

Dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorandského studia na Chirurgické klinice LF UK v Plzni

Uchazeč: MUDr. Karel Rupert
Chirurgická klinika LF UK a FN v Plzni
Alej Svobody 80
304 60 Plzeň

Školitel: Doc. MUDr. Luboš Holubec, CSc.
Chirurgická klinika LF UK a FN v Plzni

Oponenti: Prof. MUDr. Jiří Hoch, CSc.
Přednosta chirurgické kliniky 2. LF UK
Fakultní nemocnice Motol

Prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.
Chirurgická klinika
Všeobecná fakultní nemocnice Praha

Doc. MUDr. Jan Dostálík, CSc.
Přednosta chirurgického oddělení
Fakultní nemocnice s poliklinikou Ostrava – Poruba

Stanovisko k dizertační práci vypracovalo vedení Chirurgické kliniky LF UK a FN v Plzni

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací v oboru chirurgie se koná dne:

Místo obhajoby: Chirurgická klinika FN, Aula, Alej Svobody 80, Plzeň

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

Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.
předseda komise pro obhajobu
dizertačních prací v oboru chirurgie

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

MUDr. Karel RUPERT

Autoreferát dizertační práce

Obsah:

I . Teoretická část	4
II. Výzkumná část	5
1. Cíle projektu	5
2. Metodika	5
3. Rozdělení nemocných do skupin	6
4. Výsledky	6
4.1. Expresse MMP-2, MMP-7 a TIMP-1, TIMP-2	6
4.2. Expresse genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění	8
4.3. Korelace mezi hladinami exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1	8
4.4. Ověření biologických vlastností resekcčních linií kolorektálního karcinomu kvantitativní expresí mRNA CEA a TIMP-1	9
4.5. Expresse m RNA v periferní krvi kontrolních skupin	11
4.6. Expresse m RNA v periferní krvi skupiny Nádory	11
4.7. Sérové nádorové markery u kontrolních skupin	13
4.8. Sérové nádorové markery u skupiny Nádory	14
5. Souhrn	21
6. Summary	23
III. Literatura	26
1. Výběr použité literatury	26
2. Literatura autora	28

TIMP-2 in colorectal carcinoma patients, Biomarkers and Environment, No.3,4, vol.8, 2004, p. 83. Poster presentation.

Pesta M, Holubec L.jr., Topolčan O., Finek J., **Rupert K.**, Cerna M., Cerny R.: Codon 12 K-ras mutation in tissue samples from patients with colorectal cancer. Biomarkers and Environment , No.3,4, vol.8, 2004,p. 82. Poster presentation.

Topolčan O., Holubec L., Liška V., Svobodová Š., Třeška V., Finek J., **Rupert K.**, Sutnar A. : Prognostic Importance of TPS at Colorectal Carcinoma. Book of abstracts, p.30, 6th Ceftuma 2006, Prague, May 30 – June 1. Oral presentation.

Kolorektální karcinom je v civilizovaných zemích 2. nejčastějším karcinomem u mužů po karcinomu plic a u žen po karcinomu prsu. Mortalita spojená s tímto onemocněním je v České republice nejvyšší na světě a to u obou pohlaví. Jednou z příčin tohoto stavu je pozdní diagnostika kolorektálního karcinomu, kdy více než 50% nádorů je diagnostikováno v pozdních stádiích choroby (stadium III a IV). Příčinami pozdní diagnostiky jsou jednak minimální obtíže v počátečních stádiích, jednak obava nemocných z této diagnózy, dále chyba v diagnostické rozvaze lékaře, kterému se nemocný svěřil se svými obtížemi a v neposlední řadě i neexistence screeningové metody pro včasnou diagnostiku.

Rád bych poděkoval všem osobám, bez jejichž přispění by tato práce nemohla vzniknout. Svému školiteli doc. MUDr. Luboši Holubcovi, CSc. za poskytnutí námětu, odborné vedení a cenné rady. Dále všem spoluřešitelům Grantu IGA – NR 7894-3/2004 jmenovitě prof. MUDr. Vladimíru Třeškovi, DrSc., MUDr. Luboši Holubcovi ml., PhD., Mgr. Martinu Peštovi za odvedenou práci a cenné rady. Ing. S. Kormundovi děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků. MUDr. J. Koželuhové za pomoc při odběru vzorků kontrolních skupin. V neposlední řadě i všem svým kolegům z chirurgické kliniky FN Plzeň

za odborné rady a cenné zkušenosti. Chci poděkovat i své rodině za trpělivost a projevovanou lásku.

I. Teoretická část

Teoretická část obsahuje shrnutí současných znalostí o kolorektálním karcinomu. Je rozčleněna do jednotlivých kapitol, které se zabývají anatomii tlustého střeva, jeho histologií, dále obecné patologie nádorového růstu a kolorektálnímu karcinomu.

Tato kapitola se věnuje epidemiologii kolorektálního karcinomu, jeho etiologii a patogenezi, zabývá se predispozičními faktory, histologickým nálezem (typing), šířením nádorů, jednotlivými stagingovými systémy, gradíngem. Samostatná část je věnována screeningovým možnostem v současné době a tato kapitola je dále dělena dle rizikových skupin. Další podkapitolou jsou i možnosti diagnostiky kolorektálního karcinomu. Jsou zváženy všechny možnosti diagnostiky, včetně klinických příznaků, nádorových markerů a zobrazovacích metod.

Další podkapitolou je oddíl věnovaný léčbě kolorektálního karcinomu. Jsou rozebrány jednotlivé možnosti chirurgické léčby, elektivní, akutní i paliativní. Je zmíněna i léčba onkologická - chemoterapie, radioterapie a další možnosti léčby.

Předposlední podkapitola je věnována prognóze nemocných s kolorektálním karcinomem. Jsou zváženy jednotlivé faktory ovlivňující přežití nemocných. Především se jedná o staging nádoru, dále reziduální nádor, histologický nález, lokalizaci nádoru a komplikace. Pětileté přežití u pacientů s nádorem tlustého střeva a rekta v závislosti na stadiu onemocnění je přibližně následující : stadium I - 80 %, stadium II - 60 %, stadium III - 30 %, stadium IV - 5 %.

Poslední podkapitola je věnována prevenci kolorektálního karcinomu a dispenzární péči o nemocné s touto diagnózou. Preventivní opatření jsou jednak charakteru doporučeného životního stylu a jednak mají charakter optimální diagnostiky prekanceróz a časných forem tohoto nádorového onemocnění. Součástí této podkapitoly je i diagnostika v průběhu follow up.

Pesta M., Topolčan O., Holubec L. jr., **Rupert K.**, Cerna M., Holubec L. sen., Treska V., Finek J. and Cerny R.: Clinicopathological assessment & Quantitative Estimation of MMP-2, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 in Colorectal Carcinoma Tissue Samples. Anticancer Res. 2007. Accepted for publication, IF 1,5.

Skalický T., Třeška V., Valenta J., Neprašová P., **Rupert K.**: Chirurgická léčba onemocnění štítné žlázy na chirurgické klinice Fakultní nemocnice v Plzni 1994 – 2000. Rozhledy v chirurgii, červen (6) 2001, 315-9.

Abstrakta:

Rupert K., Holubec L. Jr., Pesta M., Topolčan O., Holubec L. Sen., Treska V.: Expression of proteases and their inhibitors in colorectal carcinoma. Hepato-Gastroenterology Supplement I – Abstracts of 14 th International postgraduate course of the International Association of Surgeons, gastroenterologists and Oncologists, Volume 53, December 2006, p. A77. Poster presentation.

Rupert K., Pešta M., Holubec L. Jr., Holubec L., Topolčan O., Třeška V.: Quantitative Estimation of MMP-2, MMP-7 and TIMP-1, TIMP-2 in Colorectal Carcinoma Tissue Samples. Abstracts book of XXXIII. Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, September 2005, p. 75. Poster presentation. **Selected poster to compete for EGTM's (European Group on Tumor Markers) first Poster Award**

Holubec L.jr., Pešta M., Finek J., Topolčan O., Holubec L.sen., **Rupert K.**, Třeška V.: Clinicopathological assessment & quantitative estimation of MMP-2, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. Annals of Oncology, Volume 17, 2006, Supplement 9, p. 255. Abstract of poster presentation, 31st ESMO Congress 29 September – 3 October 2006, Istanbul, Turkey.

Holubec L., Topolčan O., Finek J., Pešta M., **Rupert K.**, Sutnar A., Liška V., Kormunda S., Vrzalová J., Třeška V.: Prognostický a prediktivní význam nádorových markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem. Sborník abstrakt, str.26, II. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 7.-9. prosince 2006. Oral presentation.

Pešta M, Holubec L. Jr. , Topolčan O., Finek J., Černá M., **Rupert K.**, Černý R. Detekce mutace kodonu 12 onkogenu K-ras u vzorků kolorektálního karcinomu. Sborník JOD 2004. ISBN 80-238-7485-3. Poster presentation.

Pesta M, Holubec L.jr., Topolčan O., Finek J., **Rupert K.**, Cerna M., Cerny R.: Expression of mRNA of MMP-2 and MMP-7 and their tissue inhibitors TIMP-1 and

Třeška V. a kol. Propedeutika vybraných klinických oborů. Grada publishing 2003, 156 – 166.

Vysloužil K. Komplexní léčba nádorů rekta. Grada publishing 2005.

Xi L, Gooding W, McCarty K, Godfrey TE, Hughes SJ, D'Cunha J, Kratzke RA. Identification of mRNA markers for molecular staging of lymph nodes in colorectal cancer. Clin Chem. 2006 Mar;52(3):520-3.

Zeman et al. Speciální chirurgie. Galén 2001, 287 – 312.

2. Literatura autora

Rupert K., Pesta M., Holubec L.jr., Nosek J., Novák P., Černý R., Topolčan O., Holubec L., Třeška V.: Verification of biological characteristics of resection lines of colorectal carcinoma by quantitative expression of mRNA CEA and TIMP-1. The Internet Journal of Surgery. 2007. Volume 9 Number 1.

Rupert K., Veselý V., Jambura J., Duras P., Třeška V.: Poranění konečníku a análního kanálu. Úrazová chirurgie 4, 2005: 152-155.

Rupert K., Holubec L.Jr., Pešta M., Topolčan O., Holubec L. Sen., and Třeška V.: Expression of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and a tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma measured by means of quantitative RT-PCR. Hepatogastroenterology. Odesláno do tisku 7/06, IF 1,2.

M. Pešta, L. Holubec jr., O. Topolčan, M. Černá, **K. Rupert**, S. Kormunda, J. Finek and R. Černý: Quantitative Estimation of Matrix Metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in Colorectal Carcinoma Patients. Anticancer Research. Volume 25, Issue No. 5, 2005, IF 1,5.

Svobodova S. , Topolčan O. , Holubec L. , Třeška V. , Sutnar A., **Rupert K.**, Kormunda S. , Rousarova M. and Finek J.: Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer. Anticancer Research 2007. Accepted for publication, IF 1,5.

II. Výzkumná část

Výzkumná část vznikla za podpory grantu IGA – NR 7894-3/2004.

1. Cíle projektu:

1. Stanovení hladiny nádorové mRNA v tumorosním ložisku a v krvi nemocného, pomocí reverz-transkription polymerase chain reaction (RT-PCR) , prověření možnosti využití těchto výsledků k dispenzarizaci nemocných po operacích pro kolorektální karcinom z hlediska recidivy a metastáz nádorového onemocnění.

2. Posouzení stupně malignity a prognózy nemocného v závislosti na hladinách nádorové mRNA v krvi pacienta v korelaci s klinickým a histopatologickým nálezem.

3. Určit možnosti využití stanovení nádorové mRNA jako screeningové metody vzhledem k předpokládané specifitě porovnáním s kontrolními skupinami pacientů s benigními diagnózami a skupinou pacientů s maligní diagnosou jiné lokalizace.

4. Porovnat citlivost metody z hlediska pooperační recidivy a metastáz nádorového onemocnění se stanovením běžných nádorových markerů – karcinoembryonální antigen (CEA), glykoproteinový antigen mucinosního typu: Carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9), proliferační nádorový marker tymidinkináza (TK), solubilní cytokeratininové fragmenty: tkáňového polypeptidového antigenu (TPA) a tkáňového specifického polypeptidového antigenu (TPS) - v séru.

2. Metodika

U nemocných s nádorovým onemocněním kolorekta bez známek metastáz či generalizace byl po resekcím výkonu odebrán z preparátu vzorek tumoru velikosti 5x5x5 mm (pro možnost kontroly 2x) a byla z něj stanovena mRNA pomocí reverz-transkription polymerase chain reaction RT-PCR. Hladinu mRNA jsme stanovili v periferní krvi nemocného stejnou metodou před výkonem, 7 dní po výkonu, dále 6 a

12 měsíců po výkonu. Stejně tak byla u těchto pacientů stanovena hladina klasických onkomarkerů ve stejných intervalech.

U kontrolních skupin (specifikace kontrolních skupin viz níže) – jsme provedli náběr periferní krve, ze které jsme stanovili mRNA CEA a CK20.

Krev byla pacientům odebírána z periferní žíly. Všichni nemocní byli o zařazení do projektu informováni a podepsali písemný souhlas. mRNA z krevních vzorků a vzorků nádoru a onkomarkery stanovila radioimunologická laboratoř při II. interní klinice FN Plzeň.

3. Rozdělení nemocných do skupin

I. Nádory - nemocní s kolorektálním karcinomem předoperačně bez generalizace

II. Kontrolní skupiny:

Plíce - nemocní s primárním karcinomem plic

Prekancerózy - nemocní s verifikovanou M. Crohn

Záněty - nemocní se zánětlivým onemocněním

Zdraví – nemocní bez zn. tumoru či zánětu např. před operací kýl

NED – ze skupiny nemocných s kolorektálním karcinomem byla vytvořena skupina nemocných s minimálně 12 měsíční remisí onemocnění.

4. Výsledky

Pro větší přehlednost jsou výsledky řazeny do menších kapitol.

4.1. Expresí matrixových metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2, MMP-7) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz 1 a 2 (TIMP-1, TIMP-2) v maligní tkáni

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) a jejich inhibitory, inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs), hrají důležitou roli v nádorové invazivitě.

Hladina exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně ve srovnání s normální tkání ($p < 0.0020$, $p < 0.0467$, $p < 0.0007$, $p < 0.0003$). Zjistili jsme, že

Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2005;23(4):338-51.

Holten-Andersen MN, Nielsen HJ, Sorensen S, Jensen V, Brunner N, Christensen IJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the postoperative monitoring of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2006 Aug;42(12):1889-96. Epub 2006 Jun 30.

Holten-Andersen MN, Hansen U, Brunner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2005 Jan 10; 113(2):198-206.

Holubec L, et al. Kolorektální karcinom – současné možnosti diagnostiky a léčby. Grada 2004, p. 15-23, 15-18, 103-132.

Chen CC, Yang SH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Chang SC. Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res.* 2005 Apr;124(2):169-74.

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002, 21:2245-52.

McWilliams RR, Erlichman C. Novel therapeutics in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2005 Aug;48(8):1632-50.

Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):115-20.

Morita S, Nomura T, Fukushima Y, Morimoto T, Hiraoka N, Shibata N. Does serum CA19-9 play a practical role in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 2004 Feb; 47(2): 227-32.

Rejthar A, Vojtěšek B.: *Obecná patologie nádorového růstu.* Praha, Grada 2002.

Sandlewski A., Kokocinska D., Partyka R., Kocot J., Starzewski J., Chanek I., Jalowiecki P. Usefulness of evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) and soluble fragments of cytokeratin 18-th (TPS) in postoperative monitoring of patients with colorectal cancer. *Pol Merkur Lekarski.* 2005 Jun;18(108):647-50.

Schwandner O, Schlamp A, Broll R, Bruch HP. Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Feb;22(2):127-36. Epub 2006 Aug 2.

at the most with locoregional lymph nodes affected with tumour) entered study. Distal metastases into the liver were found only in two patients during operation. Furthermore it is the character of recurrences, where locoregional recurrence occurred in more than 50%. The results should be carefully interpreted due to the small number of relapses with regard to short follow up. Nevertheless, TPS seems to be promising marker for follow up of patients with colorectal carcinoma. Therefore, the combination of CEA and TPS appears to be ideal.

III. Literatura

1. Výběr použité literatury

Balch GC, De Meo A, Guillem JG. Modern management of rectal cancer: a 2006 update. *World J Gastroenterol.* 2006 May 28; 12(20): 3186-95.

Becker H.D., Hohenberg W., Junginger T., Schlag P.M. Chirurgická onkologie. Grada 2005. p. 3-17, 29-35, 41- 46, 457 – 545.

Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C. CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2004 Sep-Dec;25(5-6):228-34.

Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8229-34.

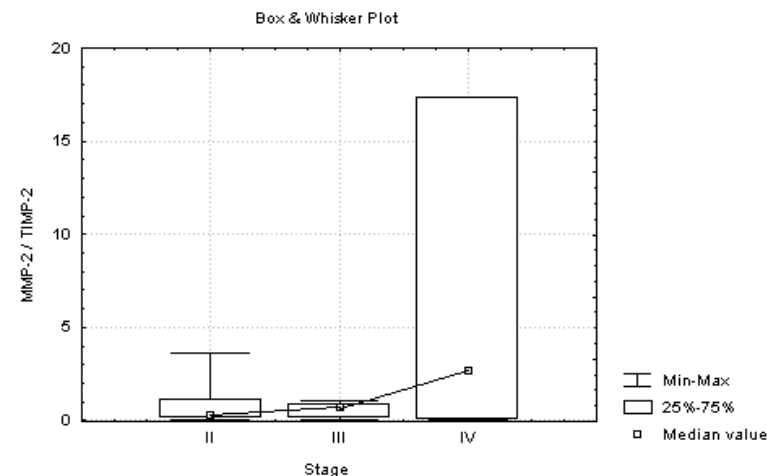
Černá M, Holubec L Jr, Pešta M, Kormunda S, Topolčan O, Černý R. Quantitative estimation of CEA and CK20 expression in tumour tissue of colorectal cancer and its liver metastases with reverse transcription and real-time PCR. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1B):803-8.

Fernandes LC, Kim SB, Saad SS, Matos D. Value of carcinoembryonic antigen and cytokeratins for the detection of recurrent disease following curative resection of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 28;12(24):3891-4.

hladina exprese je signifikantně zvýšená pouze u mRNA MMP-2 nádorové maligní tkáně ve srovnání s benigní tkání ($p < 0.0464$). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi nádorovou a benigní tkání nebyl zjištěn ($p < 0.4042$, $p < 0.1139$, $p < 0.0780$). Zjistili jsme, že hladina exprese mRNA MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 je signifikantně zvýšená u nádorové maligní tkáně ve srovnání s normální tkání a benigního onemocnění ($p < 0.0005$, $p < 0.0004$, $p < 0.0007$). Rozdíl v hladině exprese mRNA TIMP-2 mezi nádorovou maligní a nemaligní tkání byl hraniční ($p < 0.0549$). Vzhledem k funkční závislosti, jsme stanovili poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 a korelovali jej se stadiem nádorového onemocnění. Jak je vidět na grafu 1, vyšší stadium nádorového onemocnění koreluje s vyšším mediánem hodnot poměru MMP-2/TIMP-2 (stage II: 0.29, stage III: 0.69, stage IV: 2.71) ale neregistrovali jsme statistickou signifikanci ($p < 0.58$).

Nezjistili jsme žádné signifikantní rozdíly v hladinách exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV ($p < 0.8044$, $p < 0.8278$, $p < 0.7167$, $p < 0.4083$).

Graf 1. Poměr mRNA MMP-2/TIMP-2 a jeho korelace se stadiem nádorového onemocnění.



4.2. Exprese genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 v závislosti na stádiu onemocnění

Nezjistili jsme žádné signifikantní rozdíly v hladinách exprese mRNA TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 mezi stádii I, II versus III, IV ($p < 0.8044$, $p < 0.8278$, $p < 0.7167$, $p < 0.4083$).

V hladinách exprese mRNA MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1 jsme rozdíl mezi vzorky pacientů diagnózy C18 v.s. C19 a C20 nezaznamenali ($p < 0.2949$, $p < 0.2473$, $p < 0.7689$, $p < 0.3745$).

4.3. Korelace mezi hladinami exprese mRNA genů GAPDH, MMP-2, TIMP-2, MMP-7 a TIMP-1

V tab. 1. jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese MMP-2 v.s. MMP-7, MMP-2 v.s. TIMP-2, MMP-7 v.s. TIMP-1, TIMP-2 v.s. TIMP-1, MMP-2 v.s. TIMP-1, MMP-7 v.s. TIMP-2. Vzájemná negativní korelace ($r = -0.85$) mezi mRNA MMP-7 a mRNA TIMP-2 byla výrazně signifikantní ($p < 0.0001$). Další vzájemné korelace byly statisticky nevýznamné.

Tab. 1. Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a statistické významnosti mezi hladinami exprese.

nádorová tkáň	Spearmanův korelační koeficient	p - value
MMP-2 X MMP-7	-0.17802	0.5426
MMP-2 X TIMP-2	0.30989	0.2809
MMP-7 X TIMP-1	-0.26154	0.3664
TIMP-2 X TIMP-1	0.16923	0.5630
MMP-2 X TIMP-1	0.28791	0.3182
MMP-7 X TIMP-2	-0.84615	0.0001

determination of tumour markers appears as unsubstitutable.

We have compared serum levels of tumour markers in control group of healthy persons and in patients with acute inflammatory disease and also in patients with benign disease of GIT (Crohn's disease). A statistically significant difference was observed especially in proliferative marker thymidine kinase (TK) and in cytokeratins TPA and TPS, significantly higher values of TK were observed in patients with benign disease of GIT. This result is consistent with scientific literature.

Prognostic relevance of CEA has been proved in our cohort of patients. Significant correlation between elevation of preoperative CEA values and overall survival was determined using both laboratory and optimised cut off. In case of laboratory cut off, the determination of TPA was important for overall survival and in case of optimised cut off the determination of CA 19-9 was important, that is again consistent with results of literature from some authors. (7, 8, 31) However, longer follow up will be necessary for evaluation of relevance of these markers. In case of survival without any signs, the best result was obtained again in preoperative CEA values, which significance was confirmed not only using univariate, but also multivariate analysis while using laboratory cut off. Patients with preoperative CEA elevation had 11 times higher probability of progression than patients with normal values.

In our cohort of patients, the postoperative CEA values reacted best to the resection therapy by decrease. No change between preoperative and postoperative values of CA 19-9 tumour marker has been observed. On the contrary, significant increase in postoperative values of TPS tumour marker, which was followed in our cohort after the surgery, was observed. It was most probably connected with separation processes after performed surgery. It can be concluded that for control of surgical treatment success is most suitable to follow preoperative and postoperative CEA values.

The highest sensitivities have been obtained in tumour marker TPS (83%) with 95% specificity, sensitivities of classic tumour markers CEA and CA 19-9 were significantly lower (41% or 25%, respectively). These numbers are rather surprising mainly because of low sensitivity of classic tumour markers. It can be explained by cohort characteristics, where patients with locally advanced colon disease (grade I-III, it means

have therapeutic effect on tumour tissue and its vicinity. Some of the preparations are being tested (Bay 12-9566 /Bayer/, BB94 /British Biotechnology/).

We have not proved correlation between expression of these genes and disease stage and diagnosis.

We have succeeded to prove that if the surgical principles for colon resection performed due to colorectal carcinoma are observed, the resection line does not show any signs of the presence of tumour cells – mRNA for CEA is not present.

The level of mRNA for TIMP-1 is present in the resection line at lower levels than in tumour tissue, and this is due to the role that TIMP-1 plays in the colon. Its level increases not only in all tumour diseases, but also in inflammatory diseases of the colon. The question whether the expression of mRNA for TIMP-1 is also increased outside the resection line and therefore it is a reaction of the colon as an organ will be subject to further research, as will be a potential comparison with samples of colon unaffected by tumour or inflammation. Although the role of TIMP-1 as a prognostic marker remains a subject for further studies, all available studies suggest that the use of TIMP-1 in colorectal carcinoma screening is unsuitable due to the significant non-specificity of this marker.

Two different methods for determination of mRNA in peripheral blood were used. We have not succeeded to detect neither mRNA for CK 20 or CEA using first method (isolation of free RNA from plasma). We have not succeeded to detect mRNA for CEA using second method (isolation of RNA from cells attached on Millipore membrane), but we have succeeded to detect mRNA for CK 20 in 13 samples from 11 patients. No correlation has been observed during evaluation of presence of mRNA for CK 20 in peripheral blood of these patients and comparison with development of their tumour disease (progression x remission) or comparison with primary tumour staging and grading. Determination of mRNA for CK 20 and CEA in peripheral blood using the above-mentioned methods appears to us as practically not utilisable for clinical purposes.

In spite of all optimism of the research group concerning new methods, the utilisation of current immunoanalytic methods for

4.4. Ověření biologických vlastností resekčních linií kolorektálního karcinomu kvantitativní expresí mRNA CEA a TIMP-1

Pro ověření vlastností resekčních linií kolorektálního karcinomu jsme zvolili stanovení mRNA dvou odlišných genů a to mRNA karcinoembryonálního antigenu (CEA) a tkáňového inhibitoru matrixových metaloproteináz-1 (TIMP-1). Prostřednictvím mRNA CEA již někteří autoři zjišťovali přítomnost nádorových buněk v lymfatických uzlinách a nádorové tkáni. Stejně tak řada autorů zaznamenala zvýšenou expresi TIMP-1 v nádorové tkáni oproti normální tkáni.

Existuje statisticky významný rozdíl mezi resekčními linií a nádorovou tkání při stanovení mRNA pro TIMP 1 (p-value 0,0436) pro kolorektální karcinom bez rozdílu lokalizace, nepodařilo se však prokázat statisticky významný rozdíl mezi vzorky z kolorektálního karcinomu a resekčními linií při lokalizaci nádoru v rektu stanovením mRNA pro TIMP-1 (p- value 0,1338). Stejně tak neexistuje statisticky významný rozdíl mezi vzorky kolorektálního karcinomu a resekčními linií při lokalizaci tumoru v oblasti tračnicku stanovením mRNA pro TIMP-1 (p- value 0,2632). Tento rozpor vysvětlujeme nižším počtem vzorků v jednotlivých skupinách (vzorky při lokalizaci nádoru v rektu a v colon), zatímco při spojení obou skupin již počet vzorků je statisticky signifikantní. Přesto je prokázána přítomnost TIMP-1 v resekční linii, i když v nižší hladině.

Při stanovení CEA statisticky významný rozdíl existuje resekčními linií a nádorovou tkání bez rozdílu lokalizace (p- value nižší než 0,0001) – tab. 2., což prokazuje nepřítomnost nádorové tkáně v resekční linii, dále existuje statisticky významný rozdíl mezi resekčními linií a nádorovou tkání u nádorů rekta při stanovení hladin CEA v nádoru a resekční linii (p-value 0,0005) a také existuje statisticky významný rozdíl mezi resekčními linií a nádorovou tkání u nádorů colon při stanovení hladin CEA v nádoru a resekční linii (p-value 0,0042), což prokazuje nepřítomnost nádorové tkáně v resekční linii v obou skupinách. Z těchto výsledků vyplývá, že mRNA pro CEA je v resekční linii téměř nepřítomná, narozdíl od hladin mRNA pro TIMP-1.

Tab. 2. Hladiny CEA - nádorová tkáň / resekční linie

	Nádorová tkáň	Resekční linie
Lower quartile	0	0
Upper quartile	25823,50	0
p-value	Nižší než 0,0001	Nižší než 0,0001
Počet pacientů	45	45

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi hladinami sledovaných markerů (CEA, TIMP-1) u jednotlivých stadií nádorového onemocnění (p-value 0,7778 pro CEA, 0,5684 pro TIMP-1) – tab. 3. Stejně tak neexistuje žádný statisticky významný rozdíl při rozdělení vzorků dle gradingu (p-value 0,3720 pro TIMP-1, 0,4608 pro CEA), ani podle velikosti tumoru (T1-T4) (p-value 0,4828 pro TIMP-1, 0,2261 pro CEA), ani podle positivity uzlin (N0-N2) (p-value 0,5464 pro TIMP-1, 0,9274 pro CEA).

s výsledky prací některých autorů. Pro posouzení významu těchto markerů však bude třeba delší follow up. V případě bezpříznakového přežití bylo nejlepšího výsledku opět dosaženo u předoperačních hodnot CEA, jehož signifikance byla při použití laboratorních cut off potvrzena nejen univariační, ale také multivariační analýzou. Pacienti s předoperační elevací CEA měli 11x větší pravděpodobnost progresse, než pacienti s normálními hodnotami.

V našem souboru pacientů nejlépe reagoval na resekční terapii pokles pooperačních hodnot CEA. V případě nádorového markeru CA 19-9 nedošlo k žádné změně mezi hladinami před a pooperačních hodnot, u nádorového markeru TPS, který byl v našem souboru pooperačně sledován došlo naopak k výraznému vzestupu pooperačních hodnot, což bylo nejspíše spjato s reparačními pochody po provedené operaci. Lze konstatovat, že pro kontrolu úspěchu chirurgické léčby je nejvíce vhodné sledovat před- a pooperační hodnoty CEA.

Při 95% specificitě bylo nejvyšších senzitivit bylo dosaženo u nádorového markeru TPS (83%), senzitivity klasických nádorových markerů CEA a CA 19-9 byly podstatně nižší (41% respektive 25%). Tyto hodnoty jsou poněkud překvapivé, především pro nízkou senzitivitu klasických nádorových markerů. Vysvětlením může být charakteristika souboru, kde do grantové studie vstupovali pacienti s lokálně pokročilým onemocněním střeva (stadia I-III., tzn. maximálně s nádorovým postižením lokoregionálních uzlin), pouze u dvou pacientů byly perioperačně zjištěny distální metastázy do jater. Dále jde i o charakter recidiv, kde se ve více než v 50% jednalo o lokoregionální recidivu. Výsledky je třeba interpretovat opatrně pro malý počet relapsů vzhledem ke krátkému follow up, nicméně se TPS zdá jako slibný marker pro follow up pacientů s kolorektálním karcinomem. Jako ideální se proto zdá kombinace CEA a TPS.

6. Summary

The level of MMP-7, TIMP-1 and MMP-2 mRNA expression was significantly higher in the tumour tissue of colorectal carcinoma than in normal colorectal tissue. It could be possible to inhibit matrix metalloproteinases activity using appropriate antibodies, which could

mRNA pro TIMP-1 i mimo resekční linii, jedná-li se tedy o reakci tlustého střeva jako orgánu bude předmětem dalšího výzkumu, stejně tak i možné srovnání se vzorky nádorem a zánětem nepostíženého tlustého střeva. Úloha TIMP-1 jako prognostického markeru je předmětem dalšího zkoumání, ze všech studií však vyplývá, že použití TIMP-1 při screeningu kolorektálního karcinomu je nevhodné vzhledem ke značné nespecifitě tohoto markeru.

Pro stanovení mRNA v periferní krvi jsme použili dvě odlišné metodiky. První metodikou (izolace volné RNA z plazmy) se nám nepodařilo mRNA pro CK 20 ani pro CEA detekovat. Druhou metodikou (izolace RNA z buněk zachycených na membráně Millipore) jsme mRNA CEA nedetekovali, ale podařilo se nám detekovat mRNA CK 20 u 13 vzorků 11 pacientů. Při hodnocení přítomnosti mRNA CK 20 v periferní krvi těchto pacientů a srovnání s vývojem jejich nádorového onemocnění (progresse x remise) ani srovnáním s stadiem a gradingem primárního nádoru jsme žádnou souvislost nezaznamenali. Stanovení mRNA CK 20 a CEA v periferní krvi výše uvedenou metodikou se nám jeví pro klinické účely prakticky nevyužitelné.

Přes veškerý optimismus řešitelského kolektivu stran novým metod se použití stávajících imunoanalytických metod stanovení nádorových markerů jeví jako nezastupitelné.

Porovnali jsme sérové hodnoty nádorových markerů u kontrolní skupiny zdravých osob a nemocných s akutním zánětlivým onemocněním a dále u nemocných s benigním onemocněním GIT (Crohnova choroba). Především u proliferčního markeru thymidinkinázy (TK) a cytokeratinů TPA a TPS byl zaznamenán statisticky významný rozdíl, u pacientů s benigním onemocněním GIT byly signifikantně vyšší hodnoty TK. Tento výsledek je v souladu s odbornou literaturou.

Prognostický význam CEA byl prokázán u našeho souboru nemocných, kde byl stanoven signifikantní vztah mezi elevací předoperačních hodnot CEA a celkovým přežitím a to jak při použití laboratorní, tak optimalizované cut off. V případě laboratorní cut off bylo pro celkové přežití významné stanovení TPA, v případě optimalizované cut off stanovení CA 19-9, což je opět v souladu

Tab. 3. Hladiny markerů u jednotlivých stadií nádorového onemocnění a srovnání, zda existuje rozdíl v hodnotách markerů u jednotlivých stadií nádorového onemocnění

	Stadium I.	Stadium II.	Stadium III.	Stadium IV.	p-value
TIMP-1	41137,00	45865,50	30421,25	140140,00	0,5684
25%-	-	-	-	-	
75%	50066,50	284116,00	225186,00	356721,50	
Norm.	0,7536	0,7641	0,9052	1,8974	0,8971
TIMP-1	-	-	- 10,2193	-	
25%-	3,5753	5,7205		8,5134	
75%					
CEA	0	0	0	7380,00	0,7778
25%-	-	-	-	- 9055,00	
75%	8235,50	28518,50	24393,00		
Norm.	0	0	0	0,0297	0,7854
CEA	-	-	-	-	
25%-	0,0703	0,2687	0,4654	0,1589	
75%					
Počet	10	21	12	2	

4.5. Expres m RNA v periferní krvi kontrolních skupin

V kontrolních skupinách jsme nezaznamenali, metoda izolace volné RNA z plazmy i metodu záchytu nádorových buněk na membráně (metody B,C) expresi mRNA pro CEA, CK 20. Zaznamenali jsme však expresi GAPDH, což svědčí o správně provedené izolaci RNA, RT i vlastním stanovení q PCR.

4.6. Expres m RNA v periferní krvi skupiny Nádory

Stanovením mRNA v periferní krvi jsme se pokusili stanovit mRNA CEA a CK 20 ve všech vzorcích periferní krve. Nepodařilo se nám v žádném vzorku detekovat přítomnost mRNA CEA, ale mRNA CK 20 se nám podařilo detekovat ve 13 vzorcích – viz tab. 4. Ve všech

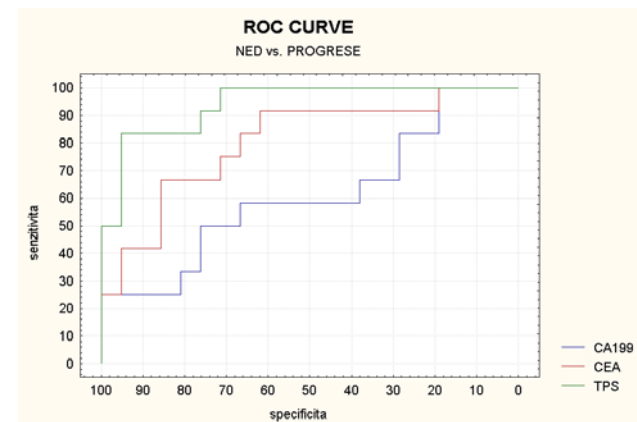
ostatních vzorcích se nám ani při opakovaném stanovení nepodařilo mRNA CK 20 prokázat.

Tab. 4. Detekce mRNA CK 20 v periferní krvi u jednotlivých pacientů a srovnání s klinikou.

Číslo pacienta	Pořadí náběru	Prům. mRNA CK 20	TNM klasifikace	Grading	Dg.	Klinika
301101	1	7562	T3N0M0	1	C18.2	Remise
270213	1	70654	T2N0M0	2	C18.3	Remise
330324	2	11600	T2N0M0	2	C19	Remise
275523	1	8980	T3N1M0	1	C20	Remise
396027	2	99	T3N0M0	2	C20	Remise
440429	1	217	T3N1M0	2	C20	Remise
380816	2	27	T3N0M0	2	C18.9	Remise
500520	1	42	T3N0M0	2	C20	Remise
500520	2	46	T3N0M0	2	C20	Remise
301103	1	7	T3N1M0	1	C18.2	Progrese
301103	3	25	T3N1M0	1	C18.2	Progrese
481206	1	963	T3N0M0	2	C20	Remise
435419	1	10	T3N1M0	1	C19	Remise

Z tab. 4. je zjevné, že neexistuje korelace mezi zachycením mRNA CK20 v periferní krvi a pohlavím, ani diagnózou, ani stadiem onemocnění, ani pozitivitou či negativitou lymfatických uzlin, ani věkem nemocného.

Přesto u nemocného označeného jako 301103 došlo k zachycení mRNA CK 20 předoperačně a po 6 měsících od operace, kdy tato hodnota byla dokonce nepatrně vyšší než předoperační. Tento muž, v době operace 75 letý, byl operován 6.4.2005 a provedena pravostranná hemikolektomie. 14.4. 2006 však byla při koloskopické kontrole nalezena lokální recidiva a nemocný reoperován, v současné době je v péči onkologů a pravidelně dispenzarizován.



Z tab. 8. a grafu 7. vyplývá, že nejvyšší senzitivity bylo dosaženo pro cytokeratinový marker TPS (senzitivita 83% při 95% specifitě), zatímco senzitivity klasických nádorových markerů byly nižší (CEA 41%, CA 19-9 25%).

5. Souhrn

Hladina exprese mRNA MMP-7, TIMP-1 a MMP-2 byla signifikantně vyšší v nádorové maligním tkáni kolorektálního karcinomu než v normální kolorektální tkáni. Pomocí vhodných protilátek by mohlo být možné aktivitu matrixových metaloproteináz inhibovat, což by mohlo mít na nádorovou tkáň a její okolí léčebný efekt. Klinicky se již některé preparáty testují (Bay 12-9566 /fa Bayer/, BB94 /fa British Biotechnologi/).

Neprokázali jsme korelaci mezi expresí těchto genů a stadiem onemocnění a diagnózou.

Podařilo se nám prokázat, že při dodržování chirurgických pravidel při resekci střeva pro kolorektální karcinom, nemá resekční linie známky přítomnosti nádorových buněk – chybí přítomnost mRNA pro CEA.

Hladina mRNA pro TIMP-1 je v resekční linii přítomna v nižší hladině než v nádorové tkáni, což však souvisí s úlohou, kterou TIMP-1 ve střevě hraje. Její hladina je zvýšená při všech nádorových, ale i zánětlivých onemocněních tlustého střeva. Zda je zvýšená exprese

Marker	Klinika	Medián	25%-75% kvartil	Statistický význam
CEA	Remise (n=22)	1,3	0,9-2,1	p < 0,007
	Progrese (n=12)	3,1	1,9-17,6	
CA19-9	Remise (n=22)	10,2	5,3-14,0	NS
	Progrese (n=12)	13,3	5,6-80,2	
TPS	Remise (n=22)	31,0	15,0-49,0	p < 0,0002
	Progrese (n=12)	225,0	101,0-636,0	

Z tab. 7. vyplývá, že u hodnot CEA a TPS se signifikantně liší remisní a progresní hodnoty nádorových markerů. Tento rozdíl nebyl signifikantní u nádorového markeru CA 19-9.

V tab. 8. jsou uvedeny senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro diagnostiku progrese (lokální recidiva, vzdálené metastázy) kolorektálního karcinomu při 95% specificitě vůči remisní skupině pacientů (NED- no evidence of disease). Formou ROC křivek jsou senzitivity a specificity uvedené v grafu 7.

Tab. 8. Senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro diagnostiku progrese (lokální recidiva, vzdálené metastázy) kolorektálního karcinomu při 95% specificitě

Markery	Cut-off	Senzitivita	AUC
CEA	8,6	41%	0,80
CA 19-9	52,0	25%	0,60
TPS	101,0	83%	0,94

AUC plocha pod křivkou

Graf. 7. ROC pro diagnostiku progrese kolorektálního karcinomu

4.7. Sérové nádorové markery u kontrolních skupin

Sérové hladiny nádorových markerů byly sledovány u všech skupin s výjimkou skupiny Plíce, pro kterou stanovení sérových nádorových markerů pro kolorektální karcinom zjevně nemělo význam.

Průměrné hodnoty a mediány námi sledovaných nádorových markerů u kontrolní skupiny zdravých osob byly v rozsahu normálních mezí a to v souladu s těmi, které jsou v literatuře uváděny pro kontrolní skupiny zdravých pacientů a to pro CEA v rozsahu 1,5 - 5,0 ng/ml, CA 19-9 do 40 U/ml, TPS do 90 IU/l, TPA do 110 IU/l, TK do 6,0 IU/l resp do 8 IU/l. U kontrolní skupiny nemocných s akutním zánětlivým onemocněním vyplývá, že ve srovnání se zdravými kontrolami jsou u akutních zánětů vyšší především hodnoty thymidinkinázy, dále i hodnoty cytokeratinů.

U kontrolní skupiny nemocných s prekancerózou (Crohnova choroba) byly hodnoty CEA a CA 19-9 srovnatelné s hodnotami zdravých kontrol, hodnoty cytokeratinů a thymidinkinázy byly nižší než u kontrolní skupiny akutních zánětů.

Další kontrolní skupinou, kterou jsme stanovili byla skupina pacientů s primárním nádorem kolorekta v kompletní remisi nádorového onemocnění (n=22). Remisní hodnoty byly brány v úvahu pouze v případě, že pocházely od žijících nemocných, kteří nikdy neměli progresi a nebyly u nich nalezeny distanční metastázy. Kromě toho byly vyloučeny všechny výsledky v intervalu dvanácti měsíců po skončení primární terapie (nelze odhadnout vliv terapie, kdy především u adjuvantní léčby může být podáno až 12 cyklů chemoterapie). Zároveň byli vyloučeni pacienti, u kterých se v průběhu dispenzární péče vyskytovalo benigní, či zánětlivé onemocnění, které by mohlo nespecificky ovlivnit hodnoty nádorových markerů.

Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou Zdraví a skupinou Záněty pro TK, TPS a TPA. Statisticky významný rozdíl nebyl zaznamenán mezi skupinou Zdraví a skupinou Prekancerozy. Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou Záněty a skupinou Prekancerozy pro nádorový marker CA 19-9.

Zejména rozdíl mezi skupinou zdravých kontrol a skupinou pacientů s akutními záněty u proliferačního markeru TK a cytokeratinů TPS a TPA je v souladu s literárními závěry, kdy je známo, že především zánětlivé komplikace mohou nespecificky elevovat hodnoty těchto markerů a je nutné s touto skutečností počítat při klinické interpretaci laboratorních výsledků.

Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou NED a skupinou Prekancerózy pro nádorové markery CA19-9 a TK. Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou NED a skupinou Záněty pro TK, TPS. Statisticky významný rozdíl existuje mezi skupinou NED a skupinou Zdraví pro TK, TPA.

Ve všech případech byl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl mezi hodnotou proliferačního markeru TK u skupiny pacientů v kompletní remisi nádorového onemocnění kolorektálního karcinomu a ostatními kontrolními skupinami, včetně zdravých kontrol. Medián hodnot TK byl u skupiny NED signifikantně nižší, než u ostatních kontrol, včetně zdravé kontrolní skupiny. Vysvětlení spočívá ve skutečnosti, že i u skupiny pacientů, které klinik označil za zdravé se vyskytovali pacienti s nespecifickou elevací TK, např. v důsledku reparačních procesů při zranění. Naopak u nádorového markeru TPA, byly hodnoty signifikantně vyšší u skupiny NED ve srovnání se skupinou zdravých kontrol, což může souviset např. s progresí nádorového onemocnění, které dosud nebylo detekováno.

4.8. Sérové nádorové markery u skupiny Nádory

Nádorové markery byly dále vyšetřovány u souboru nemocných s primárně diagnostikovaným a histologicky verifikovaným adenokarcinomem tlustého střeva.

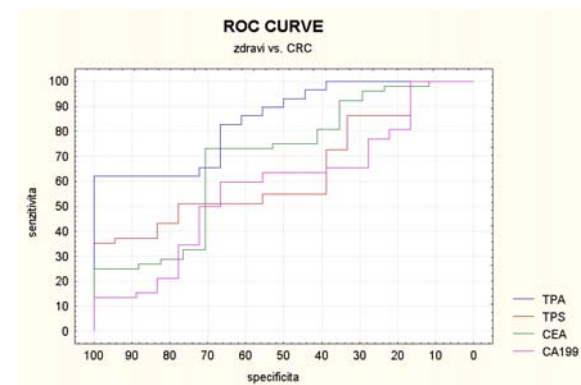
Prokázali jsme vztah předoperačních hodnot CEA s postižením lokoregionálních uzlin a výskytem vzdálených metastáz a se stadiem onemocnění, u nádorového markeru TPA jsme prokázali vztah se stadiem onemocnění. U ostatních nádorových markerů nebyly žádné významné vztahy prokázány, což může být dáno i velikostí námi sledovaného souboru.

U předoperačních hodnot jsme prokázali významnou korelaci mezi cytokeratinovým nádorovými markery TPA a TPS a dále mezi

	off		
CEA	3,5	25%	0,68
CA 19-9	30,4	14%	0,55
TPA	48,0	62%	0,33
TPS	75,0	37%	0,62
TK	8,7	14%	0,28

AUC plocha pod křivkou

Graf. 6. ROC pro primární diagnostiku kolorektálního karcinomu



Z uvedené tab. 6. a grafu 6. je zřejmé, že senzitivity jednotlivých nádorových markerů při 95% specifitě (vs. zdravé kontroly) jsou kromě TPA nízké.

V tab. 7. je porovnání mediánů hodnot nádorových markerů v klinické remisi nádorového onemocnění (skupina NED- viz charakteristika kontrolních skupin) a hodnot nádorových markerů u pacientů v klinické progresi nádorového onemocnění. Do statistické analýzy byly zavzaty pouze hodnoty zjištěné při první progresi, která nastala po primární terapii.

Tab. 7. Porovnání remisních a progresních hodnot u nemocných s kolorektálním karcinomem

kteře byly pro jednotlivé nádorové markery následující: CEA 3,5 ng/ml, CA 19-9 28.0 IU/ml, TK 6 IU/l, TPA 110 IU/l, TPS 90 IU/l.

Tab. 5. Bezpříznakové přežití (disease free survival- DFI) v závislosti na předoperačních hodnotách nádorových markerů (laboratorní cut off)- univariační analýza

Marker	Kaplan Meier	Cox Model	
		HR (95% CI)	p-value
CEA	< 0,003	5,1 (1,5-17,1)	< 0,007
CA 19-9	NS	1,4 (0,3-6,7)	NS
TPS	NS	1,6 (0,5-5,8)	NS
TPA	< 0.03	9,1 (0,8-100,5)	NS
TK	NS	1,6 (0,1-17,3)	NS

Provedená multivariační analýza (Coxův regresní model) prokázala prognostický význam u nádorového markeru CEA (hazard ratio 11,3; $p < 0,04$).

V tab. 6. jsou uvedeny senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro primární diagnostiku kolorektálního karcinomu při 95% specifitě vůči zdravým kontrolám. Formou ROC křivek jsou senzitivity a specifity uvedené v grafu 6.

Tab. 6. Senzitivity jednotlivých nádorových markerů pro primární diagnostiku kolorektálního karcinomu při 95% specifitě vůči zdravým kontrolám

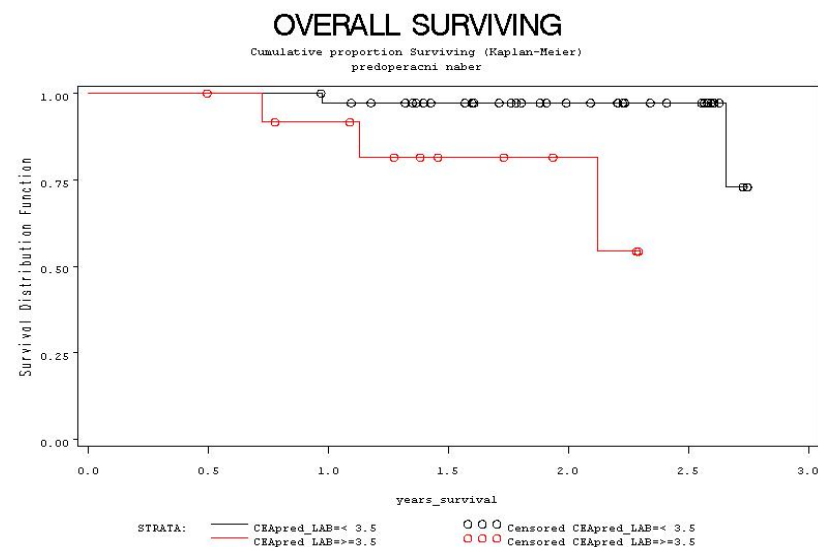
Markery	Cut-	Senzitivita	AUC
---------	------	-------------	-----

proliferčním markerem TK a TPS.

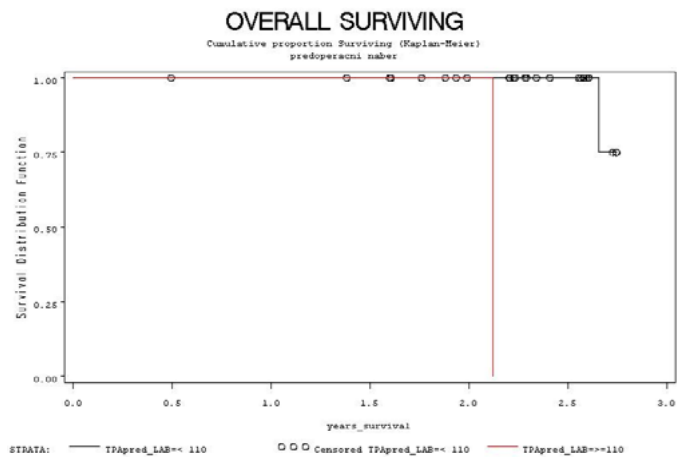
U klasických nádorových markerů došlo pooperačně k poklesu hodnot, statisticky významný byl pouze pokles CEA. U TPS došlo k signifikantnímu nárůstu, což je nejpravděpodobněji spojeno s reparačními pochody po provedené operaci (pooperační odběry byly provedeny 7. den po operaci).

Prognostický význam má dle očekávání předoperační stanovení CEA, zároveň cytokeratininový marker TPA (Log rank $p < 0.001$). K ověření významu tohoto markeru však bude nutné vyhodnocení přežití v delším časovém intervalu. Význam obou markerů pro přežití je zároveň uveden v grafech 2. a 3.

Graf. 2. Celkové přežití v závislosti na výši předoperačních hodnot CEA ve vztahu k provedené operaci (laboratorní cut off)- univariační analýza

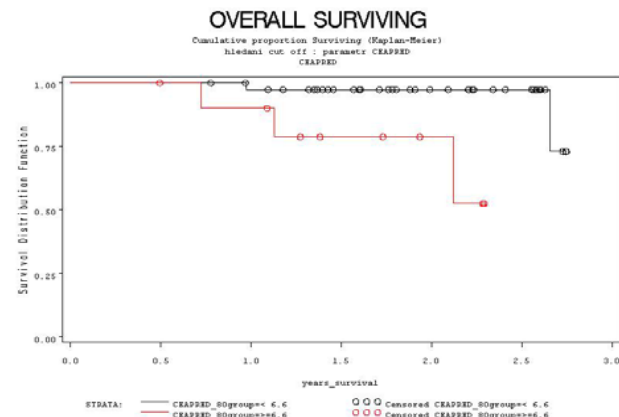


Graf. 3. Celkové přežití v závislosti na výši předoperačních hodnot TPA ve vztahu k provedené operaci (laboratorní cut off)- univariační analýza

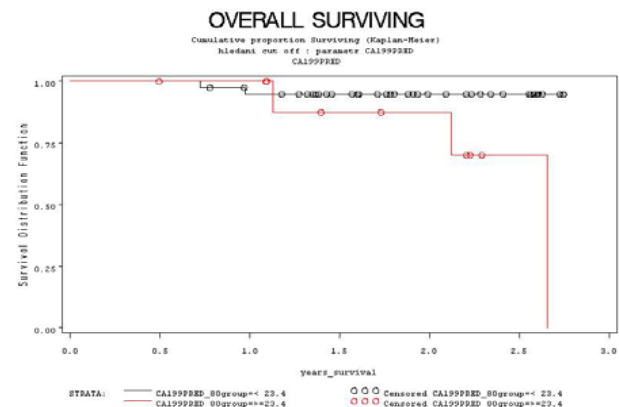


Při použití optimalizované cut off má z hlediska celkového přežití prognostický význam předoperační hodnoty CEA a CA 19-9. Ostatní sledované nádorové markery byly bez statistické významnosti. Význam obou markerů pro přežití je uveden v grafech 4. a 5.

Graf. 4. Celkové přežití v závislosti na předoperačních hodnotách CEA (optimalizovaná cut off)- univariační analýza



Graf. 5. Celkové přežití v závislosti na předoperačních hodnotách CA 19-9 (optimalizovaná cut off)- univariační analýza



Provedená multivariační analýza (Coxův regresní model) prokázala prognostický význam u nádorového markeru CEA (hazard ratio 13,5; $p < 0,02$).

V tab. 5. je charakterizováno bezpříznakové přežití (diastase free interval= DFI) v závislosti na výši předoperačních hodnot nádorových markerů ve vztahu k provedené operaci. Opět jsme jako diskriminační hladinu použili laboratorních hraničních hodnot (laboratorní cut-off),