprese IGF1R spojena se zvýšeným počtem metastáz a kratším přežitím pacientů ([All-Ericsson C.](#), 2002).

IGF1 signální dráha má však zásadní význam pro zachování správné odolnosti keratinocytů na ultrafialové záření. Tato odolnost je důležitá pro potlačení onkogenních transformací v kůži. U stárnoucí kůže nacházíme sníženou expresi IGF1R, což koreluje s faktem, že 80% rakoviny kůže se vyskytuje u pacientů starších 60ti let. Pokud je IGF1R neaktivní v době UV ozáření, keratinocyty mají menší šanci na přežití a velké procento z keratinocytů projde apoptózou. Nicméně některé přežívající keratinocyty s poškozenou DNA se můžou i nadále množit s možností karcinogenních mutací ([Lewis DA.](#), 2010).

2.6.13 Leukémie

Při sledování dětí s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) byly měřeny hladiny IGFs a jejich vazebných proteinů v době zjištění diagnózy. Byly zjištěny zvýšené hladiny IGFBP2, nízké hladiny IGFBP3, nízké IGF1 a IGF2 a normální hladiny IGFBP1. Hladiny IGFBP2 fungovaly jako nezávislý faktor, který informuje o relapsu onemocnění nebo selhání léčby ([Vorwerk P.](#), 2005).

Studie zaměřená na určení úlohy IGF1R při patogenezi (ALL) u dětí i dospělých zjistila, že IGF1R byl vyjádřen u všech 60 pacientů s ALL, exprese IGF1R byla signifikantně vyšší u nově diagnostikovaných pacientů než u pacientů v kompletní remisi a zdravými kontrolami ([Kamel MM.](#), 2008).

Studie zaměřené na určení úlohy IGF signální dráhy u akutní myeloidní leukémie odhalují významný vliv autokrinní produkce IGF1 při rozvoji onemocnění. Specifická inhibice IGF1R protilátkou proti IGF1R silně utlumila fosforylaci a přenos mitogenního signálu do buňky ([Chapuis N.](#), 2010, [Park S.](#), 2010).

2.6.14 Sarkomy

U pacientů s Ewingovým sarkomem byly nalezeny významně nižší hladiny IGF1 a IGFBP3 a významně vyšší hladiny IGF2 než u zdravých jedinců. Zvýšené hodnoty IGF2 byly spojeny se sníženým přežitím pacientů. Po odstranění nádoru se hladiny IGF1 i IGF2 vrátily k normálním hodnotám ([Avnet S.](#), 2009). IGF1R byl identifikován jako hlavní receptor pro růstový faktor v liniích buněk Ewingova sarkomu.

Byly též popsány vysoké hladiny IGF2 u sarkomů vycházejících z jiných než kostních tkání (Sato R., 2004).

Po zablokování IGF1R specifickým inhibitorem dochází k zablokování buněčné proliferace a spouštění apoptózy v buněčných liniích Ewingova sarkomu (Martins AS., 2006).

Při pokusech in vivo docházelo u myši, kterým byly aplikovány buněčné linie Ewingova sarkomu, po podání inhibitorů IGF1R v kombinaci s chemoterapií k synergickému léčebnému efektu, který výrazně inhiboval migrace, metastázy a angiogenezi.

2.6.15 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 lymfoblastická 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 lymfoblastická leukémie	×	×	↑
Akutní myeloidní leukémie	↑	×	↑
Sarkomy	×	×	↑

Vysvětlivky:

↑ - zvýšená tkáňová produkce či exprese, ↓ - snížená tkáňová produkce či exprese

× - údaje nenalezeny

2.7 Ostatní růstové faktory

2.7.1 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.

2.7.2 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 společné pro více růstových faktorů. HER1 může být využíván i růstovými faktory jako je TGF α .

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 α a VEGF v buňce (Dvořák B., 2004).

2.7.3 TGF

TGF (Transforming growth factor, transformující růstový faktor) slouží k označení dvou tříd polypeptidových růstových faktorů, TGF α a TGF β . Dvě třídy TGF však nejsou strukturálně ani geneticky příbuzné a působí prostřednictvím různých receptorů. Navíc, ne vždy vyvolávají buněčnou transformaci. TGF α hraje klíčovou roli v transformaci lidských buněk na některé druhy nádorů. Je syntetizován v makrofázích, mozkových buňkách a keratinocytech a napomáhá vývoji epitelu. TGF α patří do skupiny EGF proteinů. TGF β existuje ve třech známými lidských podtypech: TGF β 1, TGF β 2 a TGF β 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 α využívá typ HER receptorů společně s EGF. TGF β 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 TGFBR1, signál prostupuje membránou a šíří se dále do buňky. Celá TGF β signální dráha zasahuje svými účinky až na úroveň transkripce. TGF β 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).

2.7.4 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.

2.8 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).

2.8.1 CEA

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).

2.8.2 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 korelují se stadiem onemocnění. Při 90 % specifitě 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 zejména 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 fázi (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^{125} . 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:

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

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:

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

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, plis, 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, plic, 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:

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

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

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

Tab11: Diagnózy a rozložení hodnot pacientů se stanoveným IGF1

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

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

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

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

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

*hodnoty p-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.

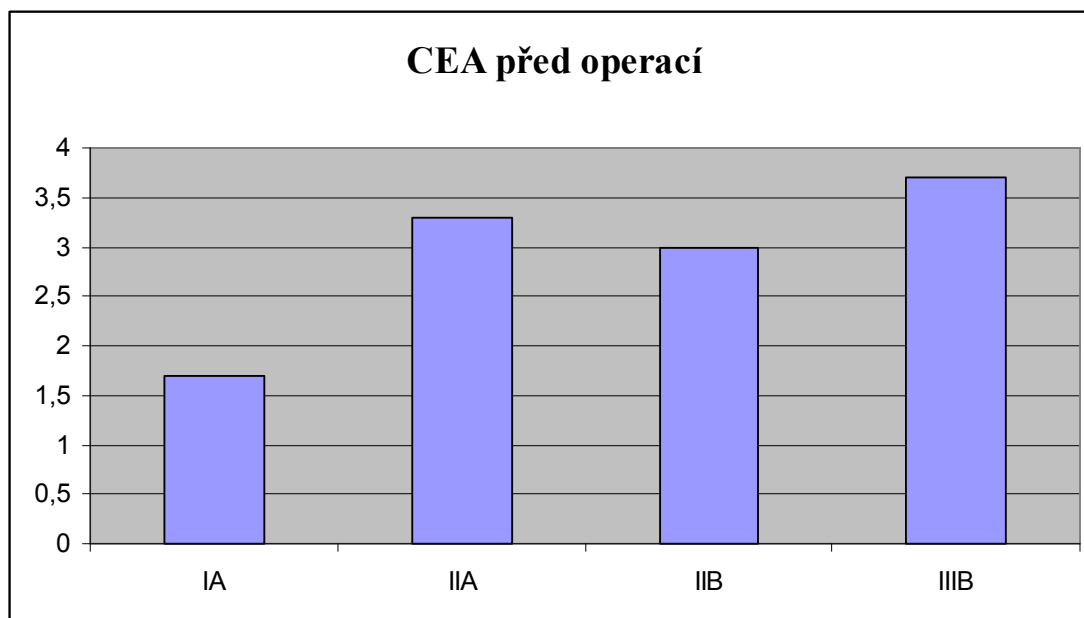
Výsledky po rozdělení do jednotlivých podskupin je možné vidět v tabulkách 15 – 22. Pro větší názornost jsem zjištěné výsledky vynesl i do grafů 1 - 8.

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 $\mu\text{g/l}$

Graf1:

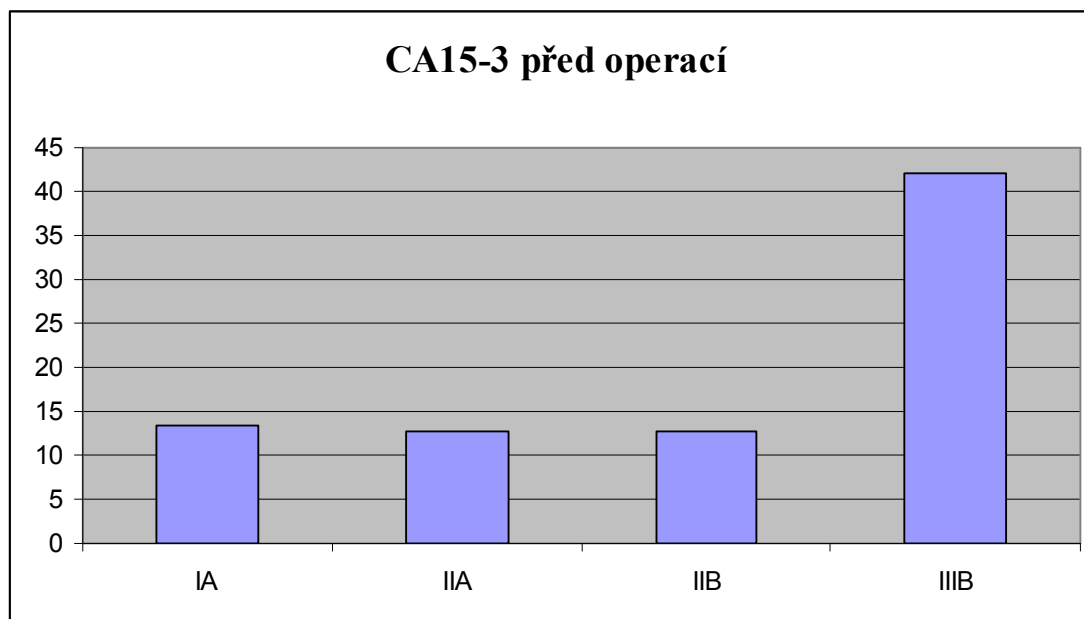


Tab16: Přehled hladin CA15-3 u Ca prsu před operací

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:

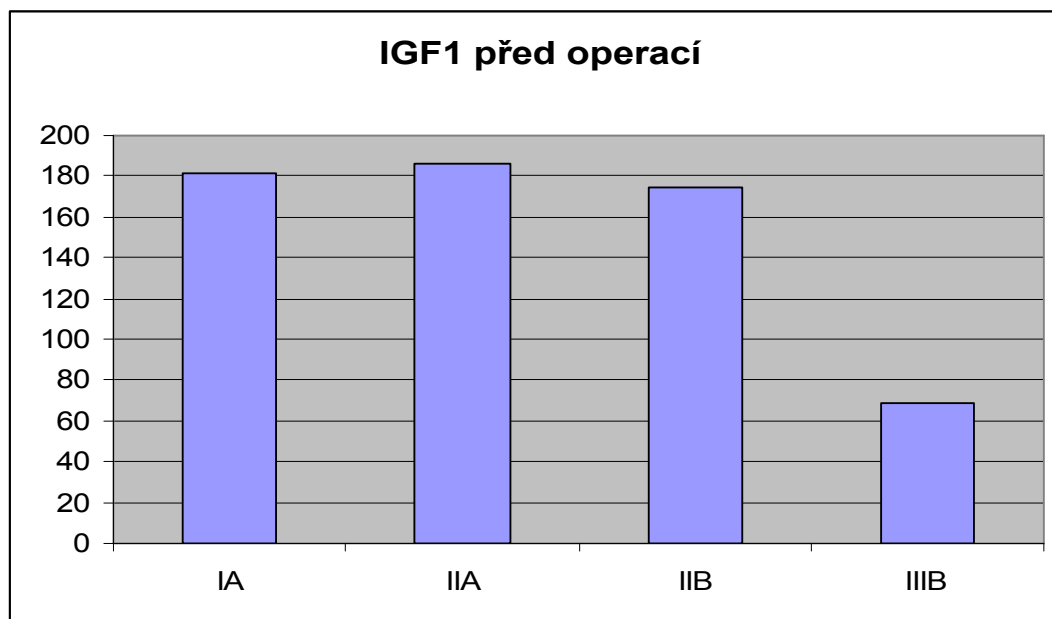


Tab17: Přehled hladin IGF1 u Ca prsu před operací

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:

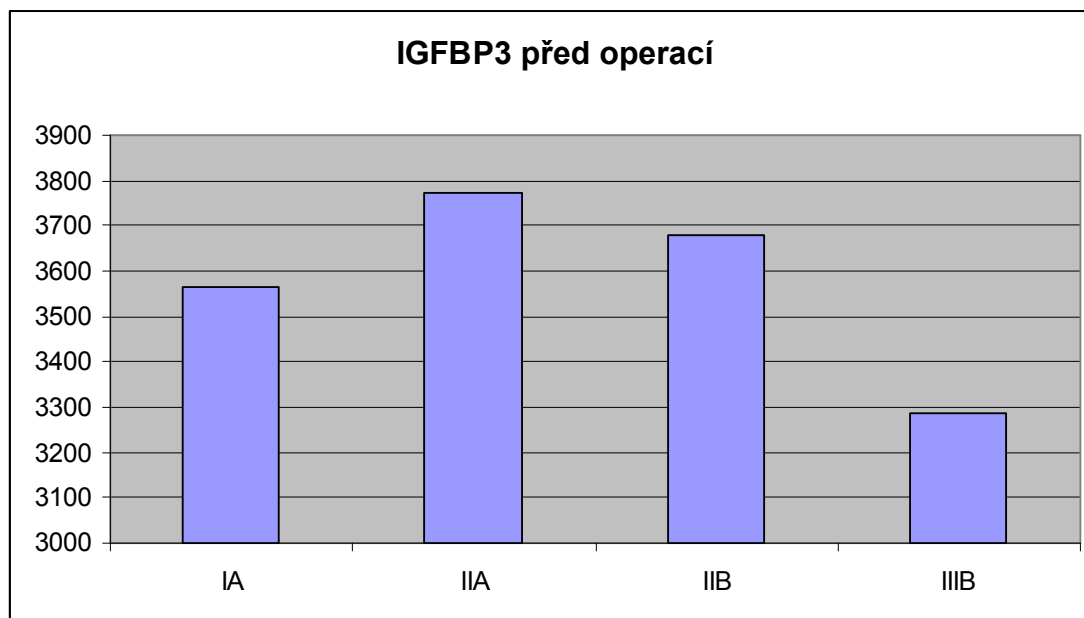


Tab18: Přehled hladin IGFBP3 u Ca prsu před operací

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:



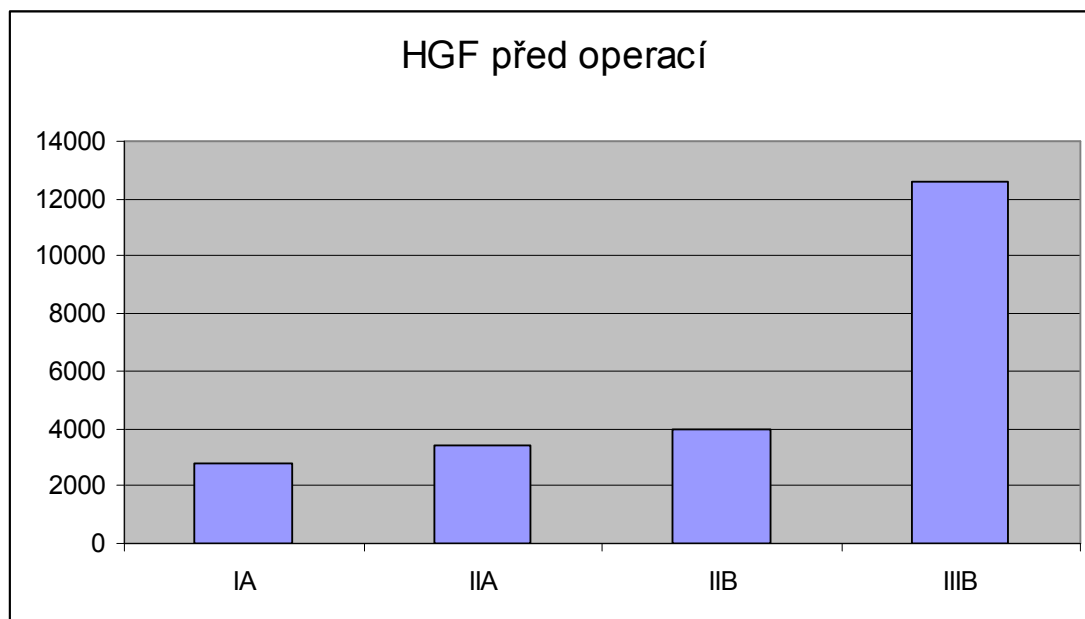
Tab19: Přehled hladin HGF u Ca prsu před operací

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:

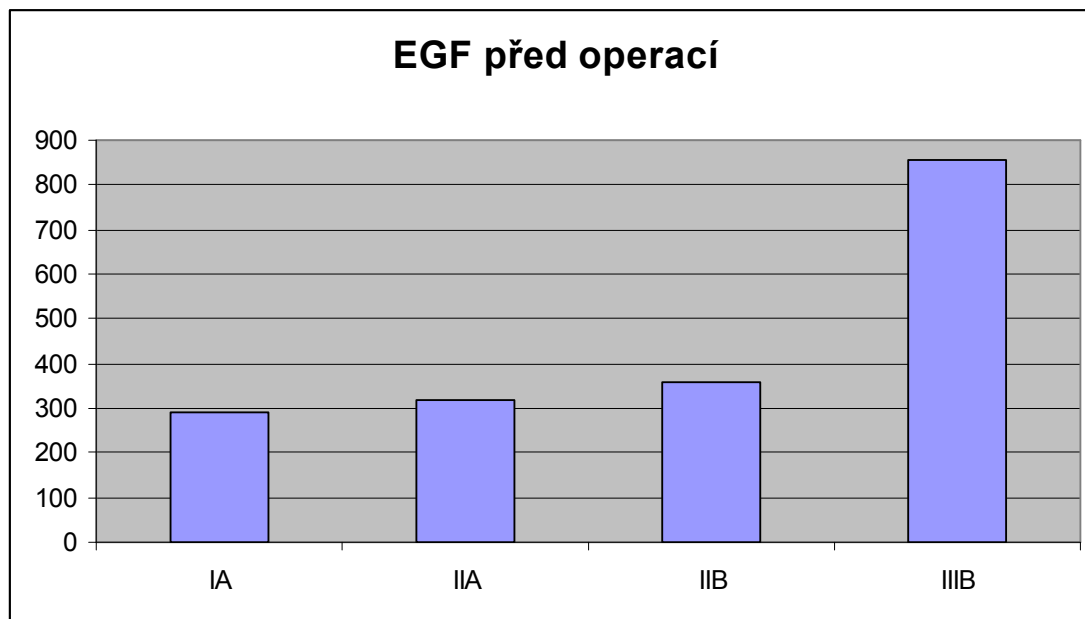


Tab20: Přehled hladin EGF u Ca prsu před operací

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:

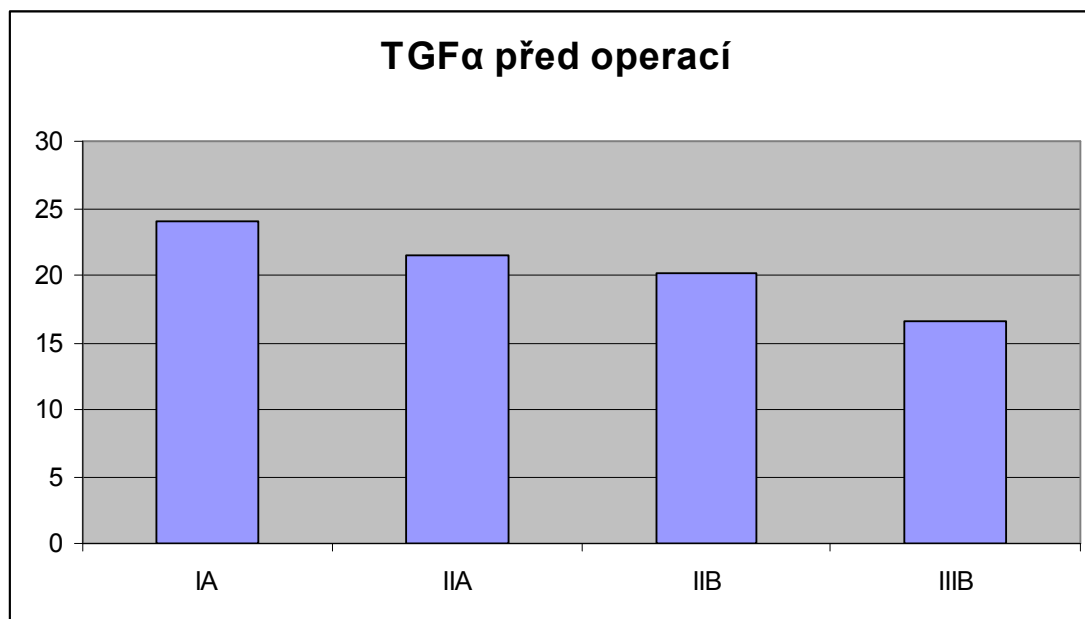


Tab21: Přehled hladin TGF α u Ca prsu před operací

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 α v pg/ml

Graf7:

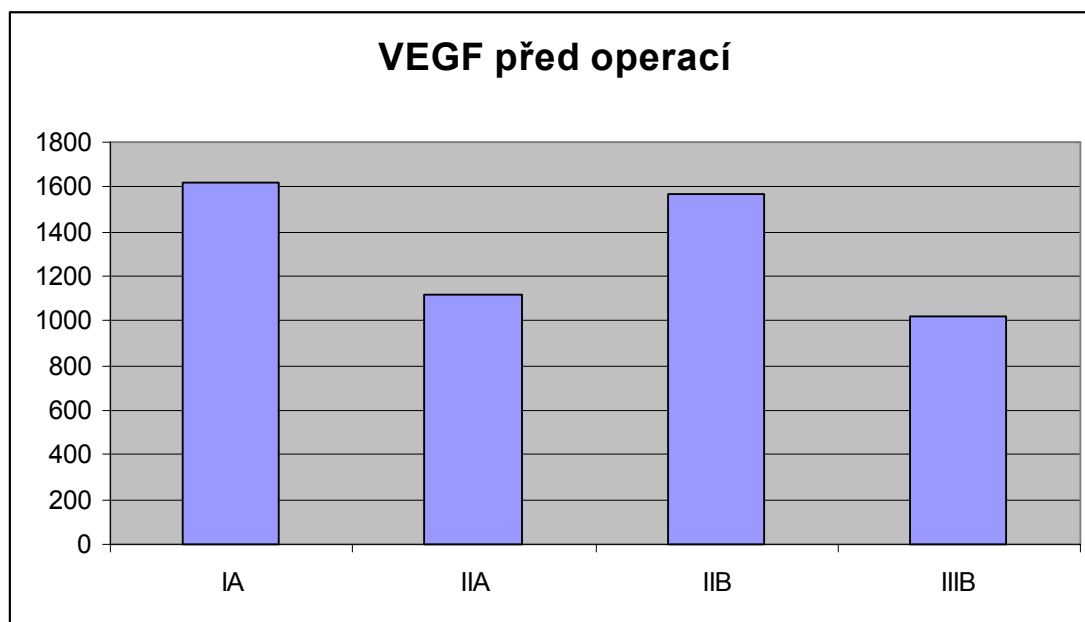


Tab22: Přehled hladin VEGF u Ca prsu před operací

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 prvozáchytch 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, 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 podle nádorových 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 α negativně korelovaly se závažností nádorového onemocnění. Což zapadá do obrazu TGF α jako nádorového onkogenu. Poté, co TGF α 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 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 α 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 Literatura

Allison AS, McIntyre MA, McArdle C, Habib FK., The insulin-like growth factor type 1 receptor and colorectal neoplasia: insights into invasion, *Hum Pathol.* Nov;38(11):1590-602. Epub 2007

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

Baglietto L, English DR, Hopper JL, Morris HA, Tilley WD, Giles GG., Circulating insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and the risk of breast cancer., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;16(4):763-8, 2007

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

Chakravarty G, Santillan AA, Galer C, Adams HP, El-Naggar AK, Jasser SA, Mohsin S, Mondal D, Clayman GL, Myers JN., Phosphorylated insulin like growth factor-I receptor expression and its clinico-pathological significance in histologic subtypes of human thyroid cancer, *Exp Biol Med (Maywood).*;234(4):372-86., 2009

Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-Lefebvre P, Gillot L, Bardet V, Willems L, Park S, Green AS, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D., Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody, *Haematologica.*;95(3):415-23, 2010

Chen B, Liu S, Xu W, Wang X, Zhao W, Wu J., IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer: a meta-analysis based on nested case-control studies., *J Exp Clin Cancer Res.* 24;28:89., 2009

DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ., A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting, *Nature*, May 3;345(6270):78-80, 1990

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

Flood A, Mai V, Pfeiffer R, Kahle L, Remaley AT, Rosen CJ, Lanza E, Schatzkin A., The effects of a high-fruit and -vegetable, high-fiber, low-fat dietary intervention on serum concentrations of insulin, glucose, IGF-I and IGFBP-3., *Eur J Clin Nutr.* Feb;62(2):186-96. Epub 2007 May 9., 2008

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

Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, Wassertheil-Smoller S, Manson JE, Li J, Harris TG, Rohan TE, Xue X, Ho GY, Einstein MH, Kaplan RC, Burk RD, Wylie-Rosett J, Pollak MN, Anderson G, Howard BV, Strickler HD., A prospective evaluation of insulin and insulin-like

growth factor-I as risk factors for endometrial cancer., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;17(4):921-9. 2008

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

Haydon AM, Macinnis RJ, English DR, Morris H, Giles GG. Physical activity, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and survival from colorectal cancer. *Gut.* May;55(5):689-94., 2006

Jacobs CI., A review of the role of insulin-like growth factor 2 in malignancy and its potential as a modifier of radiation sensitivity., *Clin Oncol.*, Jun;20(5):345-52., 2008

Jenkins PJ., Cancers associated with acromegaly., *Neuroendocrinology.*;83(3-4):218-23., Review., 2006

Kamel MM, Hammam AA, Elhoseiny SM, Mokhles A, Mohsen E., The Role of Type I Insulin Like Growth Factor Receptor (IGF-IR) in Adult and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia., *J Egypt Natl Canc Inst.* ;20(3):237-43., 2008

Keku TO, Sandler RS, Simmons JG, Galanko J, Woosley JT, Proffitt M, Omofoye O, McDoom M, Lund PK, Local IGFBP-3 mRNA expression, apoptosis and risk of colorectal adenomas, *BMC Cancer.* 22;8:143., 2008

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.

Lacey JV Jr, Potischman N, Madigan MP, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Lurain JR, Fillmore CM, Sherman ME, Brinton LA. Insulin-like growth factors, insulin-like growth factor-binding proteins, and endometrial cancer in postmenopausal women: results from a U.S. case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;13(4):607-12., 2004

Le Marchand L, Wang H, Rinaldi S, Kaaks R, Vogt TM, Yokochi L, Decker R., Associations of plasma C-peptide and IGFBP-1 levels with risk of colorectal adenoma in a multiethnic population., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.Jun;19(6):1471-7.Epub, 2010

Lewis DA, Travers JB, Somani AK, Spandau DF., The IGF-1/IGF-1R signaling axis in the skin: a new role for the dermis in aging-associated skin cancer, *Oncogene.*;29(10):1475-85., 2010

Linnerth NM, Siwicky MD, Campbell CI, Watson KL, Petrik JJ, Whitsett JA, Moorehead RA., Type I insulin-like growth factor receptor induces pulmonary tumorigenesis., *Neoplasia.*;11(7):672-82., 2009

Liu X, Jiang W, Aucejo F, Kim R, Miller C, Byrne M, Lopez R, Yerian L., Insulin-like growth factor I receptor β expression in hepatocellular carcinoma., *Hum Pathol*. Jun;42(6):882-91. Epub 2011 Feb 2., 2011

Lukanova A, Lundin E, Toniolo P, Micheli A, Akhmedkhanov A, Rinaldi S, Muti P, Lenner P, Biessy C, Krogh V, Zeleniuch-Jacquotte A, Berrino F, Hallmans G, Riboli E, Kaaks R., Circulating levels of insulin-like growth factor-I and risk of ovarian cancer., *Int J Cancer.*, 20;101(6):549-54., 2002

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

Mathur SP, Mathur RS, Gray EA, Lane D, Underwood PG, Kohler M, Creasman WT., Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: Relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-A [corrected]., *Gynecol Oncol.*;98(3):467-83. Erratum in: *Gynecol Oncol.*;101(1):186. 2005

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- β in Marfan syndrome., *GenTAC Consortium. Circulation.*;120(6):526-32., 2009

Matsubara J, Yamada Y, Nakajima TE, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Shimoda T., Clinical significance of insulin-like growth factor type 1 receptor and epidermal growth factor receptor in patients with advanced gastric cancer, *Oncology.*;74(1-2):76-83, 2008

McC Campbell AS, Broaddus RR, Loose DS, Davies PJ. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor and activation of the AKT pathway in hyperplastic endometrium. *Clin Cancer Res*, Nov 1;12(21):6373-8, 2006

Monti S., Proietti-Pannunzi L., Sciarra A., Lolli F., Falasca P., Poggi M., Celi FS., Toscano V., The IGF axis in prostate cancer., *Curr Pharm Des* 13:719-27, 2007

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

Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, Green A, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D., Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia, *Haematologica*.;95(5):819-28. Review, 2010

Peeters PH, Lukanova A, Allen N, Berrino F, Key T, and. all., Serum IGF-I, its major binding protein (IGFBP-3) and epithelial ovarian cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), *Endocr Relat Cancer*.;14(1):81-90., 2007

Peterson JE, Kulik G, Jelinek T, Reuter CW, Shannon JA, Weber MJ. Src phosphorylates the insulin-like growth factor type I receptor on the autophosphorylation sites. Requirement for transformation by src. *J Biol Chem*. Dec 6;271(49):31562–31571, 1996

Petridou E, Koukoulomatis P, Alexe DM, Voulgaris Z, Spanos E, Trichopoulos D.,
Endometrial cancer and the IGF system: a case-control study in Greece.,
Oncology.;64(4):341-5., 2003

Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett
N, Stewart TA., IGF-I is required for normal embryonic growth in mice, Genes Dev.
Dec;7(12B):2609-17, 1993

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

Rajski M, Zanetti-Dällenbach R, Vogel B, Herrmann R, Rochlitz C, Buess M., IGF-I induced
genes in stromal fibroblasts predict the clinical outcome of breast and lung cancer patients,
BMC Med., Jan 5;8:1, 2010

Renehan AG., Zwahlen M., and all., Insulin-like growth factor-I, IGF binding protein-3, and
cancer risk: systematic review and meta-regression analysis, Lancet 363:1346-53, 2004

Renehan AG, Brennan BM., Acromegaly, growth hormone and cancer risk., Best Pract Res
Clin Endocrinol Metab.:22(4):639-57. Review., 2008

Riedemann J., Macaulay VM., IGFIR signaling and its inhibition, Endocrine Related Cancer
13 Suppl. 1:S33-43, 2006

Rinaldi S, and all., IGF-I, IGFBP-3 and breast cancer risk in women: The European
Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)., Endocr Relat Cancer.;13(2):593-
605., 2006

Rowlands MA, Gunnell D, Harris R, Vatten LJ, Holly JM, Martin RM., Circulating insulin-
like growth factor peptides and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis,
Int J Cancer.;124(10):2416-29. Review, 2009

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

Sakauchi F, Nojima M, Mori M, Wakai K, Suzuki S, Tamakoshi A, Ito Y, Watanabe Y, Inaba Y, Tajima K, Nakachi K., Serum insulin-like growth factors I and II, insulin-like growth factor binding protein-3 and risk of breast cancer in the Japan Collaborative Cohort study., *Asian Pac J Cancer Prev.*;10 Suppl:51-5, 2009

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev.*;28:20–47, 2007

Sato R, Tsujino M, Nishida K, Otani Y, Minami T, Shichiri M, Hizuka N, Aiba M, Hitara Y., High molecular weight form insulin-like growth factor II-producing mesenteric sarcoma causing hypoglycemia, *Intern Med.*;43(10):967-71., 2004

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

Shi R, Berkel HJ, Yu H., Insulin-like growth factor-I and prostate cancer: a meta-analysis., *Br J Cancer.*;85(7):991-6., 2001

Shiono S., Ishii G, Nagai K, Murata Y, Tsuta K, Nitadori J, Kodama T, Ochiai A., Immunohistochemical prognostic factors in resected colorectal lung metastases using tissue microarray analysis., *Eur J Surg Oncol.*, Apr;32(3):308-9. Epub 2006

Schernhammer ES, Holly JM, Hunter DJ, Pollak MN, Hankinson SE. Insulin-like growth factor-I, its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), and growth hormone and breast cancer risk in The Nurses Health Study II. *Endocr Relat Cancer.*;13(2):583-92. 2006

Schnarr B, Strunz K, Ohsam J, Benner A, Wacker J, Mayer D. Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer. *Int J Cancer.*;89:506–513., 2000

Steller MA, Delgado CH, Bartels CJ, Woodworth CD, Zou Z., Overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor and autocrine stimulation in human cervical cancer cells., *Cancer Res.*;56(8):1761-5., 1996

Sugumar A, Liu YC, Xia Q, Koh YS, Matsuo K., Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein 3 and the risk of premenopausal breast cancer: a meta-analysis of literature., *Int J Cancer.*;111(2):293-7. Erratum in: *Int J Cancer.*, 2004

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

Vesely D, Astl J, Lastuvka P, Matucha P, Sterzl I, Betka J., Serum levels of IGF-I, HGF, TGFbeta1, bFGF and VEGF in thyroid gland tumors, *Physiol Res.*;53(1):83-9., 2004

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

Wolpin BM, Meyerhardt JA, Chan AT, Ng K, Chan JA, Wu K, Pollak MN, Giovannucci EL, Fuchs CS., Insulin, the insulin-like growth factor axis, and mortality in patients with nonmetastatic colorectal cancer., *J Clin Oncol.*;27(2):176-85., 2009

Weiderpass E, Brismar K, Bellocco R, Vainio H, Kaaks R., Serum levels of insulin-like growth factor-I, IGF-binding protein 1 and 3, and insulin and endometrial cancer risk., *Br J Cancer.*;89(9):1697-704., 2003

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

Werner H, Bruchim I., Basic and clinical significance of IGF-I-induced signatures in cancer., *BMC Med.*, Jan 5;8:2. 2010

Yatsuya H, Toyoshima H, Tamakoshi K, Tamakoshi A, Kondo T, Hayakawa N, Sakata K, Kikuchi S, Hoshiyama Y, Fujino Y, Mizoue T, Tokui N, Yoshimura T., Serum levels of insulin-like growth factor I, II, and binding protein 3, transforming growth factor beta-1, soluble fas ligand and superoxide dismutase activity in stomach cancer cases and their controls in the JACC Study. *J Epidemiol*;15 Suppl 2:S120-5., 2005

Yi HK, Hwang PH, Yang DH, Kang CW, Lee DY. Expression of the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells. *Eur J Cancer.*;37:2257–2263., 2001

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