

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**S100 proteiny u idiopatických střevních zánětů
a kolorektálních neoplázií**

Paula Morávková

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Vnitřní nemoci

Hradec Králové

2019

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na Katedře interních oborů Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

- Autor: MUDr. Paula Morávková
II. interní gastroenterologická klinika Lékařské fakulty UK v Hradci Králové
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
- Školitel: doc. MUDr. Darina Kohoutová, Ph.D.
II. interní gastroenterologická klinika Lékařské fakulty UK v Hradci Králové
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
The Royal Marsden Hospital NHS Foundation Trust, Londýn
- Školitel konzultant: prof. MUDr. Jan Bureš, CSc., FCMA
II. interní gastroenterologická klinika Lékařské fakulty UK v Hradci Králové
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Katedra interních oborů, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové
- Oponenti: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.
II. interní klinika – gastroenterologická a geriatrická Lékařské fakulty UP
Fakultní nemocnice Olomouc
- prof. MUDr. Miroslav Zavoral, Ph.D.
Interní klinika 1. Lékařské fakulty UK a ÚVN
Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Vnitřní nemoci dne 27.6.2019 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, budova č.23, 3. podlaží, učebna 3.212 od 13:30 hod.

Tato práce vznikla s podporou grantu IGA MZ 13413, Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260396) Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a s podporou výzkumného projektu PROGRES Q40-15 Univerzity Karlovy.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Jan Bureš, CSc., FCMA
předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Vnitřní nemoci
Garant studijního programu

Obsah

1. Souhrn	3
2. S100 proteins in inflammatory bowel disease and colorectal neoplasia	4
3. Úvod do problematiky	5
3.1. Sporadický kolorektální karcinom	5
3.2. Idiopatické střevní záněty	6
3.3. Proteiny S100	7
4. Cíle disertační práce	8
4.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů	8
4.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty	8
4.1.2. Určit diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4 v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů	8
4.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií	9
4.2.1. Určit asociaci proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P) s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií	9
4.2.2. Stanovit pozitivní a negativní prediktivní hodnotu proteinů S100 u kolorektálních neoplázií a určit možné klinické využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií	9
5. Materiál a metodika	9
5.1. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100A4	9
5.2. Charakteristika souboru pro stanovení proteinů S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11	10
5.3. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100P	10
5.4. Odběr vzorků a stanovení sérové koncentrace proteinů S100	11
5.5. Informovaný souhlas a Etická komise	12
5.6. Statistické zpracování a hodnocení	12
6. Výsledky	12
6.1. Protein S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty	12
6.2. Protein S100A6	13
6.3. Proteiny S100A8 a S100A9	14
6.4. Protein S100A11	14
6.5. Protein S100P u pacientů s kolorektálním karcinomem	15

7. Diskuse	16
7.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů	16
7.2. Proteiny S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 u kolorektálních neoplázií	17
7.3. Protein S100P a kolorektální karcinom	19
8. Závěry	21
8.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů	21
8.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty	21
8.1.2 Diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4 v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů	21
8.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií	21
8.2.1. Asociace proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P) s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií	21
8.2.2. Stanovení pozitivní a negativní prediktivní hodnoty proteinů S100 u kolorektálních neoplázií a určení možného klinického využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií	22
Použitá literatura	22
Přehled publikační činnosti autora	27

1. Souhrn

Idiopatické střevní záněty a kolorektální karcinom představují v celosvětovém měřítku závažný medicínsky a socio-ekonomický problém. I přes významný pokrok v diagnostice těchto onemocnění v současné době není dostupný specifický sérový marker, který by umožnil detekci rizikových skupin pacientů. Naše práce hodnotila význam vybraných proteinů S100 v séru pacientů s idiopatickými střevními záněty a kolorektálními neopláziemi. Práce byla rozdělena do třech částí, které hodnotily (1) asociaci sérové koncentrace proteinu S100A4 s idiopatickými střevními záněty, ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou; (2) asociaci sérové koncentrace proteinu S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 s kolorektálními neopláziemi a (3) asociaci sérové koncentrace proteinu S100P s kolorektálním karcinomem. Celkem bylo zahrnuto 253 osob: 40 jedinců ve skupině kontrol, 16 pacientů s ulcerózní kolitidou, 93 pacientů s Crohnovou chorobou, 20 pacientů s nepokročilým kolorektálním adenomem, 22 pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem a 62 pacientů s kolorektálním karcinomem. Potvrdili jsme významně vyšší sérové koncentrace S100A4 proteinu u pacientů s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou. Pacienti s Crohnovou chorobou vykazovali významně vyšší sérové koncentrace S100A4 ve skupině s izolovaným kolonickým a ileokolonickým postižením ve srovnání s izolovaným postižením ilea. Neprokázáli jsme asociaci sérových koncentrací proteinu S100A4 s fibrostenózní formou Crohnovy choroby a/nebo přítomností perianálního postižení. Práce potvrdila významně nižší sérové koncentrace proteinu S100A6 a S100A11 u pacientů s kolorektálním karcinomem. Sérové koncentrace proteinu S100A8 a S100P byly u pacientů s kolorektálním karcinomem významně vyšší. Potvrdili jsme významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100P u pacientů s kolorektálním karcinomem v klinickém stadiu IV a u karcinomů se středním stupněm diferenciací. Naše práce dokládá asociaci vybraných proteinů S100 s idiopatickými střevními záněty a kolorektálním karcinomem.

2. S100 proteins in inflammatory bowel disease and colorectal neoplasia

Inflammatory bowel disease and colorectal cancer represent serious medical and socio-economic problems worldwide. Despite a significant progress in the diagnostic of both disease has been made, there is no specific serum maker, which would allow to detect a risk group of patients. Our paper focused on importance of serum S100 proteins in inflammatory bowel disease and colorectal neoplasia: (1) association of serum S100A4 with inflammatory bowel disease, ulcerative colitis and Crohn's disease, (2) association of serum S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 with colorectal neoplasia and (3) association of serum S100P with colorectal cancer. A total of 253 subjects were enrolled: 40 healthy controls, 16 patients with ulcerative colitis, 93 patients with Crohn's disease, 20 patients with non-advanced colorectal adenoma, 20 patients with advanced colorectal adenoma and 62 patients with colorectal cancer. We confirmed a significantly higher serum concentrations of S100A4 protein in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. In Crohn's disease, serum S100A4 was significantly higher in patients with colonic and ileocolonic involvement. We did not confirm association of serum S100A4 with fibrostenosing phenotype of Crohn's diseases and with perianal involvement. Our study showed a significantly lower serum S100A6 and S100A11 and significantly higher S100A8 and S100P in patients with colorectal cancer. Serum S100P was significantly higher in patients with colorectal cancer in the clinical stage IV and in moderately-differentiated tumours. Association of selected S100 proteins with inflammatory bowel disease and colorectal cancer was confirmed.

3. Úvod do problematiky

3.1. Sporadický kolorektální karcinom

Sporadický kolorektální karcinom (CRC) představuje v celosvětovém měřítku třetí nejčastější nádorové onemocnění u mužů (po karcinomu plic a prostaty) a druhé nejčastější nádorové onemocnění u žen (po karcinomu prsu) [1]. V České republice je uváděná roční incidence 79/100 tisíc (přibližně 8000 nově diagnostikovaných pacientů ročně, 95/100 tisíc u mužů, 64/100 tisíc u žen) a mortalita 38/100 tisíc (45/100 tisíc u mužů, 31/100 tisíc u žen) [2]. Dostupná statistická data poukazují na pokles incidence a mortality kolorektálního karcinomu, který mezi lety 2003–2014 představoval 16 % v případě incidence kolorektálního karcinomu a v případě mortality kolorektálního karcinomu došlo k poklesu o 37,7 % [3].

Fearon a Vogelstein v roce 1990 definovali sekvenci adenom → karcinom jako genetický model přeměny normální sliznice tlustého střeva v nádorovou tkáň, podle kterého jsou určité fáze transformace epitelu tlustého střeva přímým důsledkem konkrétních mutací [4]. Základní mutaci, která indukuje proces karcinogeneze u většiny sporadických kolorektálních karcinomů, představuje mutace v APC genu. APC gen (adenomatous polyposis coli) patří mezi tumor supresorové geny. Jeho produktem je bílkovina, která po vazbě s Axin/Axin-2 a GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β) vytváří komplex, který zajišťuje ubikvitinaci β -kateninu. Ubikvitinace je proces, při kterém se pomocí ubikvitinačního komplexu označí konkrétní bílkovina určená k degradaci. Somatická mutace APC genu v oblasti kodonu 1271-1256 (tzv. mutation cluster region – MCR) má za následek snížení degradace β -kateninu, který je následně translokován do buněčného jádra, kde indukuje transkripci protoonkogenů cyclin-D1 a c-Myc, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy [5, 6]. Progrese adenomu a následný vznik kolorektálního karcinomu jsou velmi pomalé (zdvojovací čas karcinomu je 620 dní), jedná se o mnohastupňový proces, ve kterém se kromě aktivace Wnt/ β -kateninové signální dráhy uplatňuje rovněž kumulace dalších mutací a epigenetických změn vedoucích k ovlivnění intracelulárních signálních drah jako jsou p53, Ras-Raf-MAPK, PI3KCA a TGF- β /Smad signální dráha [7]. Souhrnně se tyto změny dělí do třech základních typů označovaných jako:

(1) chromozomální nestabilita (CIN) – vede ke strukturálním a numerickým změnám chromozomů, které zahrnují chromozomální a subchromozomální aberace nebo amplifikace a ztrátu heterozygosity (LOH – loss of heterozygosity), která je zjištěná až u 3/4 sporadických kolorektálních karcinomů na chromozomech 5q, 17q nebo 18q [8]; je důsledkem řady mutací vznikajících v průběhu růstu adenomu. Klíčovými geny vedoucími k chromozomální

nestabilitě jsou mutace v oblasti tumor supresorových genů jako APC, TP53, TGFBR2 a Smad4 a protoonkogenů KRAS, BRAF a PI3KCA [8, 9].

(2) nestabilita mikrosatelitů (MSI) – je odrazem defektní funkce MMR systému (mismatch repair proteinů), které za normálních okolností zajišťují opravy drobných chyb vzniklých při replikaci DNA a u sporadického kolorektálního karcinomu vznikají jako důsledek somatické mutace hlavních komponent tohoto systému. Defektní systém mismatch repair proteinů pak není schopen opravy v oblasti mikrosatelitních lokusů, a to vede k narušené syntéze nebo úplnému zastavení syntézy produktu takto postiženého genu [7].

(3) CpG metylace – CpG (5'- cytozin – fosfát – guanin – 3') představují dinukleotidové sekvence, které jsou u více než poloviny genů lokalizovány obvykle na jejich 5'-konci, kde jsou označovány jako CpG ostrůvky [10, 11]. Hypermetylace CpG ostrůvku uvnitř promotoru tumor supresorového genu vede k jeho inaktivaci.

V patogeneze kolorektálního karcinomu hraje klíčovou roli střevní mikrobiom. Bakterie mohou ovlivňovat střevní prostředí svými enzymatickými aktivitami, produkcí metabolitů jak s prokancerogenními, tak i antikancerogenními účinky, dále syntézou nebo aktivací prokancerogenů (nitrosaminy a další N-nitroso-sloučeniny), ovlivněním biotransformace xenobiotik či přímým působením na sliznici tlustého střeva [12]. Obecně lze konstatovat, že nežádoucí jsou především bakterie, které svými metabolickými aktivitami mění primární žlučové kyseliny na sekundární nebo bakterie, které jsou schopny měnit sulfáty na sirovodík [12]. V klinické praxi u každého pacienta s nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem určujeme stupeň histologické diferenciaci karcinomu, grading a rozsah postižených tkání karcinomem, staging, který je posuzován na základě TNM klasifikace, která určuje hloubku invaze primárního tumoru (T-tumor), postižení regionálních lymfatických uzlin (N-nodus) a přítomnost vzdálených metastáz (M-metastáza) [13]. Přesné stanovení stagingu kolorektálního karcinomu vede k určení klinického stadia. Rozsah karcinomu a jeho histologická diferenciaci patří mezi základní kritéria, podle kterých je zvolena léčebná strategie a určena prognóza nemocného. V potaz je třeba dále vzít celkový stav pacienta, jeho věk a preference.

3.2. Idiopatické střevní záněty

Idiopatické střevní záněty (IBD) jsou neinfekční chronická zánětlivá střevní onemocnění neznámé etiologie způsobené imunologickou dysregulací. Patří mezi ně ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD). Etiopatogeneze idiopatických střevních zánětů je multifaktoriální. U geneticky predisponovaného jedince dochází vlivem faktorů zevního prostředí k narušení

rovnováhy a bariérových slizničních mechanismů, a k abnormální imunologické odpovědi, což má za následek vznik zánětlivé reakce v trávicím traktu. Je přítomna vystupňovaná imunologická reakce na střevní mikrobiom, který u pacientů s idiopatickými střevními záněty vykazuje známky nestability. Následná nadprodukce zánětlivých cytokinů (IL-6, IL-1 β , TNF, IL-18) buňkami vrozené imunity vede k diferenciaci naivních T-lymfocytů na efektorové: Th1 lymfocyty (predominantně u Crohnovy choroby), Th2 lymfocyty (predominantně u ulcerózní kolitidy), Th9 lymfocyty, Th17 lymfocyty (detekovány jak u ulcerózní kolitidy i u Crohnovy choroby) a regulační T-lymfocyty (produkující protizánětlivé cytokiny IL-10, TGF- β) [14]. Produkce zánětlivých cytokinů T-lymfocyty přispívá nejen k udržení lokální zánětlivé reakce, ale produkované cytokiny působí chemotakticky na další imunitní buňky, což má za následek jejich přestup do místa zánětu ze systémové cirkulace a vede k další stimulaci zánětlivé reakce a poškození postižené tkáně [15].

V klinické praxi používáme k popisu Crohnovy choroby mezinárodně uznávanou Montrealskou klasifikaci, která popisuje věk v době diagnózy (A – age), lokalizaci (L – location) a chování Crohnovy choroby (B – behaviour) [16]. Význam klasifikace spočívá především k odhalení vysoce rizikových skupin pacientů s Crohnovou chorobou určených k časnému zahájení imunosupresivní nebo biologické léčby.

3.3. Proteiny S100

Proteiny S100 představují skupinu malých bílkovin s molekulovou hmotností 9-13 kDa. Patří do rodiny tzv. EF-hand proteinů. Základní strukturální jednotkou je EF-hand motiv, který je složený ze dvou α -helixů „E“ (schopného vázat vápenaté ionty) a „F“. Název skupiny proteinů S100 je odvozen od jejich rozpustnosti ve 100% roztoku síranu amonného při neutrálním pH [17]. Zvláštní postavení proteinů S100 uvnitř EF-hand rodiny je určeno vlastnostmi, které je odlišují od ostatních EF-hand proteinů:

- **struktura:** zatímco oba α -helixy EF-hand proteinů jsou tvořeny 12 aminokyselinami, u proteinů S100 je tento počet zachován pouze u jednoho helixu, který je označován jako C-konec (kanonický – „cannonical“), který váže ionty vápníku stejným způsobem jako ostatní EF-hand proteiny [18]. Druhý, označovaný jako N-konec (pseudokanonický – „pseudo-cannonical“) je tvořený 14 aminokyselinami. Ten je schopen vazby s ionty vápníku obvykle s nižší afinitou ve srovnání C-terminálním koncem, která vede ke konformačním změnám uvnitř daného proteinu S100 [19].

- **dimerizace:** proteiny S100 vytvářejí obvykle homodiméry. Některé proteiny S100 jsou schopny tyto podjednotky navzájem mezi sebou s různým stupněm afinity vyměňovat a vytvářet tak různě stabilní heterodiméry (S100A8/S100A9).
- **exprese:** proteiny S100 se vyskytují výhradně u obratlovců, jejich exprese je specifická nejen v závislosti na konkrétní tkáni, ale je specifická i buněčně a mnohdy i v závislosti na buněčném cyklu [19, 20]
- **schopnost vazby s ionty vápníku:** zatímco se EF hand proteiny podílejí výhradně na intracelulární transdukcii vápníku, proteiny S100 jsou schopny zprostředkovávat vápníkovými ionty indukované signály i mimo buňku [20]

Schopnost vazby s vápenatými ionty umožňuje proteinům S100 vstupovat do řady procesů uvnitř buňky i extracelulárně. Intracelulárně se podílejí na regulaci kalciové homeostázy, buněčného cyklu, vstupují do procesů buněčného růstu a diferenciaci. Extracelulárně se proteiny S100 podílejí zejména na regulaci buněčné migrace. Santamaria-Kisiel ve své práci dělí kalcium-dependentní funkce proteinů S100 do pěti základních oblastí: (a) regulace fosforylace zprostředkované pomocí proteinkináz, (b) modulace enzymatické aktivity, (c) regulace buněčné motility a tvaru buňky, (d) ovlivňování signálních drah, (e) udržování kalciové homeostázy [20]. Zatímco existuje celá řada cílových receptorů pro jednotlivé proteiny S100, obráceně platí, že jeden a ten samý receptor je receptorem pro více jednotlivých S100 proteinů. Vzájemná interakce se navzájem liší místem vazby proteinu S100 na daný receptor a následně typem indukované signální dráhy. Tento typ reakce navíc podléhá tkáňové a buněčné specifitě působení proteinu S100.

4. Cíle disertační práce

4.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů

4.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty

Nulová hypotéza: sérové koncentrace S100A4 pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou se neliší od zdravých kontrolních osob.

Předpoklad: nulovou hypotézu bude možno zamítnout.

4.1.2. Určit diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4 v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů

Nulová hypotéza: Sérové koncentrace S100A4 nelze využít v predikci fenotypů a tíže Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy.

Předpoklad: nulovou hypotézu bude možno zamítnout.

4.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií

4.2.1. Určit asociaci proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P) s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií

Nulová hypotéza: Není asociace mezi jednotlivými S100 proteiny a kolorektálními neopláziemi.

Předpoklad: nulovou hypotézu bude možno zamítnout.

4.2.2. Stanovit pozitivní a negativní prediktivní hodnotu proteinů S100 u kolorektálních neoplázií a určit možné klinické využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií

5. Materiál a metodika

Pro stanovení jednotlivých proteinů S100 byly vybrány tři soubory: pacienti s kolorektální neoplázií, nemocní s idiopatickým střevním zánětem (ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou) a kontrolní zdravé osoby s normálním nálezem při koloskopii. Celkem bylo zahrnuto 253 osob: 40 jedinců ve skupině kontrol, 16 pacientů s ulcerózní kolitidou, 93 nemocných s Crohnovou chorobou, 20 osob s nepokročilým kolorektálním adenomem, 22 pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem a 62 nemocných s kolorektálním karcinomem. Do skupiny kontrol byly zařazeny zdravé osoby s normálním koloskopickým nálezem. Tito jedinci měli negativní osobní anamnézu kolorektální neoplázie a idiopatických střevních zánětů a patřili do populace s průměrným rizikem pro vznik kolorektálního karcinomu.

5.1. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100A4

Soubor pro měření proteinu S100A4 zahrnoval celkem 118 osob, které byly rozděleny do tří skupin: kontrolní skupina, která zahrnovala 9 osob (2 muži, 7 žen ve věku 23-74 let, průměr 52 ± 17), skupina s Crohnovou chorobou, která zahrnovala 93 pacientů (44 mužů, 49 žen ve věku 22-79 let, průměr 44 ± 14) a skupina s ulcerózní kolitidou, která zahrnovala 16 nemocných (8 mužů, 8 žen ve věku 20-74, průměr 39 ± 15). Osoby v kontrolní skupině měly normální koloskopický nález, negativní osobní anamnézu idiopatických střevních zánětů a kolorektální neoplázie. Délka trvání ulcerózní kolitidy byla 3-18 let, průměr 10 ± 4 . Všichni pacienti s ulcerózní kolitidou užívali preparáty kyseliny 5-aminosalicylové (mesalazin), z nichž tři

pacienti užívali současně imunosupresivní léčbu – azathioprin. Žádný z pacientů s ulcerózní kolitidou nebyl léčený blokátory tumor nekrotizujícího faktoru α (anti-TNF- α). Trvání Crohnovy choroby bylo 1-39 let, průměr 15 ± 9 . Tři pacienti s Crohnovou chorobou byli v době vyšetření bez farmakoterapie, 46 nemocných bylo léčeno kyselinou 5-aminosalicylovou a 44 osob užívalo imunosupresivní léčbu (systémové glukokortikoidy a/nebo azathioprin a/nebo protilátky proti tumor nekrotizujícímu faktoru α a/nebo cyklosporin). Celkem 18 % (17/93) pacientů s Crohnovou chorobou bylo léčeno blokátory TNF- α : 4 nemocní byli léčeni adalimumabem a 13 osob infliximabem. V době odběru bylo šest pacientů ze skupiny s Crohnovou chorobou léčeno antibiotiky (ciprofloxacinem a/nebo metronidazolem): jeden nemocný ze skupiny léčené mesalazinem a pět osob s konkomitantní imunosupresivní léčbou. Pacienti s Crohnovou chorobou byli klasifikováni dle Montrealské klasifikace [16] a rozděleni do jednotlivých podskupin dle chování a lokalizace nemoci.

5.2. Charakteristika souboru pro stanovení proteinů S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11

V souboru pro stanovení sérových koncentrací proteinů S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 bylo zařazeno celkem 84 jedinců. Byli rozděleni do čtyř skupin: skupina kontrol, která zahrnovala 20 osob (7 mužů a 13 žen ve věku 23-74 let, průměr 55 ± 14), 20 pacientů s nepokročilým adenomem (10 mužů a 10 žen ve věku 41-82 let, průměr 62 ± 11), 22 nemocných s pokročilým adenomem (15 mužů a 7 žen ve věku 49-80 let, průměr 64 ± 8) a 22 pacientů s kolorektálním karcinomem (12 mužů a 10 žen ve věku 49-86 let, průměr 69 ± 10). Osoby zahrnuté v kontrolní skupině měly v době odběru normální koloskopický nález, negativní anamnézu kolorektální neoplázie a idiopatického střevního zánětu. Všichni patřili do populace s průměrným rizikem vzniku kolorektálního karcinomu. Kritériem pro zařazení do skupiny s kolorektální neoplázií byl aktuální nález neoplázie při koloskopii a/nebo toto onemocnění v osobní anamnéze. Pokročilý adenom byl definován jako jakýkoliv adenom velikosti ≥ 10 mm a/nebo jakýkoliv kolorektální adenom s potvrzeným vysokým stupněm intraepiteliální neoplázie a/nebo histologicky potvrzenou vilózní komponentou [21].

5.3. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100P

Soubor pacientů pro stanovení sérové koncentrace proteinu S100P zahrnoval celkem 79 jedinců, kteří byli rozděleni do skupiny kontrol a skupiny s kolorektálním karcinomem. Kontrolní skupina zahrnovala 36 zdravých jedinců (14 mužů, 22 žen ve věku 23-80 let, průměr 55 ± 14), které měli normální koloskopický nález, negativní osobní anamnézu kolorektální neoplázie a/nebo idiopatického střevního zánětu a patřili do populace s průměrným rizikem

kolorektálního karcinomu. Skupina s kolorektálním karcinomem zahrnovala 43 pacientů (20 mužů a 23 žen ve věku 46-86 let, průměr 67±11). Podíl nemocných ve skupině s kolorektálním karcinomem lokalizovaným v pravé části tračníku představoval 30 % (13/43). Pacienti s karcinomem v levé části tračníku tvořili 70 % (30/43) všech pacientů s kolorektálním karcinomem. Za hranici mezi pravým a levým tračníkem byla považovaná lienální flexura. Pacienti s kolorektálním karcinomem byli klasifikováni dle TNM klasifikace, NCCN guidelines version 4.2018 a stupně diferenciac (gradingu) tumoru [13]. Stupeň diferenciac byl hodnocen u 74 % (32/43) pacientů z chirurgického resektátu, 19 % (8/43) nemocných nebylo indikovaných k radikální chirurgické resekcii a stupeň diferenciac byl u těchto pacientů hodnocen z odebraných bioptických vzorků. U 7 % (3/43) pacientů nebyl stupeň diferenciac karcinomu z odebraných bioptických vzorků primárně hodnotitelný: u dvou osob došlo po neoadjuvantní léčbě ke kompletní regresi karcinomu a v resektčním materiálu karcinom nebyl přítomný, u jednoho pacienta byl v resektátu popsán středně diferencovaný kolorektální karcinom v terénu pilovitého adenomu. Tito tři nemocní ze skupiny s kolorektálním karcinomem nebyli do jednotlivých subanalýz dle gradingu onemocnění zahrnuti. Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem dle gradingu přítomného karcinomu jednotlivé podskupiny zahrnovaly 11 % (5/43) nemocných s dobře diferencovaným karcinomem (G1), 56 % (24/43) se středně diferencovaným karcinomem (G2) a 26 % (11/43) s nízkým stupněm diferenciac (G3). U 7 % (3/43) nebyl stupeň diferenciac hodnotitelný (viz výše). Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem podle stagingu onemocnění jednotlivé podskupiny zahrnovaly 21 % (9/43) nemocných v klinickém stadiu I, 16 % (7/43) v klinickém stadiu II, 30 % (13/43) v klinickém stadiu III a 30 % (13/43) v klinickém stadiu IV. Do subanalýzy podskupin dle klinického stadia kolorektálního karcinomu nebyl zařazen jeden pacient, u kterého v době statistického zpracování nebylo možné dle dostupných zobrazovacích metod přesné určení klinického stadia.

5.4. Odběr vzorků a stanovení sérové koncentrace proteinů S100

Sérové koncentrace jednotlivých proteinů S100 byly stanoveny ze vzorků periferní žilní krve, která byla odebrána při zavádění periferní žilní kanyly před diagnostickou a/nebo terapeutickou koloskopií na oddělení endoskopií II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky pro stanovení proteinů S100A4, S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 byly ihned po odběru transportovány na Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zde byly vzorky centrifugovány (2000 otáček/minutu po dobu 10 minut) a

získaná séra byla uskladněna při -80°C až do stanovení. Vzorky periferní žilní krve pro měření proteinu S100P byly ihned po odběru transportovány na Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zde byla provedena centrifugace vzorků (2500 otáček/minutu po dobu 15 minut) a získaná séra byla uskladněna při -30°C do doby stanovení. Stanovení sérových koncentrací proteinů S100 bylo provedeno metodou ELISA za použití souprav Human Protein S100-A4 ELISA Kit (MyBio Source, San Diego, Kalifornie, USA), ELISA Kit for Calcium Binding Protein A6/S100A6, A8/S100A8, A9/S100A9, A11/S100A11 (Wuhan USCN, Čína) a CircuLex S100P ELISA Kit CY-8060 (CycLex Co., Nagano, Japonsko).

5.5. Informovaný souhlas a Etická komise

Všechny osoby zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas, projekt byl schválený Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Realizace studie a zpracování získaných dat bylo provedeno v souladu s Metodickým návodem Ministerstva zdravotnictví České republiky (*k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírkou o péči o zdraví lidu v platném znění*).

5.6. Statistické zpracování a hodnocení

Získané výsledky měření proteinů S100A4, S100A8, S100A9, S100A11 a S100P byly hodnoceny metodami popisné statistiky. Skupiny s normální distribucí dat byly porovnány pomocí parametrického nepárového t-testu. Skupiny s nenormální distribucí dat byly hodnoceny neparametrickým Mann-Whitneyovým testem. Ke statistickému zpracování byl použitý statistický software STATISTICA, verze 13, 2013, Tulsa, OK, USA a statistický software SigmaStat, verze 3.1., Jandel Corp., Erkrath, Německo.

6. Výsledky

6.1. Protein S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty

Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml) byly sérové koncentrace proteinu S100A4 signifikantně vyšší jak u pacientů s ulcerózní kolitidou (průměr 159 ± 56 ng/ml), $p=0,019$, tak i u pacientů s Crohnovou chorobou (průměr 154 ± 52 ng/ml), $p=0,007$. Při porovnání výsledků sérových koncentrací proteinu S100A4 u pacientů s ulcerózní kolitidou a

Crohnovou chorobou nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, $p=0,771$. Po rozdělení pacientů s Crohnovou chorobou do podskupin podle chování a lokalizace Crohnovy choroby dle Montrealské klasifikace [16] byly sérové koncentrace proteinu S100A4 porovnány s výsledky proteinu S100A4 v séru pacientů kontrolní skupiny. Všechny podskupiny při rozdělení podle chování Crohnovy choroby vykazovaly ve srovnání s kontrolní skupinou významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A4, $p<0,05$. Při porovnání jednotlivých podskupin se sérové koncentrace proteinu S100A4 mezi podskupinami navzájem statisticky významně nelišily, $p>0,05$. Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml) byly významně vyšší koncentrace proteinu S100A4 v podskupině s izolovaným postižením tlustého střeva (L2, průměr 145 ± 44 ng/ml), $p=0,041$ a v podskupině s ileokolickým postižením (L3, průměr 163 ± 53 ng/ml), $p=0,002$. Při vzájemném porovnání podskupin pacientů s Crohnovou chorobou při rozdělení podle lokalizace nemoci dle Montrealské klasifikace [16] byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi podskupinou s izolovaným ileálním postižením (L1) a podskupinou L3, $p=0,017$. Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml) byly sérové koncentrace proteinu S100A4 významně vyšší jak u pacientů bez přítomného perianálního postižení (průměr 151 ± 48 ng/ml), $p=0,008$, tak i u pacientů s perianálním postižením (průměr 163 ± 61 ng/ml), $p=0,011$. Sérové koncentrace proteinu S100A4 mezi oběma skupinami nevykazovaly statisticky signifikantní rozdíly, $p>0,05$. Pacienti s Crohnovou chorobou bez biologické léčby (průměr 154 ± 49 ng/ml) vykazovali statisticky významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A4 ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml), $p=0,005$. Statisticky významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A4 byly potvrzeny i u pacientů s Crohnovou chorobou léčených biologickou léčbou (průměr 155 ± 65 ng/ml) ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml), $p=0,049$. Sérové koncentrace proteinu S100A4 se v obou skupinách statisticky významně nelišily, $p>0,05$.

6.2. Protein S100A6

Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 11308 ± 2968 pg/ml) byly prokázány významně nižší sérové koncentrace proteinu S100A6 u pacientů s kolorektálním karcinomem (skupina CRC-S100A, průměr 8530 ± 4743 pg/ml), $p = 0,035$. Průměrná sérová koncentrace proteinu S100A6 ve skupině s pokročilým adenomem (skupina AA) byla 8715 ± 5376 pg/ml. Tyto hodnoty ve srovnání s kontrolní skupinou vykazovaly trend ke statistické významnosti, $p=0,069$ (uváděná síla provedeného testu 0,322). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl při srovnání sérových koncentrací proteinu S100A6 u pacientů s nepokročilým adenomem (skupina non-

AA, medián 8807 pg/ml, interkvartilové rozpětí (IQR) 5161-12726 pg/ml) a kontrolní skupinou (medián 11156 pg/ml, IQR 9508-13426 pg/ml), $p > 0,05$.

6.3. Proteiny S100A8 a S100A9

Ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 2513 pg/ml, IQR 2111-4881 pg/ml) byly sérové koncentrace proteinu S100A8 statisticky významně vyšší ve skupině s pokročilým adenomem (medián 11955 pg/ml, IQR 2681-34756 pg/ml), $p = 0,009$ a ve skupině s kolorektálním karcinomem (medián 27532 pg/ml, IQR 6794-35092 pg/ml), $p < 0,001$. Skupina s nepokročilým adenomem vykazovala trend směrem ke statistické významnosti (medián 19293 pg/ml, IQR 2117-39344 pg/ml) ve srovnání s kontrolami, $p = 0,058$ (síla provedeného testu 0,967). Vypočítaná senzitivita a specifita pro protein S100A8 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem byla 94 % a 73 %. Pozitivní prediktivní hodnota pro protein S100A8 byla 68 %, negativní prediktivní hodnota byla 95 %.

Nebyly prokázány statisticky významné rozdíly sérových koncentrací proteinu S100A9 u žádné ze sledovaných skupin s kolorektální neoplázií ve srovnání s kontrolní skupinou.

6.4. Protein S100A11

Sérové koncentrace proteinu S100A11 byly statisticky významně nižší ve skupině s nepokročilým adenomem (průměr $3,5 \pm 2,4$ ng/ml), $p = 0,004$ a ve skupině s kolorektálním karcinomem (průměr $3,4 \pm 2,4$ ng/ml), $p = 0,002$ ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr $5,9 \pm 2,5$ ng/ml). U skupiny s pokročilým adenomem (průměr $4,3 \pm 3,0$ ng/ml) byl pozorován trend ke statistické významnosti ve srovnání se skupinou kontrol, $p = 0,07$ (uváděna síla provedeného testu 0,319).

V další části studie byli pacienti uvnitř jednotlivých skupin (skupina s nepokročilým a pokročilým adenomem, skupina s kolorektálním karcinomem) rozdělení na ty, kteří měli kolorektální neoplázií aktuálně přítomnou v době odběru a na ty, kteří měli příslušnou kolorektální neoplázií v osobní anamnéze. Tyto podskupiny byly dále navzájem porovnány. U žádného S100 proteinu (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11) nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, $p > 0,05$.

Ze statistického hodnocení byly vyloučeny tyto odlehle hodnoty: u proteinu S100A6 - 62486 pg/ml ze skupiny kontrol a 55086 pg/ml ze skupiny s kolorektálním karcinomem; u proteinu S100A8 - 36080 pg/ml ze skupiny kontrol; u proteinu S100A9 - 166196 pg/ml ze skupiny

kontrol a 145445 pg/ml ze skupiny s kolorektálním karcinomem; u proteinu S100A11 – 19.2 ng/ml ze skupiny s kolorektálním karcinomem.

6.5. Protein S100P u pacientů s kolorektálním karcinomem

Sérové koncentrace proteinu S100P byly statisticky významně vyšší ve skupině s kolorektálním karcinomem (medián 1251, IQR 731-1749 ng/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 765, IQR 545-1158 ng/l), $p=0,012$. Při porovnání kontrolní skupiny s podskupinami podle lokalizace kolorektálního karcinomu byly ve srovnání s kontrolní skupinou sérové koncentrace S100P významně vyšší ve skupině s kolorektálním karcinomem v levé části tračníku (medián 1426, IQR 739–1925 ng/l), $p=0,005$. Sérové koncentrace S100P skupiny s kolorektálním karcinomem v pravé části tlustého střeva (medián 1113, IQR 469–1406 ng/l) nevykazovaly statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou, $p=0,396$. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl při srovnání sérových koncentrací S100P mezi oběma testovanými podskupinami (CRC-L a CRC-R), $p=0,135$.

Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem podle určení klinického stadia onemocnění byly sérové koncentrace proteinu S100P signifikantně vyšší u pacientů s kolorektálním karcinomem v klinickém stadiu IV (medián 1622, IQR 778-2154 ng/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 765, IQR 545-1158 ng/l), $p=0,008$. Podskupiny s nižším klinickým stadiem nevykazovaly signifikantní rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou: $p=0,086$ pro klinické stadium I (medián 1391, IQR 644-2508 ng/l), $p=0,565$ pro klinické stadium II (medián 868, IQR 650-1544 ng/l) a $p=0,282$ pro klinické stadium III (medián 1112, IQR 680-1470 ng/l).

Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem podle stupně diferenciaci kolorektálního karcinomu byly sérové koncentrace S100P signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolami (medián 765, IQR 545-1158 ng/l) u pacientů se středně diferencovaným karcinomem (G2, medián 1318, IQR 853-1879 ng/l), $p=0,005$. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ve skupině G1 (dobře diferencovaný karcinom, medián 812, IQR 582-1570 ng/l), $p=0,678$ a ve skupině G3 (nízce diferencovaný karcinom, medián 1113, IQR 581-2260 ng/l), $p=0,253$ ve srovnání se skupinou kontrolní. Byl pozorován statisticky významný rozdíl ve skupině G2+G3 (medián 1251, IQR 742-1883 ng/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 765, IQR 545-1158 ng/l), $p=0,007$.

7. Diskuse

7.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů

V naší studii jsme prokázali zvýšené hodnoty S100A4 v séru pacientů s idiopatickými střevními záněty. Hodnota S100A4 byla ve srovnání se zdravými jedinci významně vyšší jak u pacientů s ulcerózní kolitidou, tak u pacientů s Crohnovou chorobou. Neprokázali jsme významný rozdíl mezi skupinou s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou. Výsledky našich měření jsou ve shodě s dostupnými daty, které potvrzují významnou roli proteinu S100A4 v mediaci a regulaci zánětlivých procesů [22]. Zhang et al. nedávno publikovali práci, ve které demonstrovali vliv S100A4 na vznik *Citrobacter rodentium*-indukované kolitidy [23]. U S100A4^{-/-} deficitních myší po infekci *Citrobacter rodentium* byla pozorovaná minimální lokální a systémová zánětlivá reakce a byla významně nižší sekrece prozánětlivých chemotaktických faktorů a zánětlivých cytokinů: IL-6, IL-17A, IL-27 a IFN- γ [23]. Významná redukce zánětlivé odpovědi ve sliznici tlustého střeva byla prokázána i u S100A4 deficitních myší po expozici DSS (dextransulfát sodný, látka využívaná v experimentech k indukci kolitidy na zvířecích modelech) [24]. Je tedy zřejmé, že role proteinu S100A4 v ovlivnění průběhu idiopatického střevního zánětu je komplexní. V souvislosti s idiopatickými střevními záněty je však zřejmé, že S100A4 působí jednak cestou sekrece prozánětlivých cytokinů v místě zánětu [24], dále indukuje sekreci chemotaktických faktorů, které umožňují migraci imunitních buněk, zejména makrofágů, do místa zánětu [25] a přímo ovlivňuje migrační schopnosti těchto imunitních buněk [25, 26]. Ve vztahu ke Crohnově chorobě Cunningham et al. zkoumali profil S100A4 v resekátech terminálního ilea na souboru vzorků od 15 pacientů, kteří podstoupili chirurgickou resekci pro fibrostenózní formu Crohnovy choroby [27]: práce potvrdila významně zvýšenou expresi S100A4 mRNA a proteinu S100A4 v oblastech postižených fibrózou a jizvením ve srovnání s expresí S100A4 mRNA a proteinu S100A4 v přilehlé zdravé tenkostěvné sliznici. V našem souboru pacientů s Crohnovou chorobou všechny podskupiny při rozdělení podle chování Crohnovy choroby dle Montrealské klasifikace [16] vykazovaly významně vyšší sérové koncentrace S100A4 ve srovnání se zdravými kontrolami. Předpoklad, že sérové koncentrace proteinu S100A4 budou vyšší u pacientů se stenózní formou Crohnovy choroby, jsme v naší studii nepotvrdili. Při vzájemném porovnání podskupin pacientů s Crohnovou chorobou při rozdělení podle chování nemoci se hladiny proteinu S100A4 vzájemně významně nelišily. Domníváme se, že zvýšená exprese S100A4 u fibrostenózní formy Crohnovy odráží lokální situaci v postižené tkáni, zatímco zvýšení S100A4 v séru pacientů pravděpodobně odpovídá jeho prozánětlivé aktivitě. Toto je v souladu s výsledky studie

Ošlejškové, která potvrdila asociaci plazmatických koncentrací S100A4 s mírou zánětlivé aktivity u pacientů s revmatoidní artritidou [28]. Autoři této studie dále poukázali na pokles multimérických forem S100A4 vlivem léčby adalimumabem (monoklonální protilátkou proti TNF α) u pacientů, kteří dosáhli klinické remise po podání biologické léčby. Tento pokles byl výsledkem změny poměru koncentrace biologicky aktivních multimérických forem S100A4 a méně biologicky aktivních dimérických forem [28]. Celková plazmatická koncentrace S100A4 u těchto nemocných se vlivem anti-TNF α léčby tedy nezměnila [28]. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky naší studie, která nepotvrdila vliv přítomné biologické léčby na sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s Crohnovou chorobou. I přesto, že celá skupina vykazovala významně vyšší hodnoty S100A4 oproti zdravé kontrolní skupině, v podskupinách pacientů s a bez biologické léčby se hodnoty S100A4 v séru významně nelišily. Podobně jsme neprokázali vliv přítomného perianálního postižení na sérovou koncentraci S100A4 u pacientů s Crohnovou chorobou. Při porovnání podskupin uvnitř skupiny pacientů s Crohnovou chorobou jsme pozorovali významně vyšší hodnoty S100A4 u pacientů s postižením tlustého střeva. Hodnoty S100A4 byly ve srovnání s kontrolní skupinou významně vyšší jak u skupiny s izolovaným postižením tračnicku, tak u skupiny s ileokolickým postižením, která vykazovala statisticky významně vyšší sérové koncentrace i ve srovnání se skupinou s izolovaným postižením ilea. I přesto, že na základě současných poznatků nemáme pro tyto výsledky jednoznačné vysvětlení, prokázaná asociace sérových koncentrací proteinu S100A4 s postižením tlustého střeva idiopatickým střevním zánětem, kterou jsme potvrdili jak u pacientů s ulcerózní kolitidou, tak u pacientů s Crohnovou chorobou, upozorňuje na možnou souvislost s rizikem vzniku kolorektálního karcinomu asociovaného s idiopatickým střevním zánětem.

7.2. Proteiny S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 u kolorektálních neoplázií

Naše studie navazuje na předchozí práce z našeho pracoviště, ve kterých byla prokázána rozdílná tkáňová exprese proteinu S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 v normální, preneoplastické a neoplastické sliznici tlustého střeva [29-31]. Dosažené výsledky ukazují významně nižší hodnoty proteinu S100A6 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině s pokročilým adenomem jsme pozorovali trend ke statistické významnosti. V literatuře doposud nebyla publikovaná práce, která by se zabývala studiem sérových koncentrací proteinu S100A6 ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu. Feng et al. ve své studii na tkáňových kulturách lidského kolorektálního karcinomu potvrdili funkci proteinu S100A6, který zajišťuje kalcium dependentní translokaci CacyBP/SIP (calcium

binding protein/Siah-1 interacting protein) z cytoplasmy do buněčného jádra [32]. CacyBP/SIP je součástí komplexu zajišťujícího ubikvitinaci (tzn. označení proteinů určených k odbourání) a degradaci β -kateninu. Vazba S100A6 s CacyBP/SIP a translokace tohoto komplexu do buněčného jádra tak vede k aktivaci Wnt/ β -kateninové dráhy, která představuje jeden ze základních procesů iniciace kolorektální karcinogeneze. Tato translokace proteinu S100A6 v průběhu vzniku kolorektálního karcinomu by mohla vysvětlit paradoxně zvýšené tkáňové exprese proteinu S100A6 a současně normální či dokonce snížené hodnoty S100A6 v séru pacientů s kolorektální neoplázií, které byly pozorovány i v rámci naší studie.

Významně nižší sérové koncentrace u pacientů s kolorektálním karcinomem jsme prokázali i v případě proteinu S100A11. Hodnoty tohoto proteinu byly statisticky významně nižší i ve skupině s nepokročilým kolorektálním adenomem. Skupina s pokročilým kolorektálním adenomem vykazovala trend ke statistické významnosti. Vztah S100A11 ke kolorektální karcinogenezi je doložen v řadě studií, které potvrzují zvýšenou expresi S100A11 ve tkáni kolorektálního karcinomu [31, 33, 34]. Na rozdíl od ostatních proteinů S100 je S100A11 za fyziologických okolností lokalizován predominantně v buněčném jádře [35]. Další studie dokládají význam S100A11 v regulaci buněčné proliferace vlivem interakce s DNA-dependentními ATPázami buněčného jádra Rad54B a Rad51, které zajišťují reparaci poškozených úseků buněčné DNA [36, 37]. Za jistých podmínek tedy zřejmě dochází uvnitř buňky s maligním potenciálem k nukleocytoplasmatické translokaci proteinu S100A11, která vede k dysfunkci DNA reparačních mechanismů a poklesu p21 a p13 (proteinů suprimujících nádorový růst). Důsledkem je pak hromadění chromozomálních aberací a akcelerace buněčného růstu [36, 37]. Dalším důsledkem nukleocytoplasmatické translokace proteinu S100A11 by mohla zřejmě být jeho snížená extracelulární produkce, kterou jsme pozorovali v naší studii. Vzhledem k významné redukci S100A11 u pacientů s nepokročilým kolorektálním adenomem lze spekulovat o tom, že k těmto procesům dochází již v časných stádiích vzniku kolorektální neoplázie. V současné době ale chybí v literatuře dostatek dat, která by toto tvrzení podpořila.

Zajímavé výsledky byly pozorovány v případě proteinů S100A8 a S100A9. Sérové koncentrace proteinu S100A8 byly významně vyšší u pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem a ve skupině s kolorektálním karcinomem, zatímco protein S100A9 nevykazoval statisticky významně odlišné hodnoty ani u jedné z porovnávaných skupin. Oba proteiny jsou součástí heterokomplexu kalprotektinu (S100A8/S100A9), který se podílí na regulaci zánětlivých dějů a procesů karcinogeneze. Lehmann et al. měřili fekální kalprotektin u pacientů s kolorektálním

karcinomem před chirurgickou resekcí karcinomu a tři měsíce po ní v souboru 80 pacientů [38 Lehmann]. U všech pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří měli zvýšenou hodnoty fekálního kalprotektinu (celkem 71 % z celého měřeného souboru), došlo tři měsíce po operaci k jeho významnému poklesu [38]. Studie dále potvrdila významně vyšší hodnoty fekálního kalprotektinu u pacientů s T3 a T4 karcinomy ve srovnání s T1 a T2 karcinomy [38]. Je zajímavé, že fekální kalprotektin nekoreloval se stupněm zánětlivé intra- a peritumorální infiltrace buňkami imunitního systému [38]. Pezzilli et al. ve své studii z roku 2008 potvrdili zvýšenou hodnotu kalprotektinu ve stolici pacientů s přítomnými kolorektálními polypy, která byla významně vyšší nejen ve srovnání s jedinci s normálním koloskopickým nálezem ale i ve srovnání s pacienty s divertikulární chorobou [39]. Již v minulosti byla na našem pracovišti prokázána zvýšená exprese S100A8 a S100A9 v tkáni kolorektálního karcinomu ve srovnání se zdravou okolní sliznicí [30]. Naše současné výsledky jsou v souladu s pozdějšími analýzami Duana et al., kteří prokázali zvýšenou tkáňovou expresi obou proteinů v buňkách kolorektálního karcinomu za použití monoklonálních anti-S100A8 a anti-S100A9 protilátek [40]. V naší studii sérové koncentrace S100A9 neodrážely v literatuře doloženou zvýšenou expresi tohoto proteinu u kolorektálního karcinomu [30, 41]. Lze předpokládat, že naše výsledky by mohly reflektovat závěry práce Kima et al., kteří nedávno poukázali na anti-tumorózní efekt S100A9: studie *in vitro* demonstrovala schopnost buněk kolorektálního karcinomu vychytávat extracelulární S100A9 [42]. Internalizace S100A9 byla spojená s redukcí proliferace a zvýšenou mírou apoptózy nádorových buněk [42]. Za zmínku stojí skutečnost, že autoři v této studii testovali kromě buněčných linií kolorektálního karcinomu také buněčné linie karcinomu prsu, žaludku, ovaria a cervixu. Internalizace S100A9 byla však pozorována pouze u buněk kolorektálního karcinomu [42].

7.3. Protein S100P a kolorektální karcinom

Naše studie potvrdila asociaci sérových koncentrací proteinu S100P s kolorektálním karcinomem. Prokázali jsme významně vyšší sérové koncentrace S100P u pacientů v klinickém stadiu TNM IV. Dostupné studie ukazují, že zvýšená tkáňová exprese proteinu S100P je spojená s proliferací nádorových buněk, podílí se na regulaci jejich motility a tím schopnosti invaze a vzniku metastáz [43, 44]. Zvýšená tkáňová exprese proteinu S100P u kolorektálního karcinomu v práci Shena korelovala s přítomností vzdálených metastáz [43]. Naopak, down-regulace proteinu S100P byla spojená s poklesem invazivního a metastatického potenciálu buněk kolorektálního karcinomu [43]. Nedávno publikovaná studie Zuo et al. prokázala vzájemnou interakci S100P a Trx-1, která vedla k indukci procesů EMT (epithelial-

mesenchymal transition), která je považovaná za základní mechanismus přeměny nádorové buňky v buňku mezenchymálního typu schopnou invaze a vzdálené migrace [45]. Vyšší hodnoty S100P u pacientů v pokročilých stádiích kolorektálního karcinomu, které jsme pozorovali v naší studii, jsou v souladu s dostupnými daty, které dokládají zvýšenou expresi S100P u kolorektálního karcinomu [43]. Naše studie dále prokázala významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100P u pacientů se středně diferencovaným kolorektálním karcinomem. I přesto, že jsme u nízké diferencovaných karcinomů signifikantní rozdíly neprokázali, při srovnání skupin G2+G3 s kontrolní skupinou byl rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky významný. Důvodem může být malá velikost souboru G3 skupiny. V literatuře jsou dostupné pouze ojedinělé studie, ve kterých jejich autoři zkoumali korelaci mezi stupněm diference kolorektálního karcinomu a tkáňovou expresí proteinu S100P [43, 46, 47]. Ani jedna studie vztah mezi stupněm diference a zvýšenou tkáňovou expresí S100P u kolorektálního karcinomu neprokázala. Naše studie jako první dokládá nejen korelaci sérových koncentrací proteinu S100P ale i jeho možný vztah ke stupni diference přítomného kolorektálního karcinomu. V naší studii jsme nepotvrdili závěry dřívějších prací, které dokumentovali vyšší tkáňovou expresi S100P u nádorů v pravém tračníku [47, 48]. V našem souboru byly sérové koncentrace S100P vyšší u pacientů s kolorektálním karcinomem v levé polovině tračníku. Vysvětlením může být především skutečnost, že tato skupina byla zastoupena ve 37 % (11 z 30) pacienty v TNM stadiu IV. Ve srovnání s touto skutečností, skupina pacientů s karcinomem v pravé polovině tračníku zahrnovala pouze 3 pacienty (3 z 13) s kolorektálním karcinomem ve IV. stadiu nemoci. Dalším vysvětlením může být absence korelace sérové koncentrace proteinu S100P s jeho tkáňovou expresí, kterou jsme v naší studii neprováděli. Vzhledem k tomu, že časná stadia kolorektálního karcinomu probíhají asymptomaticky, je v současné době snahou kromě optimalizace screeningových metod identifikovat takový biomarker, který by umožnil: 1. časnou detekci nádoru, 2. predikovat chování nádoru, 3. lépe určit prognózu onemocnění, 4. stratifikovat odpověď karcinomu na podanou protinádorovou terapii a 5. časnou detekci lokální recidivy a/nebo metastatického procesu [49]. Výsledky naší studie ukazují, že sérový protein S100P by mohl být vhodným biomarkerem u pacientů s kolorektálním karcinomem.

8. Závěry

8.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů

8.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty

Ve srovnání se zdravými jedinci v kontrolní skupině byly sérové koncentrace S100A4 pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou signifikantně významně vyšší. Nulovou hypotézu bylo možno zamítnout.

8.1.2 Diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4 v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů

Sérové koncentrace proteinu S100A4 pacientů s komplikovanými formami Crohnovy choroby, zahrnující stenozující a perforující formy onemocnění, se oproti skupině pacientů s nestenozující a neperforující formou významně nelišily. Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly mezi skupinou nemocných s Crohnovou chorobou s perianálním postižením a bez perianálního postižení.

Ve srovnání se zdravými jedinci v kontrolní skupině, byla sérová koncentrace S100A4 významně vyšší u pacientů s Crohnovou chorobou s postižením tlustého střeva, a to jak ve skupině s izolovaným postižením tlustého střeva, tak ve skupině s postižením tenkého i tlustého střeva současně. Předpokládáme, že stanovení proteinu S100A4 u pacientů s ulcerózní kolitidou a s Crohnovou chorobou s postižením tlustého střeva by mohlo sloužit jako další neinvazivní biomarker k posouzení aktivity a fenotypu idiopatického střevního zánětu. Nulovou hypotézu bylo možno zamítnout.

8.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií

8.2.1. Asociace proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P) s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií

Potvrdili jsme významně nižší hladiny S100A6 a S100A11 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem. Hladiny S100A11 byly významně nižší i u pacientů s nepokročilým adenomem. Potvrdili jsme významně vyšší sérové koncentrace S100A8 u pacientů s kolorektálním karcinomem a u nemocných s pokročilým kolorektálním adenomem. Hodnoty S100A9 se u pacientů s kolorektální neoplázií oproti zdravým jedincům z kontrolní skupiny významně nelišily. Potvrdili jsme významně vyšší hladiny S100P proteinu u pacientů s kolorektálním karcinomem. Nulovou hypotézu bylo možno zamítnout.

8.2.2. Stanovení pozitivní a negativní prediktivní hodnoty proteinů S100 u kolorektálních neoplázií a určení možného klinického využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií

Na základě potvrzené asociace sérových hladin S100A6, S100A8, S100A11 a S100P s kolorektálním karcinomem se domníváme, že tyto S100 proteiny by mohly být dalším užitečným sérovým biomarkerem využívaným v diagnostice kolorektálního karcinomu, případně v rámci dispenzarizace pacientů s kolorektálním karcinomem. Náš předpoklad je podpořen vysokou senzitivitou a významnou specificitou a dále vysokou pozitivní a negativní prediktivní hodnotou sérového proteinu S100A8 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem.

Použitá literatura

1. International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, IARC, Lyon, France, 2013. [online]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
2. Gregor J, Malúšková D, Mužík J, Šnajdrová L. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno. [online]. Available from: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>
3. Suchánek Š, Grega T, Zavoral M. Colorectal cancer screening. *Vnitr Lek* 2018; 64(6): 679-683.
4. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
5. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, Broadbent T, Sarkar S, Burt RW, Jones DA. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009; 137: 623–634.
6. Li T, Zhang L, Huo X. Inhibitory effects of aesculetin on the proliferation of colon cancer cells by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol Lett* 2018; 15(5): 7118-7122.
7. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel)* 2018; 6(2).
8. Walther A, Houlston R, Toulinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Gut* 2008; 57: 941–950.
9. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 489–499.

10. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-118.
11. Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology* 2004; 127(5): 1578-88.
12. Bureš J. Maligní nádory tlustého střeva (s. 423-430). In: Bureš J, Horáček J, Malý J et al. *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén, 2013
13. Benson AB 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Enzinger PC, Fichera A, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffe S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, Willett CG, Wu CS, Gregory KM, Freedman-Cass D. Colon Cancer, Version 4.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. [online]: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon_blocks.pdf
14. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol* 2018; 53(4): 379-389.
15. Fischer A, Zundler S, Atreya R, et al. Differential effects of a4b7 and GPR15 on homing of effector and regulatory T cells from patients with UC to the inflamed gut in vivo. *Gut* 2016; 65: 1642–1664.
16. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV Jr, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36.
17. Deloulme JC, Mbele GO, Baudier J. S100 proteins. From purification to functions. *Methods in Molecular Biology* 2002; 172: 185–198.
18. Kretsinger R. H., Nockolds C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *The Journal of Biological Chemistry* 1973; 248 (9): 3313–3326.
19. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 Proteins. *Current molecular medicine* 2013; 13(1): 24-57.

20. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal* 2006; 396(Pt 2): 201-214.
21. Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 1982; 35(8): 830-41.
22. Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E. Metastasis-inducing S100A4 protein: implication in non-malignant human pathologies. *Curr Mol Med* 2008; 8(6): 492–6.
23. Zhang J, Jiao Y, Hou S, Tian T, Yuan Q, Hao H, Wu Z, Bao X. S100A4 contributes to colitis development by increasing the adherence of *Citrobacter rodentium* in intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 2017; 7: 12099.
24. Zhang J, Hou S, Gu J, Tian T, Yuan Q, Jia J, Qin Z, Chen Z. S100A4 promotes colon inflammation and colitis-associated colon tumorigenesis. *Oncoimmunology* 2018; 11; 7(8): e1461301.
25. Li ZH, Dulyaninova NG, House RP, Almo SC, Bresnick AR. S100A4 regulates macrophage chemotaxis. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 2598–610.
26. Dulyaninova NG, Ruiz PD, Gamble MJ, Backer JM, Bresnick AR. S100A4 regulates macrophage invasion by distinct myosin-dependent and myosin-independent mechanisms. *Mol Biol Cell* 2018; 29(5): 632-642.
27. Cunningham MF, Docherty NG, Burke JP, O'Connell PR. S100A4 expression is increased in stricture fibroblasts from patients with fibrostenosing Crohn's disease and promotes intestinal fibroblast migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299(2): G457-66.
28. Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhöfer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchy D, Senolt L. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(12): 1590-4.
29. Stulík J, Osterreicher J, Koupilová K, Knízek J, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Schäfer BW, Heizmann CW. Differential expression of the Ca²⁺ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa. *Eur J Cancer* 2000; 36(8): 1050-9.
30. Stulík J, Osterreicher J, Koupilová K, Knízek, Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. *Electrophoresis* 1999; 20(4-5): 1047-54.

31. Stulík J, Koupilova K, Osterreicher J, Knížek J, Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma. *Electrophoresis* 1999; 20(18): 3638-46.
32. Feng S, Zhou Q, Yang B, Li Q, Liu A, Zhao Y, Qiu C, Ge J, Zhai H. The effect of S100A6 on nuclear translocation of CacyBP/SIP in colon cancer cells. *PLoS One* 2018; 13(3): e0192208.
33. Tanaka M, Adzuma K, Iwami M, Yoshimoto K, Monden Y, Itakura M. Human calgizzarin; one colorectal cancer-related gene selected by a large scale random cDNA sequencing and northern blot analysis. *Cancer Lett* 1995; 89(2): 195-200.
34. Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Mothes H, Kaufmann R, Settmacher U, Von Eggeling F. Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28(1): 195-200.
35. Inada H, Naka M, Tanaka T, Davey GE, Heizmann CW. Human S100A11 exhibits differential steady-state RNA levels in various tissues and a distinct subcellular localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 263(1): 135–138.
36. Murzik U, Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Ulbricht T, Bussen W, Hentschel J, von Eggeling F, Melle C. Rad54B targeting to DNA double-strand break repair sites requires complex formation with S100A11. *Mol Biol Cell* 2008; 19(7): 2926-35.
37. Foertsch F, Szambowska A, Weise A, Zielinski A, Schlott B, Kraft F, Mrasek K, Borgmann K, Pospiech H, Grosse F, Melle C. S100A11 plays a role in homologous recombination and genome maintenance by influencing the persistence of RAD51 in DNA repair foci. *Cell Cycle* 2016; 15(20): 2766-79.
38. Lehmann FS, Trapani F, Fueglistaler I, Terracciano LM, von Flüe M, Cathomas G, Zettl A, Benkert P, Oertli D, Beglinger C. Clinical and histopathological correlations of fecal calprotectin release in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20(17): 4994-9.
39. Pezzilli R, Barassi A, Morselli Labate AM, Finazzi S, Fantini L, Gizzi G, Lotzniker M, Villani V, Melzi d'Eril G, Corinaldesi R. Fecal calprotectin levels in patients with colonic polyposis. *Dig Dis Sci* 2008; 53(1): 47-51.
40. Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, Chen X, Zuo G, Zhang Y, Weng Y, Luo J, Tang M, Shi Q, He T, Zhou L. S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS One* 2013; 8(4): e62092.

41. Peng F, Huang Y, Li MY, Li GQ, Huang HC, Guan R, Chen ZC, Liang SP, Chen YH. Dissecting characteristics and dynamics of differentially expressed proteins during multistage carcinogenesis of human colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(18): 4515-28.
42. Kim K, Kim KH, Roh K, Yoo BC, Ku JL, Shin YK, Cho JY, Kim M, Kwon MH, Goh SH, Chang HJ, Oh JH. Antitumor effects of calgranulin B internalized in human colon cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(15): 20368-80.
43. Shen ZY, Fang Y, Zhen L, Zhu XJ, Chen H, Liu H, Jiang B, Li GX, Deng HJ. Analysis of the predictive efficiency of S100P on adverse prognosis and the pathogenesis of S100P-mediated invasion and metastasis of colon adenocarcinoma. *Cancer Genet* 2016; 209(4): 143-53.
44. Jiang L, Lai Y-K, Zhang J, Wang H, Lin MC, He ML, Kung HF. Targeting S100P inhibits colon cancer growth and metastasis by Lentivirus-mediated RNA interference and proteomic analysis. *Mol Med* 2011; 17: 709–716.
45. Zuo Z, Zhang P, Lin F, Shang W, Bi R, Lu F, Wu J, Jiang L. Interplay between Trx-1 and S100P promotes colorectal cancer cell epithelial-mesenchymal transition by up-regulating S100A4 through AKT activation. *J Cell Mol Med* 2018; 22(4): 2430-2441.
46. Wang Q, Zhang YN, Lin GL, Qiu HZ, Wu B, Wu HY, Zhao Y, Chen YJ, Lu ChM. S100P, a potential novel prognostic marker in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2012; 28(1): 303–310.
47. Dong L, Wang F, Yin X, Chen L, Li G, Lin F, Ni W, Wu J, Jin R, Jiang L. Overexpression of S100P promotes colorectal cancer metastasis and decreases chemosensitivity to 5-FU in vitro. *Mol Cell Biochem* 2014; 389(1-2): 257-64.
48. Fuentes MK, Nigavekar SS, Arumugam T, Logsdon CD, Schmidt AM, Park JC, Huang EH. RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(8): 1230-40.
49. Moravkova P, Kohoutova D, Drahosova M, Bures J. Serum concentration of S100P protein with colorectal cancer. *Gastroent Hepatol* 2017; 71(4): 293-298.

Přehled publikační činnosti autora

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

1. Kohoutova D, Smajs D, **Moravkova P**, Cyrany J, Moravkova M, Forstlova M, Cihak M, Rejchrt S, Bures J. Escherichia coli strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. BMC Infect Dis 2014; 14: 733. IF 2,62
2. Kohoutova D, Drahosova M, **Moravkova P**, Rejchrt S, Bures J. Anti-Outer membrane protein C and anti-glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel disease and their association with complicated forms of Crohn's disease. BMC Gastroenterol 2014; 14: 190. IF 2,731.
3. Kohoutova D, Drahosova M, Cihak M, **Moravkova P**, Bures J. Anti-Outer membrane protein C antibodies in colorectal neoplasia. Folia Microbiol (Praha) 2016; 61(4): 295-9. IF 1,311

Ostatní práce v impaktovaném časopise

4. Kohoutova D, **Moravkova P**, Kruzliak P, Bures J. Thromboembolic complications in inflammatory bowel disease. J Thromb Thrombolysis. 2015 May;39(4):489-98. IF 2,62
5. **Moravkova P**, Kohoutova D, Rejchrt S, Cyrany J, Bures J. Role of S100 proteins in colorectal carcinogenesis. Gastroenterol Res Pract 2016; 2016: 2632703. IF 1,859

Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

6. Kohoutová D, Pejchal J, Cyrany J, **Morávková P**, Rejchrt S, Bureš J. Apoptóza při vývoji kolorektální neoplazie. Gastroenterol Hepatol 2016; 70: 313-18.
7. **Morávková P**, Kohoutová D, Vávrová J, Bureš J. S100A4 Protein in Inflammatory Bowel Disease: Results of a Single Centre Prospective Study. Acta Med (Hradec Kralove) 2017; 60(3): 108-13.
8. **Moravkova P**, Kohoutova D, Drahosova M, Bures J. Serum concentration of S100P protein in patients with colorectal cancer. Gastroent Hepatol 2017; 71(4): 293-298.
9. Peterová E, Chládek J, Kohoutová D, Knoblochová V, **Morávková P**, Vávrová J, Řezáčová M, Bureš J. Exhaled Breath Condensate: Pilot Study of the Method and Initial Experience in Healthy Subjects. Acta Medica (Hradec Kralove) 2018; 61(1): 8-16.

Ostatní práce v neimpaktovaném časopise

10. Stefanek, **Moravkova P**, Laco J, Nova M, Zak P, Kopacova M, Atypical picture of colon infiltration with lymphoma in a patient with lymphocytic leukaemia, Gastroent Hepatol 2015; 69(2): 141–145.
11. Gabalec F, Šimkovič M, Zavřelová A, Kašparová P, **Morávková P**, Kopáčová M, Masopust V, Žák P, Čáp J, Radocha J. Treatment of Multifocal Multisystem BRAF Positive Langerhans Cell Histiocytosis with Cladribine, Surgery and Allogenic Stem Cell Transplantation. Acta Med (Hradec Kralove) 2017; 60(4): 152-6.

Ostatní

12. Paula Morávková, Darina Kohoutová, Jaroslava Vávrová, Jan Bureš. S100A4 protein in inflammatory bowel disease: results of a single centre prospective study. Poster. 25th United European Gastroenterology Week, Oct 28 – Nov 1, 2017. Barcelona, Španělsko
13. Paula Morávková, Darina Kohoutová, Jaroslava Vávrová, Jan Bureš. Serum S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 in colorectal neoplasia: results of a single centre prospective study. Poster. Digestive Disease Week, June 2-5, 2018. Washington DC, USA.

Odborné přednášky

14. **P. Morávková**, D. Kohoutová, J. Vávrová, J. Bureš. Sérové koncentrace S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty: prezentace výsledků prospektivní studie. XXI. Hradecké gastroenterologické a hepatologické dny a XI. Mezinárodní endoskopický workshop (2017). 16.-17.3.2017 – Hradec Králové.
15. **P. Morávková**, D. Kohoutová, J. Vávrová, J. Bureš. Vybrané S100 proteiny u pacientů s kolorektální neoplázií. XXII. Hradecké gastroenterologické a hepatologické dny a XII. Mezinárodní endoskopický workshop (2018). 15.-16.3.2018 – Hradec Králové.
16. **P. Morávková**, T. Douda. Praktické zkušenosti s ustekinumabem u pacientů s Crohnovou nemocí. XXIII. Hradecké gastroenterologické a hepatologické dny a XIII. Mezinárodní endoskopický workshop (2019). 21.-22.3.2019 – Hradec Králové.

V recenzním řízení

17. **Moravkova P**, Kohoutova D, Vavrova J, Bures J. Serum S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 proteins in colorectal neoplasia: results of a single centre prospective study.