Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Autoreferát disertační práce

Využití nových biomarkerů pro zefektivnění diagnostiky a optimalizaci léčby nádorů trávicího traktu

Utilisation of New Biomarkers for the Optimalization of Diagnostics and Therapy of Tumors of the Gastrointestinal Tract

MUDr.Martin Šafanda

Plzeň 2017

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu vnitřní nemoci na oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň a LF UK v Plzni.

Uchazeč: MUDr. Martin Šafanda

Školitel: doc. PharmDr. Radek Kučera , Ph.D.

Oponenti: prof. MUDr. Jindřich Fínek , Ph.D.
Onkologická a radioterapeutická klinika FN Plzeň

MUDr. Šárka Svobodová , Ph.D.
3. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Autoreferát byl rozeslán dne: 20.7.2017

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu vnitřní nemoci

se koná dne:

Místo obhajoby: Šafránkův pavilon, LF UK Plzeň, Alej Svobody 31, Plzeň

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

prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.
předseda komise pro obhajobu disertačních prací studijního programu vnitřní nemoci
Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň

Abstrakt

Využití nových biomarkerů pro zefektivnění diagnostiky a optimalizaci léčby nádorů trávicího traktu

Úvod:

Nádorové markery patří ke standardním diagnostickým prostředkům. Uplatňují se především v monitorování průběhu onemocnění a ke kontrole úspěšnosti léčby. Důležité je sledování dynamiky změn. Změna hladiny biomarkeru může předcházet klinické manifestaci a tím vést k časné diagnostice relapsu, a to ve svém důsledku znamená zlepšení kvality života včetně prodloužení přežití. Poslední dobou se setkáváme s řadou diagnostických algoritmů, kdy se za pomoci statistických metod navrhují algoritmy výpočtů odhadu rizika přítomnosti nádoru, či rizika progrese nádorového onemocnění.

Cíle práce:

Cílem práce je ověřit nové biomarkery pro diagnostiku rakoviny žaludku a vypracovat optimální algoritmus jejich použití. Dále posoudit význam stanovení cytokeratinových markerů - Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS) pro diagnostiku metastatického kolorektálního karcinomu v játrech a provedení pilotní studie hladin FGF23 u osob s kolorektálním karcinomem a dalšími nádory trávicího ústrojí.

Metody a soubory nemocných:

Pro analýzu pacientských vzorků byly použity metody na principu imunoradiometrického, chemiluminiscenčního, enzymoimunoanalytického a fluorescenčního stanovení. Pro každý řešený problém byl vybrán specifický soubor pacientů. Byly hodnoceny skupiny pacientů se zhoubnými nádory žaludku (105 osob), kolorektálním karcinomem v různých stádiích (60 osob) a skupina pacientů s nádory kolorekta s metastatickým postižením jater (111 osob). Jako kontrolní byly hodnoceny skupiny zdravých osob.

Výsledky a diskuze:

Tato kapitola je členěna podle řešených problematik.

Karcinom žaludku.

Výsledkem našeho výzkumu je matematický model pro výpočet rizika karcinomu žaludku, který jsme nazvali Gastric Cancer Index – GCI. Při použití GCI jsme dosáhli nejlepší ROC křivky a nejvyšší AUC. V následné studii se zaměříme na ověření přínosu jednotlivých parametrů našeho matematického modelu a celkové vylepšení algoritmu pro výpočet indexu GCI. Z výsledků můžeme konstatovat, že nádorové markery CEA a CA 72-4 zůstávají nejlepšími jednotlivými markery pro diagnostiku karcinomu žaludku. Ujistili jsme se, že MMP-1, MMP-7, OPN a PIVKA II jsou slibnými kandidáty na nové biomarkery pro detekci karcinomu žaludku. Potvrdili jsme nižší hladiny pepsinogenu-I, vyšší hladiny gastrinu a přítomnost Helicobacter pylori jako rizikové faktory vzniku karcinomu žaludku. Vytvořili jsme matematický algoritmus pro posouzení rizika karcinomu žaludku v lidské populaci. Je nutné provést další studie a ověřit naše zjištění na větším souboru pacientů.

Metastázy kolorektálního karcinomu do jater.

Při vyhodnocení druhého souboru pacientů jsme se zaměřili na změny v hladinách nádorových markerů v jednotlivých stadiích a na interpretaci výsledků pacientů bez metastáz a s metastázami. Z uvedených dat vyplynulo, že každý z použitých markerů byl statisticky významně vyšší u stadia IV v porovnání se stadii I + II + III. CEA je nejběžněji používaným nádorového markerem v séru a řada studií uvádí jeho významné zvýšení u pacientů s jaterními metastázami. Pokud vycházíme z ROC křivek a z AUC, které jsou výsledkem naší studie, je zřejmé, že CEA (AUC=0.6903) nedosahuje takové úspěšnosti při detekci metastáz jako oba cytokeratiny – TPS (AUC=0.9912) a TPA (AUC=0.9116). Naše zjištění jsou v souladu se zjištěními dalších autorů, kteří se zabývali stejnou tématikou.

Využití fibroblastického růstového faktoru (FGF23) v diagnostice kolorektálního karcinomu.

Hodnoty FGF23 u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou statisticky významně vyšší, než hodnoty naměřené u zdravé populace. Podle minimo-maximálních hodnot je však patrné, že FGF23 nebude použitelné jako biomarker záchytu v časných stadiích. Naopak, pokud jsme hodnotili pouze nemocné ve stádiu IV, kde byly naměřené hodnoty nejvyšší, bylo srovnání se stádii I, II a III velmi optimistické. Hodnoty FGF23 těchto skupin se vůbec nepřekrývaly. Je však nutné poznamenat, že se jednalo o velmi malý soubor. Klinickou využitelnost této informace je nutné ověřit na větším souboru pacientů.

Závěry:

Skupina pacientů s karcinomem žaludku:

- Multivariační regresní analýzou byl navržen algoritmus pro výpočet rizika karcinomu žaludku ve tvaru: **GCI = CEA * 0,6315 + 0,9344 * CA72-4 – Pepsinogen-I * 0.00217 + Helicobacter pylori * 0,0362 + MMP-7 * 0.00180.**
- CA 72-4 stále zůstává nejlepším jednotlivým nádorovým markerem pro diagnostiku karcinomu žaludku.
- Snížená hladina pepsinogenu-I, vyšší hladina gastrinu a přítomnost Helicobacteru pylori jsou rizikové faktory vzniku karcinomu žaludku.

Skupina pacientů s metastázami kolorektálního karcinomu:

- Cytokeratinové nádorové markery TPA a TPS je možné doporučit pro použití v diagnostice jaterních metastáz kolorektálního karcinomu.
- Kombinovaný test CEA + cytokeratin má lepší senzitivitu než použití samotného CEA.
- Nejvyšší senzitivity při detekci jaterních metastáz, téměř 100%, je dosaženo při použití kombinace CEA a TPS. Pokud zvolíme cut-off, který byl vypočten pro jednotlivé testy samostatně, je nutné počítat se specificitou na úrovni 80%.
- Cytokeratinové markery, stejně jako CEA, nedokáží odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

Skupina pacientů s využitím FGF23 v diagnostice kolorektálního karcinomu:

- Hodnoty FGF23 u kolorektálního karcinomu se statisticky významně liší od zdravé populace.
- Výrazně zvýšené hodnoty je možné nalézt u metastatických forem onemocnění.
- Využitelnost FGF23 k časnému záchytu metastáz bude nutné ověřit na větší skupině pacientů.

Klíčová slova:

Nádorové markery, solubilní cytokeratinové fragmenty, FGF23, imunoradiometrické stanovení, chemiluminiscenční stanovení, kolorektální karcinom, karcinom žaludku, metastatické jaterní postižení, CGI.

Abstract

Utilisation of New Biomarkers for the Optimalization of Diagnostics and Therapy of Tumors of the Gastrointestinal Tract

Introduction:

Tumor markers are standard diagnostic tools. They are mainly used to monitor the course of the disease and to check the efficacy of the treatment. It is important to observe dynamics. Changing the level of the biomarker can prevent clinical manifestation and lead to early diagnosis of relapse, which in turn means improving the quality of life, including prolonging survival. Recently, we have encountered a number of diagnostic algorithms that suggest algorithms for estimating the risk of tumor presence or the risk of progression of cancer, using statistical methods.

Objectives:

The aim of this work is to verify new biomarkers for the diagnosis of gastric cancer and to develop an optimal algorithm for their use. Further, to evaluate the importance of cytokeratin markers - Tissue Polypeptide Antigen (TPA) and Tissue Polypeptide Specific Antigen (TPS) for the diagnosis of metastatic colorectal carcinoma in the liver. To carry out a pilot study of FGF23 levels in people with colorectal carcinoma and other gastrointestinal tumors.

Methods and patients:

Patient samples were analyzed using immunoradiometric, chemiluminescence and fluorescence assays. For each solved problem, a specific patient set was selected. Groups of patients with malignant tumors of the stomach (105 persons), colorectal carcinoma at various stages (60 persons) and a group of patients with colorectal cancer with metastatic liver disease (111 persons) were evaluated. Control groups of healthy individuals were evaluated.

Results and Discussion:

This chapter of the thesis is structured according to the solved problems.

Stomach cancer.

The result of our research is a mathematical model for calculating the risk of stomach cancer, which we called the Gastric Cancer Index - GCI. When using GCI, we achieved the best ROC curve and the highest AUC. In the follow-up study, we will focus on verifying the benefits of the individual parameters of our mathematical model and the overall improvement of the algorithm for calculating the GCI index. From the results, we can state that tumor markers CEA and CA 72-4 remain the best individual markers for the diagnosis of gastric cancer. We have assured that MMP-1, MMP-7, OPN and PIVKA II are promising candidates for new biomarkers for the detection of gastric cancer. We have confirmed lower levels of pepsinogen-I, higher levels of gastrin and the presence of Helicobacter pylori as risk factors for gastric cancer. We have created a mathematical algorithm for assessing the risk of gastric cancer in the human population. Further studies need to be carried out to verify our findings in a larger patient population.

Metastases of colorectal carcinoma to the liver.

In evaluating the second set of patients, we focused on changes in tumor marker levels at individual stages and on interpretation of patient results without metastasis and with metastasis. From the above data, each of the markers used was statistically significantly higher in Stage IV compared to Stage I + II + III. CEA is the most commonly used tumor marker in serum and a number of studies show its significant increase in patients with hepatic metastases. Based on the ROC curves and the AUC resulting from our study, it is clear that CEA (AUC = 0.6903) does not achieve such metastatic detection success rates as both cytokeratin - TPS (AUC = 0.9912) and TPA (AUC = 0.9116). Our findings are in line with the findings of other authors who have dealt with the same topic.

Use of fibroblast growth factor (FGF23) in the diagnosis of colorectal carcinoma.

FGF23 values in patients with colorectal cancer are statistically significantly higher than those measured in the healthy population. However, according to the minimal-maximal values, it is evident that FGF23 will not be useful as a marker of capture at early stages. Conversely, when we evaluated only the patients in stage IV, where the measured values were the highest, the comparison with stages I, II and III was very optimistic. The FGF23 values of these groups did not overlap at all. However, it should be noted that this was a very small set. The clinical relevance of this information should be verified in a larger patient population.

Conclusions:

Group of patients with gastric cancer:

- A multivariate regression analysis was designed to calculate the risk of stomach cancer risk in the following form: GCI = CEA * 0.6315 + 0.9344 * CA72-4 - Pepsinogen-I * 0.00217 + Helicobacter pylori * 0.0362 + MMP-7 * 0.00180.
- The CA 72-4 remains the best single tumor marker for the diagnosis of gastric cancer.
- Reduced levels of pepsinogen-I, higher levels of gastrin and the presence of Helicobacter pylori are risk factors for gastric cancer.

A group of patients with colorectal carcinoma metastases:

- Cytokeratin tumor markers TPA and TPS can be recommended for use in the diagnosis of colorectal carcinoma liver metastases
- The combined CEA + cytokeratin test has better sensitivity than CEA alone.
- The highest sensitivity to nearly 100% liver metastasis is achieved with the combination of CEA and TPS. If we choose a cut-off that has been calculated for each test individually, it is necessary to calculate the specificity at 80%.
- Cytokeratin markers, like CEA, cannot distinguish pure liver metastases from multiple metastases at different locations.

A group of patients using FGF23 in the diagnosis of colorectal cancer:

- FGF23 values in colorectal cancer are statistically significantly different from the healthy population.
- Significantly elevated values can be found in metastatic forms of the disease.
- The usefulness of FGF23 to early diagnosis of the metastasis will need to be verified in a larger group of patients.

Keywords:
Tumor markers, soluble cytokeratin fragments, FGF23, immunoradiometric assay, chemiluminescence assay, colorectal carcinoma, gastric cancer, metastatic liver disease, CGI.

Obsah

1. Úvod…...……11

2. Přehled současných znalostí o dané problematice…….……11

2.1 Epidemiologie nádorů žaludku a kolorekta…….....11

2.2 Histologická charakteristika karcinomu žaludku……...…15

2.3 Histologická charakteristika kolorektálního karcinomu……15

2.3.1 Imunohistochemická fenotypizace……..16
2.3.2 Patogenetická a molekulární charakteristika……...16

2.4 Diagnostika nádorů žaludku a kolorektálního karcinomu……17

2.4.1 Endoskopické a zobrazovací metody…….17
2.4.2 Laboratorní diagnostika…….17

2.5 Léčba nádorů žaludku a kolorekta……...…18

2.5.1 Léčba operabilních stádií……..18
2.5.2 Léčba pokročilých a metastatických stádií……...……18
2.5.3 Resekabilní a potenciálně resekabilní jaterní postižení……18

3. Cíle práce…..……20

4 Metodika……..…….20

4.1 Odběry vzorků……20

4.2. Přehled použitých imunoanalytických metod……...20

4.3 Sledované biomarkery a jejich charakteristika……..20

4.4 Statistické hodnocení vyýsledků……21

4.5 Soubory nemocných a použité analytické metody…….22

4.5.1 Karcinom žaludku……...22
4.5.2 Metastázy kolorektálního karcinomu do jater…….23
4.5.3 Různá stádia kolorektálního karcinomu jako pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu……24

5 Výsledky a diskuze……25

5.1 Výsledky a hodnocení souboru karcinomu žaludku……..25

5.2 Výsledky a hodnocení metastáz kolorektálního karcinomu do jater…….30

5.3 Výsledky a hodnocení pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu…….41

6 Závěry pro klinickou praxi……45

7 Perspektivy……....46

8 Literatura……...46

1 Úvod

Během posledních 10 let došlo k výraznému pokroku v diagnostice a zejména léčebných možnostech nádorových onemocnění. Přestože incidence nádorových onemocnění stoupá meziročně v průměrů o 4%, u některých lokalizací se úspěšnost léčby promítá do setrvalého poklesu úmrtnosti.

Nádorové markery dnes patří ke standardním diagnostickým prostředkům. Uplatňují se především v monitorování průběhu onemocnění a ke kontrole úspěšnosti léčby. Poslední dobou se za pomoci statistických metod navrhují algoritmy odhadu přítomnosti nádoru v organismu, či rizika progrese nádorového onemocnění. Práce je členěna na následující části:

Přehled současných znalostí o dané problematice

Cíle práce

Metodická část

Výsledky a diskuze

Závěry pro praxi

Perspektivy

2 Přehled současných znalostí o dané problematice

Incidence nádorových onemocnění celosvětově vzrůstá, a to zvláště ve vyspělých zemích. V České republice je situace podobná, u některých typů nádorových onemocnění jsou statistická čísla alarmující. Nádorová onemocnění zažívacího traktu (GIT) tvoří celou čtvrtinu všech nádorů v České republice.

2.1 Epidemiologie nádorů žaludku a kolorekta

Karcinom žaludku je celosvětově onemocněním s mírně klesající incidencí, je však pátým nejčastějším nádorovým onemocněním. Jsou rozlišovány dvě lokalizace; kardiální a nekardiální, které se od sebe liší nejen lokalizací, ale především epidemiologicky, rizikovými faktory a klinickým obrazem. U evropské populace se vyskytuje nejčastěji forma kardiální [Ferlay, 2015] s převahou výskytu u mužů. V centrální Asii rovněž převažuje nádor kardie [Kamangar, 2006], ale v jihovýchodní Asii dominuje nekardiální lokalizace karcinomu žaludku [Ang, 2014]. V některých zemích, například v Austrálii, USA a Velké Británii, nacházíme srovnatelnou incidenci obou typů nádorů [Colquhoun, 2012]. V České republice se nejčastěji, obdobně jako ve většině Evropy, vyskytuje karcinom žaludku v kardiální lokali-

zaci. Incidence karcinomu žaludku byla v roce 2014 16,27 mužů/11,45 žen na 100 000 obyvatel. To je v absolutních číslech 1454 nově diagnostikovaných nádorů [ÚZIS ČR, 2016]. Přehled nejdůležitějších rizikových faktorů pro kardiální i nekardiální lokalizaci je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled rizikových faktorů pro karcinom žaludku [Kamiri, 2014]

Kardiální lokalizace	Nekardiální lokalizace
Věk	Věk
Mužské pohlaví	Mužské pohlaví
Kouření	Kouření
Rasa	Rasa
Rodinná zátěž	Rodinná zátěž
Nedostatek fyzické aktivity	Nedostatek fyzické aktivity
Malé množství vlákniny ve stravě	Malé množství vlákniny ve stravě
Ozařování v anamnéze	Ozařování v anamnéze
	Alkohol
Obezita	H.Pylori
Gastroesofageální reflux	Nízký socioekonomický status
	Vysoký příjem slaného a uzeného jídla
	Nízký příjem ovoce a zeleniny

Zatímco většina nádorů žaludku vzniká sporadicky, odhaduje se, že 5 až 10% může mít familiární komponentu a 3 až 5% nádorů vzniká na základě vrozených predispozičních syndromů [Lindor, 2008].

Kolorektální karcinom (KRK) je třetí nejčastější nádor mezi muži a druhý mezi ženami, což přestavuje 10% všech nádorů po celém světě [Siegel, 2011]. KRK je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz a ve všech vyspělých státech jeho incidence setrvale narůstá. Česká republika navíc obsazuje přední místa v mezinárodním srovnání. Podle nejnovějších dat GLOBOCAN z roku 2012 [Ferlay, 2013] stojí česká populace mužů v evropském přehledu na 3. místě za Slovenskem a Maďarskem, u žen potom obsazujeme 10. nejvyšší pozici v Evropě. Incidence je vyšší 1,4x u mužů než u žen. V roce 2014 byla incidence KRK v ČR 79,09/100 000 obyvatel a mortalita 38,15/ 100 000 obyvatel. V absolutních číslech bylo v roce 2014 diagnostikováno 8160 nových nemocných. Ačkoliv

incidence mírně stoupá, mortalita pozvolna klesá [ÚZIS ČR, 2016]. Riziko vzniku rakoviny tlustého střeva závisí na různých faktorech, které lze rozdělit na vlivy životního stylu (ovlivnitelné) a faktory genetické (neovlivnitelné). Relativní riziko nejdůležitějších rizikových faktorů je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2. Relativní riziko nejběžnějších rizikových faktorů [Johnson, 2013]

Rizikové faktory	**Hodnocené parametry**	**RR (95% CI)**
BMI	30 vs 22 kg/m2	1.10 (1.08-1.12)
Fyzická aktivita (FA)	Zvýšení FA o 2 stupně dle stupnice	0.88 (0.86-0.91)
Kouření	5 vs. 0 krabiček/rok 30 vs. 0 krabiček/rok	1.06 (1.03-1.08) 1.26 (1.17-1.36)
Alkohol	5 vs. 0 nápojů týdně 20 vs. 0 nápojů týdně	1.06 (0.91-1.23) 1.26 (0.68-2.32)
KRK v rodinné anamnéze	Ano vs. Ne	1.80 (1.61-2.02)
Zánětlivé střevní nemoci	Ano vs. Ne	2.93 (1.79-4.81)
HRT současná	5 vs. 0 let 10 vs. 0 let	0.65 (0.26-1.68) 0.61 (0.10-3.96)
HRT v minulosti	5 vs. 0 let 10 vs.0 let	0.96 (0.91-1.02) 0.84 (0.70-1.02)
Aspirin/NSAR	5 vs. 0 let	0.76 (0.50-1.15)
Uzené/zpracované maso	5 vs. 0 porcí týdně	1.09 (0.93-1.25)
Červené maso	5 vs. 0 porcí týdně	1.13 (1.09-1.16)
Ovoce	3 vs. 0 porcí týdně	0.84 (0.75-0.96)
Zelenina	5 vs.0 porcí týdně	0.86 (0.78-0.94)

Na základě mezinárodních doporučení byla (podle přítomnosti zmíněných rizikových faktorů) definována skupina osob se zvýšeným rizikem vzniku KRK a tyto osoby byli pak zařazeny do pravidelného skríninkového programu. Patří sem skupiny nemocných, u kterých jsou popsány: adenomové polypy v osobní anamnéze, kolorektální karcinom v osobní anamnéze, zánětlivé onemocnění střev, rodinná anamnéza KRK nebo polypů a dědičné

syndromy [Balmaña, 2013]. Asi 10% případů KRK jsou hereditárně podmíněné. Přehled je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3. Souhrn familiárních typů nádorů zažívacího traktu

Název	Genetická mutace	Nádorová manifestace v GIT	Nádorová manifestace mino GIT
Hereditární difúzní karcinom žaludku	CDH1	Žaludek	Prs
Lynchův syndrom	MLH1,MLH2,MSH6,PMS2	Tlusté střevo, žaludek, tenké střevo, játra	Děloha, vaječníky, močový trakt, mozek
Juvenilní polypóza	Smad4, BMPR1A	Žaludek, tenké střevo, rektum	-
Familiární adenomová polypóza (FAP)	APC	Tlusté střevo, žaludek, tenké střevo, játra, pankreas	Papilární nádor štítné žlázy, adrenální nádory, meduloblastom
Gardnerův syndrom	APC	Tlusté střevo, játra	Osteomy, štítná žláza, ledvina
Turcotův syndrom	MLH1,PMS2,APC	Tlusté střevo	Glioblastom, meduloblastom
Peutz-Jeghersův syndrom	STK11/LKB1	Žaludek, jícen, tlusté i tenké střevo, pankreas	Prs, vaječníky, děloha, varlata, štítná žláza, plíce
Li-Fraumeni	TP53	Žaludek, tlusté střevo, jícen, pankreas	Sarkomy měkkých tkání, adrenální nádory, prs, leukémie, plíce

Hereditární nádory prsu a vaječníků	BRCA1/2	Žaludek, pankreas	Prs, vaječníky, prostata

2.2 Histologická charakteristika karcinomu žaludku

Histologicky vykazuje karcinom žaludku výraznou heterogenitu jak v architektonické úrovni, tak i cytologické úrovni, často s koexistencí několika histologických prvků. V průběhu uplynulého půlstoletí byla histologická klasifikace karcinomu žaludku založena na **Laurenových kritériích**, ve kterých byly střevní (intestinální) typ a difúzní typ adenokarcinomu považovány za dva hlavní histologické podtypy, plus neobvyklé varianty (neurčitý typ) [Hwang, 2010]. Relativní frekvence jsou přibližně 54% pro střevní typ, 32% v případě difuzního typu a 15% pro neurčitý typ [Polkowski, 1999]. Existují náznaky, že karcinom žaludku difúzního typu je častěji vidět u žen a mladých jedinců [Lauren, 1965; Caldas, 1999], zatímco střevní typ adenokarcinomu je více spojován se střevní metaplazií a infekcí Helicobacter pylori [Kaneko, 2001; Parsonnet, 1991]. V roce 2010 WHO klasifikace stanovila čtyři hlavní histologické typy karcinomů žaludku: tubulární, papilární, mucinózní a difuzní karcinom (včetně karcinomu buněk pečetního prstenu), plus neobvyklé histologické varianty [Lauwers, 2010]. Tato klasifikace je založena na převládajícím histologickém typu karcinomu, který často koexistuje s méně dominantními rysy jiných histologických typů.

2.3 Histologická charakteristika kolorektálního karcinomu

Základní morfologickou změnou při vzniku karcinomu je dysplastická léze epitelu tlustého střeva (aberantní kryptový fokus, plochý, polypózní adenom, neadenomové polypy jakékoli etiologie). Histologicky více než 90% kolorektálních karcinomů jsou adenokarcinomy pocházející z epitelových buněk sliznice tlustého střeva [Hamilton, 2010]. Jiné vzácné druhy kolorektálních karcinomů zahrnují neuroendokrinní, z dlaždicových buněk, adenoskvamózní, vřetenobuněčný a nediferencovaný. Konvenční adenokarcinom se vyznačuje přítomností žlázových struktur, které jsou základem pro stanovení nádorového gradingu [Fleming, 2012]. U dobře diferencovaného adenokarcinomu má více než 95% nádoru přítomnou žlázovou strukturu. Středně diferencovaný adenokarcinom vykazuje 50-95% žlázové struktury. Špatně diferencovaný adenokarcinom obsahuje většinou méně než

50% žlázové struktury. V praxi je přibližně 70% kolorektálních adenokarcinomů diagnostikováno jako středně diferencovaných. Dobře a špatně diferencované karcinomy tvoří 10% a 20%, respektive. Je zřejmé, že stanovení gradingu nádoru je subjektivní záležitostí. Mnohé studie prokázaly, že 2-stupňový třídící systém, který v sobě spojuje dobře a středně diferencovaný adenokarcinom do nízkého stupně (50% žlázy) a definuje špatně diferencovaný adenokarcinom jako vysokého stupně (méně než 50% žlázy), snižuje observační variaci a zlepšuje prognostický význam [Compton, 2000]. Ačkoliv je grading nádoru obecně považován za stádium nezávislou prognostickou proměnnou, nádory s vysokým gradingem a špatně diferencované histologie jsou spojeny se špatným přežitím pacientů [Blenkinsopp, 1981; Jass, 1986; Comptom, 1999].

2.3.1 Imunohistochemická fenotypizace

Nejrozšířenější imunohistochemické markery pro kolorektální adenokarcinom jsou cytokeratiny (CK) 20, CK7 a CDX2. Nejběžnější imunofenotyp kolorektálního adenokarcinomu je pozitivita CK20 a negativita CK7, což je relativně specifický výsledek barvení kolorektálního původu [Chu, 2002]. Avšak až 20% nádorů může vykazovat CK7-pozitivní / negativní CK20 nebo CK7-negativní / CK20-negativní výsledek barvení.

2.3.2 Patogenetická a molekulární charakteristika

Kolorektální karcinom je heterogenní skupina onemocnění s výrazným genetickým a epigenetickým pozadím [Ogino, 2008]. Již v roce 1980 bylo zjištěno, že nádory vznikající v proximálním tračníku a distální části tlustého střeva mohou vznikat různými genetickými mechanismy [Bufill, 1990; Beart, 1983]. Díky rychlému pokroku v chápání vzniku kolorektálních nádorů a jejich farmakogenetiky, je vyžadováno stále více molekulárních a genetických testů sloužících k optimálnímu navrhnutí individuální terapie pro jednotlivé pacienty a tím i lépe předpovídat prognózu pacienta. Přehled je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4. Molekulární charakteristika KRK

Biomarker	Využití	Metoda stanovení	Výskyt v populaci
MSI (mikrosatelitní nestabilita)	prognostické prediktivní	IHC, PCR*	MSI-H < 10%

KRAS (Kirsten rat sarkom virového onkogenu	prediktivní prognostické	PCR	Mutace v 30-50%
NRAS (Neuroblastoma RAS viral)	prediktivní	PCR	Mutace v 3-5%
BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)	prediktivní prognostický	PCR	Mutace v 10%

* PCR- polymerázová řetězová reakce

2.4 Diagnostika nádorů žaludku a kolorektálního karcinomu

2.4.1 Endoskopické a zobrazovací metody

Endoskopie je základní diagnostickou metodou s nejvyšší mírou spolehlivosti. Umožňuje přímé zobrazení patologického nálezu, jeho lokalizaci, stanovení velikosti, ohraničení a další parametry (exulceraci, nekrotizaci nebo krvácení povrchu, obstrukci průsvitu). Poskytuje možnost biopsie tkáně k histologickému vyšetření. Patří sem esofagogastroduodenektomie pro vyšetření horní části traktu a kolonoskopie pro dolní části GIT. Ze zobrazovacích metod používáme jako základní stagingovou metodu počítačovou tomografii (CT). Další speciální metody jsou magnetická rezonance a pozitronová emisní tomografie.

2.4.2 Laboratorní diagnostika

Biomarkery

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

Stanovení nádorových markerů není metodou vedoucí k diagnóze ani skríninkovou metodou, protože není znám dostatečně specifický a senzitivní marker pro karcinom žaludku. Je však standardní součástí sledování průběhu onemocnění. U KRK je postavení markerů důležitější.

Zvýšené předoperační hladiny CEA jsou negativním prognostickým parametrem [Fong, 1997].

2.5 Léčba nádorů žaludku a kolorektálního karcinomu

2.5.1 Léčba operabilních stádií

Základem správného stanovení léčebného postupu je **multidisciplinární přístup**. U karcinomu žaludku stejně jako u KRK je radikální chirurgická léčba stále jediným kurativním řešením. Adjuvatní - pooperační léčba se podává s cílem snížit riziko relapsu a prodloužit přežití. U nádorů žaludku závisí volba na celkovém stavu pacienta. Za standard se považuje kombinace chemoterapie s radioterapií [Smalley, 2012]. Cílová skupina jsou nemocní s rizikovými faktory, kteří nebyli léčeni předoperačně. Mezi rizikové faktory patří: lymfovaskulární invaze, špatně diferencovaný typ nádoru (G3), postižení spádových uzlin, perineurální invaze, méně než D2 lymfadenektomie, věk pod 50 let [Haller, 2005]. U kolorektálního karcinomu jsou identicky indikováni vysoce rizikoví nemocní ve stadiu II a všichni nemocní s postiženými lymfatickými uzlinami ve stadiu III, opět v závislosti na celkovém stavu. Rizikovými faktory jsou: T4 nádor, špatně diferencovaný typ nádoru, lymfangioinvaze a/nebo perineurální invaze, ileózní stav a/nebo perforace jako průvodní jev nemoci, nejisté nebo pozitivní resekční okraje, vyšetření méně než 12 spádových lymfatických uzlin.

2.5.2 Léčba pokročilých a metastatických stádií

Léčba pokročilých a metastatických stádií nevede k vyléčení nemocných, může zpomalit průběh nemoci, prodloužit přežití a zlepšit kvalitu života. Mezi tyto paliativní přístupy patří: chemoterapie, radioterapie, chirurgická léčba a speciální metody jako radiofrekvenční ablace a chemoembolizace. Základem je paliativní chemoterapie samotná, nebo s biologickou léčbou.

2.5.3 Resekabilní a potenciálně resekabilní jaterní postižení

S rozvojem diagnostiky, onkologických postupů a jaterní chirurgie se vyhlídky nemocných výrazně zlepšily a někteří nemocní jsou dokonce trvale vyléčeni. Předpokladem

pro stanovení optimálního léčebného postupu je komplexní zhodnocení stavu pacienta, stanovení cíle léčby, zda je, či není kandidátem intenzivní léčby, a to včetně léčby chirurgické. Rozhodovací proces je často velmi složitý a musí zohlednit nejen primární nádorové onemocnění, ale i přidružené choroby a v neposlední řadě i rizika spojené s navrhovanou léčebnou modalitou. Je kladen důraz na komunikaci mezi zkušenými lékaři v dané problematice a na již zmíněnou úlohu multioborového týmu. Chirurgická léčba charakteru radikální resekce je jedinou kurativní léčebnou modalitou. Jaterní metastázy mohou být synchronní, nebo metachronní. Z hlediska operability jsou nemocní rozděleni na 2 skupiny.

Resekabilní onemocnění je primárně indikováno k chirurgickému výkonu. I zde je nutno zvažovat několik možností, především operabilitu primárního nádoru. Pokud jsou obě lokalizace operovatelné a nehrozí progrese jaterního postižení, pak nejčastěji volíme operaci primárního nádoru a v druhé době resekci jaterních metastáz. Je možno postupovat i inverzním přístupem tzv. liver first (pokud je primární nádor rektum, tak je nutno zvážit předchozí RT či RT/CHT na oblast pánve). Poslední možností je současná resekce primárního nádoru a metastáz. Pokud splňují technická kritéria pro resekci a nemají negativní prognostické znaky, pak není perioperační chemoterapie součástí léčebného protokolu.

Potenciálně resekabilní onemocnění. Někteří pacienti s onemocněním ve stádiu IV (zejména pacienti s jaterními metastázami) mohou být léčeni s výhledem k radikálnímu chirurgickému výkonu a tím vyléčitelní. Dokonce určitá skupina pacientů s původně neresekovatelnými jaterními metastázami může dojít k resekci, pokud dojde k dostatečné reakci na chemoterapii. Tento přístup byl nazván „konverzní terapií" [Petrelli, 2007], aby se odlišil od "neoadjuvantní terapie", která se používá jako termín pro předoperační terapii podávanou pacientům, kteří jsou primárně resekabilní. Klíčovým parametrem pro výběr konkrétního režimu v tomto scénáři není přežití, nebo zlepšení kvality života (QoL), ale míra odpovědi (RR) (tj. schopnost daného režimu zmenšit metastázy) [Folprecht, 2005]. U pacientů s nemutovaným KRAS onemocněním se zdá, že chemoterapie spolu s protilátkou proti epidermálnímu růstovému faktoru (EGFR) dosahuje nejlepších výsledků právě u metastatické jaterní nemoci. Analogicky může být zvažována i kombinace chemoterapie a protilátky proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF), který vykazuje menší frekvenci nežádoucích účinků [Venook, 2014]. Některá pracoviště preferují trojkombinaci FOLFOXIRI s anti-VEGFR, který vykazuje vysoké procento RR, je však zatížen vyšším výskytem závažných nežádoucích účinků a často je primárně redukován [Cremolini, 2014]. Na poslední konferenci ASCO 2017 bylo konstatováno, že žádná s následujících studií s trojkombinací FOLFOXIRI

nedosáhla tak dobrých výsledků jako originální Falconeho studie. Evropské i americké doporučení považují za správné i použití chemoterapie bez cílené terapie.

3 Cíle práce

1) Ověřit nové biomarkery pro diagnostiku rakoviny žaludku a vypracovat optimální algoritmus jejich použití.
2) Posoudit význam stanovení cytokeratinových markerů - Tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS) pro diagnostiku metastatického procesu v játrech (primární nádor kolorektální) a porovnat s výsledky CEA, který dlouhodobě patří mezi základní a nejpoužívanější nádorového markery.
3) Provést pilotní studii hladin FGF23 u osob s kolorektálním karcinomem a event. dalšími nádory trávicího ústrojí a korelovat hladiny tohoto markeru s agresivitou onemocnění.

4 Metodika

4.1 Odběry vzorků

Vzorky žilní krve byly odebírány z kubitální žíly náběrovým systémem VACUETTE firmy Greiner Bio-one (Rakousko). Krev byla centrifugována při 1700 xg po dobu 10 min. Získané sérové nebo plazmové vzorky byly bez odkladu zamraženy a uchovávány při -80°C. Vzorky byly rozmraženy pouze jednou, a to před vlastní analýzou.

4.2. Přehled použitých imunoanalytických metod

Pro analýzu pacientských vzorků byly použity metody na principu imunoradiometrického, chemiluminiscenčního, enzymoimunoanalytického a fluorescenčního stanovení.

4.3 Sledované biomarkery a jejich charakteristika

Tabulka 5. Základní charakteristika

Skupina		Popsán	m.h.(kDA)		Charakteristika
Onkofetální	CEA	1965	150 -300		Glykoprotein

	CA 72-4	1986	200-400		Mucin sialo- glykolipid
	CA 19-9	1979	200-1000		Mucin – glykoprotein
Cytokeratiny	TPA	1957	22-45		Protein
	TPS	1958	12		Polypeptid
Růstové faktory	FGF 23	2000	25		Protein
Hormony	Gastrin	1905	2,05		Protein
Enzymy	Pepsinogen I	1969	42-44		Protein
Enzymy	Pepsinogen II	1969	39-42		Protein
Ostatní	PIVKA	1984	170		Protein
MMP	MMP 1	1962	54		Protein
	MMP 2	1970	72		Protein
	MMP 7	1988	29,6		Protein
	MMP 8	1990	53,4		Protein
	MMP 9	1992	78,5		Protein
	OPN	1986	44		Glykoprotein
	OPG	1997	55-60		Protein

4.4 Statistické hodnocení výsledků

Pro statistické výpočty byl použit software SAS 9.4 (Statistical Analysis Software release 9.4; SAS Institute Inc., Carry, NC, USA). Byly spočítány deskriptivní statistiky pro všechny hodnocené skupiny pacientů. Dále jsou ve výsledcích spočítány následující parametry: aritmetický průměr, medián, minimum a maximum, dále pak byly spočítány pro vyhodnocení užitečnosti jednotlivých markerů ROC křivky a plochy pod křivkou (AUC). Porovnání změn hladin nádorových markerů ve sledovaných skupinách osob bylo provedeno vzhledem k negaussovskému rozdělení hodnot neparametrickým Wilcoxonovým testem. Všechny provedené testy byly oboustranné a p-value menší než 0.05 indikovala statistickou významnost. K výpočtu gastric cancer indexu (GCI) byla použita mnohorozměrná postupná logistická regrese (stepwise regression). V této proceduře jsou do statistického modelu postupně přidávány prediktory, dokud jsou po přidání do modelu statisticky významné a vylučovány ty dříve přidané prediktory, které se přidáním dalších staly statisticky

nevýznamnými. Tímto způsobem je zaručeno, že všechny prediktory ponechané v logistické regresi jsou statisticky významné. Možné prediktory byly následující: CEA, CA19-9, CA72-4, pepsinogen-I, pepsinogen-II, gastrin, Helicobacter pylori IgG, MMP-1 MMP-2, MMP-7, MM-8, MMP-9, OPG, OPN, PIVKA-II, poměr pepsinogen I / pepsinogen II.

Procedura mnohorozměrné postupné logistické regrese pak vybrala tyto prediktory: CEA, CA72-4, pepsinogen-I, Helicobacter pylori IgG a MMP-7, a k nim určila optimální hodnoty násobících koeficientů.

4.5 Soubory nemocných a použité analytické metody

V disertační práci jsme řešili tři problematiky. Pro každé řešené téma byl vybrán specifický soubor pacientů. Byly hodnoceny následující skupiny pacientů:

1) karcinom žaludku
2) metastázy kolorektálního karcinomu do jater
3) různá stádia kolorektálního karcinomu jako pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu

4.5.1 Karcinom žaludku

Tabulka 6. Věková charakteristika hodnocených skupin – studie karcinom žaludku

Stav	**počet** (N)	**věk** (roky)				**p-Value Wilcoxon test**
		Mean	**Medián**	**Minimum**	**Maximum**	
Zdraví jedinci	**69**	**63.6**	**64.0**	**42.0**	**79.0**	0.5030
Ca žaludku	**36**	**65.2**	**65.0**	**49.0**	**84.0**	

Skupina pacientů s karcinomem se skládala z pacientů ve stadiu I (20%), stádiu II (10%), stádiu III (20%) a stadiu IV (50%). Kontrolní skupina zdravých osob se sestávala z lidí, kteří podstoupili pravidelné preventivní prohlídky ve FN Plzeň. Žádný ze zdravých jedinců neměl v anamnéze karcinom žaludku nebo jiné nádorové onemocnění, vředovou chorobu žaludku, nebo jiné žaludeční onemocnění. Všechny diagnózy karcinomu žaludku byly histologicky ověřené.

U každého pacienta byly stanoveny ve vzorcích séra a plazmy následující biomarkery: CEA, CA 19-9, CA 72-4, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MM-8, MMP-9, OPG, OPN, PIVKA II, pepsinogen I, pepsinogen II, gastrin a Helicobacter pylori IgG. Vypočítán byl dále poměr pepsinogen I / pepsinogen II pro každý vzorek.

4.5.2 Metastázy kolorektálního karcinomu do jater

Hodnocená skupina čítala v tomto případě 111 pacientů. Všichni pacienti měli histologicky potvrzenou diagnózu kolorektálního karcinomu. Hodnocená skupina byla rozdělena na čtyři podskupiny (1 - 4) podle stadia onemocnění (I - IV). U všech pacientů byly stanoveny nádorové markery TPS, TPA a CEA. Charakteristiku souborů pacientů uvádí Tabulka 7. Ani jeden ze sledovaných markerů není závislý na věku ani pohlaví. Pro úplnost však uvádím počty mužů a žen v jednotlivých stádiích včetně věkového rozložení.

Tabulka 7. Základní charakteristika skupin pro markery TPS, TPA a CEA

Rozdělení osob a skupin		**1**	**2**	**3**	**4**
Ženy	**N/%**	**78/74**	**7/70**	**4/57**	**14/29**
Muži	**N/%**	**28/26**	**3/30**	**3/43**	**26/71**
Celkem	**N**	**54**	**10**	**7**	**40**
Věk	**Medián (roky)** (min – max)	**58** (27 – 79)	**77.5** (58 – 88)	**68** (58 – 85)	**65** (37 – 78)

Skupina pacientů s jaterními metastázami (skupina 4) byla tvořena pacienty, kteří měli metastázy pouze v játrech (31) a pacienty, u kterých byla nalezena metastáza současně i v jiné lokaci, nežli pouze v játrech (9). Detailní přehled uvádí Tabulka 8.

Tabulka 8. Rozdělení pacientů ve stadiu IV

Lokalizace metastáz	**Počet pacientů (N)**	**Celkem**
Meta pouze játra	**31**	**31**
Meta játra + plíce	**5**	**9**
Meta játra + skelet	**3**	
Meta játra + ledviny	**1**	

CEA v séru bylo stanoveno za použití chemiluminiscenčního kitu ACCESS CEA a (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Hladiny TPS a TPA byly stanoveny soupravami radioimunometrickými. Sérové hladiny TPS byly stanoveny za použití kitu IRMA TPS (IDL Biotech, Bromma, Sweden). Sérové hladiny TPA byly stanoveny za použití kitu IRMA TPA-M (DiaSorin, Saluggia, Itálie).

4.5.3 Různá stádia kolorektálního karcinomu jako pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu

Tabulka 9. Věková charakteristika hodnocených skupin – studie FGF23

Stav	**počet** (N)	**věk** (roky)				**p-Value Wilcoxon test**
		Mean	**Medián**	**Minimum**	**Maximum**	
Zdraví jedinci	**30**	**62.2**	**60**	**39**	**87**	**0.3505**
Kolorektální karcinom	**30**	**65.6**	**64**	**41**	**90**	

U všech osob byl stanoven FGF23 pomocí chemiluminiscenčního kitu LIAISON FGF23 (DiaSorin, Saluggia, Itálie).

5 Výsledky a diskuze

5.1 Výsledky a hodnocení souboru karcinomu žaludku

Tabulka 10 ukazuje srovnání hladin CEA, CA 19-9, CA 72-4, MMP, OPG, OPN a PIVKA II mezi skupinami zdravých osob a pacientů s karcinomem žaludku.

Tabulka 10. Srovnání hladin CEA, CA 19-9, CA 72-4, MMP, OPG, OPN a PIVKA II mezi skupinami zdravých osob a pacientů s karcinomem žaludku

Analyt (jednotky)	**Stav**	**Průměr**	**Medián**	**Dolní kvartil**	**Horní kvartil**	**Minimum Maximum**	**p-Value Wilcoxon test**
CEA (µg/l)	zdraví	1.49	1.20	0.80	2.00	0.40 – 6.40	**0.0008**
	nemoc	5.96	2.50	1.50	4.80	0.20 – 78.0	
CA 19-9 (kIU/l)	zdraví	7.93	5.40	2.60	9.60	1.00 – 39.1	**0.0112**
	nemoc	26.49	10.40	4.60	25.10	1.10 – 228	
CA 72-4 (kIU/l)	zdraví	2.00	1.40	0.98	2.30	0.60 – 7.10	**<0.0001**
	nemoc	20.48	7.50	5.60	9.90	3.00 – 361	
MMP-1 (pg/ml)	zdraví	2039	614	656	3392	614 – 12284	**0.0219**
	nemoc	4232	1963	814	5160	614 – 18968	
MMP-2 (pg/ml)	zdraví	4567	2548	1424	7198	1127 – 16555	0.7229
	nemoc	4685	1127	1537	8068	1127 – 17675	
MMP-7 (pg/ml)	zdraví	1748	1730	1443	2120	50 – 3140	**0.0012**
	nemoc	2337	2214	2007	2508	931 – 4566	
MMP-8 (pg/ml)	zdraví	5319	3532	2441	6299	310 – 25076	0.9949
	nemoc	4888	3799	2117	6416	310 – 14458	
MMP-9 (pg/ml)	zdraví	32494	23439	15345	41095	100 – 111269	**0.0445**
	nemoc	42170	38197	25203	60314	7025 – 77959	
OPG (pg/ml)	zdraví	577	535	476	726	213 – 885	0.0551
	nemoc	675	643	548	800	401 – 1048	
OPN (pg/ml)	zdraví	12956	10483	30232	18925	216 – 78056	**0.0053**
	nemoc	20787	16708	12979	27528	4841 – 63950	

PIVKA II (mAU/ml)	zdraví	29.96	28.14	22.11	34.76	17.50 – 68.57	**0.0209**
	nemoc	858	32.14	26.67	58.55	15.29 – 20167	

Pozorovali jsme statisticky významné zvýšení u skupiny pacientů s karcinomem žaludku a to v následujících biomarkerech: CEA (medián 2.50 µg/l, p<0.0091 oproti 1.40 µg/l ve skupině zdravých osob), CA 72-4 (medián 10.00 kIU/l, p=0.0004 oproti 1.40 kIU/l), MMP-1 (medián 1963 pg/ml, p<0.0254 oproti 1127 pg/ml), MMP-7 (medián 2214 pg/ml, p <0.0034 oproti 1745 pg/ml), OPN (medián 16708 pg/ml, p<0.0053 oproti 10483 pg/ml) a PIVKA II (medián 32,14 mAU/ml, p<0.0209 oproti 28.14 mAU/ml). Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v koncentracích MMP-2, MMP-8 a OPG. Tabulka 11. ukazuje vyhodnocení biomarkerů ukazujících na možná rizika vzniku rakoviny žaludku.

Tabulka 11. Vyhodnocení biomarkerů rizika vzniku rakoviny žaludku

Analyt (unit)	**Stav**	**Průměr**	**Medián**	**Dolní kvartil**	**Horní kvartil**	**Minimum Maximum**	**p-Value Wilcoxon test**
Pepsinogen I (µg/l)	zdraví	1342	1277	836	1931	462 – 2098	**0.0463**
	nemoc.	1000	850	315	1560	193 – 2098	
Pepsinogen II (µg/l)	zdraví	71.41	59.40	29.31	102	19.30 – 227	0.6014
	nemoc.	75.72	45.44	25.30	122	19.30 – 255	
Ratio **Pepsinogen I** **Pepsinogen II**	zdraví	24.39	23.76	15.74	30.65	9.23 – 57.10	**0.0045**
	nemoc.	17.30	11.62	10.03	20.81	4.79 – 48.09	
Gastrin (pmol/l)	zdraví	15.73	6.50	7.50	11.01	6.50 – 83.50	**0.0338**
	nemoc.	30.64	12.22	9.60	64.50	6.50 – 80.00	
Helicobacter IgG (U/ml)	zdraví	28.50	13.40	7.30	37.90	2.00 – 148	**0.0002**
	nemoc.	72.88	65.70	35.00	92.30	6.70 – 171	

Pozorovali jsme statisticky významný pokles koncentrace pepsinogenu-I ve skupině pacientů s nádorem žaludku ve srovnání se skupinou zdravých osob (medián 898 g/l, p<0.0204 oproti 1353 μg/l). Pozorovali jsme statisticky významné zvýšení následujících biomarkerů ve skupině pacientů s nádorem žaludku ve srovnání se skupinou zdravých osob: gastrin (medián 12.22 pmol/l, p <0.4051 oproti 8.56 pmol/l) a Helicobacter pylori IgG (medián 45.44 U/ml, p<0.0223 oproti 17.20 u/ml). Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné změny v hladinách pepsinogenu-II.

Multivariační regresní analýza pak vybrala následující biomarkery jako nejlepší prediktory rizika karcinomu žaludku: CEA, CA72-4, pepsinogen-I, Helicobacter pylori, MMP-7. Návrh algoritmu pro výpočet rizika karcinomu žaludku je následující:

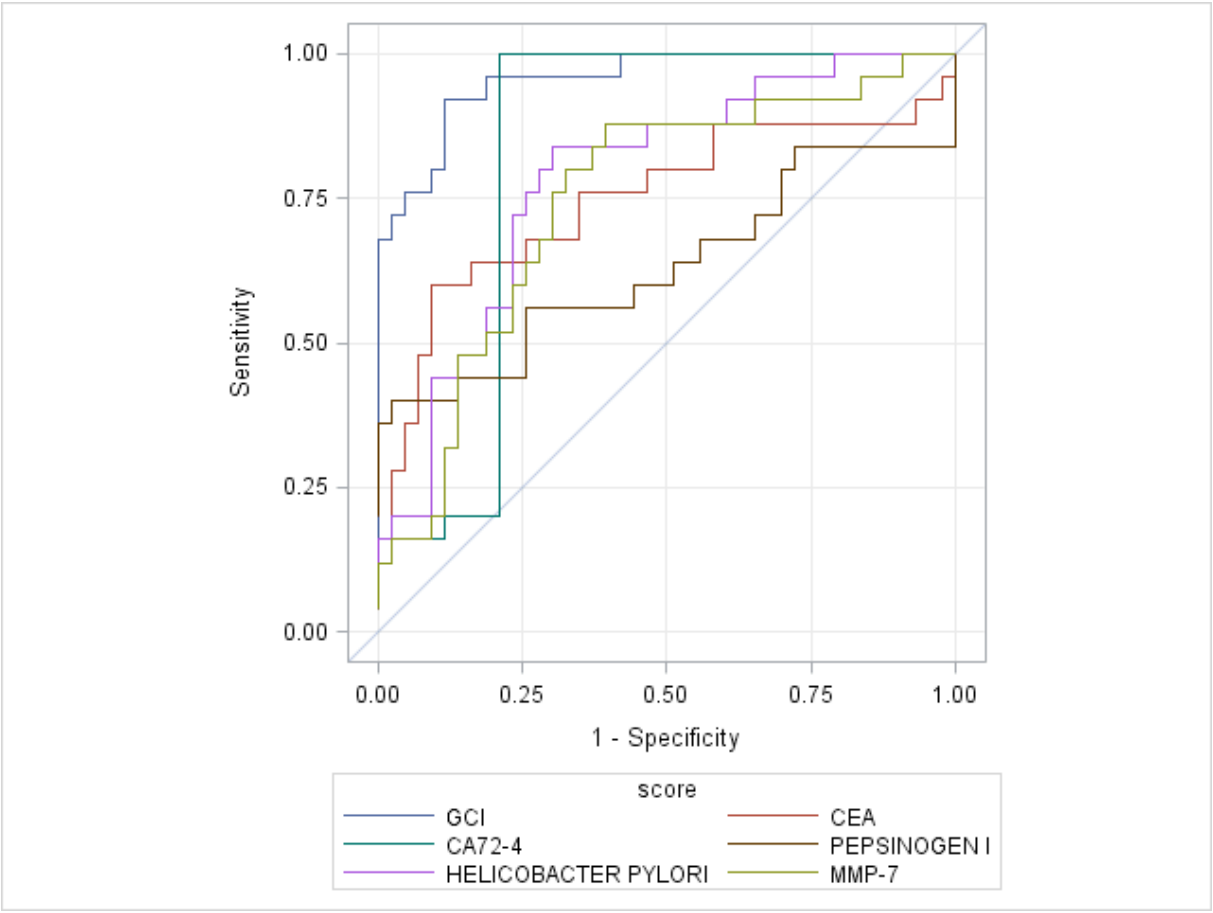
GCI = CEA * 0.6315 + 0.9344 * CA72-4 – Pepsinogen-I * 0.00217 + Helicobacter pylori * 0.0362 + MMP-7 * 0.00180.

Dále byly spočítány tvary ROC křivek a vypočítány AUC pro jednotlivé parametry. Nejlepší ROC křivku a nejvyšší AUC (0.9553) měl jednoznačně vypočítaný parametr GCI. (Tabulka 12, Graf 1)

Tabulka 12. Hodnoty AUC CEA, CA 72-4, pepsinogen I, Helicobacter pylori, MMP-7 a GCI

Analyt (unit)	**CEA** (μg/l)	**CA 72-4** (kIU/l)	**Pepsinogen I** (μg/l)	**Helicobacter pylori** (U/ml)	**MMP-7** (pg/ml)	**GCI** (- - -)
AUC	**0.6789**	**0.7758**	**0.6484**	**0.7851**	**0.7285**	**0.9553**

Graf 1. ROC křivky CEA, CA 72-4, pepsinogen-I, Helicobacter pylori, MMP-7 a GCI



Navzdory mírně klesajícímu počtu případů je karcinom žaludku stále závažné onemocnění se špatnou prognózou [Ferlay, 2015]. Pouze včasná diagnóza dává šanci na úspěšnou léčbu. Předpokladem pro úspěšnou léčbu je provedení radikální operace. Dlouhodobá pozorování ukazují, že pouze 25% pacientů s diagnózou karcinomu žaludku je indikováno k radikální operaci. Nízký počet pacientů, kteří podstupují radikální operaci, je výsledkem záchytu v pokročilém stadiu onemocnění [Smid, 2015].

Nádorové markery CEA, CA19-9 a CA72-4 jsou po dlouhou dobu využívány v rutinní praxi pro diagnostiku karcinomu žaludku [Kim, 2014]. Nicméně, jejich schopnost včasného záchytu tohoto nádorového onemocnění je omezena vzhledem k jejich nedostatečné citlivosti [Yang, 2014]. V této pilotní studii jsme se rozhodli otestovat možnosti využití nových biomarkerů v detekci karcinomu žaludku, nebo jejich schopnosti zlepšit senzitivitu výše uvedených nádorových markerů, pokud by se s nimi používaly v kombinaci.

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou zinek-dependentní endopeptidázy, které degradují extracelulární matrix a složky buněčné membrány. Jejich aktivita hraje klíčovou

roli v růstu nádoru, jeho invazivitě a metastazování [Gialeli, 2011]. Testovali jsme celý panel MMP, která je v současné době k dispozici jako komerční panel Bio-Plex. Z hodnocení panelu metaloproteináz vyplynulo, že změny MMP-1, MMP-7 a MMP-9 byly statisticky významné. AUC MMP-7 byla jedním z nejvyšších AUC v panelu vybraných biomarkerů a MMP-7 byl vybrán jako jeden z nejlepších prediktorů karcinomu žaludku podle našeho matematického modelu.

Osteoprotegerin (OPG) a Osteopontin (OPN) jsou známé díky jejich roli v kostním metabolizmu [Albu, 2013]. OPG souvisí především s projevem kostních metastáz určitých druhů zhoubných nádorů včetně karcinomu žaludku [D'Amico, 2013]. Některé studie uvádějí zvýšené hladiny OPN jako negativní prognostický faktor karcinomu žaludku [Chen, 2014]. V naší skupině pacientů byl OPN statisticky významně vyšší ve skupině pacientů s karcinomem žaludku ve srovnání se skupinou zdravých jedinců. To je v souladu se zjištěními ostatních autorů.

PIVKA-II je biomarker, který byl poprvé popsán jako biomarker hepatocelulárního karcinomu [Fujiyama, 1988]. Odborná literatura zmiňuje též produkci PIVKA-II karcinomem žaludku [Takahashi, 2010]. Produkci PIVKA-II karcinomem žaludku potvrzují též pozitivní nálezy v naší skupině pacientů.

Jako další skupinu jsme sledovali biomarkery, které jsou popsány jako rizikové faktory vředové choroby žaludku a potažmo též karcinomu žaludku [Charvat, 2015]. Potvrdili jsme významnou úlohu pepsinogenu-I, gastrinu a Helicobacteru pylori, jako rizikových faktorů vzniku karcinomu žaludku. Pepsinogen-I a Helicobacter pylori IgG byly také vybrány jako prediktory karcinomu žaludku naším matematickým modelem.

V současné době můžeme říci, že snaha o nalezení nových biomarkerů pro včasnou diagnostiku karcinomu žaludku není tak úspěšná, jak by bylo žádoucí. Naše pilotní studie tuto skutečnost potvrzuje. Nejlepších výsledků (podle p-value, ROC a AUC) bylo dosaženo u tradičních nádorových markerů CA72-4 a CEA. Pro některé onkologické diagnózy jsou v současné době navrhovány matematické modely hodnocení výsledků biomarkerů, ve snaze zvýšit efektivitu diagnostického procesu. Tento způsob se ukázal jako velmi účinný při diagnóze karcinomu prostaty v podobě indexu zdravé prostaty (Prostate Health Index – PHI) [Tosoian, 2012]. Podobně zajímavý se pro praxi jeví algoritmus pro výpočet rizika ovariálních malignit (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm – ROMA) [Moore, 2011]. Rozhodli jsme se proto použít nový přístup k hledání nástroje, který by mohl být použit pro včasnou diagnózu karcinomu žaludku. S použitím multivariační analýzy jsme vybrali pět biomarkerů, jejichž výsledky se zdají být pro diagnostiku karcinomu žaludku nejefektivnější.

Výsledkem našeho přístupu je matematický model pro výpočet rizika karcinomu žaludku, který jsme nazvali Gastric Cancer Index – GCI. Při použití GCI jsme dosáhli nejlepší ROC křivky a nejvyšší AUC. V následné studii se zaměříme na ověření přínosu jednotlivých parametrů našeho matematického modelu a celkové vylepšení algoritmu pro výpočet indexu GCI.

Závěrem tedy můžeme konstatovat, že nádorové markery CEA a CA 72-4 zůstávají nejlepšími jednotlivými markery pro diagnostiku karcinomu žaludku. Ujistili jsme se, že MMP-1, MMP-7, OPN a PIVKA II jsou slibnými kandidáty na nové biomarkery pro detekci karcinomu žaludku. Potvrdili jsme nižší hladiny pepsinogenu-I, vyšší hladiny gastrinu a přítomnost Helicobacteru pylori jako rizikové faktory vzniku karcinomu žaludku. Vytvořili jsme matematický algoritmus pro posouzení rizika karcinomu žaludku v lidské populaci. Je nutné provést další studie a ověřit naše zjištění na větším souboru pacientů.

5.2 Výsledky a hodnocení metastáz kolorektálního karcinomu do jater

Při vyhodnocení druhého souboru pacientů jsme se zaměřili na změny v hladinách nádorových markerů v jednotlivých stadiích a na interpretaci výsledků pacientů bez metastáz a s metastázami. Výsledky získané vyhodnocením celé skupiny 111 pacientů podle jednotlivých stadií jsou uvedeny v Tabulce 13.

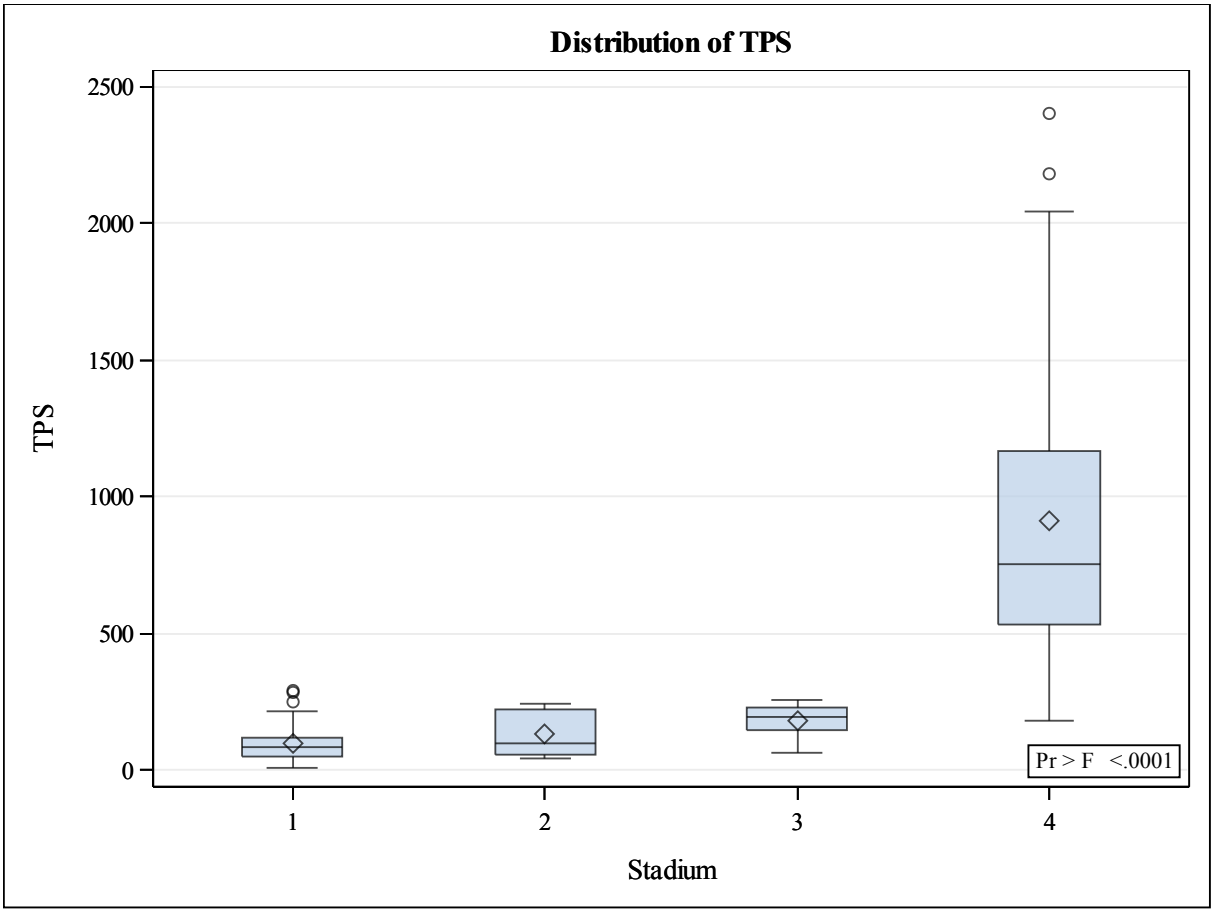
Tabulka 13. Hladiny nádorových markerů TPS, TPA a CEA v jednotlivých stadiích

Stadium	N	Nádorový marker	Průměr	Medián	Dolní kvartil	Horní kvartil	Min – Max
I	54	TPS	96.7	81.5	47.0	117.0	10.0 – 293.0
		TPA	51.7	42.0	22.0	73.0	10.0 – 186.0
		CEA	4.6	2.3	1.5	4.7	0.4 – 51.8
II	10	TPS	129.8	97.0	59.0	225.0	41.0 – 242.0
		TPA	101.3	46.5	35.0	186.0	10.0 – 259.0
		CEA	3.5	3.6	2.2	4.3	0.5 – 6.9
III	7	TPS	178.6	196.0	147.0	230.0	62.0 – 255.0
		TPA	216.6	183.0	132.0	257.0	116.0 – 393.0
		CEA	5.0	1.8	0.7	9.0	0.6 – 14.1

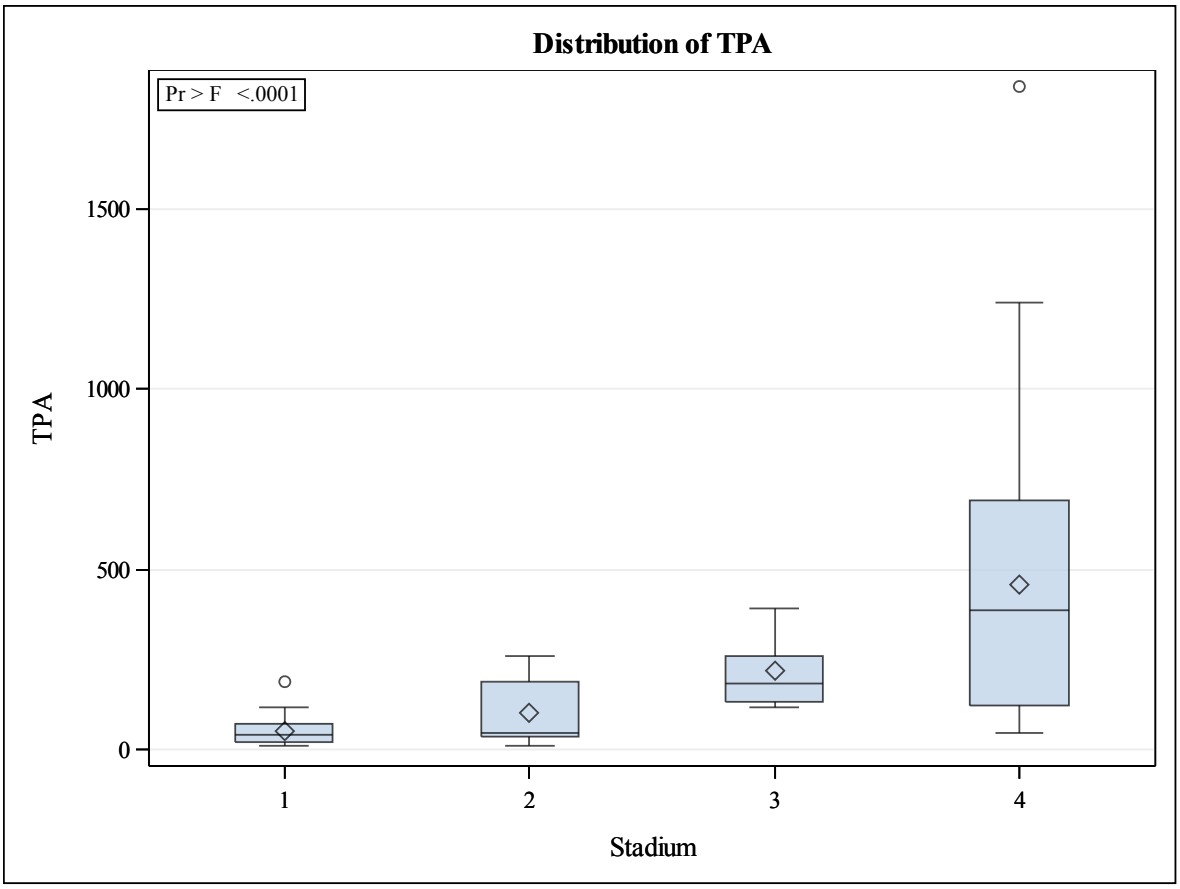
IV	**40**	**TPS**	914.2	750.5	532.0	1167	181.0 – 2400
		TPA	456.2	387.5	123.5	698.5	48 – 1838
		CEA	84.5	6.2	2.0	55.0	0.4 – 951.0

Pro lepší představu o rozložení hodnot jsou výsledky nádorových markerů v jednotlivých stadiích zobrazeny v následujících grafech.

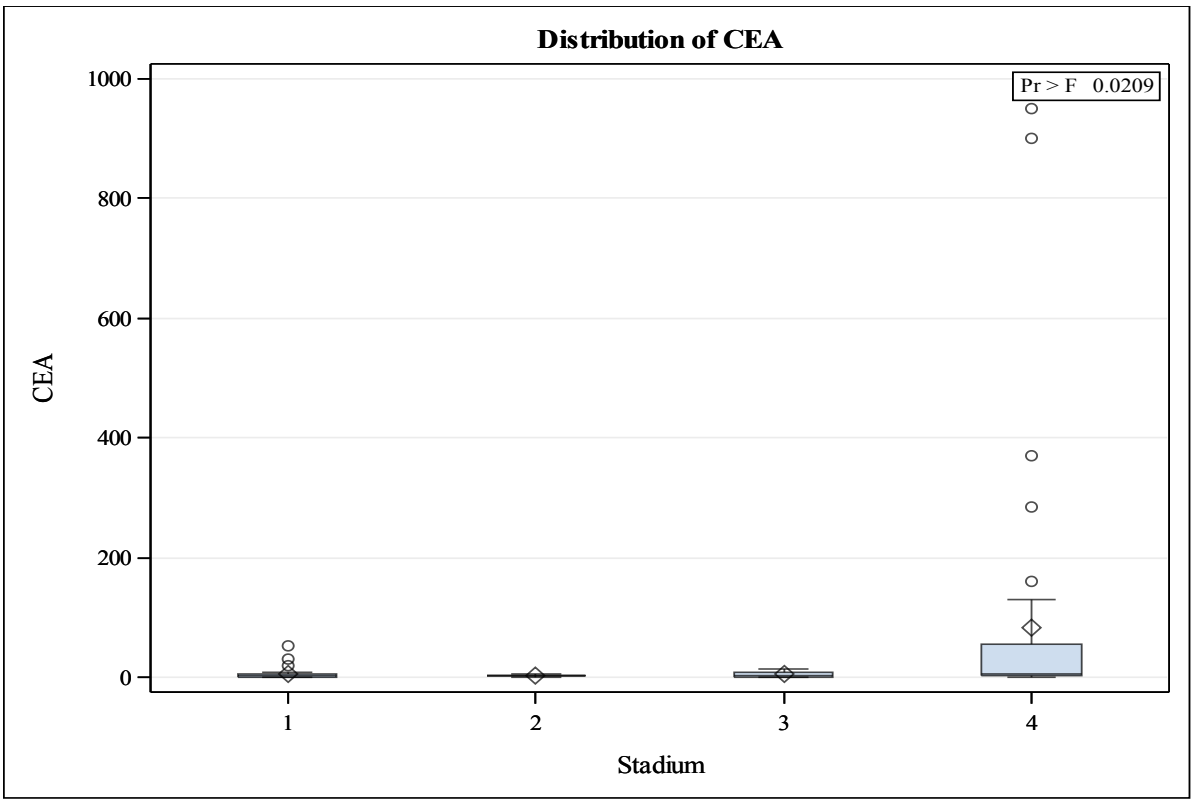
Graf 2. Rozložení hodnot TPS v jednotlivých stadiích



Graf 3. Rozložení hodnot TPA v jednotlivých stadiích



Graf 4. Rozložení hodnot CEA v jednotlivých stadiích



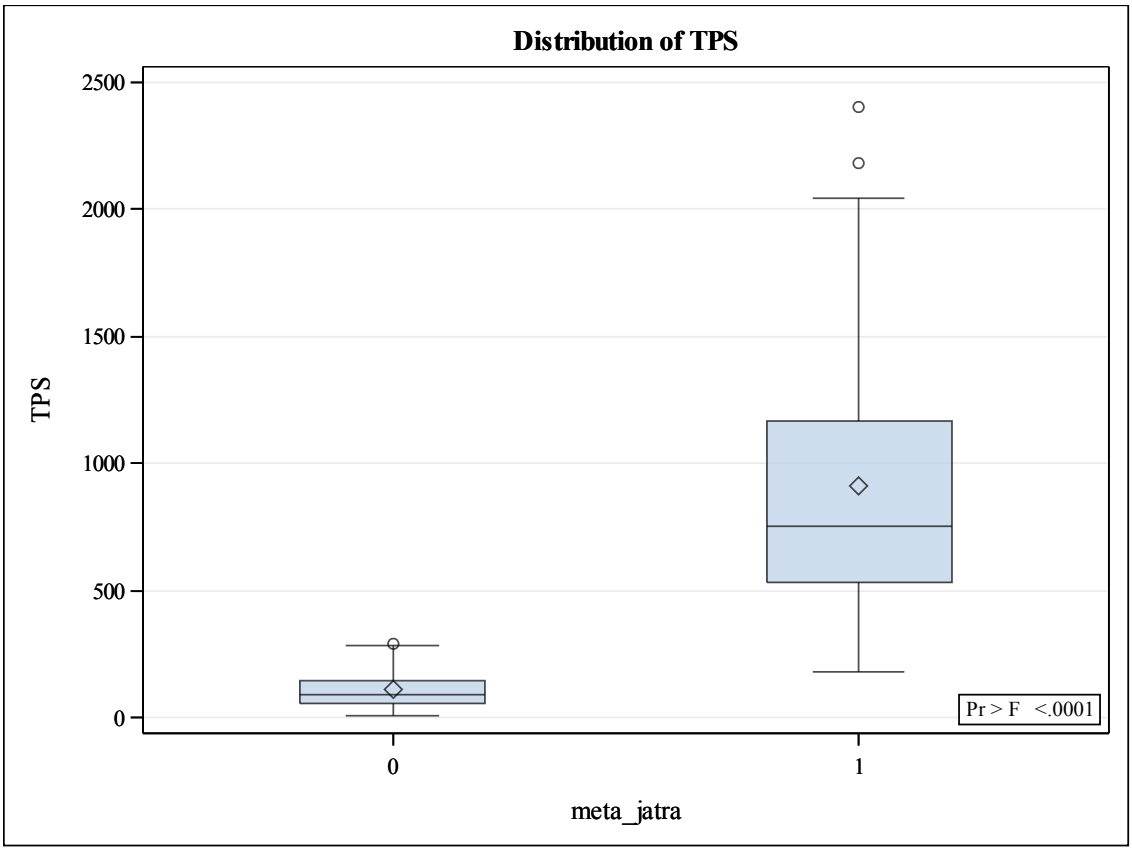
Z uvedených údajů vyplývá, že se zvyšujícím se stádiem onemocnění se většinou zvyšovaly i hladiny sledovaných nádorových markerů. Toto zjištění je sice v souladu s dnes již poměrně vžitou představou o pozitivní korelaci hladin nádorových markerů se závažností klinického stavu, ale v rozhodování o způsobu léčby se dá použít jen velice těžko. Zásadním zvratem a důvodem k rychlému terapeutickému zásahu je zjištění metastáz. Je zdokumentováno, že kolorektální karcinom metastazuje v 80% případů do jater [Dominello, 2014; Ogiso, 2015]. Rozhodli jsme se proto zaměřit na schopnost markerů odlišit stádium s prokázanými metastázami od zbývajících tří stadií. Výsledky tohoto srovnání jsou uvedeny v následující Tabulce 14.

Tabulka 14. Sérové hladiny TPS, TPA a CEA stadium I+II+III vs. stadium IV

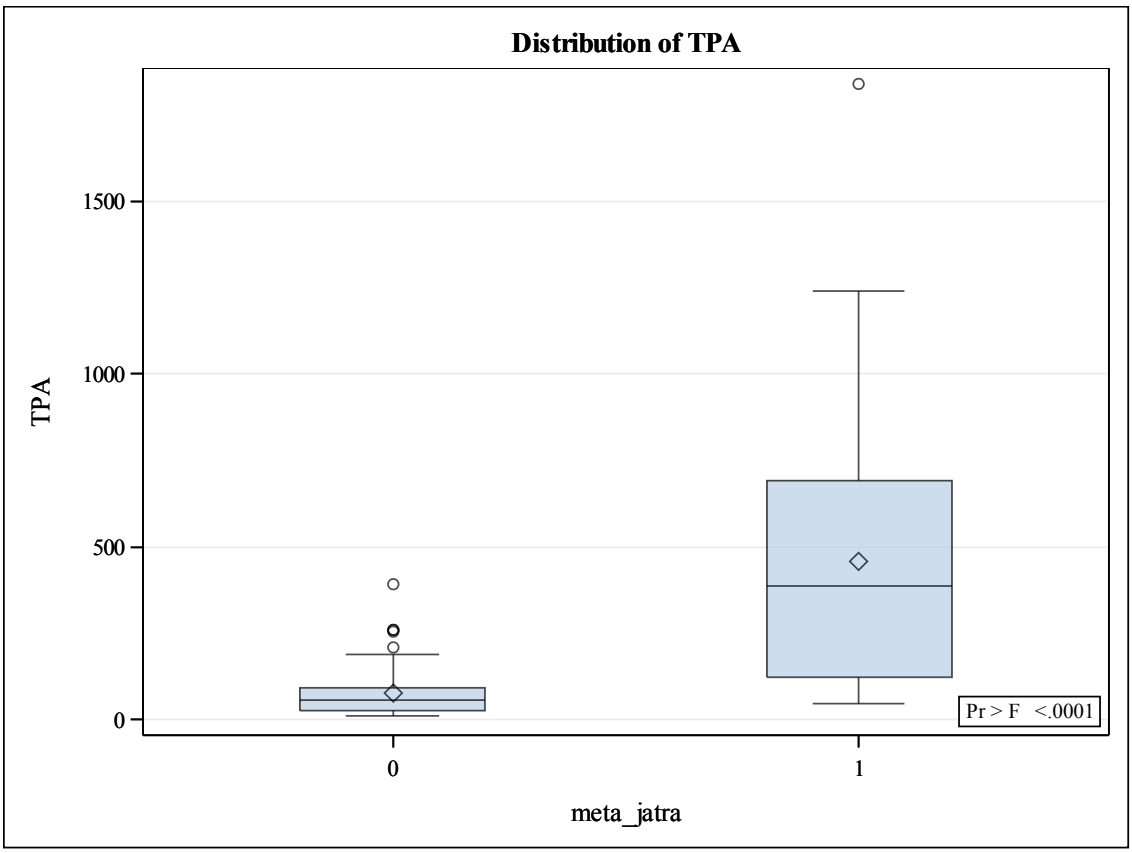
Analyt (unit)	**Stadium**	**Průměr**	**Medián**	**Dolní kvartil**	**Horní kvartil**	**Min – Max**	***p*-value Wilcoxon test**
TPS (IU/l)	**Stadium I+II+III**	109.4	90.0	59.0	149.0	10.0 – 293.0	**<0.0001**
	Stadium IV	914.2	750.5	532.0	1167	181.0 – 2400	
TPA (IU/l)	**Stadium I+II+III**	74.9	54.0	24.0	93.0	10.0 – 393.0	**<0.0001**
	Stadium IV	456.2	387.5	123.5	689.5	48.0 – 1838	
CEA (μg/l)	**Stadium I+II+III**	4.50	2.50	1.30	5.00	0.40 – 51.8	**<0.0011**
	Stadium IV	84.5	6.20	2.00	55.0	0.40 – 951.0	

Rozložení hodnot jednotlivých markerů uvádím i v grafické podobě Grafy 5 – 7.

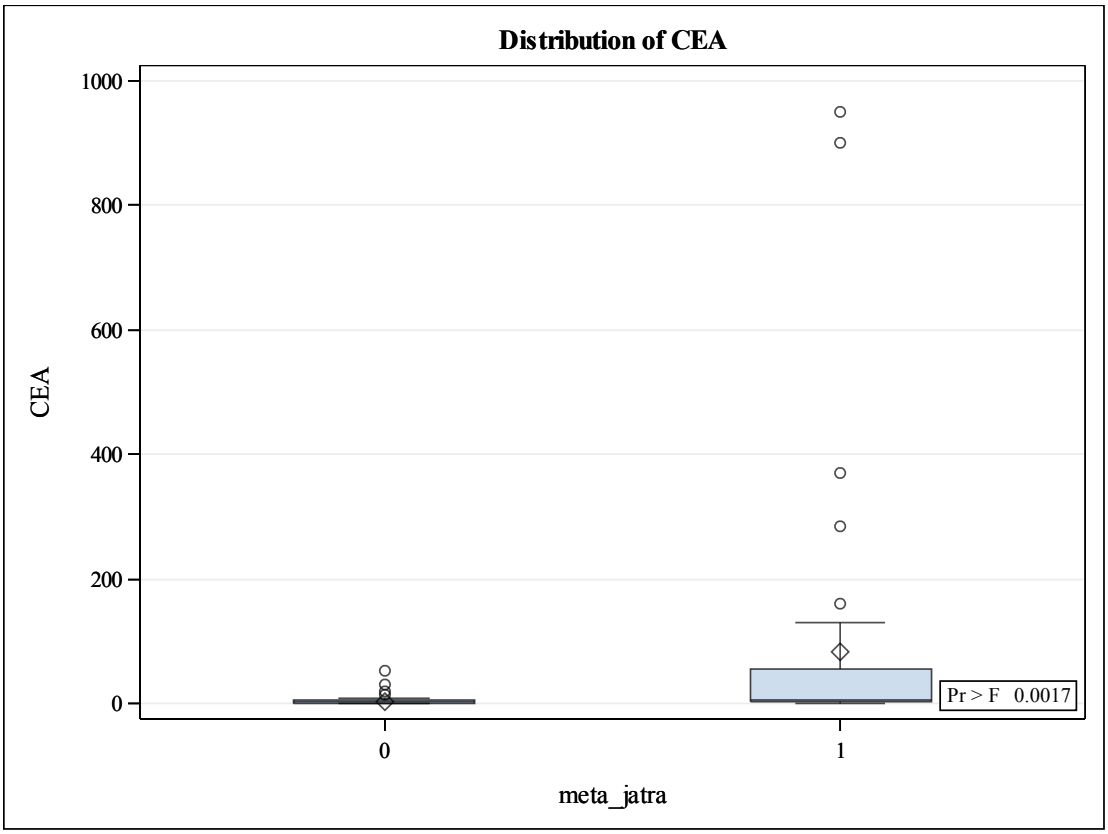
Graf 5. Hodnoty TPS stadium I + II + III vs. stadium IV



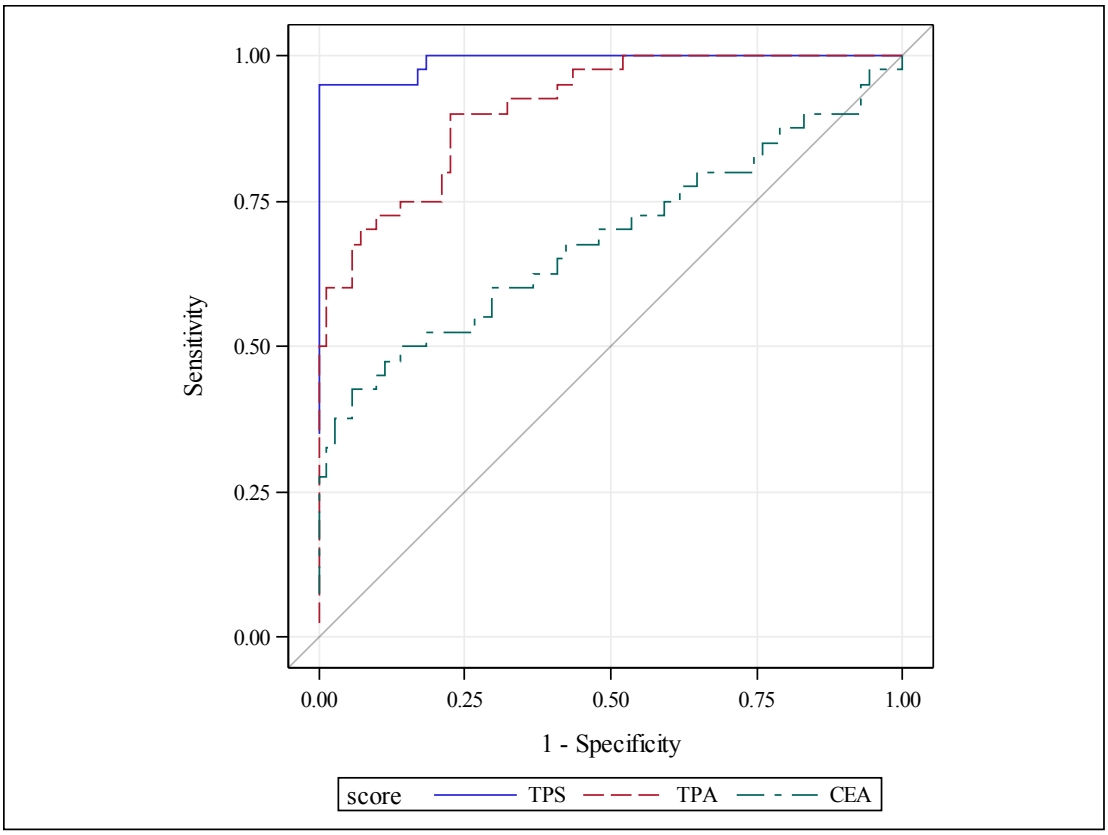
Graf 6. Hodnoty TPA stadium I + II + III vs. stadium IV



Graf 7. Hodnoty CEA stadium I + II + III vs. stadium IV



Graf 8. ROC křivky TPS, TPA a CEA stadium I + II + III vs. stadium IV



O užitečnosti jednotlivých markerů nejlépe vypovídají ROC křivky (Graf 8) a AUC (Tabulka 15). V této tabulce je též spočítaný cut-off pro jednotlivé markery při hodnotě specificity 95%.

Tabulka 15. AUC a cut-off hodnoty TPS, TPA a CEA stadium I + II + III vs. stadium IV

Analyt (jednotky)	**AUC**	**Cut-off**	**Specificita** (%)	**Sensitivita** (%)
TPS (IU/l)	0.9912	**226**	90	95.0
TPA (IU/l)	0.9116	**184**	90	72.5
CEA (µg/l)	0.6903	**7.6**	90	45.0

Z výše uvedených dat vyplývá, že každý z použitých markerů byl statisticky významně vyšší u stadia IV v porovnání se stadii I + II + III.

Použité nádorové markery jsou známé již řadu let a jejich pravidelné používání v diagnostice má již více než dvacetiletou tradici. Před dvaceti lety však jejich použití k detekci metastáz nemělo větší klinický význam. Zjištění metastáz, ať již jaterních či jiných, znamenalo v minulosti vždy vážnou komplikaci a výrazné zhoršení prognózy. V současné době je zjištění jaterních metastáz též závažným faktem, nicméně rozvoj nových chirurgických metod a metod systémové léčby v posledních letech nabízí pacientům možnost výrazně delšího přežití se zachováním relativně vysoké kvality života [Kim, 2015]. Základním způsobem léčby je jaterní resekce nebo je možné použít další chirurgické techniky jako je portální žilní embolizace, chemoembolizace, radioembolizace, tepelná či radiofrekvenční ablace [Treska, 2014].

Závažnost prognózy pacientů s jaterními či jinými metastázami závisí na biologické aktivitě nádoru. Zde se otevírá cesta k použití cytokeratinových nádorových markerů, které mají sice nízkou specificitu, ale jsou úzce spojeny s dělením buněk – jednou ze známek biologické aktivity nádoru [Ahn, 2013]. Při progresi zhoubných nádorů lze pozorovat proteolytické štěpení rozpustných cytokeratinových fragmentů. Tyto fragmenty jsou uvolňovány do krve, kde mohou být detekovány pomocí in vitro diagnostických testů [Barak, 2007].

CEA je nejběžněji používaným nádorového markerem v séru a řada studií uvádí jeho významné zvýšení u pacientů s jaterními metastázami [Lunachi, 2012; Hara, 2013]. Pokud vycházíme z ROC křivek a z AUC, které jsou výsledkem naší studie (Graf 8, Tabulka 15), je zřejmé, že CEA (AUC=0.6903) nedosahuje takové úspěšnosti při detekci metastáz jako oba cytokeratiny – TPS (AUC=0.9912) a TPA (AUC=0.9116). Naše zjištění jsou v souladu se zjištěními dalších autorů, kteří se zabývali stejnou tématikou [Fernandes, 2005; Romero-Ventosa, 2015].

Studie autorů [Vodicka, 2014] uvádí, že rozhodující prognostické faktory celkového přežití u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou počet metastáz a předoperační hodnoty TPS. TPS a TPA byly také popsány jako důležité prognostické markery po jaterní resekci nebo radiofrekvenční ablaci jaterních metastáz kolorektálního karcinomu [Treska, 2009]. I když všechny výše uvedené skutečnosti ukazují, že měření TPS a TPA je nesporným přínosem v diagnostice metastatického procesu, je třeba zmínit, že použití sérových nádorových markerů je omezeno nízkou specificitou. K falešně pozitivním výsledkům by mohly vést následující klinické stavy: jaterní nebo ledvinová nedostatečnost a zánětlivé stavy [Fletcher, 2002]. Sérová hladina cytokeratinů může být také velmi zvýšena v důsledku destrukce nádorových buněk v průběhu úspěšné onkologické léčby [de Haas, 2008]. Další důležitou podmínkou při monitorování pacientů pomocí cytokeratinových markerů, jakož i nádorových markerů obecně, je systematické sledování dynamiky změn sérových hladin. Dynamika změn je mnohdy větším přínosem pro klinika v jeho rozhodování, než absolutní hodnota nádorového markeru [Duffy, 2014]. Všechny tyto skutečnosti je třeba vzít v úvahu při interpretaci výsledků, abychom se vyvarovali nesprávných závěrů.

Jak tedy v našem případě hodnotit naměřené výsledky? Je možné použít referenční meze, které se používají v rutinní praxi? To byly otázky, které jsme si kladli před vyhodnocením výsledků. Z tohoto důvodu byl součástí vyhodnocení též výpočet a návrh cut-off pro použité nádorové markery. V Tabulce 15 výše uvádím hodnoty cut-off při hodnotě specificity nastavené na 90%. Senzitivity pak klesají od TPS k CEA. Všechny hodnoty cut-off jsou vyšší, než používáme v rutinní praxi pro odlišení maligního nádoru od ostatních onemocnění. Zde si však musíme uvědomit, že cut-off by měl sloužit pro oddělení pacientů s nádory bez metastáz (stadia I, II a III) od pacientů s metastázami (stadium IV). Pohybujeme se tedy ve skupinách pacientů, kteří by měli mít hodnoty sledovaných nádorových markerů nad hranicí referenčních hodnot. Navržené cut-off hodnoty tak jen odrážejí tento fakt.

Pokud tedy vezmeme za prokázané, že TPS a TPA jsou přínosem pro diagnostiku metastáz kolorektálního karcinomu, je možné si dále položit otázku, zda jsou cytokeratiny

nebo také CEA schopné odlišit čistě jaterní metastázy od souběžného výskytu metastáz i v jiných lokacích. Výsledek porovnání uvádí Tabulka 16.

Tabulka 16. Sérové hladiny TPS, TPA a CEA metastázy játra vs. metastázy játra a jiné lokace

Analyt (unit)	**Stadium**	**Průměr**	**Medián**	**Dolní kvartil**	**Horní kvartil**	**Min – Max**	***p*-value Wilcoxontest**
TPS (IU/l)	**meta pouze v játrech**	930.1	861.0	517.0	1178.0	181.0 – 2400	**0.7236**
	meta játra + jiné lokace	859.3	720.0	606.0	987.0	426.0 – 1944	
TPA (IU/l)	**meta pouze v játrech**	477.0	362.0	110.0	763.0	110.0 – 1838.0	**0.6760**
	meta játra + jiné lokace	384.2	413.0	254.0	462.0	48.0 – 851.0	
CEA (μg/l)	**meta pouze v játrech**	76.3	7.10	2.10	56.9	0.50 – 951.0	**0.3533**
	meta játra + jiné lokace	112.8	4.00	0.90	9.20	0.40 – 900.0	

Pokud porovnáme soubor pacientů, u kterých se metastázy vyskytovaly pouze v játrech, se souborem pacientů s metastázami i v jiných lokacích, vidíme, že průměry a mediány všech tří nádorových markerů se liší. Dle Wilcoxonova testu však vidíme, že nikoliv statisticky významně. I když soubor vícečetných metastáz čítal pouze 9 pacientů, z výsledků je patrné, že není předpoklad, že by cytokeratinové markery, nebo CEA dokázaly odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

V klinické praxi je velmi často používáno kombinací nádorových markerů. Většinou se používá kombinace nádorového markeru souvisejícího s hmotou nádoru, jako je například CEA, s nádorovým markerem vypovídajícím o rychlosti růstu nádoru a jeho agresivitě, jako jsou například cytokeratiny. Ty trpí nižší specificitou, protože nám signalizují dělení buněk v organismu, a to nejen nádorových. Po vyloučení těchto vlivů (zánětlivé stavy, jaterní nebo ledvinová nedostatečnost, metody léčby vedoucí k destrukci a rozpadu buněk) je možné

použít jimi poskytovanou diagnostickou informaci jako doplněk k informaci poskytované nádorovými markery spojenými s hmotou nádoru. Pokud chceme odlišit pacienty bez metastáz od pacientů s metastázami, jsou cytokeratiny velmi vhodnou volbou. Pro konkrétní demonstraci tohoto faktu uvádím v Tabulkách 13 – 17 níže detailní rozbor falešně negativních a falešně pozitivních pacientů při použití jednotlivých nádorových markerů (CEA, TPS a TPA) a jejich kombinací (CEA + TPA, CEA + TPS).

Pro vyhodnocení jednotlivých nádorových markerů byl použit cut-off s nastavenou specificitou 90%. Pro vyhodnocení kombinací nádorových markerů (Tabulky 20, 21) byl ponechán stejný cut-off jako v tabulkách pro vyhodnocení jednotlivých markerů.

U CEA je největším problémem nízká senzitivita (45%), kdy 22 pacientů by bylo hodnoceno jako bez metastáz, ale ve skutečnosti byly metastázy přítomny (Tabulka 17). Výrazně lepších hodnot bylo dosaženo při použití TPA, kdy 11 pacientů by bylo hodnoceno jako falešně negativní na přítomnost metastáz (Tabulka 18). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití TPS, kdy pouze 2 pacienti by se jevili z hlediska přítomnosti metastáz jako falešně negativní (Tabulka 19). Při nastavené specificitě 90% je ve všech třech případech vyhodnoceno 7 pacientů jako falešně pozitivních.

Tabulka 17. Rozdělení pacientů na základě hodnocení podle hladiny CEA

CEA (µg/l)	**Stadium I+II+III**	**Stadium IV**	**Total**
<7.6	**64**	**22**	86
>=7.6	**7**	**18**	25
Total	71	40	111

Tabulka 18. Rozdělení pacientů na základě hodnocení podle hladiny TPA

TPA (IU/l)	**Stadium I+II+III**	**Stadium IV**	**Total**
<7.6	**64**	**11**	75
>=7.6	**7**	**29**	36
Total	71	40	111

Tabulka 19. Rozdělení pacientů na základě hodnocení podle hladiny TPS

TPS (IU/l)	**Stadium I+II+III**	**Stadium IV**	**Total**
<226	**64**	**2**	66
>=226	**7**	**38**	45
Total	71	40	111

Při použití kombinací nádorových markerů a zachování vypočítaných cut-off je zařazení cytokeratinového markeru, ať již TPA nebo TPS, jednoznačným přínosem. Specificita kombinovaného testu se sice mírně sníží (82%), což znamená, že u obou dvojkombinací nádorových markerů bude vyhodnoceno 13 pacientů jako falešně pozitivní, ale v případě kombinace CEA + TPA (Tabulka 20) bude vyhodnoceno jako falešně negativních 9 pacientů (senzitivita 78%) oproti 22 pacientům (senzitivita 45%), pokud bychom použili pouze CEA samotné. Pokud použijeme kombinaci CEA + TPS (Tabulka 21) pouze 1 pacient bude hodnocen jako falešně negativní, což znamená senzitivitu 98%.

Tabulka 20. Rozdělení pacientů na základě kombinace CEA a TPA

Status	**Stadium I+II+III**	**Stadium IV**	**Total**
negativní	**58**	**9**	67
pozitivní	**13**	**31**	44
Total	71	40	111

Tabulka 21. Rozdělení pacientů na základě kombinace CEA a TPS

Status	**Stadium I+II+III**	**Stadium IV**	**Total**
negativní	**58**	**1**	59
pozitivní	**13**	**39**	52
Total	71	40	111

Závěrem je možné konstatovat, že sérové hladiny TPS a TPA je možné doporučit jako užitečné diagnostické nástroje pro detekci jaterních metastáz u kolorektálního karcinomu. Cytokeratiové nádorové markery mohou ve většině případů, dříve než často používaný CEA, upozornit na možnou přítomnost metastázy a urychlit tak radikální léčebné řešení. Tento přístup může výrazně zvýšit efektivitu detekce metastatického procesu a umožnit delší přežití pacientů.

Pokud bychom měli volit v diagnostickém použití mezi TPA a TPS, je vhodnější v případě metastáz kolorektálního karcinomu TPS.

Cytokeratinové markery nedokáží odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

5.3 Výsledky a hodnocení pilotní studie využití FGF23 při diagnostice kolorektálního karcinomu

Úloha FGF23 v mechanizmu kancerogeneze není příliš jasná. V literatuře lze dohledat dobře zdokumentované případy nádorem indukované osteomalácie, kdy v důsledku nadprodukce FGF23 způsobené genetickou mutací v neoplastické tkáni je možné naměřit vysoké plazmatické hladiny FGF23 [Leaf, 2013]. Protože místem účinku FGF23 jsou ledviny, kde v proximálním tubulu zvyšuje exkreci fosfátů, osteomalácie je pak logickým důsledkem delší dobu neřešené nadprodukce FGF23 [Han, 2016]. FGF23 je též inhibitorem 1-alpha-hydroxylázy, která katalyzuje přeměnu zásobní formy vitamínu D (kalcidiolu) na jeho aktivní formu (calcitriol). Některé práce se zabývají vztahem hladin FGF23 a vitamínu D v možné účasti FGF23 v procesu kancerogeneze. Závěry zatím naznačují, že zvýšené hladiny FGF23 mohou být zapojeny do procesu vývoje kolorektálních neoplazií nezávisle na hladinách vitamínu D [Jacobs, 2011]. Poslední zveřejněné informace z tohoto roku prokazují zapojení FGF23 do procesu angiogeneze. Aktivita glykolytického enzymu hexokinázy 2 (HK2) je kontrolována pomocí signalizace FGF, která je přenášena přes FGF receptor. Pokles hladin HK2 v nepřítomnosti signalizačních vstupů na FGF receptor vede ke snížení glykolýzy, což vede k narušení proliferace a migrace endoteliálních buněk. Zvýšená stimulace FGF receptoru naopak proliferaci a migraci buněk endotelu podporuje [Yu, 2017]. Tento mechanizmus byl zatím prokázán na zvířecím modelu.

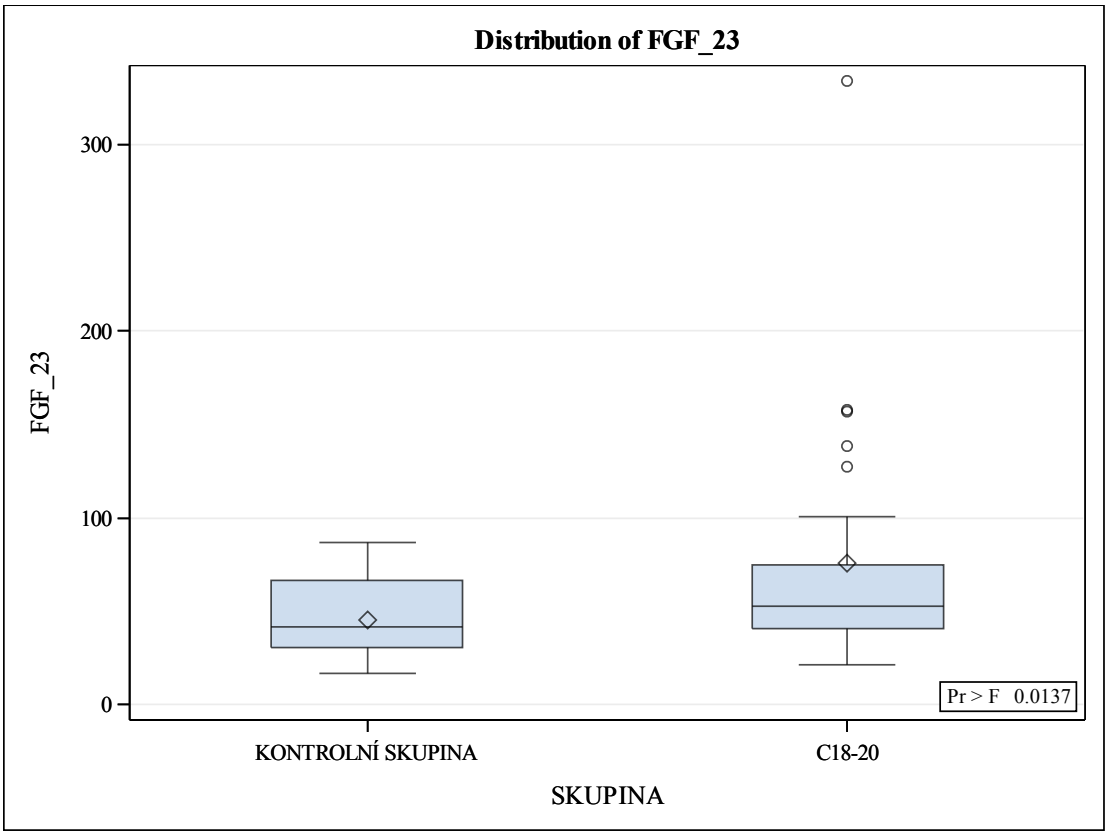
Nás tedy zajímalo, zda je možné vysledovat rozdíly v hladinách FGF23 u náhodně vybraných pacientů s kolorektálním karcinomem v různých stadiích a vzorkem zdravé populace, zatím nezávisle na jakýchkoliv dalších biomarkerech. Obdobně koncipovanou

studii není možné zatím dohledat v žádné dostupné literatuře. Porovnání hladin FGF23 u skupiny zdravých osob a u pacientů s kolorektálním karcinomem uvádí Tabulka 22 a Graf 9.

Tabulka 22. FGF23 u zdravých osob vs. pacienti s kolorektálním karcinomem

Analyt (unit)	**Stadium**	**Průměr**	**Medián**	**Dolní kvartil**	**Horní kvartil**	**Min – Max**	***p*-value Wilcoxontest**
FGF23 (pgU/l)	**zdraví**	45.0	41.7	30.1	74.9	16.9 – 87.0	**0.0097**
	kolorektální karcinom	75.9	52.3	40.4	66.4	20.9 – 334	

Graf 9. FGF23 u zdravých osob vs. pacienti s kolorektálním karcinomem



Hodnoty FGF23 u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou statisticky významně vyšší, než hodnoty naměřené u zdravé populace. Podle minimo-maximálních hodnot je však patrné, že FGF23 nebude použitelné jako biomarker záchytu v časných stadiích, když hodnoty

u zdravé populace se pohybují mezi 16.9 – 87.0 ng/ml a hodnoty kolorektálního karcinomu začínají na 20.9 ng/ml.

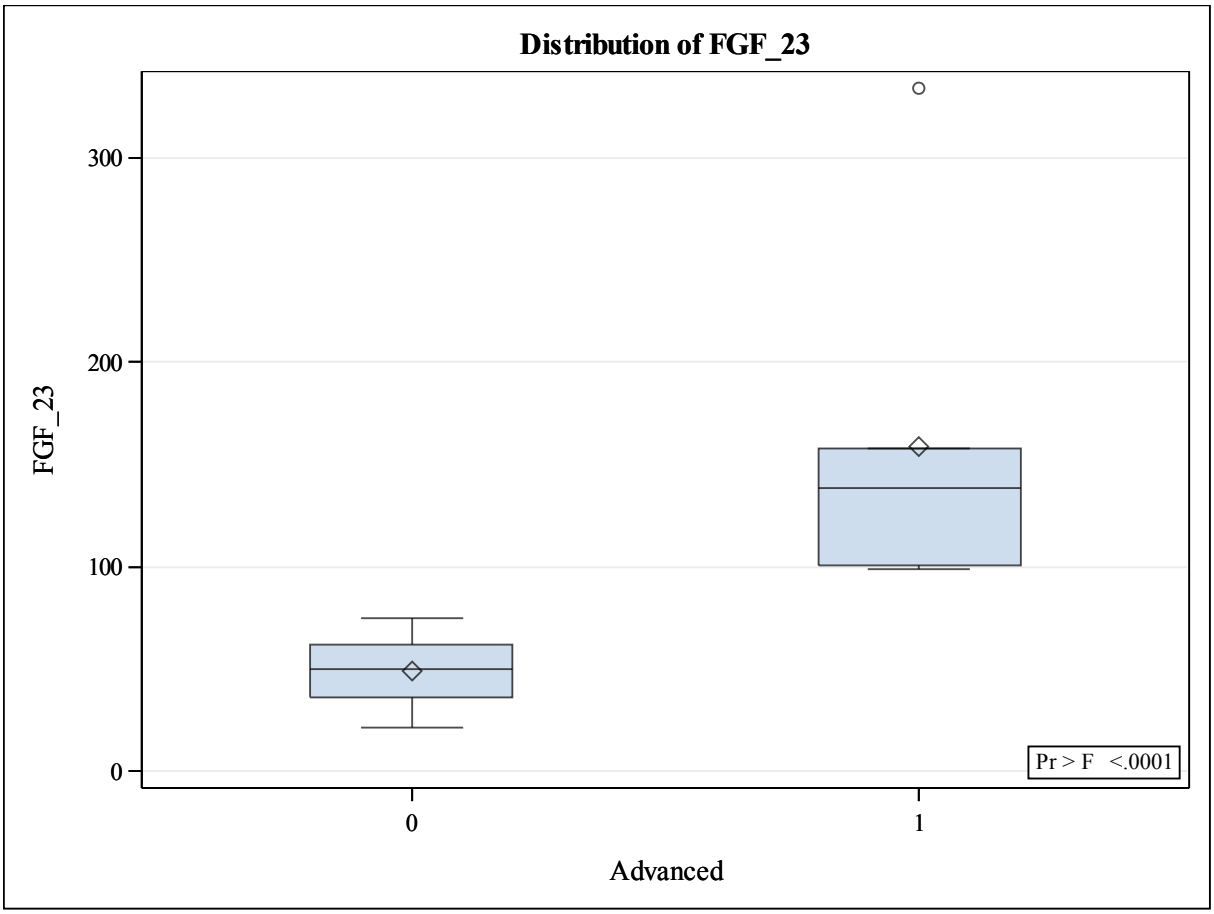
V druhém kroku jsme chtěli zjistit, zda by nebylo možné použít FGF23 jako biomarker záchytu metastáz. Oddělili jsme proto skupinu se stadiem I, II a III a porovnali ji s hodnotami FGF23 pouze ve stadiu IV, kde byly dosažené hodnoty FGF23 nejvyšší. Výsledek porovnání uvádí Tabulka 23 a Graf 10. Toto srovnání je na první pohled velmi optimistické, protože pokud se podíváme na minimo-maximální hodnoty tak zjistíme, že se hodnoty FGF23 u těchto dvou skupin vůbec nepřekrývají, což demonstruje i Graf 12. Takto by měl fungovat ideální biomarker. Na tomto místě je však nutné poznamenat, že jsme porovnávali velmi malý počet pacientů. Ve skupině stadia I, II, a III bylo celkem 22 pacientů a ve skupině stadia IV celkem 8 pacientů.

Čísla námi získaná jsou zajímavá, ale je potřeba pokračovat ve sběru dat a ověřit námi získané hodnoty na větším souboru pacientů. Z důvodu malého počtu pacientů jsme též neprováděli dynamiku změn FGF23 mezi jednotlivými stadii. Dále je nutné uvést, že do naší pilotní studie jsme pečlivě vybírali pacienty bez údajů o zjištěné osteoporóze v anamnéze či podávání vitamínu D. Chtěli jsme se tím vyhnout možnému ovlivnění výsledků. Dále jsme dbali na to, aby všichni pacienti měli v pořádku ledvinné funkce. Ověření vlivu renální insuficience na hladiny FGF23 je uvedeno níže.

Tabulka 23. FGF23 u stadia I, II, a III vs. stadium IV

Analyt (unit)	**Stadium**	**Průměr**	**Medián**	**Dolní kvartil**	**Horní kvartil**	**Min – Max**	***p*-value Wilcoxontest**
FGF23 (pgU/l)	**Stadium I, II, III**	49.4	50.0	36.1	62.1	20.9 – 74.88	**0.0006**
	Stadium IV	159.2	138.9	100.4	158.0	99.05 – 334	

Graf 10. FGF23 u stadia I, II, a III vs. stadium IV



Místem účinku FGF23 jsou ledviny, kde FGF23 snižuje aktivitu sodíko-fosfátové pumpy. V literatuře se uvádí vysoké zvýšení FGF23 u dialyzovaných pacientů. Protože jsme do této doby neměli žádné vlastní klinické zkušenosti s FGF23, rozhodli jsme se stanovit plazmatické hladiny FGF23 u několika pacientů s renální insuficiencí a u dialyzovaných pacientů. Výsledky uvádí Tabulka 24.

Tabulka 24. FGF23 u renální insuficience a dialyzovaných pacientů

Stav	**FGF23 (pg/ml)**
Renální insuficience	**367**
Renální insuficience	**387**
Renální insuficience	**690**
Hemodialýza	**1587**
Hemodialýza	**>5000**

Plazmatická hladina FGF23 u všech těchto pacientů překonala hladiny FGF23 u generalizovaných kolorektálních karcinomů. Ke správnému hodnocení vysokých hladin FGF23 je tedy vždy nutné mít informaci o funkčním stavu ledvin.

Závěrem je tedy možné uvést, že plazmatická hladina FGF23 je statisticky významně vyšší u metastatických forem kolorektálního karcinomu. Klinickou využitelnost této informace je nutné ověřit na větším souboru pacientů.

6 Závěry pro klinickou praxi

Závěry disertační práce jsem rozdělil podle řešených problematik.

Závěry plynoucí z vyhodnocení souboru pacientů s karcinomemu žaludku:

- Multivariační regresní analýzou byl navržen algoritmus pro výpočet rizika karcinomu žaludku ve tvaru: **GCI = CEA * 0.6315 + 0.9344 * CA72-4 – Pepsinogen-I * 0.00217 + Helicobacter pylori * 0.0362 + MMP-7 * 0.00180.**
- Hodnoty AUC pro navržený GCI jsou jednoznačně vyšší (0.9553) než nejvyšší hodnota dosažená jednotlivým biomarkerem použitým v navrhovaném algoritmu, což byl CA 72-4 s hodnotou AUC=0.7758.
- Pokud bychom nepoužili k hodnocení souboru pacientů GCI, tak CA 72-4 stále zůstává nejlepším jednotlivým nádorovým markerem pro diagnostiku karcinomu žaludku.
- Snížená hladina pepsinogenu-I, vyšší hladina gastrinu a přítomnost Helicobacteru pylori jsou rizikové faktory vzniku karcinomu žaludku.
- Algoritmus pro výpočet rizika karcinomu žaludku GCI je potřeba ověřit na větším souboru pacientů.

Závěry plynoucí z vyhodnocení souboru pacientů s metastázami kolorektálního karcinomu:

- Cytokeratinové nádorové markery TPA a TPS je možné doporučit pro použití v diagnostice jaterních metastáz kolorektálního karcinomu
- Pokud bychom měli volit v diagnostickém použití mezi TPA a TPS, je vhodnější v případě metastáz kolorektálního karcinomu TPS.

- TPA a zejména pak TPS mohou ve většině případů dříve než často používaný CEA upozornit na možnou přítomnost metastázy a urychlit tak radikální léčebné řešení.
- Pokud zvolíme kombinovaný test CEA + cytokeratin, je vždy dosaženo lepších senzitivit než při použití samotného CEA.
- Nejvyšší senzitivity při detekci jaterních metastáz, téměř 100% je dosaženo při použití kombinace CEA a TPS. Pokud zvolíme cut-off, který byl vypočten pro jednotlivé testy samostatně, je nutné počítat se specificitou na úrovni 80%.
- Cytokeratinové markery, stejně jako CEA, nedokáží odlišit čistě jaterní metastázy od vícečetných metastáz v různých lokacích.

Závěry plynoucí z pilotní studie využití FGF23 v diagnostice kolorektálního karcinomu:

- Hodnoty FGF23 u kolorektálního karcinomu se statisticky významně liší od zdravé populace.
- Výrazně zvýšené hodnoty je možné nalézt u metastatických forem onemocnění.
- Využitelnost FGF23 k časnému záchytu metastáz bude nutné ověřit na větší skupině pacientů.

7 Perspektivy

Ze závěrů pro praxi vyplývá, že stále nalézáme nové možnosti využití biomarkerů v klinické praxi. Před zavedením metodik do rutinní praxe je nutné ověřit stávající poznatky na širších souborech pacientů.

8 Použitá literatura

Ahn SK, Moon HG, Ko E, et al. Preoperative serum tissue polypeptide-specific antigen is a valuable prognostic marker in breast cancer. Int J Cancer. 2013 Feb 15;132(4):875-81.

Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. Singapore Med J. 2014;55(12): 621–628.

Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol 2013; 24(Suppl. 6): 72–79.

Barak V, Frenkel S, Valyi-Nagy K, et al. Using the direct-injection model of early uveal melanoma hepatic metastasis to identify TPS as a potentially useful serum biomarker. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Oct;48(10):4399-402.

Beart RW, Melton LJ III, Maruta M, et al. Trends in right and left-sided colon cancer. Dis Colon Rectum 1983;26:393-8.

Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, et al. Histopathology reporting in large bowel cancer. J Clin Pathol 1981;34:509-13.

Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. Ann Intern Med 1990;113:779-88.

Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. J Med Genet 1999;36:873-80.

Charvat H, Sasazuki S, Inoue M, et al. Prediction of the 10-year probability of gastri cancer occurrence in the Japanese population: the JPHC study cohort II. Int J Cancer 2015;138:320-331.

Chen T, Sun L, He C, et al. Serum OPN expression for identification of gastric cancer and atrophic gastritis and its influencing factors. PLoS One 9: e114005, 2014.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. Histopathology 2002;40:403-39.

Colquhoun A, Arnold M, Ferlay J, et al. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. Gut. 2015;64(12):1881-8.

Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? Dig Dis 1999;17:67-79.

Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. Arch Pathol Lab Med 2000;124:1016-25.

Cremolini C, Loupakis F, Masi G, et al. FOLFOXIRI/bevacizumab versus FOLFIRI/ bevacizumab as first-line treatment in unresectable metastatic colorectal cancer: results of phase III TRIBE trial by GONO Group. Ann Oncol 2014; 24(Suppl 4): abstr O-0026

D'Amico L, Satolli MA, Mecca C, et al. Bone metastases in gastric cancer follow a RANKL-independent mechanism. Oncol Rep 2013;29:1453-1458.

de Haas EC, di Pietro A, Simpson KL, et al. Clinical evaluation of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer. Neoplasia 2008;10(10):1041-1048.

Dominello M, Bowers J, Zaki M, Konski A: Radiotherapy and radioembolization for liver metastases. Ann Palliat Med 2014; 3(2): 104-113.

Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. Int J Cancer 2014;134(11): 2513-2522.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer 2013;49:1374-1403.

Fernandes LC, Kim SB, Matos D: Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging and prognosis of colorectal adenocarcinoma. World J Gastroenterol 2005;11(5):645-648.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF , Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol 2012;3(3):153-173.

Fletcher RH. Successfull colorectal cancer screening starts with primary care. Rev. Gastroenterol. Disord 2002; 2(1): 27–34.

Folprecht G, Grothey A, Alberts S, et al. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. Ann Oncol 2005; 16:1311.

Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, et al. Liver resection for colorectal metastases. J Clin Oncol 1997;15:938-946.

Fujiyama S, Morishita T, Hashiguchi O and Sato T. Plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. Cancer 1988; 61: 1621-1628.

Gialeli C, Theocharis AD and Karamanos NK: Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J 2011; 278: 16-27.

Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010:134-46.

Han X, Quarles LD. Multiple faces of fibroblast growth factor-23. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2016 Jul;25(4):333-42.

Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. J Clin Oncol 2005;23:8671- 8678.

Hara M, Sato M, Takahashi H, Takayama S, Okada Y, Nagasaki T, Takeyama H. Carcinoembryonic antigen elevation in post-hepatectomy patients with colorectal cancer liver metastasis indicates recurrence with high accuracy. Hepatogastroenterology. 2013 Nov-Dec;60(128):1935-9.

Hwang SW, Lee DH, Lee SH, et al. Preoperative staging of gastric cancer by endoscopic ultrasonography and multidetector-row computed tomography. J Gastroenterol Hepatol 2010;25:512-8.

Jacobs E, Martinez ME, Buckmeier J, Lance P, May M, Jurutka P. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with increased risk for metachronous colorectal adenoma. J Carcinog. 2011 Feb 12;10:3.

Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. Histopathology 1986;10:437-59.

Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. Cancer Causes Control. 2013 June ; 24(6): 1207–1222.

Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. Mod Pathol 2004;17:1392-9.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. J Clin Oncol 2006 ;24(14):2137-2150.

Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(5):700–713.

Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. Br J Cancer 2001;84:400-5.

Kim JH, Jun KH, Jung H, et al. Prognostic Value of Preoperative Serum Levels of Five Tumor Markers (Carcinoembryonic Antigen, CA19-9, Alpha-fetoprotein, CA72-4, and CA125) in Gastric Cancer. Hepatogastroenterology 2014;61:863-869.

Kim MC, Yook JH, Yang HK, et al. Long-Term Surgical Outcome of 1057 Gastric GISTs According to 7th UICC/AJCC TNM System: Multicenter Observational Study From Korea and Japan. Medicine (Baltimore) 94(41): e1526, 2015.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classi cation. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64:31-49.

Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY. Gastric carcinoma. In: Bowman FT, Carneiro F, Hruban RH, eds. Classi cation of Tumours of the Digestive System. Lyon:IARC;2010.

Leaf DE, Pereira RC, Bazari H, Jüppner H. Oncogenic osteomalacia due to FGF23-expressing colon adenocarcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Mar;98(3):887-91.

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. J Natl Cancer Inst Monogr 2008:1-93.

Lumachi F, Marino F, Orlando R, Chiara GB, Basso SM. Simultaneous multianalyte immunoassay measurement of five serum tumor markers in the detection of colorectal cancer. Anticancer Res. 2012 Mar;32(3):985-8.

Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. Obstet Gynecol 2011;118: 280-288.

Nekulová M, Simícková M, Pecen L, et al. Early diagnosis of breast cancer dissemination by tumor markers follow-up and method of prediction, Neoplasma 1994;41(2):113-8.

Ogino S, Goel A. Molecular classi cation and correlates in colorectal cancer. J Mol Diagn 2008;10:13-27.

Ogiso S, Hatano E, Nomi T, Uemoto S. Laparoscopic liver resection: Toward a truly minimally invasive approach. World J Gastrointest Endosc 7(3): 159-161, 2015.

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, et al. Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst 1991;83:640-3.

Petrelli NJ. Plenary program discussion. 43rd annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, Illinois, June 4, 2007

Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, et al. Prognostic value of Laurén classi cation and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. Ann Surg Oncol 1999;6:290-7.

Romero-Ventosa EY, Blanco-Prieto S, González-Piñeiro AL, et al. Pretreatment levels of the serum biomarkers CEA, CYFRA 21-1, SCC and the soluble EGFR and its ligands EGF, TGF-alpha, HB-EGF in the prediction of outcome in erlotinib treated non-small-cell lung cancer patients. Springerplus. 2015 Apr 9;4:171.

Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin 2011;61:212-36.

Smalley SR, Benedetti JK, Haller DH, et al. Updated Analysis of SWOG-Directed Intergroup Study 0116: A Phase III Trial of Adjuvant Radiochemotherapy Versus Observation After Curative Gastric Cancer Resection. J Clin Oncol 2012;30(19): 2327-2333.

Smid D, Skalicky T, Dolezal J, Kubackova D and Fichtl J: Surgical treatment of gastric cancer. Bratisl Lek Listy 2015;116: 666-670.

Yang AP, Liu J, Lei HY, et al. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CAl9-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer. Clin Chim Acta 2014;437: 183-186.

Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development. Nature. 2017 May 11;545(7653):224-228.

Zdravotnická ročenka ČR 2015. ÚZIS, 2016; ISSN 1210-9991.

Práce autora

Safanda M, Kucera R, Topolcan O. Insulin like Growth Factors (IGFS) System and Tumors. Plzeň. Lék. Sborn., 2016;82:17-23.

Kucera R, Smid D, Topolcan O, Karlikova M, Fiala O, Slouka D, Skalicky T, Treska V, Kulda V, Simanek V, Safanda M, Pesta M. Searching for New Biomarkers and the Use of Multivariate Analysis in Gastric Cancer Diagnostics. Anticancer Res. 2016 Apr;36(4):1967-71.

Kucera R, Topolcan O, Fiala O, Kinkorova J, Treska V, Zedníková I, Slouka D, Simanek V, Safanda M, Babuska V. The Role of TPS and TPA in the Diagnostics of Distant Metastases. Anticancer Res. 2016 Feb;36(2):773-7.

Holubec L, Polivka J, Lisnerova L, Kubikova T, Safanda M. The Effectiveness of Febrile Neutropenia Prophylaxis with Lipegfilgrastim in Routine Clinical Practice. In Vivo. 2017 May-Jun;31(3):303-306. Review.

Holubec L, Polivka J Jr, Safanda M, Karas M, Liska V. The Role of Cetuximab in the Induction of Anticancer Immune Response in Colorectal Cancer Treatment. Anticancer Res. 2016 Sep;36(9):4421-6. Review.

Mądry R, Popławska L, Haslbauer F, Šafanda M, Ghizdavescu D, Benkovicova J, Csőszi T, Mihaylov G, Niepel D, Jaeger C, Frkanova I, Macovei A, Staudigl C. Results of a prospective dose intensity and neutropenia prophylaxis evaluation programme (DIEPP) in cancer patients at risk of febrile neutropenia due to myelosuppressive chemotherapy. Wien Klin Wochenschr. 2016 Apr;128(7-8):238-47.

Kubackova K, Melichar B, Bortlicek Z, Pavlik T, Poprach A, Svoboda M, Lakomy R, Vyzula R, Kiss I, Dusek L, Prausova J, Buchler T; Czech Renal Cancer Cooperative Group. Comparison of Two Prognostic Models in Patients with Metastatic Renal Cancer Treated with Sunitinib: a Retrospective, Registry-Based Study. Target Oncol. 2015 Dec;10(4):557-63.

Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. Lancet. 2013 Mar 9;381(9869):805-16. Erratum in: Lancet. 2013 Mar 9;381(9869):804.

Oliverius M, Safanda M, Petruzelka L. Treatment of colorectal liver metastases: a current view. Klin Onkol. 2010;23(2):73-7. Review.

Varga M, Oliverius M, Valsamis A, Kucera M, Gürlich R, Safanda M, Matia I, Honsová E. Pancreatic resection for metastatic renal cell carcinoma. Klin Onkol. 2009;22(6):288-90.
Varga M, Valsamis A, Matia I, Peregrin J, Honsová E, Safanda M, Oliverius M. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. Rozhl Chir. 2009 Aug;88(8):434-8. Czech.

Janku F, Pribylova O, Zimovjanova M, Pazdrova G, Safanda M, Zemanova M, Petruzelka L. 4-years results of weekly trastuzumab and paclitaxel in the treatment of women with HER2/neu overexpressing advanced breast cancer: single institution prospective study.
Bull Cancer. 2004 Oct 1;91(10):E279-83. Print 2004 Oct.

Honová H, Safanda M, Petruzelka L, Burian J, Marek M, Rejchrt J, Sus F, Tovarys F, Dbalý V, Honzátko J, Tomandl I, Mares V. Neutron capture therapy in the treatment of glioblastoma multiforme. Initial experience in the Czech Republic. Cas Lek Cesk. 2004;143(1):44-7.