

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Tereza Hálková

Studium genetického pozadí solidních tumorů
Study of genetic background of solid tumors

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Konzultant: RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.1.2025

Podpis:

Mgr. Tereza Hálková

Prohlášení školitelky o podílu na publikacích:

Prohlašuji, že Mgr. Tereza Hálková rozhodujícím způsobem (40 - 90 %) přispěla ke vzniku všech 4 odborných publikací, které jsou uvedeny ve výsledkové části této disertační práce. U každé publikace je uveden konkrétní výčet činností, kterými se na jejím vzniku podílela.

V Praze, 20.1.2025

Podpis:

doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Disertační práce byla vypracována na Oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu v Praze a v Centru aplikované genomiky solidních nádorů Výzkumného ústavu Genomac v Praze.

Poděkování

Tato práce vznikla pod vedením doc. RNDr. Běly Bendlové, CSc., ředitelky Endokrinologického ústavu v Praze, které bych chtěla na tomto místě upřímně poděkovat za její mnohaletou podporu a energii, kterou mi po celou dobu studia a sepisování disertační práce dodávala. Rovněž děkuji za její cenné rady a velmi si vážím toho, s jakou ochotou mi předávala své vědomosti a zkušenosti.

Děkuji také své nynější nadřízené, RNDr. Lucii Benešové, Ph.D., ředitelce Výzkumného ústavu Genomac v Praze, která se ujala role mojí konzultantky a mentorky v oblasti onkologického výzkumu. Při sepisování této práce i v průběhu výzkumných projektů, na kterých je práce založena, byla mojí nepostradatelnou rádkyní a oporou.

V neposlední řadě patří můj dík také všem kolegům z obou pracovišť, na kterých tato práce vznikla, za vytvoření profesionálního a zároveň přátelského pracovního prostředí. Děkuji také za milou spolupráci všem klinickými pracovištím, zejména lékařům z Fakultní nemocnice v Motole v Praze, z Ústřední vojenské nemocnice v Praze a z Thomayerovy nemocnice v Praze, kteří zaštitili klinickou část výzkumných projektů a zajišťovali sběr vzorků.

*Tato práce byla podporována grantovými projekty Ministerstva zdravotnictví ČR
NT/13901-4, NT/13638-4, 15-27939A, 17-31909A a NU22-08-00424*

Abstrakt

Disertační práce pojednává o rozdílných metodických přístupech detekce různých genetických alterací u tří typů solidních nádorů: štítné žlázy, kolorekta a slinivky břišní. Moderní onkologický výzkum se na znalosti somatických genetických alterací v nádorovém ložisku zakládá. Tato znalost, krom toho, že vědcům poskytuje představu o příčině vzniku nádorů, má největší přínos v tom, že může významně ovlivnit léčbu konkrétního nádoru, respektive pacienta. Specifické genetické alterace dokážou totiž předpovědět prognózu pacienta nebo umožňují využít k terapii molekulárně cílenou léčbu, tzv. biologickou léčbu, nejčastěji ve formě inhibitorů onkoproteinů vzniklých expresí mutovaných genů.

Další úrovní je pak využití konkrétních genetických alterací pro detekci tzv. volné nádorové DNA (ctDNA, z angl. circulating tumor DNA), která se vyskytuje v krvi onkologických pacientů. Analýza ctDNA v periferní krvi pacientů, označovaná také jako „tekutá biopsie“, je aktuálně velmi atraktivním přístupem, který umožňuje neinvazivní sledování průběhu léčby pomocí stoupajících či klesajících hladin ctDNA, a to prakticky kdykoliv je potřeba.

V této práci se zaměřuji pouze na nejdůležitější poznatky a výsledky získané během svého působení v onkologickém výzkumu solidních nádorů, které dokládám příslušnými publikacemi.

V rámci charakterizace souboru pediatrických pacientů s papilárním karcinomem **štítné žlázy** byla díky drobnému vylepšení stávající metodiky detekce fúzních genů nalezena nová atypická fúze genů *RET* a *CCDC6*, která byla pojmenována *RET/PTC1ex9*. Tato fúze byla zřejmě příčinou agresivního projevu papilárního karcinomu štítné žlázy u osmiletého pacienta.

Při výzkumu **kolorektálních karcinomů** bylo zásadních objevů dosaženo během studia ctDNA. Nejprve byla zavedena rutinní citlivá metodika detekce ctDNA a následně bylo více než 10 let studováno její uplatnění v různých klinických situacích. Nejvíce se ctDNA osvědčila při dlouhodobém monitorování pacientů. Ukázalo se, že ctDNA může být citlivějším markerem než běžně využívané proteinové tumorové markery a že dokáže odhalit návrat nádorového onemocnění (recidivu) dříve než tyto tumorové markery nebo zobrazovací metody. Dále je důležitým ukazatelem při hodnocení radikality provedeného chirurgického odstranění tumorového ložiska.

Zcela jiným metodickým přístupem rovněž při studiu **kolorektálních karcinomů** bylo studium intratumorové mutační heterogenity prekancerózních kolorektálních lézí. S cílem co nejpodrobněji lokalizovat a kvantifikovat zastoupení různých mutačních klonů v rámci adenomu, byly prekancerózní léze rozděleny do miniaturních vzorků o objemu cca 5 mm³. Každý ze vzorků se následně analyzoval separátně. Krom představy o přesném prostorovém umístění a množství jednotlivých mutací v prekancerózních lézích se ukázalo, že přítomnost mutace v 7. exonu genu *TP53* je potenciálním prediktorem brzké recidivy onemocnění v podobě vzniku nových metachronních lézí.

Při studiu **karcinomu slinivky břišní** došlo k významnému pokroku v metodice detekce mutací genu *KRAS*, které jsou hlavním předmětem mého výzkumu. Ukázalo se, že nejvhodnějším materiálem pro vyšetření mutací je bioptický materiál získaný při diagnostice karcinomu pankreatu natřený na cytologické sklíčko. Díky tomu, že patolog při cytologickém vyšetření označí na sklíčku oblast výskytu tumorových buněk a díky izolaci DNA pouze z této oblasti je možné eliminovat falešně negativní výsledky a získat skutečně relevantní záchyt *KRAS* mutací. Zásadním poznatkem pak bylo zjištění, že jednotlivé typy *KRAS* mutací u karcinomu pankreatu nejsou rovnocenné a mohou ovlivňovat prognózu pacientů. Toho lze využít při racionálním plánování způsobu léčby zejména s ohledem na kvalitu života a zátěž pacienta.

Abstract

The dissertation discusses different methodological approaches for detection of various genetic alterations in three types of solid tumors: thyroid, colorectal and pancreatic. Modern oncological research is based on the knowledge of somatic genetic alterations in tumor. This knowledge, besides providing scientists with an idea of the cause of the formation of tumors, has the greatest benefit in that it can significantly influence the treatment of a particular tumor or patient. Specific genetic alterations can predict the prognosis of a patient or enable the use of molecularly targeted treatment, so-called biological treatment, most often in the form of inhibitors of oncoproteins produced by expression of mutated genes.

The next level is the use of specific genetic alterations to monitor the so-called circulating tumor DNA (ctDNA) that occurs in the blood of oncological patients. The investigation of genetic alterations from the blood, also referred to as "liquid biopsy", is currently a very attractive approach that allows non-invasive monitoring of the course of treatment using rising or falling levels of present genetic alteration, virtually whenever needed.

In this work, I focus only on the most important findings and results obtained during my work in oncological research of solid tumors, which I illustrate with relevant publications.

During the characterization of a cohort of paediatric patients with **papillary thyroid cancer**, a new atypical fusion of *RET* and *CCDC6* genes, named *RET/PTC1ex9*, was found thanks to a minor improvement in the existing methodology for detection of fusion genes. This fusion was apparently the cause of aggressive manifestation of papillary thyroid cancer in an eight-year-old patient.

In **colorectal cancer** research, major discoveries were made during the study of ctDNA. First, a routine sensitive methodology for the detection of ctDNA was introduced and then its application in various clinical situations was studied for more than 10 years. CtDNA has proven most effective in long-term monitoring of patients. It has been shown that ctDNA can be a more sensitive marker than commonly used protein tumor markers and that it can detect cancer recurrence earlier than these tumor markers or imaging methods. Furthermore, it is an important indicator in assessing the radicality of surgical removal of tumor lesions.

A completely different methodological approach was also used in the research of **colorectal carcinomas** to study intratumor mutational heterogeneity of precancerous colorectal lesions. In order to locate and quantify different mutant clones within the adenoma in as much detail as possible, precancerous lesions were divided into miniature samples with a volume of approximately 5 mm³. Each of the samples was subsequently analyzed separately. In addition to the idea of the precise spatial location and quantification of individual mutations in precancerous lesions, it was shown that the presence of a mutation in the 7th exon of the *TP53* gene is a predictor of early disease recurrence in the form of new metachronous lesions.

During the research of **pancreatic cancer**, significant progress was made in the methodology of detecting *KRAS* gene mutations, which are the main subject of my research. It turned out that the most suitable material for the examination of mutations is the biopsy material obtained during the diagnosis of pancreatic cancer smeared on a cytological slide. Thanks to the fact that the pathologist during the cytological examination marks on the slide the tumor cell area and thanks to the isolation of DNA only from this area it is possible to eliminate false negative results and obtain a truly relevant detection of *KRAS* mutations. The key finding was that the individual types of *KRAS* mutations in pancreatic cancer are not equivalent and may affect the prognosis of patients. This can be used in rational planning of treatment, especially with regard to the quality of life and burden of the patient.

Sezam použitých zkratk a symbolů

Zkratka	Anglicky	Česky
<i>ALK</i>	Anaplastic Lymphoma Kinase	gen pro kinázu anaplastického lymfomu
<i>APC</i>	Adenomatous Polyposis Coli	gen familiární adenomatózní polypózy
ARTN	Artemin	artemin
<i>BRAF</i>	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	virový protoonkogen v-raf myšího sarkomu, homolog B1
CA19-9	Cancer antigen 19–9	tumorový antigen 19–9
cDNA	Complementary DNA	komplementární DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen	karcinoembryonální antigen
cfDNA	Circulating cell-free DNA	cirkulující „volná“ DNA
CIMP	CpG island methylator phenotype	Fenotyp s hypermetylovanými CpG ostrůvky
CIN	Chromosomal instability	chromozomální nestabilita
CRC	Colorectal cancer	kolorektální karcinom
CT	Computed tomography	výpočetní tomografie
ctDNA	Circulating tumor DNA	cirkulující nádorová DNA
<i>DCC</i>	Deleted in colorectal cancer, (tumor suppressor gene)	nepřítomen u kolorektálního karcinomu, tumor supresorový gen
DNA	Deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dPCR	Digital PCR	digitální PCR
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor	gen pro receptor epidermálního růstového faktoru
<i>ERK</i>	Extracellular signal-regulated Kinase	gen pro kinázu regulovanou extracelulárním signálem
EUS	endoscopic ultrasonography	endoskopická ultrasonografie
EUS – FN(A)B	endoscopic ultrasonography – fine needle (aspiration) biopsy	endoskopickou ultrasonografií naváděná biopsie tenkou jehlou
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded	(tkáň) fixovaná formalínem, zalitá do parafínu
FN(A) B	Fine-needle (aspiration) biopsy	(aspirační) biopsie tenkou jehlou
GDN	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor	neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	homolog virového protoonkogenu Kirsten kryšího sarkomu
LOD	Limit of detection	limit detekce
LOH	Loss of heterozygozity	ztráta heterozygozity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	proteinkináza aktivovaná mitogeny
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAPKK 1, mitogen aktivující proteinkináza kináza 1
<i>MLH1</i>	Tumor suppressor gene encoding DNA mismatch repair protein Mlh1	tumor supresorový gen kódující protein Mlh1 pro opravu chybného párování DNA
MRI	Magnetic resonance imaging	magnetická rezonance
MSI	Microsatellite instability	mikrosatelitová nestabilita
NGS	Next generation sequencing	sekvenování nové generace
NRTN	Neurturin	neurturin

Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>NTRK</i>	Neurotrophic tyrosine receptor kinase	gen pro neurotrofní tyrozinovou receptorovou kinázu
OS	Overall survival	celkové přežití
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia	pankreatická intraepiteliální neoplázie
PCR	Polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma	duktální adenokarcinom pankreatu
PSPN	Persephin	persefin
PET/CT	Positron emission tomography/ computed tomography	pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase	Gen pro fosfatidylinositol 3-kinázu
PTC	Papillary thyroid cancer	papilární karcinom štítné žlázy
qPCR	Quantitative PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
<i>RAS</i>	Ras sarcoma virus gene	gen kódující protein p21
<i>RET</i>	Rearranged during transfection	protoonkogen, „přeskupený během transfekce“
<i>RET/PTC</i>	<i>RET/PTC</i> fusion gene	fúzní gen vzniklý spojením <i>RET</i> genu s jiným genem (u PTC)
RNA	Ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
<i>TP53</i>	Tumor protein 53	gen pro tumorový protein 53
<i>TRK</i>	Tropomyosin Receptor Kinase	gen pro tropomyosinový receptor s kinázovou aktivitou
<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor	gen pro vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Nádorová onemocnění	2
1.2	Onkogenetika	3
1.3	Charakter vzorků pro onkogenetické vyšetření.....	4
1.4	Karcinomy štítné žlázy.....	6
1.4.1	Anatomie štítné žlázy	6
1.4.2	Papilární karcinom štítné žlázy – diagnostika a léčba.....	8
1.4.3	Onkogenetika PTC	10
1.4.3.1	RET/PTC přeskupení	12
1.4.3.2	Metodika detekce exprese <i>RET/PTC</i> genů.....	14
1.5	Kolorektální karcinomy	16
1.5.1	Anatomie tlustého střeva a konečníku	16
1.5.2	CRC – diagnostika a léčba	17
1.5.3	Onkogenetika CRC	22
1.5.4	Intratumorová mutační heterogenita - ITH	25
1.5.4.1	Metodika detekce ITH kolorektálních prekancerózních lézí	27
1.5.5	ctDNA	27
1.5.5.1	Metodiky detekce ctDNA.....	28
1.5.5.2	Dostupná metoda pro rutinní detekci ctDNA.....	29
1.6	Karcinom Pankreatu.....	32
1.6.1	Anatomie slinivky břišní	32
1.6.2	Karcinom pankreatu – diagnostika a léčba	33
1.6.3	Onkogenetika karcinomu pankreatu.....	36
1.6.4	Charakter PDAC vzorků pro genetická vyšetření	37
2	Cíle disertační práce	39
3	Výsledky	40
3.1	Publikace 1	40
3.2	Publikace 2	50
3.3	Publikace 3	62
3.4	Publikace 4	76
4	Diskuze.....	91
5	Shrnutí a závěr.....	96
6	Seznam použité literatury.....	97

1 Úvod

Část disertační práce věnující se karcinomům štítné žlázy byla vypracována na Oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu v Praze. Výsledky této části práce jsou obsaženy v následujícím článku publikovaném v impaktovaném zahraničním periodiku, který je uveden v kapitole 3 Výsledky jako **Publikace 1**:

1. **Halkova T**, Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Sykorova P, Vlcek P, Reboun M, Katra R, Kodetova D, Schrupf M, van Wezel T, Morreau H, Bendlova B. A novel RET/PTC variant detected in a pediatric patient with papillary thyroid cancer without ionization history. *Hum Pathol.* **2015**; 46: 1962-1969. **IF = 2.7**

Výzkum týkající se kolorektálních karcinomů a karcinomů pankreatu byl proveden v Centru aplikované genomiky solidních nádorů Výzkumného ústavu Genomac v Praze. Výsledky této části práce jsou shrnuty ve 3 publikacích zveřejněných v impaktovaných zahraničních periodikách, který jsou uvedeny v kapitole 3 Výsledky jako **Publikace 2-4**:

2. Benešová L, **Hálková T**, Ptáčková R, Semyakina A, Menclová K, Pudil J, Ryska M, Levý M, Šimša J, Pazdírek F, Hoch J, Blaha M, Minárik M. Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA. *World J Gastroenterol.* **2019**; 25: 6939-6948. **IF = 4.3**
3. **Hálková T**, Ptáčková R, Semyakina A, Suchánek Š, Traboulsi E, Ngo O, Hejcmanová K, Májek O, Bureš J, Zavoral M, Minárik M, Benešová L. Somatic Mutations in Exon 7 of the *TP53* Gene in Index Colorectal Lesions Are Associated with the Early Occurrence of Metachronous Adenoma. *Cancers* **2022**; 14: 2823. **IF = 5.2**
4. **Hálková T**, Bunganič B, Traboulsi E, Minárik M, Zavoral M, Benešová L. Prognostic Role of Specific *KRAS* Mutations Detected in Aspiration and Liquid Biopsies from Patients with Pancreatic Cancer. *Genes* **2024**; 15: 1302. **IF = 2.8**

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních onemocněních celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Jednotlivá nádorová onemocnění jsou velice heterogenní a mohou postihnout prakticky jakoukoliv tkáň. Všechna nádorová onemocnění jsou geneticky podmíněná, protože příčinou maligní transformace buněk je vždy genetická alterace, nejčastěji mutace v DNA.

Nádory mohou být **hereditární (familiární, dědičné)**, a to pokud je dispozice k jejich vzniku (mutace odpovědného genu) zděděna ze zárodečných buněk rodiče. Jedná se o tzv. **germinální (zárodečné, vrozené) mutace**, které jsou pak přítomny ve všech buňkách organismu a mohou být dále předávány potomkům (Foretová *et al.* 2022). Typicky se jedná o mutace tumor supresorových genů (viz odstavec 1.2), které mají recesivní charakter a k rozvoji nádorového onemocnění tedy dochází až po mutaci druhé alely genu v somatické buňce příslušné tkáně. Tato práce se však zaměřuje pouze na **sporadické formy nádorových onemocnění**, kterých je naprostá většina. Sporadické nádory vznikají vlivem **somatických mutací** zdravých somatických buněk a jejich následnou transformací v buňky nádorové. Nádorové buňky se vymykají kontrolním mechanismům buněčné proliferace. To vede v konečném důsledku k jejich nekontrolovanému množení a vzniku nádorové tkáně (Liggett a DeGregori 2017). Pokud zmnožením transformovaných buněk vznikne pevný útvar, nazýváme ho **solidním nádorem**. Druhou skupinou nádorových onemocnění jsou malignity krvetvorných buněk (leukémie) a lymfoidní malignity (lymfomy), o těch však tato práce nepojednává.

Maligní transformace je postupný proces a dochází při ní k mnoha histologickým, morfologickým a genetickým změnám (Zhang *et al.* 2024). Krom již zmíněné nekontrolované proliferace se nádorové buňky odlišují od zdravých somatických buněk také ztrátou kontaktní inhibice, to znamená, že po kontaktu s jinou buňkou nezastaví svůj růst, mohou prorůstat přes sebe, vytvářet vrstvy nebo shlukovité útvary. Nádorové buňky se navíc množí po neomezený počet generací a jsou tak prakticky nesmrtelné. Nádorové buňky nepotřebují k růstu stimulaci růstovými faktory. Dochází u nich také ke změně povrchových antigenů, čímž se vymykají kontrole imunitního systému (Gonzalez *et al.* 2018, Hanahan a Weinberg 2000).

1.2 Onkogenetika

Pro maligní transformaci jsou zásadní mutace v **protoonkogenech** a **tumor supresorových genech**, což jsou geny kódující proteiny, jejichž nadměrná aktivace (protoonkogeny) nebo naopak ztráta funkce (tumor supresory) způsobí růstovou výhodu buňky a vede k její nekontrolované proliferaci (Hanahan a Weinberg 2000, Shen *et al.* 2024). Protoonkogeny kódují proteiny, které pozitivně regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci a inhibují apoptózu. Patří mezi ně např. růstové faktory, receptory pro růstové faktory, proteiny signálních drah, buněčného cyklu (cykliny, cyklin-dependentní kinasy), transkripční faktory a inhibitory apoptózy. Mutace v protoonkogenech nastávají většinou v tzv. hotspotech (kodony příp. exony s častým výskytem mutací). Nejčastěji se jedná o bodové mutace, méně často delece, genové přestavby, nebo genové amplifikace. Je-li protoonkogen aktivován mutací, stává se z něj onkogen. K tomu stačí mutace na jedné alele protoonkogenu – jde o tzv. **dominantní mutace** (Anderson *et al.* 1992). Typickými představiteli protoonkogenů jsou *RET*, *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA*.

Tumor supresorové geny negativně regulují (tlumí) buněčnou proliferaci. Často jsou to geny kódující inhibitory v signálních drahách, negativní transkripční faktory, aktivátory apoptózy a DNA reparační proteiny. K inaktivaci tumor supresorového genu je potřeba tzv. dvojího zásahu – tedy jde o inaktivaci tzv. **recesivními mutacemi**, které inaktivují obě alely tumor supresoru. Nejčastěji se jedná o bodovou mutaci jako první zásah na jedné alele a následně bodovou mutaci na druhé alele nebo její úplnou ztrátu (LOH – z angl. loss of heterozygosity, ztráta heterozygoty), nebo epigenetické umlčení hypermethylací CpG ostrůvků v promotorové oblasti genu (Lipsick 2020, Chen *et al.* 2020). Bodové mutace v tumor supresorových genech nemívají hotspoty výskytu, mohou nastat prakticky v kterémkoliv exonu, ačkoliv v některých exonech se vyskytují častěji - např. v 15. exonu genu *APC* nebo v 5. - 8. exonu genu *TP53*. V roce 1990 byly tumor supresorové geny uznány za stejně klíčové pro rozvoj rakoviny jako protoonkogeny (Lipsick 2020).

Maligní transformace může začít mutací jen v jediné somatické buňce (tzv. iniciovaná buňka) a jejím klonálním zmnožením (klonální expanzí) pak vzniká nádorové ložisko. Během karcinogeneze se pak většinou hromadí v jednotlivých klonech iniciované buňky další genetické alterace (viz také kapitola 1.5.3 a obr. 8; kapitola 1.5.4 a obr. 9), takže ve výsledné nádorové mase může být přítomno mnoho klonů různě mutovaných

buněk. Tento jev se nazývá **intratumorová mutační heterogenita, ITH**. Podrobněji o ITH pojednává kapitola 1.5.4.

1.3 Charakter vzorků pro onkogenetické vyšetření

Při studiu solidních nádorů je možné pracovat s několika druhy vzorků. Nejčastěji se jedná o zmrazenou nádorovou tkáň získanou **peroperativně** nebo o **bioptickou** tkáň získanou např. z tlustého střeva při kolonoskopii nebo během ultraasonografického vyšetření při diagnostice karcinomu pankreatu. Výtežky i kvalita DNA izolované z těchto vzorků tzv. **čerstvé zmrazené nádorové tkáně** (angl. fresh frozen tissue) bývají v řádech desítek až stovek ng/μl a tedy zcela dostačující pro následné analýzy. Vzhledem však k tomu, že tyto vzorky nejsou před zmražením podrobeny histologickému či cytologickému zhodnocení, je potřeba počítat s tím, že zastoupení sledovaných genetických mutací může být nižší než je tomu u jiných druhů vzorků (viz dále). Důvodem je to, že nádorové ložisko je směsí nádorových i nenádorových buněk a nemutovaná DNA z nenádorových buněk pak snižuje záchyt genetických mutací. To může být problém zejména u bioptických vzorků, kde bývají nádorové buňky zastoupeny minoritně nebo ve vzorku mohou chybět úplně. Dále je potřeba počítat s ITH (viz kapitola 1.2 a 1.5.4). Přítomnost nádorových buněk s různými mutacemi totiž také snižuje jejich záchyt a ztěžuje interpretaci výsledků, protože nikdy není jasné, zda je přítomen jeden klon buněk s více mutacemi nebo více klonů s různými mutacemi. Z uvedených důvodů je třeba u těchto vzorků počítat také s falešnou negativitou.

Přesnější charakterizace vzorků je možná u preparátů ve formě **parafinových bloků**, tzv. FFPE bloků (z angl. formalin fixed paraffin embedded), nebo bioptických **cytologických nátěrů** na mikroskopickém sklíčku, které bývají rutinně histologicky respektive cytologicky zhodnoceny patologem a pak teprve poskytnuty pro izolaci a analýzu DNA. Patolog tak může vyznačit na preparátu konkrétní oblast s výskytem nádorových buněk, ze které je pak izolována DNA. Odpadá tím komplikace s příměsí nenádorových buněk, zůstává však problém s ITH. Výhodou těchto archivovaných preparátů je možnost uskladnění při pokojové teplotě, nevýhodou je obtížnější izolace DNA pouze z omezeného množství materiálu. Dále bývá DNA z parafinových bloků vlivem fixace tkáně ve formaldehydu fragmentovaná a chemicky modifikovaná, což může vést k negativnímu ovlivnění PCR reakce.

Další moderní variantou je detekce DNA mutací z cirkulující nádorové DNA (**ctDNA** z angl. circulating tumor DNA). Prvním krokem je odběr krve pacienta a následná separace plazmy od krevních buněk centrifugací. V dalším kroku je izolována celková volná (cirkulující) DNA z plazmy (cfDNA z angl. cell free DNA), jejíž frakcí je i ctDNA. V tomto případě je analýza DNA zatížena stejnými komplikacemi jako analýza čerstvé nádorové tkáně, protože se opět jedná o analýzu směsi nádorové i nenádorové DNA. Navíc analýza ctDNA vyžaduje vysoce citlivou metodiku. Podrobněji o ctDNA pojednává kapitola 1.5.5.

1.4 Karcinomy štítné žlázy

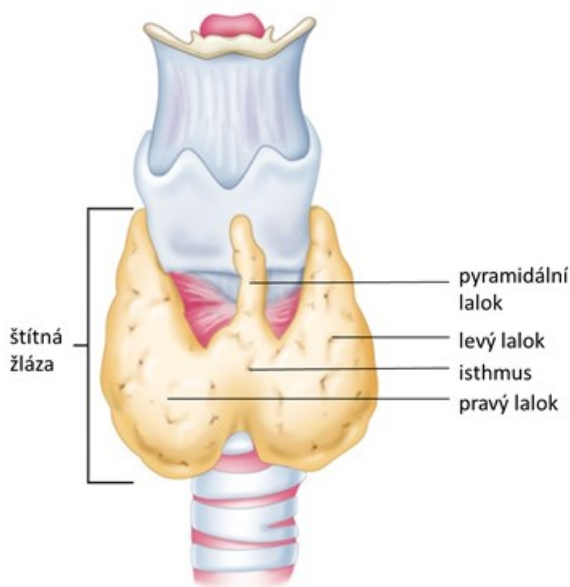
Karcinomy štítné žlázy jsou poměrně vzácné, tvoří přibližně 1 až 1,5 % všech nově diagnostikovaných karcinomů, nicméně jsou nejčastější malignitou endokrinního systému (cca 90 %). Manifestují se ve všech věkových skupinách, přičemž výrazně převažuje výskyt u žen v poměru 1 : 0,4 oproti mužům. Jejich incidence celosvětově od konce 20. století stále narůstá. V České republice bylo v roce 1984 diagnostikováno 239 případů, v roce 2021 bylo registrováno už 1148 případů (ÚZIS 2021). Nárůst incidence můžeme částečně vysvětlit zlepšenou diagnostikou pomocí ultrasonografií naváděné biopsie tenkou jehlou (EUS - FNAB z angl. endoscopic ultrasonography - fine needle aspiration biopsy). Díky ultrazvukovému vyšetření je v současnosti možné detekovat i karcinomy menší než 1 cm, tzv. mikrokarcinomy, které byly v minulosti detekovatelné obtížně (Russell *et al.* 2023). Rostoucí trend incidence je dále přisuzován zvýšené informovanosti pacientů či zpřísnění diagnostických kritérií. Je však zřejmé, že existují i další faktory, které mohou za rostoucí počet karcinomů štítné žlázy, zejména environmentální polutanty, obezita a změna mikrobioty, či nadměrné využívání rentgenového vyšetření ve stomatologii (Memon *et al.* 2019, Kim *et al.* 2020, Kitahara a Schneider 2022).

1.4.1 Anatomie štítné žlázy

Štítná žláza (latinsky *glandula thyroidea*) je endokrinní žláza uložená v přední části krku v oblasti hrtanu pod štítnou chrupavkou. Štítná žláza je vysoce cévně zásobená, má tmavě červenou barvu, hladký povrch a je pokryta vazivovým pouzdrem (Mohebaty a Shaha 2012). Skládá se ze dvou laloků, které jsou ve spodní části spojeny můstkem (*isthmus*). Na zadní straně štítné žlázy jsou obvykle umístěny dva páry příštítných tělísek. Z isthmu může směrem k hlavě vyrůstat pyramidální lalok (*lobus pyramidalis*) jakožto pozůstatek sestupu štítné žlázy během ontogeneze. Vzácně může docházet k absenci isthmu a žláza pak existuje jako dva samostatné laloky (Mohebaty a Shaha 2012, Khatawkar a Awati 2015).

Štítná žláza je tedy tvarově poměrně variabilní – někdy připomíná tvar písmene U, jindy písmene H. Nejčastěji je však přirovnávána k obrazu motýla (viz obr. 1). Díky značné velikosti obou laloků (obvykle cca 5 x 2 x 3 cm) se štítná žláza řadí mezi jednu z největších

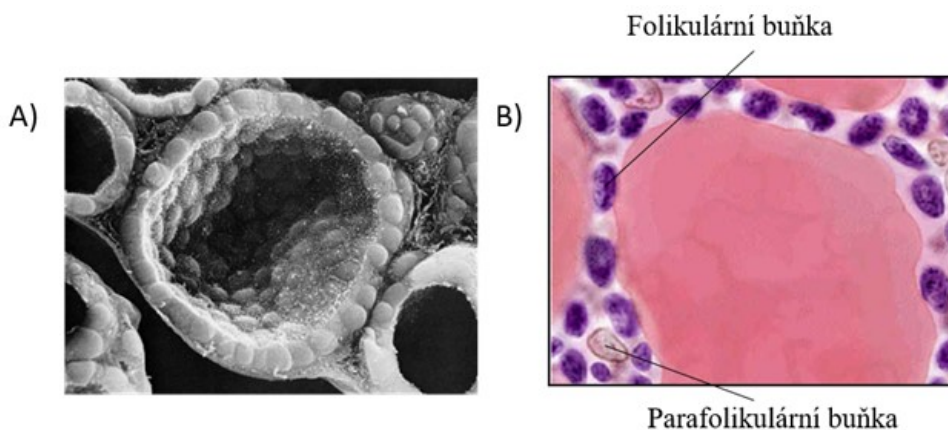
endokrinních žláz o váze přibližně 20 g u dospělých (Pankow *et al.* 1985, Khatawkar a Awati 2015).



Obr. 1 Anatomie štítné žlázy – žláza při pohledu zepředu.

Převzato a upraveno dle knihy Moini J et al. Epidemiology of Endocrine Tumors, Chapter 1 - Endocrine Glands. Dostupné z webové stránky <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/thyroid-gland>

Mikroskopicky je štítná žláza tvořena z folikulů, dutých kulovitých měchýřků ohraničených jednou vrstvou folikulárních buněk (obr. 2 A, B). Folikulární buňky secernují dovnitř folikulu koloid obsahující tyreoglobulin, který je prekurzorem hormonů 3,5,3',5'-tetrajodthyroninu (thyroxinu, T4) a 3,5,3'-trijodthyroninu (T3). Mezi folikulárními buňkami jsou roztroušeny parafolikulární buňky (C-buňky) produkující hormon kalcitonin (obr. 2 B).



Obr. 2 Folikuly štítné žlázy A) pohled elektronovým mikroskopem, B) pohled mikroskopem při cytologickém vyšetření.

1.4.2 Papilární karcinom štítné žlázy – diagnostika a léčba

Karcinomy štítné žlázy rozdělujeme podle původu a stupně diferenciaci. Klasifikace nádorů štítné žlázy je na základě nových klinicko-patologických a molekulárních poznatků neustále zpřesňována a aktualizována (Baloch *et al.* 2022, Juhlin *et al.* 2022, Rossi a Baloch 2023).

Majoritní skupinou jsou karcinomy odvozené od folikulárního epitelu, které zahrnují **papilární karcinom (PTC)**, invazivní opouzdřenou **folikulární variantu papilárního karcinomu**, **folikulární karcinom**, **onkocytární karcinom**, high-grade **neanaplastický karcinom** a **anaplastický karcinom** (Baloch *et al.* 2022). Z parafolikulárních C-buněk vychází **medulární karcinom** s prevalencí 2 % (Lim *et al.* 2017).

Nejběžnějším typem je papilární karcinom (PTC), který představuje 84 % malignit štítné žlázy (Lim *et al.* 2017), a který byl předmětem mého výzkumu.

PTC je diagnostikován většinou po náhodném nahmatání bulky na krku pacientem nebo lékařem. Základním vyšetřením je ultrasonografie, která je neinvazivní a pro pacienta nezatěžující metodou. PTC se při ultrasonografii projevuje jako hypoechogenní útvar se špatně definovanými okraji. Ke stanovení konečné diagnózy však vede až cytologické vyšetření bioptického materiálu odebraného pomocí EUS - FNAB. Při potvrzení diagnózy PTC je pacient indikován k operaci. V České republice je preferován radikální výkon, totální thyreoidektomie, jehož výhodou je zejména nízký výskyt recidiv v porovnání s méně radikálními zákroky (hemithyreidektomie). Nevýhodou je nutnost trvalé suplementace pacienta tyroxinem (Yang *et al.* 2024). V současné době je mezi odbornou veřejností vedena diskuse o méně radikálním přístupu k léčbě, kdy se názory různí, ale zejména odborníci z USA podporují spíše hemithyreidektomii. V hodnocení agresivity nádoru a doporučeného rozsahu operace pomáhají molekulární markery.

K charakterizaci resektovaného PTC patologem se využívá **TNM systém klasifikace**, kde **T je charakteristikou primárního nádorového ložiska**, **N je charakteristikou metastáz do přilehlých lymfatických uzlin** a **M je charakteristikou vzdálených metastáz** (viz tabulka 1). Na základě TNM klasifikace se následně stanovuje pokročilost (stádium) PTC (viz tabulka 2). TNM systém klasifikace PTC byl nedávno revidován a aktuálně je platná jeho 8. edice (Brierley *et al.* 2017). Mladší pacienti mívají obecně příznivější prognózu, proto se u nich určují pouze stadia I nebo II, a to na základě absence či přítomnosti distálních metastáz. Největší změnou v 8. edici TNM klasifikace je posun

cut-off věku z původních 45 let na 55 let, což umožňuje zpřesnit odhad rizika agresivity nádoru (Nam *et al.* 2018, Gholami *et al.* 2024).

Tab. 1 TNM klasifikace PTC (8. edice)

Charakteristika primárního nádoru	TX	nelze hodnotit
	T0	není přítomen
	T1	omezen na štítnou žlázu ≤ 2 cm
	T2	omezen na štítnou žlázu > 2 cm a ≤ 4 cm
	T3a	omezen na štítnou žlázu > 4 cm
	T3b	makroskopická extratyreoidální extenze zasahující do příčně pruhované svaloviny, jakákoliv velikost
	T4a	postihuje podkoží, hrtan, tracheu, jícen, nebo zvratný nerv
	T4b	postihuje prevertebrální fascii, cévy mediastina nebo krční tepnu
Přítomnost metastáz v regionálních mízních uzlinách	NX	nelze hodnotit
	N0	nejsou přítomny
	N1a	metastázy uzlin v centrálním kompartmentu
	N1b	metastázy uzlin v laterálním kompartmentu
Přítomnost vzdálených metastáz	MX	nelze hodnotit
	M0	nejsou přítomny
	M1	jsou přítomny

Tab. 2 Určování stádia PTC podle TNM klasifikace (8. edice)

PTC, věk < 55 let			
Stadium I	jakékoliv T	jakékoliv N	M0
Stadium II	jakékoliv T	jakékoliv N	M1
PTC, věk ≥ 55 let			
Stadium I	T1a, T1b	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium IVa	T1, T2, T3	N1a	M0
	T1, T2, T3	N1b	M0
	T4a	jakékoliv N	M0

Stadium IVb	T4b	jakékoliv N	M0
Stadium IVc	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Jako pooperační terapie se pacientovi podává radiojod ^{131}I . Cílem je eliminovat zbytky tkáně a případné metastázy. Radiojod ^{131}I se podává perorálně (ve formě kapsle) s aktivitou 3,7 GBq, pokud jsou přítomny lokální či vzdálené metastázy, jsou aktivity vyšší (4,4 – 7,4 GBq) (Vlček 2006). Pacienti jsou dále celoživotně sledováni. V rámci dispenzarizace podstupují pravidelné ultrasonografické vyšetření a měření hladiny tyreoglobulinu v krvi (slouží jako marker recidivy onemocnění), jednou za 5 – 10 let podstupují také celotělovou scintigrafii radiojodem. Při zvýšení hladiny tyreoglobulinu, nebo při pozitivní scintigrafii je indikována terapie radiojodem.

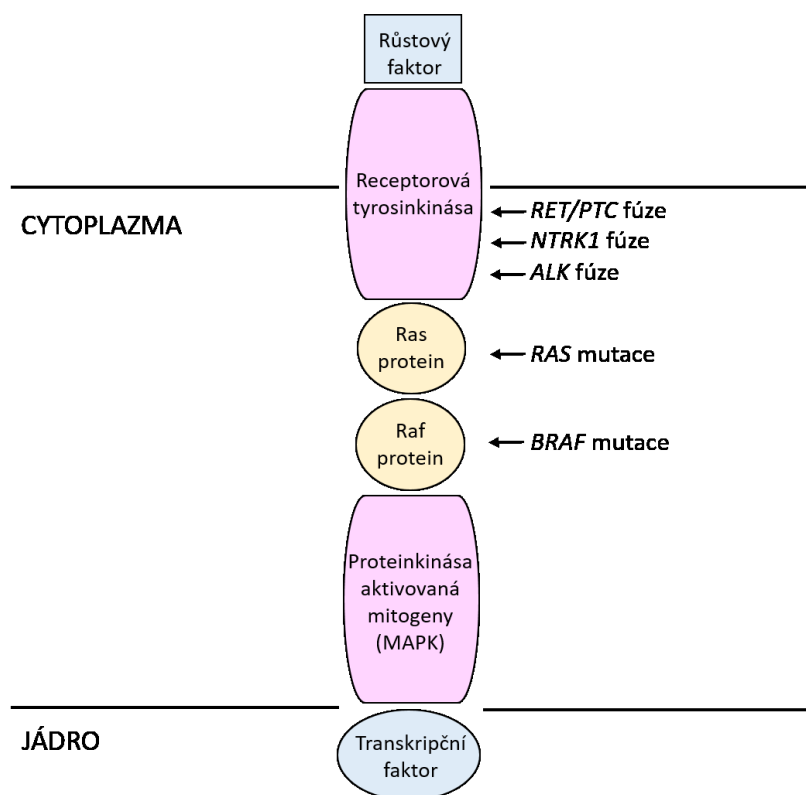
V 5 - 15 % případů jsou ložiska karcinomu štítné žlázy refrakterní (necitlivá) k léčbě radiojodem (Worden 2014). V takovém případě, stejně jako v případě neresekovatelného nebo rekurentního karcinomu štítné žlázy, může být pacient indikován k biologické léčbě tyrozinkinázovými inhibitory na základě mutace detekované v nádorové tkáni (Zhang *et al.* 2022, Cortas a Charalambous 2023). Konkrétní nejčastější mutace jsou uvedeny v následující kapitole. Chemoterapie a radioterapie bývá obecně indikována vzácně, většinou až po vyčerpání všech ostatních léčebných modalit.

Prognóza pacientů s PTC je velmi příznivá, což úzce souvisí s včasnou diagnostikou, kdy většina PTC je diagnostikována ve stádiu I. Pětileté přežití léčených pacientů v ČR v období 2015 – 2019 dosahovalo hodnoty 98,8 % (ÚZIS 2021).

1.4.3 Onkogenetika PTC

V současné době jsou dobře známy klíčové somatické příčiny vzniku PTC. Zahrnují v cca 50 % mutaci v *BRAF* genu (Val600Glu), v cca 15 % mutace v *RAS* genech (nejčastěji *NRAS*, méně často *HRAS* a *KRAS*) a v 15 % vznik fúzních genů receptorových tyrozinkináz (nejčastěji *RET*, méně často *NTRK* a *ALK* protoonkogeny) s jinými běžně exprimovanými geny (např. Nikiforov a Nikiforova 2011, Fagin *et al.* 2023, Landa a Cabanillas 2024). Všechny tyto geny kódují signální proteiny MAPK (angl. Mitogen-Activated Protein Kinase, proteinkináza aktivovaná mitogeny) dráhy (obr. 3), která hraje klíčovou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze (Bahar *et al.* 2013, Roberts a Der 2024). Mutace zmíněných genů pak způsobují aktivaci MAPK dráhy. U 11 % PTC se vyskytují

mutace v promotoru genu *TERT*, který kóduje katalytickou podjednotku telomerázy. Tyto mutace jsou spojeny s agresivním chováním nádoru (Liu *et al.* 2024).



Obr. 3 Schematické znázornění MAPK signální dráhy včetně umístění nejčastějších genetických změn vedoucích k rozvoji PTC.

Uvedené somatické změny se málokdy vyskytují v tomtéž karcinomu a jsou nalézány s různou frekvencí v různých věkových skupinách pacientů. Například fúzní geny *RET* protoonkogenu jsou přítomny ve větší míře u dětí než u dospělých, zatímco *BRAF* mutace se častěji vyskytuje v dospělé populaci (Alzahrani *et al.* 2020). Celkově, bez ohledu na věk, lze říci, že některá ze zmíněných somatických alterací je přítomna asi v 70 % PTC tkání (Nikiforov a Nikiforova 2011). Ve zbývajících 30 % případů zůstává genetická příčina vzniku PTC neznámá, díky rozvoji vysoce citlivých technik molekulární biologie v posledních dvou desetiletích, zejména díky sekvenování nové generace (NGS), jsou však nalézány další somatické změny, které zapříčiňují vznik PTC i ostatních karcinomů štítné žlázy (Sykorova *et al.* 2015, Pekova *et al.* 2020, Bulanova Pekova *et al.* 2023). Nalezení dalších genetických markerů je důležité zejména kvůli přesné molekulární diagnostice a predikci chování nádoru (Ahmadi a Landa a Cabanillas 2024). Výskyt určité mutace může

být totiž charakteristický pro určitý fenotypový projev onemocnění. Např. koincidence mutace *BRAF* s mutacemi *TERT* genu je spojena s obrovským synergickým efektem na agresivitu nádoru, projevující se vyšší recidivou a mortalitou než mutace samotné (Liu *et al.* 2014, Liu *et al.* 2024). Nejnověji se ukazuje, že agresivní charakteristiky vykazují také nádory s přítomným *RET/PTC* přeskupením, kdy 75 % případů je spojeno s metastazováním do přilehlých lymfatických uzlin a 19 % s přítomností vzdálených metastáz (Bulanova Pekova *et al.* 2023).

Během výzkumu PTC jsem se zaměřovala zejména na detekci *RET/PTC* přeskupení.

1.4.3.1 *RET/PTC* přeskupení

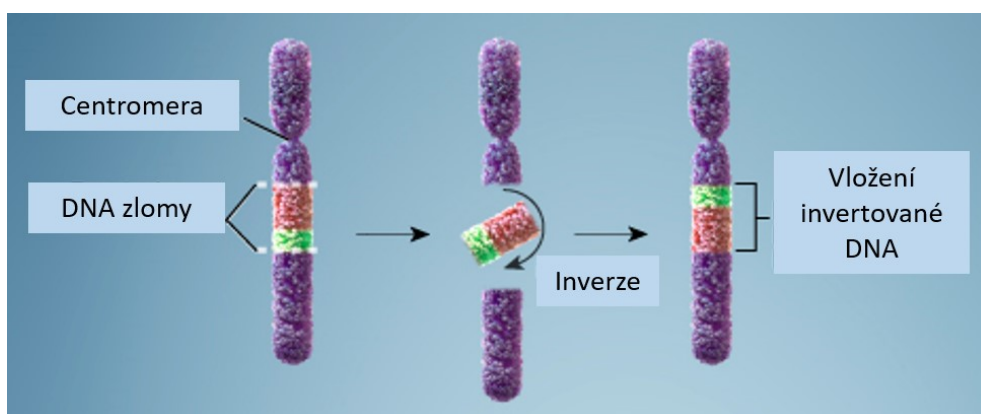
RET je protoonkogen, který kóduje transmembránovou receptorovou tyrozinkinázu (viz Obr 3). Je lokalizován na dlouhém raménku 10. chromozomu (10q11.2) a obsahuje 21 exonů, které kódují extracelulární (exony 1 - 11), transmembránovou (exon 12) a intracelulární (exon 13 - 21) tyrozinkinázovou doménu *RET* proteinu (Hansford a Mulligan 2000, De Groot *et al.* 2006).

RET protein je aktivován komplexem ligandu a koreceptoru, který stimuluje jeho dimerizaci, což je kritický krok pro získání tyrosinkinázové aktivity. V současné době jsou známy 4 ligandy *RET* receptoru: neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie (*GDN*), neurturin (*NRTN*), artimin (*ARTN*) a persefin (*PSPN*). Jejich koreceptory patří do rodiny tzv. *GNDF*-family receptor α (*GFR α*) a jsou také 4, přičemž každý ligand *GDNF*, *NTN*, *ART* a *PSP* má svůj specifický koreceptor *GFR α* 1-4 (Santoro *et al.* 2004, Arighi *et al.* 2005).

Gen pro *RET* receptor je běžně exprimován v parafolikulárních buňkách štítné žlázy a jeho aktivující mutace vedou ke vzniku medulárního karcinomu štítné žlázy. **Ve folikulárních buňkách štítné žlázy je exprese *RET* naopak velmi omezená, přesto však může být u PTC aktivován, a to pomocí tzv. *RET/PTC* přeskupení** (angl. rearrangement). *RET/PTC* vzniká fúzí intracelulární tyrozinkinázové domény *RET* genu (3' konec vzniklé fúze) a jiného genu (5' konec vzniklé fúze), který je ve folikulárních buňkách štítné žlázy normálně exprimován a tím poskytuje *RET* protoonkogenu promotor (Nikiforov 2002). Fúzní partneři protoonkogenu *RET* navíc umožňují homodimerizaci

fúzních proteinů *RET/PTC*. Výsledkem je, že produkty genových přeskupení *RET/PTC* jsou v buňkách štítné žlázy konstitutivně aktivovány bez potřeby vazby ligandu. Tím vzniká stále aktivní chimérická forma receptoru, která postrádá extracelulární a transmembránovou doménu a je proto lokalizovaná v cytoplazmě.

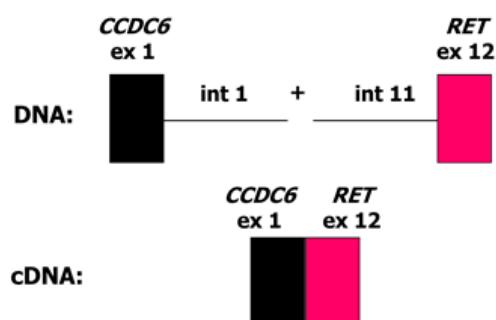
RET/PTC přeskupení vznikají v důsledku DNA zlomů mechanismem paracentrické inverze (viz obr. 4) dlouhého raménka chromozomu 10 (intrachromozomální translokace), nebo méně často jako reciproční translokace mezi 10q a jinými chromozomy (interchromozomální translokace) (Pierotti *et al.* 1996).



Obr. 4 Schematické znázornění paracentrické inverze, nejčastějšího mechanismu vedoucího ke vzniku *RET/PTC* přeskupení.

Upraveno podle U. S. National Library of Medicine, dostupné z:
<https://medlineplus.gov/genetics/understanding/mutationsanddisorders/structuralchanges>

Vzhledem k tomu, že ke zlomu v DNA *RET* protoonkogenu dochází v 11. intronu, ale konkrétní pozice se liší, je nutné stanovovat přítomnost *RET/PTC* přeskupení z cDNA (komplementární DNA neobsahující introny vzniklá reverzní transkripcí z mRNA), viz obr. 5.



Obr. 5 Schematické znázornění formace *RET/PTC1*. Intracelulární doména *RET* genu (12.-20. exon) je připojena za promotorovou oblast (1. exon) genu *CCDC6* se zlomy v 11. intronu *RET* a 1. intronu *CCDC6*.

RET/PTC přeskupení je častější u nádorů postihujících děti a mladé dospělé a u PTC spojených s radiační expozicí (Nikiforov 2002, Romei a Elisei 2012). V současné době je známo nejméně 50 různých druhů *RET/PTC* přeskupení a jejich počet s využitím NGS rychle stoupá (Iyama *et al.* 2017, Bulanova Pekova *et al.* 2023).

Nejběžnějším typem je ***RET/PTC1*** (viz obr. 5) dané fúzí s genem *CCDC6* (dříve *H4*), které představuje 60 – 70 % všech *RET/PTC* přeskupení, dále ***RET/PTC3*** dané fúzí s genem *ELE1*, které čítá 20 – 30 % všech přeskupení a ***RET/PTC2*** detekované v < 10 % případů všech přeskupení (Bongarzone *et al.* 1998, Nikiforova *et al.* 2002). Ostatní formy *RET/PTC* byly detekovány většinou jen v jediném případě.

Nedávno byly publikovány studie provedené na velké kohortě českých dětských a dospělých pacientů s nádory štítné žlázy (Pekova *et al.* 2020, Bulanova Pekova *et al.* 2023). Bylo detekováno celkem 20 různých typů *RET* fúzí. Tyto fúzní geny byly nalezeny pouze u PTC (11,4 % pacientů s PTC), přičemž třikrát častěji u dětských a adolescentních pacientů (29,8 %) než u dospělých (8,7 %). (Bulanova Pekova *et al.* 2023).

1.4.3.2 Metodika detekce exprese *RET/PTC* genů

Při detekci exprese fúzních genů *RET/PTC1* a *RET/PTC3* v PTC tkáni se využívá cDNA, jak již bylo řečeno v předchozí kapitole. Primery použité pro PCR bývají navrženy tak, aby amplifikovaly místo fúze. V případě *RET/PTC1* tedy v 1. exonu *CCDC6* a 12. exonu *RET* a v případě *RET/PTC3* v 1. exonu *ELE1* a 12. exonu *RET*. Zároveň je sledována i exprese kontrolního ubikvitárně exprimovaného genu, např. *GAPDH* nebo *β-aktinu*, aby se ověřilo, že reverzní transkripce RNA na cDNA byla úspěšná a cDNA je kvalitní. Při každé analýze bývá navíc zařazena pozitivní a negativní kontrola – tedy vzorek exprimující a neexprimující hledaný fúzní gen. Vzorky by se měly analyzovat, pokud možno v duplikátech či triplikátech.

Historicky se exprese fúzních genů prokazovala elektroforeticky, detekcí odpovídajícího PCR produktu na agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem. Tuto metodu nahradila rychlejší real-time PCR, která je dnes používána zejména pro detekci známých genových fúzí. V posledních letech se k analýze fúzních genů využívají také vysokokapacitní přístupy, jako je cílené RNA sekvenování pomocí NGS (Pekova *et al.* 2020, Pokorná *et al.* 2022, Bulanova Pekova *et al.* 2023). Výhodou tohoto přístupu je

možnost analýzy různých typů fúzních genů najednou a také možnost identifikace nových typů fúzí.

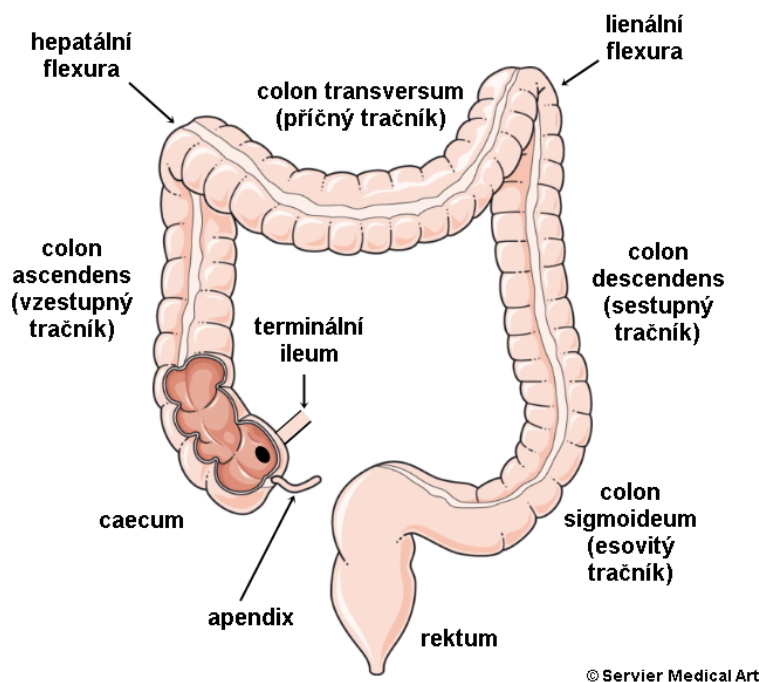
Při své práci jsme k detekci *RET/PTC* využívala real-time PCR. Ve výsledkové části disertační práce popisuji, jak jsem díky drobné změně v metodice – přidáním analýzy křivek tání PCR produktů po skončení real-time PCR – našla nové atypické přeskupení *RET/PTC1ex9*. Popis toho přeskupení je *in extenso* uveden v článku, který je nazván **Publikace 1** v kapitole 3 Výsledky.

1.5 Kolorektální karcinomy

Pojem kolorektální karcinomy (CRC, colorectal cancer) zahrnuje nádory tlustého střeva (*intestinum crassum*) a konečníku (*rectum*). Tyto nádory patří mezi nejčastější – k 31. 12. 2021 žilo v České republice 60 395 osob s tímto onemocněním, tj. 575,1 případů na 100 000 osob. Incidence CRC v ČR do roku 2002 setrvale výrazně stoupala, po tomto roce je patrná stabilizace a od roku 2013 dokonce mírný každoroční pokles. I tak bylo ale v roce 2021 v ČR diagnostikováno 6901 nových případů CRC s převahou výskytu u mužů (1,5 : 1 oproti ženám), nejčastěji ve věku nad 60 let (ÚZIS 2021). Pokles incidence je přičítán zejména dlouhotrvajícímu (více než 20 let) organizovanému celostátnímu screeningovému programu. Klesající trend je patrný rovněž u mortality, i zde zřejmě zásluhou screeningových vyšetření, protože zhruba 50 % CRC bývá diagnostikováno v raných stádiích (I a II). I tak je však pětileté přežití pacientů jen cca 67 % (ÚZIS 2021).

1.5.1 Anatomie tlustého střeva a konečníku

Tlusté střevo je poslední částí trávicí trubice, kam přichází kašovitá strava z tenkého střeva, aby se zde dále zahustila. Je asi 1,5 m dlouhé a 6 - 8 cm široké. Tlusté střevo začíná slepým střevem (*intestinum caecum*), které je uloženo v pravé kyčelní jámě. Na jeho konci je červovitý přívěsek (*appendix vermiformis*). Na slepé střevo navazuje hlavní část tlustého střeva - tračník (*colon*). Kolmo vzhůru po pravé straně dutiny břišní stoupá vzestupný tračník (*colon ascendens*) až pod játra, kde přechází v jaterní ohbí (*flexura hepatica*, hepatální flexura) a odtud napříč do levé poloviny břicha jako příčný tračník (*colon transversum*) ke slezinnému ohbí (*flexura lienalis*, lienální flexura). Pod slezinou tlusté střevo dále pokračuje kolmo dolů podél levé strany dutiny břišní až do levé jámy kyčelní jako sestupný tračník (*colon descendens*). Na něj navazuje esovitá klička (*colon sigmoideum*, esovitý tračník) a konečník (*rectum*). Vyústěním tlustého střeva je řiť (*anus*) (Kahai *et al.* 2023).



Obr. 6 Anatomie tlustého střeva a konečníku

Převzato z učebních textů 1. LF UK MUDr. Jiřího Štefánka dostupných z: https://www.stefajir.cz/tluste-strevo-obecne-informace#google_vignette

Mikroskopicky je stěna tlustého střeva tvořena čtyřmi vrstvami: sliznicí (mukózou), podslizničním vazivem (submukózou), svalovinou tlustého střeva a serózou (obr. 7 na str. 20, kruhová výseč vpravo nahoře). Míra invazivity primárního nádoru do/přes stěnu tlustého střeva je jedním z ukazatelů při hodnocení pokročilosti (stádia) onemocnění.

1.5.2 CRC – diagnostika a léčba

Základním předpokladem pro úspěšnou léčbu CRC je, stejně jako u ostatních nádorových onemocnění, včasná diagnóza umožňující kompletní chirurgické odstranění nádoru a v případě již léčeného onemocnění včasná identifikace jeho progresu. K monitoringu CRC je v současné době využíváno několik postupů, které ovšem mají své limity a v praxi se proto většinou kombinují.

Nejrozšířenější metodou pro screening kolorektálního karcinomu je **průkaz okultního krvácení** ve stolici (FOBT, z angl. fecal occult blood test). Jedná se o neinvazivní, jednoduchý a levný test, který je však náchylný k produkci falešně pozitivních i falešně negativních výsledků (Rosman a Korsten 2010). Další metodou pro screening i diagnostiku CRC je **kolonoskopie**. Je vysoce senzitivní a v případě potřeby zároveň

umožňuje provedení menších terapeutických výkonů či odběr bioptického vzorku pro verifikaci nálezu. Jedná se však o metodu invazivní, která vyžaduje náročnou přípravu pacienta a zkušený personál. V České republice je v rámci aktuálně platného screeningového programu nabízen pacientům ve věku 50-54 let každý rok test na okultní krvácení do stolice s následnou kolonoskopií v případě pozitivního výsledku nebo přímá screeningová kolonoskopie v desetiletých intervalech (Grega *et al.* 2024, Suchánek *et al.* 2024). Od 55 let věku pak probíhá testování okultního krvácení do stolice ve dvouletém intervalu. V České republice je ročně provedeno přibližně 250 000 kolonoskopických vyšetření a zhruba čtvrtina z nich je spojena s odstraněním prekancerózních kolorektálních polypů.

Pomocnou metodou pro detekci CRC je **stanovení tumorových markerů**, nejčastěji CEA (carcinoembryonic antigen) a CA-19 (carbohydrate antigen 19-9) v séru pacientů (Fernandes *et al.* 2005). Tumorové markery bývají využívány také v rámci pooperačního sledování pacientů spolu se **zobrazovacími technikami**, jako jsou výpočetní tomografie (CT), pozitronová emisní tomografie (PET/CT), magnetická rezonance (MRI) či rentgen (RTG). Další, velmi atraktivní možnost monitoringu CRC představuje **detekce cirkulující nádorové DNA (ctDNA)** v plazmě pacienta. Problematice ctDNA je věnována kapitola 1.5.5.

Při stanovení pokročilosti (stádia) CRC se podobně jako u PTC či karcinomu pankreatu (viz dále) využívá TNM systém hodnocení uvedený v tabulkách 3 a 4.

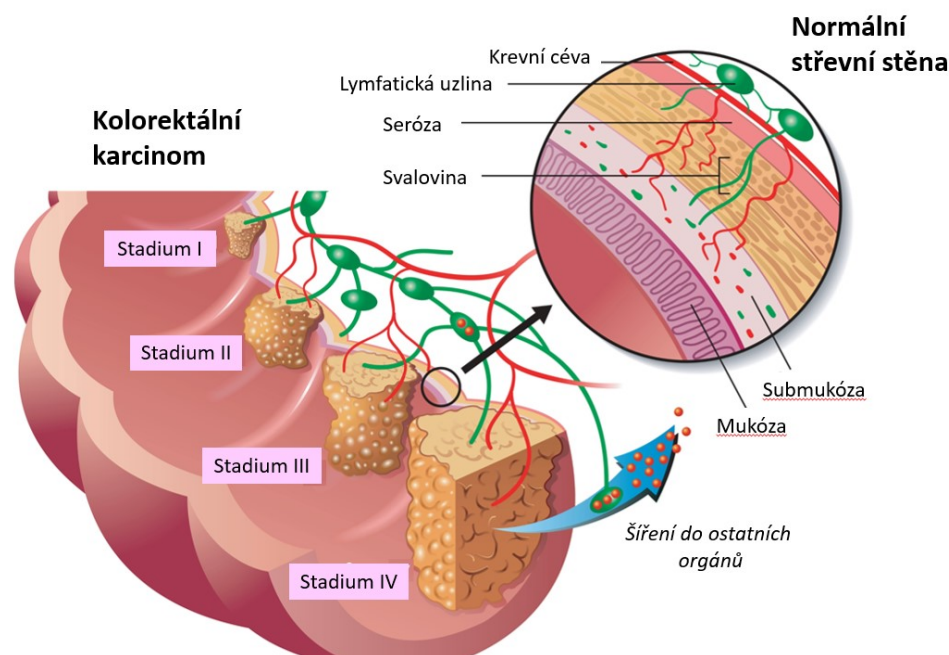
Tab. 3 TNM klasifikace CRC (8. edice)

Charakteristika primárního nádoru	TX	nelze hodnotit
	T0	není přítomen
	Tis	karcinom <i>in situ</i> , invaze do lamina propria mucosae
	T1	invaze do submukózy
	T2	invaze do muskuláris propria
	T3	invaze přes muskuláris propria
	T4a	nádor prorůstá na viscerální peritoneum
	T4b	nádor prorůstá do okolních orgánů
Přítomnost metastáz v regionálních mízních uzlinách	NX	nelze hodnotit
	N0	nejsou přítomny
	N1a	postižení 1 regionální lymfatické uzliny
	N1b	postižení 2-3 uzlin

	N1c	satelity v subseróze, bez postižení regionálních uzlin
	N2a	postižení 4-6 uzlin
	N2b	postižení 7 a více uzlin
Přítomnost vzdálených metastáz	MX	nelze hodnotit
	M0	nejsou přítomny
	M1a	metastázy 1 orgánu (játra, plíce, vaječník, neregionální lymfatická uzlina(y)), bez peritoneálních metastáz
	M1b	metastázy > 1 orgánu, bez peritoneálních metastáz
	M1c	metastázy na peritoneu s nebo bez postižení dalších orgánů

Tab. 4 Určování stádia CRC podle TNM klasifikace (8. edice)

CRC			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/T2	N0	M0
Stadium IIa	T3	N0	M0
Stadium IIb	T4a	N0	M0
Stadium IIc	T4b	N0	M0
Stadium IIIa	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIb	T3/T4a	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
Stadium IIIc	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
Stadium IVa	jakékoliv T	jakékoliv N	M1a
Stadium IVb	jakékoliv T	jakékoliv N	M1b
Stadium IVc	jakékoliv T	jakékoliv N	M1c



Obr. 7 Znárodnění různých stádií CRC a normální stěny tlustého střeva

Převzato a upraveno podle webu *Facing Our Risk of Cancer Empowered*.
<https://www.facingourrisk.org/info/risk-management-and-treatment/cancer-treatment/by-cancer-type/colorectal/stages-and-subtypes>

Pro úspěšnou léčbu CRC je stěžejní chirurgické odstranění všech karcinomových ložisek, co nejdříve je to možné. Typ a rozsah chirurgického zákroku je indikován s ohledem na stádium onemocnění a v případě výskytu více ložisek s ohledem na jejich počet, velikost a umístění. Přibližně pětina pacientů má při počáteční diagnóze již přítomné vzdálené metastázy. Metastatickým rozesevem jsou nejčastěji postiženy játra, na druhém místě pak plíce (Mítrý *et al.* 2010, Vatandoust *et al.* 2015, He *et al.* 2023). Bohužel jak plicní, tak i jaterní metastázy jsou mnohdy inoperabilní, což má negativní dopad na prognózu pacientů (He *et al.* 2023). Mezi další místa, kam může CRC metastazovat, patří *peritoneum* (pobřišnice), centrální nervová soustava a kosti. Jsou známé i případy metastáz v nadledvinách a slezině (Vatandoust *et al.* 2015).

Prognóza pacientů souvisí také s radikalitou chirurgického odstranění tumorových ložisek (primárního karcinomu a/nebo metastáz CRC), kterou stanovuje patolog na základě vyšetření okrajů resekovaných vzorků. **Kompletní resekce** bez makroskopických nebo mikroskopických reziduí tumoru jsou označovány jako **R0**. **Mikroskopicky nekompletní resekce** s přítomností nádorových buněk v okraji excize jsou označovány jako **R1**. **Makroskopicky nekompletní resekce** pak jako **R2** a jsou dále klasifikovány jako R2a (makroskopická přítomnost rezidua primárního tumoru), R2b (makroskopická přítomnost

distálních metastáz), R2c (makroskopická přítomnost jakéhokoli zbytku/zbytků primárního nádoru i distálních metastáz) (Wittekind *et al.* 2009).

U pacientů s neresekabilním CRC je cílem maximální zmenšení nádoru a potlačení jeho dalšího růstu a šíření. Hlavními léčebnými strategiemi u těchto pacientů jsou radioterapie a chemoterapie. Ty mohou být v některých případech aplikovány i před nebo po operaci jako neoadjuvantní nebo adjuvantní léčba k maximální redukci a stabilizaci nádoru (Labianca *et al.* 2013, Van Cutsem *et al.* 2014, Messersmith 2019, Brown *et al.* 2019).

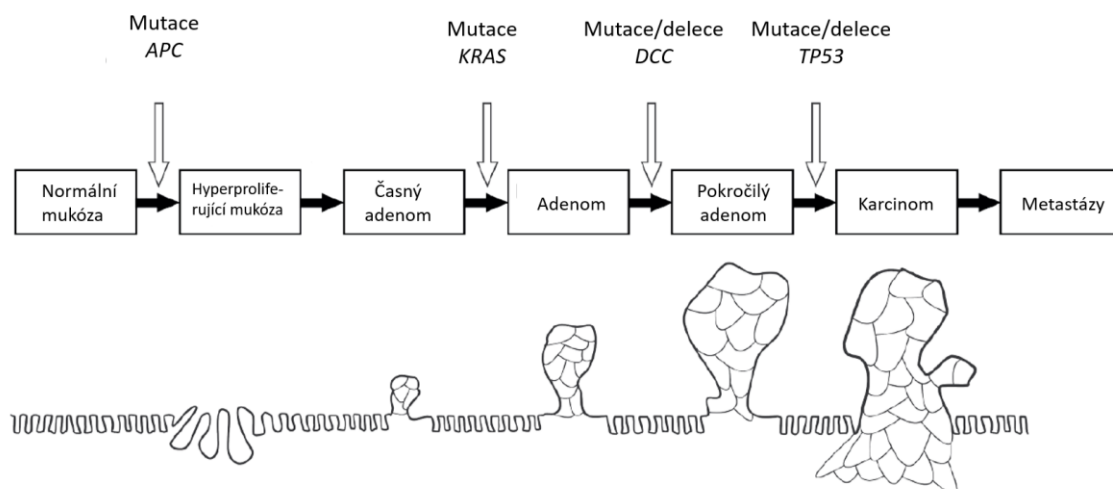
Cílená biologická léčba zatím neprokázala dostatečný benefit v léčbě lokalizovaného CRC, proto je vyhrazena pro léčbu metastatického CRC. U metastatického onemocnění bývá cílená léčba indikována hned v 1. linii, a to buď samostatně, nebo v kombinaci s chemoterapií. První cílené preparáty byly schváleny k léčbě metastatického CRC v roce 2004. Jedná se o monoklonální protilátku **Cetuximab** (Erbix®) cílící na receptor pro epidermální růstový faktor EGFR (z angl. epidermal growth factor receptor) a monoklonální protilátku **Bevacizumab** (Avastin®) proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru VEGF (z angl. vascular endothelial growth factor). V roce 2006 přibyl další cílený anti-EGFR lék **Panitumumab** (Vectibix®), postupně však narůstá množství dalších schválených cílených preparátů a mnoho dalších se testuje (Xie *et al.* 2020).

VEGF stimuluje růst endoteliálních cév a je nejdůležitějším pro-angiogenním faktorem ve vývoji nádoru (Mabeta a Steenkamp 2022, Ji *et al.* 2024). Angiogeneze je spuštěna interakcí VEGF s tyrozinkinázovými receptory VEGFR 1 a VEGFR 2 na povrchu endoteliálních buněk. Bevacizumab se váže na VEGF, čímž zabraňuje interakci s VEGF receptory a nedochází tak k angiogenezi potřebné pro růst a cévní zásobení nádoru (Gerriets a Kasi 2023, Ji *et al.* 2024). Benefit z léčby Bevacizumabem není vázán na mutační stav protoonkogenů *RAS* (u CRC typicky *KRAS*, méně často *NRAS*) ani *RAF* (u CRC *BRAF*) na rozdíl od anti-EGFR léčiv, které jsou doporučeny jen pro pacienty exprimující v nádorové tkáni nemutované formy protoonkogenů *RAS* a *RAF*. EGFR je receptorová tyrosinkináza (podobně jako RET, viz kapitoly 1.4.3. a 1.4.3.1) a *RAS* a *RAF* jsou efektory v signální dráze, která převádí signál z EGFR do jádra. Jsou-li protoonkogeny *KRAS*, *NRAS* nebo *BRAF* aktivovány mutací, je nádor rezistentní vůči blokaci EGFR protilátkami (Markman *et al.* 2010).

V České republice se při léčbě metastatického onemocnění nejčastěji využívají 4 cílené preparáty, kromě tří již jmenovaných ještě multikinázový inhibitor **Regorafenib** (Stivarga®), který bývá indikován v pozdějších liniích léčby (John 2020, Pacas a Lukáč 2023, Kiss a Tomášek 2023) a který byl k léčbě metastatického CRC schválen v roce 2012 (Xie *et al.* 2020). Stanovení mutačního stavu minimálně u protoonkogenů *KRAS* a *BRAF* je dnes již běžnou rutinou při volbě léčby metastatického CRC a s přibývajícími cílenými preparáty se i molekulárně-genetické testování neustále rozšiřuje (Redakce BOD 2024).

1.5.3 Onkogenetika CRC

Obecně lze říci, že onemocnění začíná tvorbou benigního adenomu, který může postupnou pomalou transformací přejít v invazivní karcinom. Tento proces, známý také jako **sekvence adenom–karcinom**, může trvat až 15 let (Winawer *et al.* 1993), poprvé byl popsán v roce 1990 pány Fearonem a Vogelsteinem (Fearon a Vogelstein 1990) a byl po nich nazván **Fearon-Vogelsteinův model kolorektální karcinogeneze**. Je široce akceptován dodnes a bývá prezentován jako vícestupňový proces, při kterém se hromadí mutační inaktivace tumor supresorových genů a aktivace protoonkogenů (Vogelstein *et al.* 1988, Fearon a Vogelstein 1990, Markowitz a Bertagnolli 2009, Morán *et al.* 2010, De Rosa *et al.* 2016). Klíčové genetické alterace provázející Fearon-Vogelsteinův vývoj CRC jsou znázorněny na obrázku 8. V časně fázi kolorektální karcinogeneze je to především mutace v genu *APC*, následována mutací v genu *KRAS*. Dále dochází k mutacím a následně rozsáhlým delecím v genu *DCC* a nakonec, ve fázi pokročilého karcinomu, lze detekovat inaktivační mutace a genové delece v tumor supresorovém genu *TP53* (Fearon a Vogelstein 1990). Jako poslední se pak přidávají mutace v genech souvisejících se schopností metastazovat (na obrázku není znázorněno) – např. geny účastnící se procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice, buněčné adheze a angiogeneze (De Rosa *et al.* 2016).



Obr. 8 Fearon-Vogelsteinův model kolorektální karcinogeneze zobrazující postupnou akumulaci zásadních mutací.

Převzato a upraveno podle disertační práce Wielenga MCB. Between cancer and therapy: Studies of the colon. Universiteit van Amsterdam, Nizozemsko, 2016, str 19.

S rozvojem NGS a objevem dalších kauzálních genetických alterací však vyšlo najevo, že k akumulaci mutací dochází v důsledku **chromosomální nestability** - CIN (z angl. chromosomal instability) a že existují ještě další dvě možné molekulární dráhy vzniku CRC. Jsou to **mikrosatelitová nestabilita** - MSI (z angl. microsatellite instability) a **hypermethylace CpG ostrůvků promotorů tumor supresorových genů** - CIMP (z angl. CpG Island Methylator phenotype) (Minarikova 2016, De Rosa *et al.* 2016, Nojadeh *et al.* 2018).

Většina (asi 70 %) CRC vzniká cestou CIN, která je charakterická přítomností jednonukleotidových mutací (substituce, inserce, delece), alelických ztrát v tumor supresorových genech a dále změnami počtu chromozomů (Pino a Chung 2010). Typ CIN tedy odpovídá klasickému Fearon-Vogelsteinovu modelu kolorektální karcinogeneze (Morán *et al.* 2010). Nejčastějšími mutacemi charakteristickými pro tento typ CRC jsou mutace protoonkogenů *KRAS* (34 % CRC), *PIK3CA* (15 %) a *BRAF* (10 %) a tumor supresorových genů *APC* (52 %) a *TP53* (47 %) (COSMIC 2024). Ve svém výzkumu jsem se zaměřovala na detekci všech těchto mutací a to v DNA izolované z různých typů vzorků (primární tumory, jaterní, plicní a peritoneální metastázy, ve formě čerstvých zmražených tkání nebo parafinových bloků, nebo jejich detekce v ctDNA).

CRC vzniklé **MSI** cestou se vyznačují tím, že různé buňky v kolorektální tkáni nesou různý počet opakování krátkých repetitivních sekvencí DNA (tzv. mikrosatelitů, proto mikrosatelitová nestabilita). MSI je projeven nefunkčního MMR opravného systému (z angl. Mismatch Repair), který zajišťuje opravy DNA při replikaci. K jeho nefunkčnosti dochází vlivem inaktivace tzv. **mutátorových genů, MMR genů** (např. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*) prostřednictvím somatických delecí, bodových mutací nebo epigenetického umlčení (Ionov *et al.* 1993, Thibodeau *et al.* 1993). Častou příčinou MSI je methylace promotoru genu *MLH1* (Boland a Goel 2010, Minarikova *et al.* 2016). MSI fenotyp se vyskytuje přibližně u 15 - 20 % pacientů (Shaikh *et al.* 2024, Wang *et al.* 2024).

Poslední zmíněná dráha vzniku CRC, **CIMP**, je charakteristická methylocí promotorových oblastí tumor supresorových genů vedoucí k inhibici jejich transkripce (Curtin *et al.* 2011). Nejnověji se zdá, fenotyp CIMP predisponuje k výskytu synchronního CRC, tedy výskytu více než jednoho ložiska CRC (Weng a Huang 2024). CIMP je typický pro CRC vznikající tzv. **serátní dráhou**. Serátní dráha začíná lézemi histopatologicky klasifikovanými jako **hyperplastické polypy**, které mohou přejít v **serátní léze** a dále v **serátní adenomy** mající histologicky typický pilovitý vzhled až nakonec v CRC (Patai *et al.* 2013, De Palma *et al.* 2019, Sano *et al.* 2020, Booth *et al.* 2021). Předpokládá se, že touto alternativní cestou může vzniknout ≥ 15 % CRC (IJspeert *et al.* 2015). Typickou DNA mutací spojenou se serátní dráhou je mutace v protoonkogenu *BRAF* a v části serátních adenomů také mutace v protoonkogenu *KRAS* (Patai *et al.* 2013, De Palma *et al.* 2019, Sano *et al.* 2020).

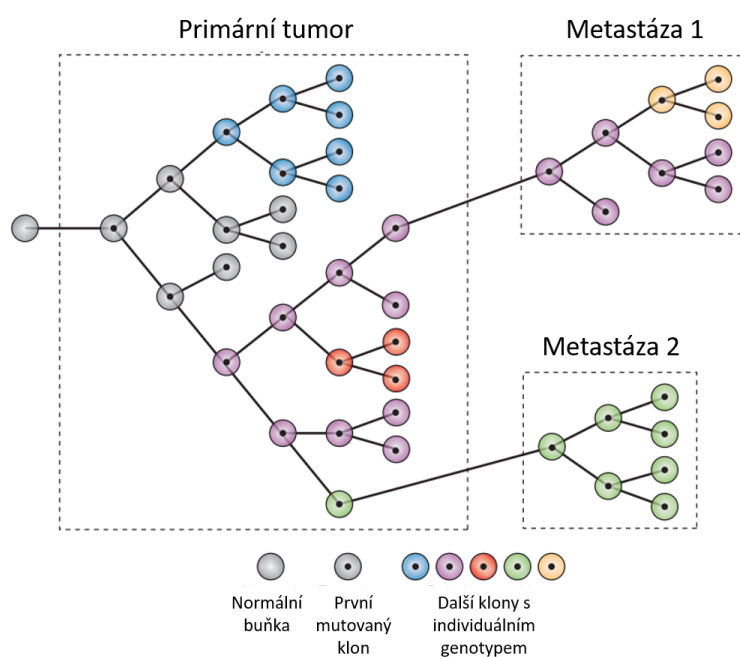
Kromě rozdělení genetických a epigenetických příčin vzniku CRC do těchto tří hlavních fenotypových skupin byly formulovány další teorie a navrženy další modely při studiu ITH (viz dále).

V roce 2002 dále vyšla najevo klinickopatologická heterogenita kolorektálního karcinomu v závislosti na jeho lokalizaci v pravé části tračníku (proximální), v levé části tračníku (distální) nebo v konečniku (Iacopetta 2002). Za tu může být zodpovědný například odlišný embryonální původ proximálního tračníku od distálního tračníku a rektu, jejich různé fyziologické funkce (Minoos *et al.* 2010), nebo skutečnost, že v pravém a levém tračníku je odlišnou měrou exprimováno více než 1000 genů (Glebov *et al.* 2003). CRC v pravém tračníku, levém tračníku a rektu má odlišné klinické projevy, histologické charakteristiky, je spojen s různou odpovědí na terapii i celkovou prognózou, což bylo jednoznačně potvrzeno ve studii s téměř 58 tisíci pacienty (Yang *et al.* 2016).

1.5.4 Intratumorová mutační heterogenita - ITH

Jak je patrné z předchozího odstavce, CRC je velice heterogenní onemocnění vyznačující se postupnou akumulací různých mutací (viz obr. 9 na další straně). Nicméně přesný mechanismus maligní transformace adenomů na karcinomy ani význam ITH v tomto procesu stále nejsou zcela objasněny. ITH premaligních kolorektálních lézí je proto aktuálně velmi slibnou oblastí výzkumu, který má jednak umožnit vědcům lépe pochopit vznik a vývoj CRC, a jednak pomoci lékařům usadit či optimalizovat jeho diagnostiku a/nebo terapii. Základní představa je taková, že vlivem rychlého dělení nádorových buněk dochází v různých buňkách k výskytu náhodných mutací, které se hromadí a přenášejí na dceřinné buňky, což má za následek vznik více subklonů s různými genotypy (Hu *et al.* 2019).

ITH lze rozdělit na dva typy: **intraprimární nádorovou heterogenitu IPTH** a **intraindividuální nádorovou heterogenitu IITH**. První se týká přítomnosti různých mutačních klonů v primárním nádoru a druhý poskytuje informace o rozdílech v klonálním složení primárního nádoru a všech metastatických ložisek (Zheng *et al.* 2020). Oba typy ITH jsou znázorněny na obr. 9.



Obr. 9 Znázornění intratumorové mutační heterogenity.

V nádorové tkáni primárního tumoru může být přítomno mnoho klonů různě mutovaných buněk (IPTH). Jednotlivé klony mohou být navíc rozdílně zastoupeny v jednotlivých nádorových ložiscích. Tedy např. metastáza 2 může být tvořena klonem, který je v primárním nádoru zastoupen jen minoritně apod (IITH). *Převzato a upraveno podle Caldas et al. 2012.*

V současnosti existují dvě základní teorie o tom, jak k ITH dochází. První je **klasická teorie postupné akumulace genetických změn** v protoonkogenech a tumor supresorových genech v souladu s Fearon-Vogelsteinovým modelem (Fearon a Vogelstein 1990). Druhá je tzv. **teorie velkého třesku** navržená v roce 2015, která předpokládá, že ITH se prakticky kompletně vyvine už ve velmi raném stádiu kolorektální neoplazie, v průběhu několika počátečních dělení buňky. Dochází k časnému smíchání subklonů a buňky se pak mohou rozptýlit v různých, i vzdálených, oblastech nádoru, a proto prostorové vztahy mezi jednotlivými buněčnými klony nemusí zdánlivě souviset. V průběhu růstu nádoru má šanci se prosadit (přetrvat) pouze časná změna. Objevují se i pozdější alterace (pozdě vytvořené klony), které však nestihnou expandovat a zaujmají proto menší prostor. Takže nejvíce detekovatelná ITH a vlastně i maligní potenciál nádoru je dán již od samého počátku léze (Sottoriva *et al.* 2015).

Kromě těchto dvou klíčových teorií vzniku ITH existuje neméně zajímavá studie z roku 2005, která na základě srovnání mutačních profilů ukazuje, že časná stadia CRC vykazují větší ITH než pokročilá stadia (Losi *et al.* 2005). Zdá se tedy, že k rozvoji karcinomu dochází pravděpodobně pouze z několika subklonů přítomných v adenomu, jejichž genetický profil zaručuje nejpříznivější podmínky pro další růst, přežití a obranu proti imunitnímu systému. Jiná teorie předpokládá tzv. model paralelního vývoje synchronního adenomu a karcinomu. Byl navržen v roce 2015 na základě výsledků celoexomové sekvenační analýzy 8 kolorektálních lézí, které obsahovaly složku adenomu a karcinomu. Autoři předpokládají, že synchronní adenom a karcinom mohou mít stejný klonální původ, ale pak se vyvíjejí nezávisle na sobě (Kim *et al.* 2015).

Kromě ITH jsou prekancerózní léze také histologicky heterogenní. Histologicky se dělí na **adenomy tubulární, tubulovilózní a vilózní**. V tomto pořadí se také zvyšuje riziko jejich maligního zvratu. Podle stupně dysplastických změn můžeme kolorektální adenomy dále dělit na **adenomy s nízkou, střední a těžkou dysplazií** (Zavoral *et al.* 2013).

Samostatnou skupinou jsou pak adenomy mající histologicky pilovitý vzhled, tzv. **pilovité neboli serátní adenomy** vznikající alterantivní **serátní dráhou**, která byla popsána v kapitole 1.5.3.

1.5.4.1 Metodika detekce ITH kolorektálních prekancerózních lézí

Pro ucelenou představu o rozmístění a množství jednotlivých mutačních klonů v adenomu je zásadní rozdělit vzorek na co nejmenší části. Důležitá je při tom také dokumentace (např. fotografická) původního adenomu a důkladné označení všech jeho částí, aby bylo možné ho po ukončení analýz opět virtuálně remodelovat do původní podoby. Z každé části adenomu je samostatně izolována DNA, ve které jsou následně stanoveny somatické mutace typické pro kolorektální adenomy/karcinomy.

Svoje dosavadní zkušenosti získané studiem ITH různých histologických typů kolorektálních lézí shrnuji v článku, který je uveden v kapitole 3 Výsledky jako **Publikace 3**. Zároveň tato publikace demonstruje, že přítomnost mutace v 7. exonu genu *TP53* je prediktorem brzkého vzniku nových metachronních lézí.

1.5.5 ctDNA

Pojmem cirkulující nádorová DNA (ctDNA) se rozumí DNA pocházející z buněk nádoru (primárního ložiska či metastázy), která je ve formě fragmentů přítomna v krevním řečišti. S použitím dostatečně citlivých metod je tedy možné v plazmě detekovat somatické genetické změny. Využití ctDNA jako tumorového markeru nabízí širokou škálu uplatnění a je výhodné zejména proto, že vzorky krve jsou snadno dostupné a odběr krve pacienta výrazně nezatěžuje. Proto se uvažuje o využití ctDNA především v případech, kdy není možné provést biopsii tumoru (často je nádor na těžko přístupném místě, což se týká např. karcinomu slinivky - viz dále - nebo plicních či jaterních metastáz CRC) nebo tehdy, kdy je potřeba biopsii provádět opakovaně (Perkins *et al.* 2012). Z toho důvodu se o ctDNA začalo hovořit jako o „**tekuté biopsii**“ (angl. **liquid biopsy**) (Diaz *et al.* 2012, Bettgowda *et al.* 2014, Chi 2016).

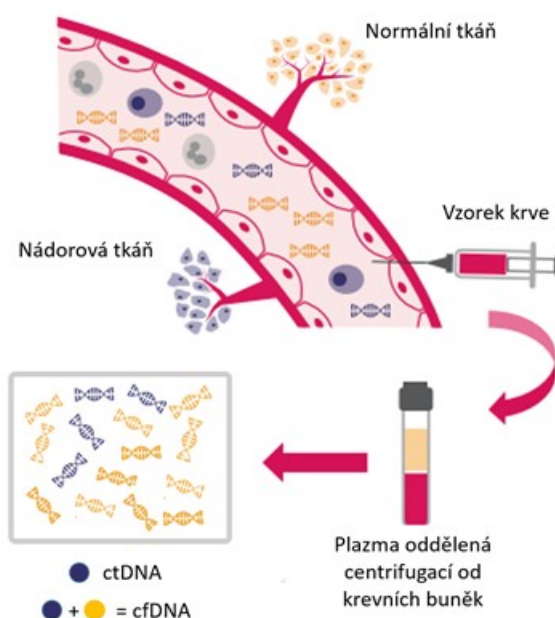
Doposud nebyl ustanoven konsensus ohledně mechanismu, kterým je ctDNA do krve uvolňována, i když existuje několik pravděpodobných hypotéz, jako jsou pasivní uvolňování apoptickými a nekrotickými nádorovými buňkami, aktivní uvolňování živými nádorovými buňkami skrze membránové váčky (exosomy) a lipoproteonukleotidové komplexy (virtosomy), fagocytóza a exocytóza (Stroun *et al.* 2000, Jahr *et al.* 2001, Thierry *et al.* 2016, Tivey *et al.* 2022). Často akceptována je také teorie formulovaná Diehlem a kol., podle které ctDNA pochází z nekrotických nádorových buněk, které jsou

pohlčeny makrofágem a makrofág uvolňuje fragmenty tumorové DNA do krevního oběhu (Diehl *et al.* 2005).

ctDNA je detekovatelná u většiny typů nádorů a je tedy biomarkerem, který lze univerzálně využívat v managementu nádorových onemocnění. Obecně lze říci, že hladina ctDNA roste s pokročilostí onemocnění (s tumorovou masou, angl. též tumor burden) a největší záchyt je pozorován u pacientů ve 4. stádiu onemocnění. Zatímco tradiční biopsie poskytuje informace jen o té části karcinomu, ze které byla odebrána, ctDNA odráží celkovou genetickou ITH, protože v plazmě kolují fragmenty DNA pocházející z různých částí tumoru, případně i z metastatických ložisek.

1.5.5.1 Metodiky detekce ctDNA

Využití ctDNA v praxi má ve srovnání s tradiční tkáňovou biopsií samozřejmě také nevýhody. Tou zásadní je, že ctDNA je součástí veškeré volně cirkulující cfDNA (viz obr. 10) a vyskytuje se tedy ve velmi nízkých koncentracích. Frakce ctDNA v periferní krvi onkologických pacientů se pohybuje od desítek do setin procent celkové cfDNA (Diehl *et al.* 2008). Pro analýzu ctDNA jsou proto potřeba velmi citlivé metody. V dnešní době je metodika založena převážně na dvou přístupech: **digitální PCR (dPCR)** a **NGS**.



Obr. 10 Schematické znázornění původu ctDNA a cfDNA.

Převzato a upraveno podle Lauer 2022.

Při dPCR se rozděluje analyzovaný vzorek do tisíců až milionů reakčních segmentů, což mohou být mikrojamky na čípech nebo mikrokapky olejové emulze (droplet digital PCR, ddPCR). V každém z reakčních segmentů jsou molekuly DNA individuálně amplifikovány klasickou PCR. Pokud je v daném segmentu přítomna cílová DNA, dojde k amplifikaci a je detekován fluorescenční signál. Pokud v daném segmentu molekula cílové DNA není, k amplifikaci nedojde a fluorescenční signál je nulový. Množství segmentů s detekovanou fluorescencí pak odpovídá počtu molekul cílové DNA ve směsi (Taly *et al.* 2013). Obdobně lze využít dPCR pro kvantifikaci somatických mutací, pokud se do reakční směsi přidají fluorescenční sondy specifické pro danou mutaci. Aplikací dPCR je například i metoda BEAMing (z angl. beads, emulsion, amplification and magnetics), která lze zjednodušeně popsat jako zachycení DNA na magnetické kuličky a její následná analýza pomocí dPCR (Diehl *et al.* 2005). Limit detekce mutace (LOD, z angl. limit of detection) pomocí klasické dPCR je 0,01–0,10 % (Zhang *et al.* 2015, Zonta *et al.* 2016, Rapisuwon *et al.* 2016). LOD metody BEAMing je 0,01 % (Diehl *et al.* 2008; Taniguchi *et al.* 2011). Srovnatelně citlivé jsou i metody založené na principu NGS. Např. metoda CAPP-Seq (z angl. CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing) má limit detekce 0,02 % (Newman *et al.* 2014), metoda Safe-SeqS (Safe-Sequencing System) pro identifikaci vzácných mutací má citlivost 0,01–0,5 % (Belic *et al.* 2015).

Digital PCR i NGS mají však také nevýhody. Tou zásadní je náročnost na množství a kvalitu vzorku DNA. Např. z cytologických preparátů získáváme v naší laboratoři průměrně 10 ng DNA a v tomto množství ani jedna z těchto analýz není reálná. Další nevýhodou je, že obě metodiky je možné provádět jen na specializovaných molekulárně-genetických pracovištích, protože nemocniční laboratoře běžně nedisponují sekvenátory nové generace a dPCR cyklery. Další nevýhodou je stále ještě vysoká cena těchto analýz.

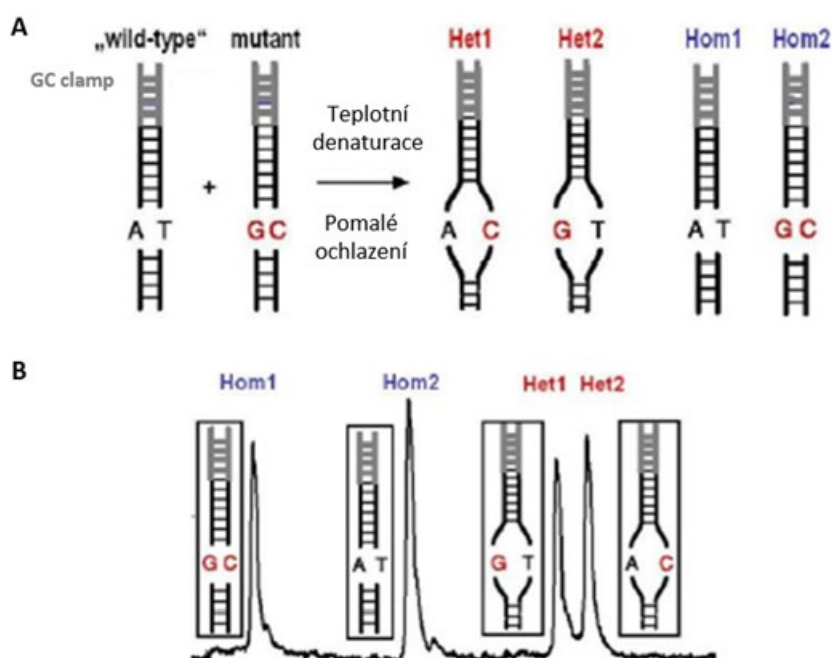
1.5.5.2 Dostupná metoda pro rutinní detekci ctDNA

Existují dva možné přístupy analýzy ctDNA. Prvním z nich je panelová analýza nejčastějších mutací charakteristických pro dané nádorové onemocnění přímo z cfDNA. V současné době je však častěji využíván druhý přístup, kdy je v plazmě stanovována tumor-specifická DNA mutace. Tento přístup tedy vyžaduje dostupnost vzorku nádorové tkáně, v ní je nalezena somatická mutace a ta je pak sledována v plazmě. Pro tento účel

byla v naší laboratoři vyvinuta dostatečně citlivá metoda založená na klasické **PCR s následnou tvorbou heteroduplexů** (Levý *et al.* 2012).

Princip metody spočívá v **separaci heteroduplexů**, neboli nekomplementárních bází mezi dvěma řetězci DNA, které se liší v jednom nukleotidu (zdravá vs mutovaná DNA) **pomocí denaturační kapilární elektroforézy** (obr. 11 na další straně). K separaci dochází vlivem rozdílné denaturační teploty, přičemž nejdříve denaturují fragmenty obsahující heteroduplexy. Nejprve se dvouřetězcové fragmenty rozevírají v místě heteroduplexu a dále postupně ve zbytku DNA fragmentu, což způsobuje zpoždění heteroduplexů za homoduplexy během kapilární elektroforézy. U vzorku obsahujícího somatickou mutaci (zdravou i mutovanou DNA) jsou na výsledném elektroferogramu patrné 4 píky (homoduplex nemutované DNA, homoduplex mutované DNA a 2 fragmenty s heteroduplexy). U vzorku zdravé tkáně je výsledkem pouze 1 pík. Aby během separace nedošlo vlivem denaturace k úplnému oddělení obou řetězců DNA, bývá jeden z primerů prodloužený o tzv. GC clamp (GC svorku) složený ze 40 G a C nukleotidů. Ty díky své vysoké denaturační teplotě zajišťují permanentní dvouřetězcové spojení obou vláken DNA fragmentu v místě této svorky.

Nevýhodou metody je nemožnost přímé identifikace neznámé mutace a poměrně malá analyzovaná oblast (PCR produkty o velikosti 100 – 200 bp).



Obrázek 11: Znázornění A - tvorby heteroduplexů a B - separace heteroduplexů při kapilární elektroforéze. Het1, Het2 – heteroduplexy, Hom1, Hom2 – homoduplexy.

Převzato z Benešová, 2007.

Tato metoda může být použita pro detekci somatických mutací v nádorové tkáni, ale díky své vysoké citlivosti také v ctDNA. LOD závisí na konkrétním typu mutace a typicky se pohybuje od 0,03 do 1 %. V případě *KRAS* mutace dosahujeme LOD 0,03 % (Benešová *et al.* 2022). Kromě citlivosti je velkou výhodou také možnost vypočítat frekvenci (procentuální zastoupení) mutantních alel na základě ploch píků homo a heteroduplexů.

Tato metoda může být rutinně používána k monitorování úspěšnosti léčby nebo sledování recidivy již známého onemocnění. Ve srovnání s NGS a dPCR je tato metodika levnější, stačí malé množství vorku DNA (jednotky ng) a není potřeba složité instrumentální vybavení. Proto je potenciálně využitelná v běžné klinické praxi.

V kapitole 3 Výsledky této práce je uvedena **Publikace 2** popisující největší benefity využití ctDNA při monitorování souboru pacientů s metastatickým CRC. Tato publikace popisuje také podrobněji metodiku detekce ctDNA, stejně jako **Publikace 4** zabývající se karcinomem pankreatu (viz dále).

1.6 Karcinom Pankreatu

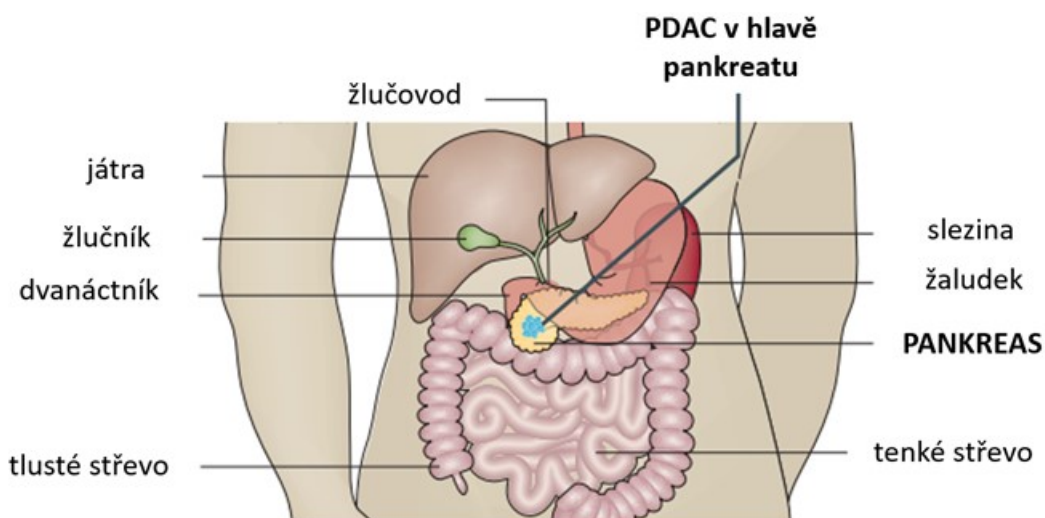
Duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC) je obávaným onkologickým onemocněním, které je notoricky známé pro svou špatnou prognózu. Incidence PDAC v dlouhodobém horizontu (od r. 1977 do r. 2021) neustále vzrůstá s občasnými nepatrnými meziročními poklesy. K 31. 12. 2021 žilo v ČR 3 455 osob s tímto onemocněním, tj. 32,9 případů na 100 000 osob. PDAC se vyskytuje u mužů i u žen srovnatelně často (1:1) s typickým nástupem v pozdním věku, v období 2017 – 2021 byl v ČR střední věk nově nemocných 71 let (ÚZIS 2021). Vzhledem k absenci nebo nespecifitě příznaků bývá více než polovina onemocnění (55 %) diagnostikována až v pozdním, inoperabilním stádiu (klinické stadium III a IV), což úzce souvisí s jeho nepříznivou prognózou. PDAC mívá velice rychlý a fatální průběh, incidence se prakticky rovná mortalitě, přičemž většina pacientů umírá už v prvním roce od stanovení diagnózy. Pětileté přežití léčených pacientů v letech 2015–2019 dosahovalo hodnoty pouze 12,6 %. Oproti období 2005–2009 přitom došlo k nárůstu o necelých 7 % (ÚZIS 2021).

1.6.1 Anatomie slinivky břišní

Slinivka břišní neboli pankreas (lat. *pancreas*) je orgán, který je součástí trávicí soustavy. Pankreas slouží zejména k výrobě pankreatické šťávy, která obsahuje trávicí enzymy zajišťující štěpení potravy (tzv. **exokrinní funkce pankreatu**). V exokrinní tkáni je dále roztroušen asi milion Langerhansových ostrůvků – souborů epiteliálních buněk zajišťujících sekreci pankreatických hormonů insulinu, glukagonu a somatostatinu (tzv. **endokrinní funkce pankreatu**).

Pankreas je uložen v epigastriu (mezi žeberními oblouky) za žaludkem na zadní stěně břišní a sahá od duodena (dvanáctníku) ke slezině. U dospělého člověka měří asi 12–18 cm a má hmotnost 60 – 90 g (Trna *et al.* 2021). Pankreas je tedy uložen na velmi těžko přístupném místě, což komplikuje diagnostiku karcinomu pankreatu, jeho bioptické vyšetření i případnou chirurgickou léčbu.

Makroskopicky se pankreas dělí na 3 části: hlavu (*caput*) tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*), přičemž karcinomy se nejčastěji vyskytují v oblasti hlavy pankreatu (Ryska *et al.* 2007), jak je znázorněno na obr. 11 na další straně.



Obr. 11 Uložení pankreatu v lidském těle včetně znázornění karcinomu umístěného v hlavě pankreatu.

Převzato a upraveno podle Kleef et al 2016.

1.6.2 Karcinom pankreatu – diagnostika a léčba

Z histologického hlediska se karcinomy pankreatu dělí na **duktální adenokarcinomy** (PDAC, z angl. pancreatic ductal adenocarcinoma), které tvoří asi 90 % všech karcinomů pankreatu, druhou nejpočetnější skupinou jsou **neuroendokrinní karcinomy**, dále **cystické karcinomy**, **lymfomy** a **metastázy** nádorů jiných lokalizací (Hlavsa *et al.* 2008, Kleef *et al.* 2016). Ve svém výzkumu jsem se zaměřovala převážně na PDAC.

Diagnostika PDAC je velmi obtížná a v současné době neexistují spolehlivé nástroje, které by odhalily toto onemocnění v časných stádiích, protože ta jsou většinou asymptomatická. První příznaky bývají nespecifické, například únava, hubnutí či nechutenství, a proto bývají pacienti podceňováni. V době závažnějších příznaků, jako je bolest břicha, zad, či žloutenka způsobená útlakem dvanáctníku, bývá onemocnění již v pokročilém stádiu.

Základními metodami pro stanovení diagnózy jsou zobrazovací metody – CT, MRI nebo EUS. Při CT podezření na karcinom pankreatu je první otázkou posouzení jeho resekability (přítomnost vzdálených metastáz, věk pacienta, vztah nádoru k okolním velkým cévám). Následně se přistupuje k potvrzení diagnózy pomocí EUS-FNB suspektního místa pankreatu (Hlavsa *et al.* 2008, Nelsen *et al.* 2015, Cazacu *et al.* 2021). EUS-FNB pankreatu je velmi náročná – pankreas je dostupný pouze přes stěnu žaludku či

duodena (záleží na lokalizaci suspektního místa) a vyžaduje proto přítomnost zkušeného endoskopisty. Navíc má PDAC tkáň tzv. desmoplastický charakter, tedy je v ní přítomno malé množství nádorových buněk na pozadí velkého množství vaziva.

Diagnostický význam laboratorních vyšetření je u PDAC omezený, u pacientů se může objevit zvýšená hladina bilirubinu, alkalické fosfatázy a sedimentace erytrocytů, u třetiny nemocných patologická glykemická křivka a v případě prorůstajícího nádoru anémie. Z nádorových markerů se nejčastěji vyšetřují mucinové antigeny CA 19-9, CA 242, CA 50 a CA 72-4, ale vzhledem k jejich poměrně nízké specifitě i senzitivitě mají význam spíše při sledování progresu onemocnění než při diagnostice (Jiang *et al.* 2004, Rückert *et al.* 2010).

Jedinou léčebnou metodou, která je v současné době potencionálně kurabilní a může prodloužit život nemocného, je chirurgická resekce karcinomu následovaná v některých případech adjuvatní chemoterapií gemcitabinem. Ten je podáván i v pokročilých stádiích, případně v kombinaci s radioterapií nebo cílenou biologickou léčbou erlotinibem (Burris *et al.* 2023). Kromě chirurgické léčby mají však ostatní léčebné modalita (chemoterapie, radioterapie, biologická léčba) pouze paliativní charakter (Havlík *et al.* 2010). Pokud je PDAC umístěn v hlavě pankreatu, bývá radikální chirurgickou resekci proximální pankreatoduodenektomie. Jedná se o náročnou, několikahodinovou, rozsáhlou operaci (D'Cruz *et al.* 2024), která bývá spojena s poměrně vysokou mortalitou v časném pooperačním období (8 %) a s pooperačními komplikacemi, které mívá 23,5 % nemocných, přičemž zhruba u poloviny z nich je potřeba provést chirurgickou revizi (Ryska *et al.* 2007). Navíc, chirurgicky resektabilních je asi jen 20 % pacientů z celkového počtu diagnostikovaných (Jemal *et al.* 2008) a u zhruba 80 % operovaných pacientů se i tak objeví časná lokální recidiva či generalizace onemocnění (Ryska *et al.* 2007, Kleef *et al.* 2016).

Pro stanovení závažnosti onemocnění se i u PDAC využívá TNM systém hodnocení a následné stanovení stádia na základě TNM charakteristik (tabulky 5 a 6). Po úspěšné chirurgické resekci je tříleté přežití pacientů v I. stádiu onemocnění 60 %, ve II. stádiu 29,5 %, ve III. stádiu 39,5 %, ve stádiu IVa 15,6 % a ve stádiu IVb pouze 10,5 % (Ryska *et al.* 2007).

Z uvedených důvodů je při volbě terapie u tohoto onemocnění často zvažován reálný přínos léčby zejména s ohledem na kvalitu života pacienta. Ve svém výzkumu jsem se proto primárně soustředila na hledání molekulárních markerů, které by umožnily zpřesnit

prognózu pacientů nebo predikovaly jejich odpověď na léčbu a pomohly tak klinikům při volbě adekvátní terapie pro daného pacienta.

Tab. 5 TNM klasifikace PDAC (8. edice)

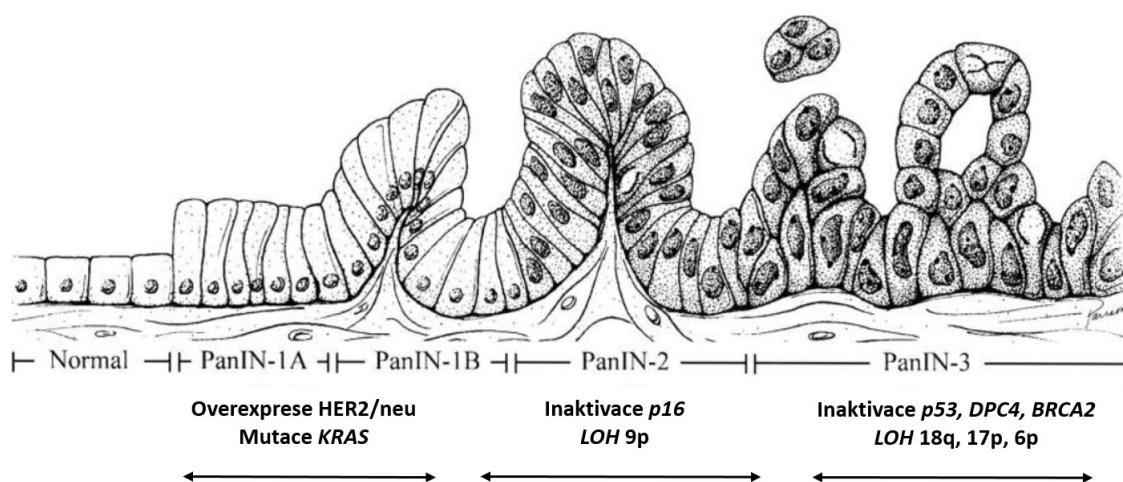
Charakteristika primárního nádoru	T0	není přítomen
	Tis	karcinom <i>in situ</i>
	TX	nelze hodnotit
	T1a	nádor $\leq 0,5$ cm v největším rozměru
	T1b	nádor $> 0,5 \leq 1$ cm v největším rozměru
	T1c	nádor $> 1 \leq 2$ cm v největším rozměru
	T2	nádor $> 2 \leq 4$ cm v největším rozměru
	T3	nádor větší než 4 cm v největším rozměru
	T4	nádor zasahuje do truncus coeliacus nebo a. mesenterica superior a/nebo společnou jaterní tepnu (a. hepatica communis)
Přítomnost metastáz v regionálních mízních uzlinách	N0	nejsou přítomny
	NX	nelze hodnotit
	N1	metastázy v 1-3 regionálních mízních uzlinách
	N2	metastázy ve 4 a více regionálních mízních uzlinách
Přítomnost vzdálených metastáz	M0	nejsou přítomny
	MX	nelze hodnotit
	M1	přítomnost

Tab. 6 Určování stádia PDAC podle TNM klasifikace (8. edice)

PDAC			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	jakékoliv N	M0
Stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

1.6.3 Onkogenetika karcinomu pankreatu

Podobně jako v případě kolorektálního karcinomu, také pro karcinom pankreatu byl navržen model popisující postupnou akumulaci genetických a cytologických změn. Na rozdíl od CRC zde premaligní stádia neoznačujeme jako adenomy, ale jako neoplázie a postupná přeměna zdravých pankreatických buněk v buňky nádorové je proto označována jako **model pankreatické intraepiteliální neoplázie**, neboli **PanIN** (Hruban *et al.* 2000). Na základě postupných změn epiteliálních buněk pankreatu rozlišujeme 4 stupně neoplázie: **PanIN-1A** a **PanIN-1B** představují jen lehkou atypii buněk, **PanIN-2** značí mírnou atypii s tvorbou vícejaderných buněk a **PanIN-3** těžkou atypii a invazivitu tkáně slinivky (obr. 11).



Obr. 12 PanIN model vývoje karcinomu pankreatu.

Převzato a upraveno podle Hruban et al. 2000.

V souvislosti s PanIN jsou nejčastěji uváděny mutace v prototonkogenu *KRAS*, tumor supresorových genech *TP53* a *CDKN2A* (kódujícím protein p16) a delece tumor supresorového genu *SMAD4* lokalizovaného na chromozomu 18q (např. Talar – Wojnarowska a Malecka-Panas 2006, Salek *et al.* 2009, Zavoral *et al.* 2011, Wood *et al.* 2022). K mutacím *KRAS* dochází hned v počátečních fázích PanIN-1A a 1B, proto se mutace *KRAS* vyskytují prakticky ve všech PDAC tkáních a jejich přítomnost je pro PDAC charakteristická (Luo 2021).

Výskyt mutací v genech *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* a delecí *SMAD4* byl u PDAC popsán už v 80. – 90. letech minulého století (Almoguera *et al.* 1988, Scarpa *et al.* 1993, Caldas *et al.* 1994, Hahn *et al.* 1996) a následně při první celoexomové sekvenační studii

24 PDAC tkání byl potvrzen jejich stěžejní význam (Jones *et al.* 2008). Současně bylo objeveno, že PDAC tkáň obsahuje v průměru 63 genetických alterací, většinou (76 %, 48/63) somatických mutací (Jones *et al.* 2008).

1.6.4 Charakter PDAC vzorků pro genetická vyšetření

Ke studiu molekulárních markerů se v současné době využívají hlavně **resekáty** PDAC získané peroperačně. Jak ale vyplývá z kapitoly 1.6.2, resekáty reprezentují pouze asi 20 % PDAC, protože jen 20 procentům pacientů je diagnostikováno lokalizované onemocnění s možností kurativní resekce. Zbylá většina pacientů operaci nepodstupuje a je odkázána pouze na paliativní terapii. Molekulární analýza resekátů tedy není pro běžnou klinickou praxi příliš vhodná. Spíše je potřeba soustředit se na prospektivní analýzy a využívat k hledání molekulárních markerů vzorky tumorové tkáně všech pacientů, včetně pacientů s lokálně pokročilým či metastatickým onemocněním. Takovými vzorky jsou **EUS-FNAB**, které se odebírají ze suspektní pankreatické tkáně při diagnostice PDAC a jsou následně cytologicky hodnoceny (Nelsen *et al.* 2015, Bhatia a Varadarajulu 2017). Analýza bioptického vzorku je z molekulárního hlediska náročnější než analýza resekátu, protože EUS-FNAB vzorek bývá malý, silně prokrvácený, kontaminovaný nenádorovou tkání, často málo buněčný a buňky bývají fragmentovány. To je pravděpodobně důvod, proč využívání EUS-FNAB vzorků PDAC ke studiu molekulárních markerů není běžné.

Pracoviště, která s EUS-FNAB pracují, je využívají nejčastěji v **nativní formě** - tedy část bioptického vzorku je využita pro genetickou analýzu a další část vzorku je natřena na sklíčko k cytologickému stanovení diagnózy (např. Wang *et al.* 2011, Ogura *et al.* 2012, Ginestà *et al.* 2013, Cazacu *et al.* 2021). Nejčastěji jsou nativní aspiráty používány k průkazu mutace *KRAS* ve vzorku pro zpřesnění diagnostiky PDAC, respektive odlišení od chronické pankreatitidy (Salek *et al.* 2007). Vzorek nativní tkáně je z hlediska extrakce genetického materiálu nejkvalitnější, ale slabinou je, že buněčný materiál natřený na cytologickém sklíčku a zhodnocený patologem, nemusí být tentýž jako v nativním vzorku a tudíž u něj není známo procentuální zastoupení nádorových buněk (pokud vůbec nějaké přítomny jsou), takže detekce *KRAS* mutací (i ostatní genetické analýzy) v těchto vzorcích může vést k falešně negativním výsledkům.

Vhodnější variantou je proto využít ke genetické analýze **tentýž aspirát natřený na sklíčko**, který hodnotil cytolog. Pak je možné izolovat genetický materiál pouze z oblasti výskytu tumorových buněk, kterou vyznačí cytolog během svého hodnocení. Tato

metoda se na našem pracovišti velmi osvědčila a díky ní detekujeme *KRAS* mutace v 90 % bioptických vzorků (Benešová *et al.* 2019).

Detekce *KRAS* mutací z cytologických sklíček byla využita také v recentní publikaci, která je pod označením **Publikace 4** uvedena v kapitole 3 Výsledky. Pojednává o rozdílné prognostické roli různých typů *KRAS* mutací u pacientů s PDAC.

2 Cíle disertační práce

Cílem práce bylo studium genetického pozadí solidních tumorů a hledání molekulárních markerů, které by byly využitelné v klinické praxi při zpřesňování diagnostiky a prognózy onemocnění.

Konkrétní cíle disertační práce:

1. Detekce *RET/PTC1* a *RET/PTC3* přeskupení v souboru čítajícím 47 dětských pacientů s papilárním karcinomem štítné žlázy
2. Optimalizace metodiky detekce cirkulující nádorové DNA a demonstrace jejího využití v klinické praxi u pacientů s pokročilým karcinomem kolorekta
3. Studium intratumorové mutační heterogenity prekancerózních kolorektálních lézí a možností jejího využití v klinické praxi
4. Stanovení prognostické role *KRAS* mutací u pacientů s karcinomem pankreatu; porovnání výsledků při detekci *KRAS* mutací z cytologického materiálu a z ctDNA.

3 Výsledky

3.1 Publikace 1

Nová varianta *RET/PTC1* přeskupení detekovaná u chlapce s papilárním karcinomem štítné žlázy bez historie ionizujícího ozáření

Hálková T., Dvořáková Š., Václavíková E., Sýkorová V., Včelák J., Sýkorová P., Vlček P., Řeboun M., Katra R., Kodetová D., Schrumpf M., van Wezel T., Morreau H., Bendlová B.

Úvod: Genetickou příčinou PTC je v pětině případů vznik chimérního fúzního genu, tzv. *RET/PTC*. Vzniká, pokud je oblast *RET* protoonkogenu, která kóduje intracelulární katalyticky aktivní doménu, připojena k jinému genu poskytujícímu promotor a umožňujícímu dimerizaci a tím aktivaci RET receptoru. Nejběžnější z těchto přeskupení je *RET/PTC1*, kde 12. exon *RET* genu je připojen k 1. exonu genu *CCDC6* se zlomy v 11. intronu *RET* a 1. intronu *CCDC6*.

Metodika: Osmiletý chlapec s PTC (T3m N1b M1, opakovaná recidiva), bez historie ionizujícího ozáření, podstoupil totální thyroidektomii. Z nádorové tkáňe byla izolována RNA spolu s DNA pomocí komerčního izolačního kitu AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Venlo, Nizozemsko). RNA byla reverzní transkripcí převedena do cDNA. Detekce *RET/PTC1* přeskupení byla provedena metodou real-time PCR s následnou analýzou křivky tání. Purifikovaný PCR produkt byl sekvenován.

Výsledky: Na základě křivky tání odlišné od *RET/PTC1* pozitivní kontroly, byla nalezena nová, delší varianta *RET/PTC1* přeskupení. Sekvence cDNA odhalila fúzi 1. exonu *CCDC6* s 9. exonem *RET* kódujícím část jeho extracelulární domény. Za 9. exonem následuje hned 12. exon *RET*, exony 10 a 11 přítomny nejsou.

Závěr: Byla nalezena nová, atypická forma *RET/PTC1* přeskupení. Překvapivá je zejména přítomnost části extracelulární domény *RET* genu (exon 9), která se v žádném doposud popsaném *RET/PTC* přeskupení nevyskytuje. Možným vysvětlením by mohl být nesprávný sestřih *RET* v důsledku somatické 32 bp dlouhé delece v *RET* na hranici exon-intron 11.

Podíl disertantky na publikaci:

- 1) 100% podíl na izolaci nukleových kyselin, reverzní transkripci, detekci *RET/PTC* přeskupení pomocí real-time PCR
- 2) participace z cca 60 % na metodických postupech použitých k objasnění sekvence nového přeskupení (Sangerovo sekvenování, NGS, long range PCR)
- 3) zpracování experimentálních a klinických dat (100 %)
- 4) vytvoření tabulky a obrázků (100 %)
- 5) sepsání celého rukopisu (100 %)



ELSEVIER

Case study

A novel *RET/PTC* variant detected in a pediatric patient with papillary thyroid cancer without ionization history^{☆,☆☆}



Tereza Halkova MSc^{a,b,*}, Sarka Dvorakova PhD^a, Eliska Vaclavikova PhD^{a,b}, Vlasta Sykorova PhD^a, Josef Vcelak MSc^{a,b}, Pavla Sykorova MD^c, Petr Vlcek MD^c, Martin Reboun MSc^d, Rami Katra MD^e, Daniela Kodetova MD^f, Melanie Schruppf^g, Tom van Wezel^g, Hans Morreau^g, Bela Bendlova^a

^aDepartment of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Prague 1, 11694, Czech Republic

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague 2, 12843, Czech Republic

^cDepartment of Nuclear Medicine and Endocrinology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital Motol, Prague 5, 15006, Czech Republic

^dInstitute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague 2, 12808, Czech Republic

^eDepartment of ENT, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague 5, 15006, Czech Republic

^fDepartments of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague 5, Czech Republic

^gDepartment of Pathology, Leiden University Medical Center, Leiden, 2333 ZA, The Netherlands

Received 20 May 2015; revised 15 August 2015; accepted 26 August 2015

Keywords:

Papillary thyroid cancer;
RET gene;
RET/PTC rearrangement;
RET/PTC1ex9;
Fused gene;
Next-generation sequencing

Summary Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most frequent type of thyroid cancer. Its development is often caused by the formation of *RET/PTC* fused genes. *RET/PTC1* is the most prevalent form, where exon 1 of *CCDC6* gene is fused with the intracellular portion of *RET* protooncogene starting with exon 12. We have discovered a novel *RET/PTC1* variant which we have named *RET/PTC1ex9* in metastatic PTC of 8-year-old boy. *RET/PTC1ex9* detection was performed by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis and subsequent Sanger and next-generation sequencing. A fusion of exon 1 of *CCDC6* with exon 9 of extracellular domain of *RET* followed by exon 12 of *RET* was revealed. This is the first *RET/PTC* variant among PTC cases that contain the extracellular part of *RET*. This observation could be probably explained by incorrect splicing of *RET* due to the somatic 32-bp deletion in exon-intron 11 boundary of *RET*.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

[☆] Competing interests: The authors of this publication declare that they have no conflict of interest.

^{☆☆} Funding/Support: This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grants NT 13901-4 and DRO (EU, 00023761), and Charles University in Prague, grant SVV UK 260148/2015.

* Corresponding author at: Institute of Endocrinology, Narodni 8, Prague 1, 11694, Czech Republic.

E-mail address: thalkova@endo.cz (T. Halkova).

1. Introduction

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common subtype of thyroid cancer with a worldwide prevalence range of 80% to 85%. Somatic genetic alterations leading to the

activation of the mitogen-activated protein kinase pathway are the most frequent cause of PTC [1]. They comprise mainly mutations of the genes encoding intracellular signaling proteins B-raf and Ras as well as large-scale chromosomal rearrangements resulting in the *RET* proto-oncogene activation via formation of fused genes known as *RET/PTCs* and its chimeric proteins.

Ret protein acts as a transmembrane tyrosine kinase receptor, and *RET/PTC* formation results from the fusion of the *RET* region encoding intracellular tyrosine kinase (TK) domain with the part of the other gene providing the promoter. *RET/PTC* rearrangements arise as a consequence of paracentric inversion of the long arm of chromosome 10 or, less frequently, as reciprocal translocation between 10q and other chromosomes [2]. Most recently, a novel *ACBD5/RET* rearrangement resulting from the pericentric inversion *inv(10)(p12.1;q11.2)* was found [3]. The occurrence of 2 DNA breakpoints is essential for the *RET/PTC* formation, and 1 of the breakpoints is localized at 10q11.2, where the *RET* protooncogene is mapped.

Several fusion partners of *RET* have been described in thyroid cancer up to now. *RET/PTC1* is the most prevalent form, where the TK domain starting in the exon 12 of *RET* is fused to exon 1 of *CCDC6* (*H4* formerly) with breakpoints within intron 1 of *CCDC6* and intron 11 of *RET*. In this article, we describe a novel longer atypical *RET/PTC1* variant, which we have named *RET/PTC1ex9*. “Ex9” in the name indicates that the intact exon 9 of the extracellular portion of *RET* is involved in the rearrangement between part of *CCDC6* and exon 12 of *RET*.

2. Materials and methods

2.1. Characterization of the patient

The young male Czech patient harboring *RET/PTC1ex9* was diagnosed by ultrasonography with a suspected node affecting the entire left lobe of the thyroid gland and metastases in the lymph nodes at the age of 8 years. He underwent total thyroidectomy with left-sided neck dissection at the same age. A pathologic examination revealed a classical variant of PTC with T3N1M1. Local metastases were detected in 13 of 16 resected lymph nodes. Distant metastases bilaterally in the lungs were identified immediately after surgery during the first posttherapeutic scintigraphy (2 months after total thyroidectomy). The therapeutic activity of radioiodine was applied with dosage of 5.52 GBq. Next, radioiodine treatment was applied 7, 31, 37, and 46 months after surgery with dosages of 5.55, 2.6, 4.4, and 2.96 GBq, respectively. In the period between the 7th and the 31st month, radioiodine treatment was interrupted because the patient had no evidence of the disease. After last application of radioiodine (November 2013), scintigraphy showed no evidence of pathologic accumulations in lungs, and ultra-

sound imaging was without any signs of local recurrence of the primary disease. Total follow-up time frame available for the patient is 58 months.

The patient had no history of irradiation, surgeries, injuries, allergies, and no hereditary predisposition. His birth parents are healthy, and there is no evidence of thyroid disease or serious illness in the family.

The genetic examination was performed under informed consent with participation in the study number NT 13901-4 approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology. The purpose of this study was to detect the most common genetic alterations in thyroid carcinomas including *RET/PTC* rearrangements. Unlike routine practice, this case was additionally subjected to Sanger sequencing due to the presence of an atypical rearrangement. Long-range polymerase chain reaction (PCR) and next-generation sequencing (NGS) methods were additionally used to confirm the atypical fused gene sequence.

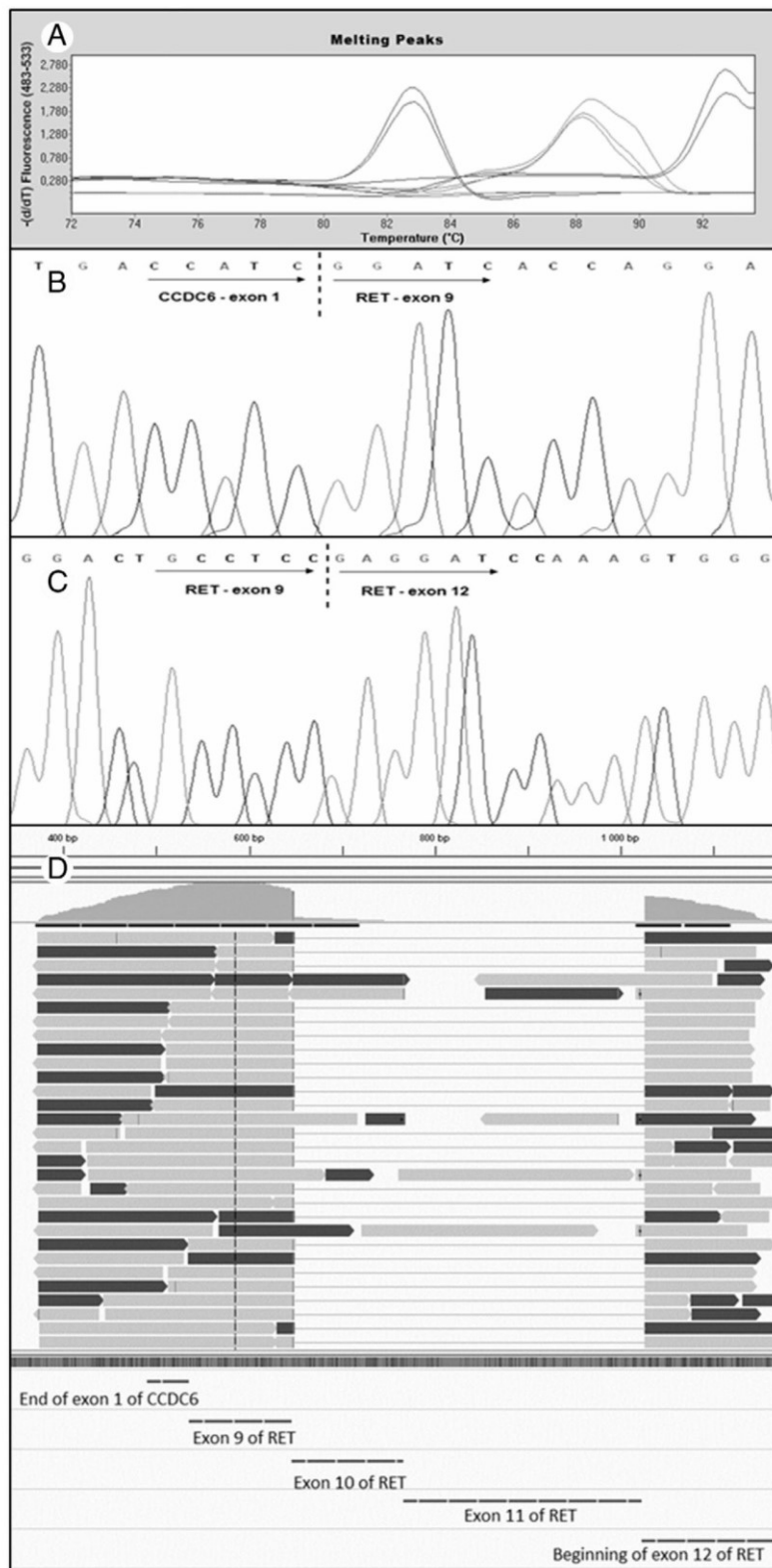
2.2. DNA and RNA isolation and complementary DNA synthesis

Tumor DNA and RNA were extracted from the fresh frozen PTC tissue after pathologic examination using AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Tumor tissue used for isolation contained at least 70% of tumor cells. Corresponding germ line DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by automated DNA extraction according to the manufacturer's protocol (QuickGene-610L; Fujifilm, Tokyo, Japan).

Eight micrograms of total RNA was reverse transcribed into 100 μ L of complementary DNA (cDNA) using random hexamer primers and AMV reverse transcriptase (Promega, Fitchburg, WI) according to the manufacturer's protocol.

2.3. *RET/PTC1ex9* detection

The detection of *RET/PTC1* expression was performed by quantitative real-time PCR followed by melting curve analysis using a Light Cycler 480 instrument (Roche, Basel, Switzerland). Real-time PCR was performed in 20- μ L reaction mixture containing 2 μ L of 5 \times diluted cDNA, 10 μ L of 2 \times IQ Sybr Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), and 1 μ L of 10 μ mol/L primers specific for *RET/PTC1* amplification (5'-CGCGACCTGCG CAAA-3', annealing in exon 1 of *CCDC6* and reverse: 5'-CAAGTTCTTCCGAGGGAATTCC-3', annealing in exon 12 of *RET*). The detection was carried out in 96-well plates under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, 40 cycles of 10-second denaturation at 95°C, 10-second annealing at 60°C and 10-second elongation at 72°C, final elongation at 72°C for 10 minutes followed by melting curves analysis (70°C-94°C; ramp rate, 0.11°C/s). The sample was analyzed in triplicate. Positive



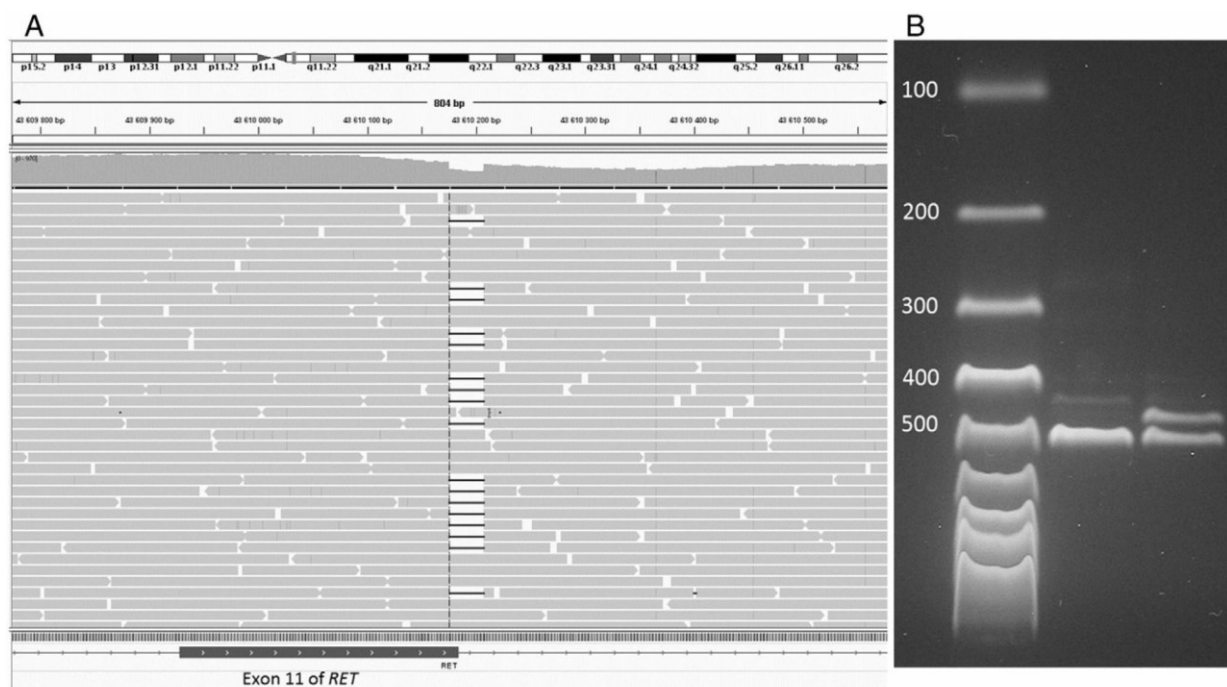


Fig. 2 Detection of the partial 32-bp deletion comprising exon-intron 11 boundary in the PTC tissue (tumor DNA). A, NGS of the 5564-bp-long section of the *RET* protooncogene from exons 9 to 13 revealed the partial 32-bp deletion in exon-intron 11 boundary (9 bp from exon 11 and 23 bp from intron 11) shown in the figure as black dash. This deletion was present in 26% of tumor DNA and was absent in germ line DNA. B, Visualization of the somatic deletion by gel electrophoresis. From the left: 100-bp DNA ladder, PCR product corresponding to *RET* exon 11 isolated from blood (germ line DNA) and PCR product corresponding to *RET* exon 11 isolated from PTC tissue (tumor DNA). In the third well can be clearly seen the presence of partial 32-bp deletion.

and negative controls for *RET/PTC1* were included in the run (in duplicate). For the cDNA quality control, expression of housekeeping gene (*β -actin*) in the sample was tested (in duplicate).

2.4. PCR and Sanger sequencing

To clarify the *RET/PTC1ex9* sequence, the PCR was performed using a Biometra thermocycler (Göttingen, Germany) in a total volume of 20 μ L containing 0.3 U Gold Taq polymerase, 200 μ mol/L deoxyribonucleoside triphosphates, 1 \times PCR Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 mmol/L MgCl₂, 0.25 μ mol/L of each primer (identical to the primers used for real-time PCR), and 2 μ L of cDNA. Cycling conditions were as follows: initial denatur-

ation at 95°C for 10 minutes, 35 cycles consisted of 20-second denaturation (95°C), 30-second annealing (60°C), 1-minute extension (72°C), and final extension at 72°C for 10 minutes. PCR product was visualized by 1.5% agarose gel electrophoresis in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer.

Subsequently, the PCR product was purified on an Agencourt SPRIplate Magnet Plate using an Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and sequenced using a DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing) Quick Start Master Mix Kit and a CleanSEQ Dye-Terminator Removal (Beckman Coulter) according to the manufacturer's protocols. Sequencing was performed using a CEQ 8000 instrument, and the data were evaluated by CEQ 8000 software (Beckman Coulter). The primers used for sequencing were identical to the primers used for

Fig. 1 The detection of *RET/PTC1ex9* by melting curve analysis and identification of its cDNA sequence. A, Melting curve analysis revealed differences between melting peaks corresponding to the *RET/PTC1*-positive control (first peak, analyzed in duplicate) and melting peaks of *RET/PTC1ex9* PCR product formed by real-time PCR (middle peak, analyzed in triplicate). Last peak corresponds to *β -actin* (cDNA quality control, analyzed in duplicate), and baseline corresponds to negative control (water instead of cDNA in the reaction mixture). Sanger sequencing—fusion points between exon 1 of *CCDC6* and exon 9 of *RET* (B) and between exon 9 of *RET* and exon 12 of *RET* (C). Both PCR products used for sequencing were separately amplified by primers designed to be specific for *RET/PTC1ex9* as described in paragraph 2.4. D, NGS—visualization of *RET/PTC1ex9* in IGV browser after its construction in TopHat program—the fusion consists of exon 1 of *CCDC6* gene and exons 9 and 12 of the *RET* protooncogene. The exons 10 and 11 of *RET* are nearly totally spliced as seen from coverage of each part of the fused gene in the top of the figure.

amplification. The cycle sequencing conditions consisted of 30 cycles of 96°C for 20 seconds, 50°C for 20 seconds, and 60°C for 4 minutes.

The presence of exon 9 of the *RET* protooncogene was confirmed by 2 PCR reactions with specific primers designed to anneal within exon 9 of *RET* followed by Sanger sequencing of the products. The first product, *CCDC6* exon 1–*RET* exon 9, was amplified using primers: forward: 5'-CGCGACCTGCGCAAA-3' (annealing in exon 1 of *CCDC6*) and reverse: 5'-GGTCTCCACAACATCG CAGT-3' (annealing in exon 9 of *RET*), and the second product, *RET* exon 9–*RET* exon 12, was amplified using primers: forward: 5'-CCACTGCGATGTTGTGGAGA-3' (annealing in exon 9 of *RET*) and reverse: 5'-CAAG TTCTTCCGAGGGAATTCC-3' (annealing in exon 12 of *RET*).

For amplification of exon 11 of the *RET* in the tumor and germ line DNA, the primers and PCR conditions were used according to our previous article [4].

2.5. Long-range PCR

For the identification of breakpoints and any structural changes in exons and introns of the *RET* protooncogene, long PCR was performed using LongRange PCR kit (Qiagen) according to manufacturer's handbook. Tumor and germ line DNA was used to amplify the 5564-bp long region of the *RET* protooncogene from exon 9 to exon 13 with primers: forward: 5'-CCACTGCGATGTTGTGGAGA-3' (annealing in exon 9 of *RET*) and reverse: 5'-TGCA GGCCCCATACAATTTGA-3' (annealing in exon 13 of *RET*).

2.6. Next-generation sequencing

NGS method was applied to verify the sequence of 3 previously generated PCR products: *RET/PTC1ex9* amplified from cDNA and region of the *RET* protooncogene starting with exon 9 and ending with exon 13 amplified with LongRange PCR from tumor and germ line DNA. Libraries were generated using Nextera XT kit (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's sample preparation protocol. Libraries with a molarity 4 μmol/L were subjected to cluster generation on flow cell, and paired-end sequencing for 300 cycles by a MiSeq Reagent Kit v2 in a MiSeq sequencer platform (Illumina) was performed.

Sequence data were analyzed by the on-instrument software MiSeq Reporter v.2.4 (Illumina). The data were demultiplexed, and FASTQ files were generated. Reads from pair-end fragments were trimmed for low-quality and duplicate reads. The MiSeq Reporter software aligned the reads against the human reference sequence GRCH37.p5/hg19 using a Burrows-Wheeler Aligner. The variant calling for targeted regions was performed using a Genome Analysis Toolkit (GATK; Broad Institute, Cambridge, MA).

Secondary analysis of the data for the construction of fusion gene was performed by the TopHat-Fusion [5]. This software aligns reads across fusion points and is able to find a fusion across 2 chromosomes or rearrangements within a single chromosome. For visualization of the fusion, a TopHat (2.0.13) splice junction mapper was used [6]. For this purpose, a *RET/PTC* fusion reference sequence, which contained exon 1 of *CCDC6* gene and exons 9, 10, 11, and 12 of *RET* gene, was constructed. As an input files for TopHat analysis, the FASTQ files were used and low-quality

Table *RET/PTC* oncogenes

Oncogene	Fusion partner gene	Chromosome	Radiation induced	References
<i>RET/PTC 1</i>	<i>CCDC6 (H4, D10S170)</i>	10q21	Both yes and no	[15]
<i>RET/PTC 1L</i>	<i>CCDC6 (H4, D10S170)</i>	10q21	No	[16]
<i>Long RET/PTC 1</i>	<i>CCDC6 (H4, D10S170)</i>	10q21	Yes	[17]
<i>RET/PTC1ex9</i>	<i>CCDC6 (H4, D10S170)</i>	10q21	No	Current report
<i>RET/PTC 2</i>	<i>PKARIA</i>	17q23	Both yes and no	[18]
<i>RET/PTC 3</i>	<i>ELE1 (NCOA4, RFG, ARA70)</i>	10q22.1	Both yes and no	[19-21]
<i>RET/PTC 3r2</i>	<i>ELE1 (NCOA4, RFG, ARA70)</i>	10q22.1	Yes	[22]
<i>RET/PTC 3r3</i>	<i>ELE1 (NCOA4, RFG, ARA70)</i>	10q22.1	Yes	[23]
<i>RET/PTC 4</i>	<i>ELE1 (NCOA4, RFG, ARA70)</i>	10q22.1	Yes	[24]
<i>RET/PTC 5</i>	<i>RFG5 (GOLGIN-84, GOLGA5)</i>	14q32.12	Yes	[25]
<i>RET/PTC 6</i>	<i>TRIM24 (HTIF1, TIF1A)</i>	7q32-34	Yes	[26]
<i>RET/PTC 7</i>	<i>TRIM33 (HTIFG, TIF1G, RFG7)</i>	1p13	Yes	[26]
<i>RET/PTC 8</i>	<i>KTN1 (KINECTIN)</i>	14q22.1	Yes	[27]
<i>RET/PTC 9</i>	<i>RFG9 (KIAA1468)</i>	18q21-22	Yes	[28]
<i>ELKS-RET</i>	<i>ELKS (RAB6IP2)</i>	12p13.3	No	[29]
<i>PCM1-RET</i>	<i>PCM1</i>	8p21-22	Yes	[30]
<i>Δ RFP-RET</i>	<i>TRIM27 (RFP)</i>	6p21.3	Yes	[31]
<i>HOOK3-RET</i>	<i>HOOK3</i>	8p11.21	No	[32]
<i>ACBD5-RET</i>	<i>ACBD5</i>	10p12.1	Yes	[3]

and duplicate reads were trimmed away. Results were finally visualized with an Integrative Genomics Viewer [7].

3. Results

The melting curve analysis showed an atypical fusion gene in the sample that we have named *RET/PTC1ex9* (Fig. 1A). The melting peak of *RET/PTC1ex9* strongly differed from *RET/PTC1* positive control which prompted us to perform further analysis.

Subsequently, the length of *RET/PTC1ex9* transcript was compared with classical *RET/PTC1* transcript by agarose gel electrophoresis. *RET/PTC1ex9* transcript was approximately 100 bp longer than the classical *RET/PTC1* (results not shown). Sanger sequencing of the *RET/PTC1ex9* revealed the presence of intact exon 9 of *RET* between exon 1 of *CCDC6* and exon 12 of *RET* in the rearrangement, and the sequences of the 2 fusion points in 2 separate PCR products, that is, *CCDC6* exon 1–*RET* exon 9 and *RET* exon 9–*RET* exon 12, are shown in Fig. 1B and C, respectively. *RET/PTC1ex9* transcript was also sequenced by NGS, and the most possible fusion gene was constructed by the TopHat program (Fig. 1D). There is clear evidence of sharp decrease of coverage in the exons 10 and 11 that most probably represent splicing of these exons.

NGS of LongRange PCR product (the 5564-bp-long section of the *RET* protooncogene from exons 9 to 13) of tumor and germ line DNA revealed the new somatic 32-bp deletion in exon-intron 11 boundary (9 bp from exon 11 and 23 bp from intron 11) shown in Fig. 2A. This deletion was present in part (26%) of tumor DNA and was missing in the germ line DNA. The deletion in tumor DNA was also confirmed by agarose gel electrophoresis of PCR product of exon 11 of *RET* shown in Fig. 2B.

4. Discussion

RET/PTC rearrangements are found in various populations and geographic regions with different frequencies. The variability of *RET/PTC* prevalence depends on the age of PTC patients, the histologic subtype of PTC, the detection method, geographical conditions, and the patients' history of radiation exposure [8]. Irradiation (therapeutic or accidental) seems to be the main risk factor for *RET/PTC* formation, and high frequencies of *RET/PTCs* (56%–87% of PTC cases) were especially detected in children exposed to the radioactive fallout following the Chernobyl nuclear accident [9–14].

At present, 13 fusion partners of *RET* forming 18 different *RET/PTCs* have been found among thyroid cancer cases in the world (Table). *RET/PTC1* and *RET/PTC3* are the most frequently found ones, whereas the other variants are rare, mostly detected in single cases. The great majority of *RET/PTC* oncogenes, except of *RET/PTC1L*, *ELKS-RET* and *HOOK3-RET*, have been found in radiation-induced thyroid tumors. All the known *RET/PTC* variants result from the fusion of intracellular TK domain of *RET* at its 5' end and the other gene and, therefore, lack the transmembrane and extracellular domain of *RET*.

Our *RET/PTC1ex9* was found in the sporadic PTC of an 8-year-old male Czech patient without any evidence of radiation exposure. From the clinical point of view, this rearrangement seems to tend to an aggressive phenotype of PTC and repeated recurrence. In *RET/PTC1ex9*, the fusion occurred between exon 1 of *CCDC6* and exon 9 of *RET* instead of exon 12 of *RET*, as it is in classical *RET/PTC1* fusion. Moreover, in *RET/PTC1ex9*, the absence of exons 10 and 11 of *RET* was observed, and thus, exon 9 is directly followed by exon 12. To date, this is the single case where involvement of the extracellular part of *RET* in *RET/PTC*

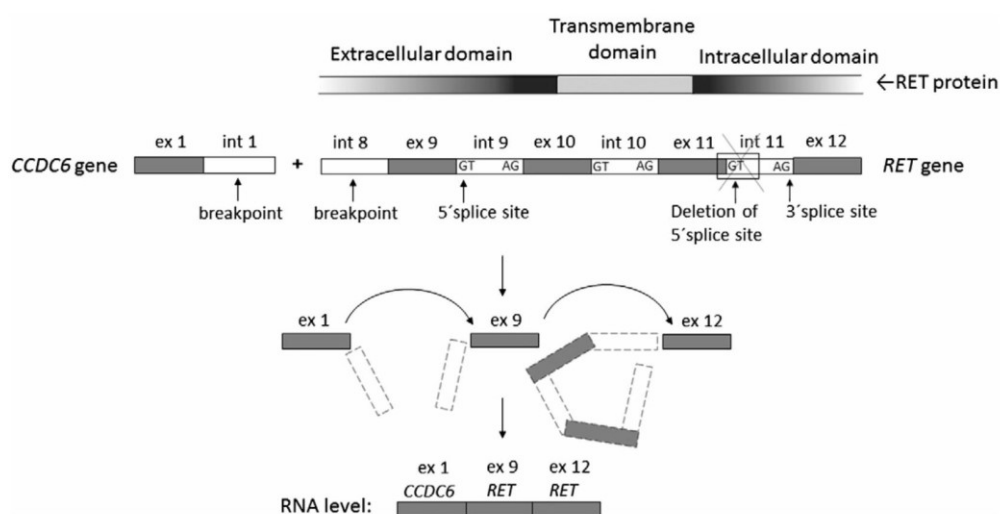


Fig. 3 Schematic diagram of *RET/PTC1ex9* and possible mechanism of its formation (int, intron; ex, exon).

formation has been described. The question thus arises how the presence of extracellular domain could affect the function of the oncoprotein. All previously described *RET/PTC* gene fusions give rise to constitutively active chimeric proteins without a transmembrane domain; therefore, these oncoproteins are localized in the cytoplasm instead of plasma membrane. The presence of the extracellular domain of *RET* in *RET/PTC1ex9* could probably affect the localization of oncoprotein, for example, letting it remain in the plasma membrane. Furthermore, the extracellular domain influences the size of the oncoprotein. It has been shown that *RET/PTC1* dimerizes rapidly after translation and exists in high-molecular-weight protein complexes with multiple adaptor and effector proteins [33]. Thus, the presence of extracellular domain could enhance or suppress the ability to produce high-molecular-weight complexes.

The genetic analysis of *RET* for identification of the fusion points and genetic changes on the level of DNA and cDNA was performed. It seems that this rearrangement was formed by the combination of 2 genetic changes in *RET* protooncogene on the level of tumor DNA—the partial deletion of exon-intron 11 boundary and the breakpoint occurring within intron 8 and subsequent fusion of *RET* with *CCDC6* gene. The somatic deletion comprising the exon-intron 11 boundary of *RET* could be the reason why the exons 11 and 10 are not involved in the rearrangement. Because the deletion is located in an important splice site, during expression—on the level of RNA—it could lead to incorrect splicing with skipping of exons 11 and 10 as schematically shown in the Fig. 3. However, the mechanism of *RET/PTC1ex9* formation remains still not fully explained, and there are still several questions.

In summary, this current report expands the list of the known *RET/PTC* rearrangements in thyroid cancer by a novel *RET/PTC1ex9* variant. In contrast to the classical *RET/PTC1* variant, this novel variant additionally contains the intact exon 9 of *RET*, which is fused to exon 1 of *CCDC6* at its 5' end and to exon 12 of *RET* at its 3' end. To the best of our knowledge, this is the first variant among PTC cases involving the extracellular part of *RET* protooncogene.

References

- [1] Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:569-80.
- [2] Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, Greco A, Pilotti S, Sozzi G. Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16:1-14 [Review].
- [3] Hamatani K, Eguchi H, Koyama K, Mukai M, Nakachi K, Kusunoki Y. A novel RET rearrangement (ACBD5/RET) by pericentric inversion, inv(10)(p12.1;q11.2), in papillary thyroid cancer from an atomic bomb survivor exposed to high-dose radiation. *Oncol Rep* 2014;32:1809-14.
- [4] Jindřichová S, Vcelák J, Vlcek P, Neradilová M, Nemeč J, Bendlová B. Screening of six risk exons of the RET proto-oncogene in families with medullary thyroid carcinoma in the Czech Republic. *J Endocrinol* 2004; 183:257-65.
- [5] Kim D, Salzberg SL. TopHat-Fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biol* 2011;12:R72.
- [6] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009;25:1105-11.
- [7] Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;14:178-92.
- [8] Marotta V, Guerra A, Sapio MR, Vitale M. RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. *Eur J Endocrinol* 2011;165:499-507 [Review].
- [9] Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, et al. Activated RET oncogene in thyroid cancers of children from areas contaminated by Chernobyl accident. *Lancet* 1994;344:259.
- [10] Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, et al. Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* 1995;55: 5617-20.
- [11] Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 1995;11: 2459-67.
- [12] Bounacer A, Wicker R, Caillou B, et al. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 1997; 15:1263-73.
- [13] Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997;57:1690-4.
- [14] Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000;6:1093-103.
- [15] Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557-63.
- [16] Giannini R, Salvatore G, Monaco C, et al. Identification of a novel subtype of H4-RET rearrangement in a thyroid papillary carcinoma and lymph node metastasis. *Int J Oncol* 2000;16:485-9.
- [17] Elisei R, Romei C, Soldatenko PP, et al. New breakpoints in both the H4 and RET genes create a variant of PTC-1 in a post-Chernobyl papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 2000;53:131-6.
- [18] Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG, et al. Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol* 1993;13: 358-66.
- [19] Bongarzone I, Butti MG, Coronelli S, et al. Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:2979-85.
- [20] Jhiang SM, Smanik PA, Mazzaferri EL. Development of a single-step duplex RT-PCR detecting different forms of ret activation, and identification of the third form of in vivo ret activation in human papillary thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 1994;78:69-76.
- [21] Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 1994;9: 509-16.
- [22] Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. A new form of RET rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 1996;13:1099-102.
- [23] Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Molecular analysis of new subtypes of ELE/RET rearrangements, their reciprocal transcripts and breakpoints in papillary thyroid carcinomas of children after Chernobyl. *Oncogene* 1998;16:671-5.
- [24] Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I. Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a

- novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Oncogene* 1996;13:1093-7.
- [25] Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Res* 1998;58:198-203.
- [26] Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999;18:4388-93.
- [27] Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer AM, Bauchinger M. Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:2786-9.
- [28] Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Demidchik E, Rabes HM. A novel type of RET rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). *Cancer Res* 2000;60:7028-32.
- [29] Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, et al. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:97-103.
- [30] Corvi R, Berger N, Balezon R, Romeo G. RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2000;19:4236-42.
- [31] Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, et al. Novel tumorigenic rearrangement, Delta rfp/ret, in a papillary thyroid carcinoma from externally irradiated patient. *Mutat Res* 2003;527:81-90.
- [32] Ciampì R, Giordano TJ, Wikenheiser-Brokamp K, Koenig RJ, Nikiforov YE. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:445-52.
- [33] Richardson DS, Gujral TS, Peng S, Asa SL, Mulligan LM. Transcript level modulates the inherent oncogenicity of RET/PTC oncoproteins. *Cancer Res* 2009;69:4861-9.

3.2 Publikace 2

Význam pooperačního sledování pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem pomocí cirkulující nádorové DNA

Benešová L., Hálková T., Ptáčková R., Semyakina A., Menclová K., Pudil J., Ryska M., Levý M., Šimša J., Pazdírek F., Hoch J., Blaha M., Minárik M.

Úvod: Možnost sledovat ctDNA v plazmě onkologických pacientů přináší zásadní klinické benefity. CtDNA může být rutinně používána jako prostředek pro monitorování úspěšnosti léčby, nebo pro včasnou identifikaci recidivy či progresu onemocnění. V této práci je demonstrováno uplatnění ctDNA v dlouhodobém pooperačním sledování pacientů s metastatickým CRC a je zde také popsáno její možné využití pro potvrzení radikality provedeného chirurgického zákroku.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 47 pacientů indikovaných k resekci metastatického CRC, kteří měli předoperačně detekovanou ctDNA. Standardní pooperační sledování pomocí zobrazovacích technik a tumorových markerů bylo doplněno odběry krve pro detekci ctDNA. Analýza ctDNA byla provedena před operací, cca týden po operaci a následně v přibližně tříměsíčních intervalech. Přítomnost ctDNA byla korelována s radikalitou provedené chirurgické léčby a aktuálním klinickým stavem pacienta.

Výsledky: Kurativní R0 resekce korelovala s pooperační negativitou ctDNA u 26/28 (93%) případů chirurgických výkonů. Ve zbývajících dvou případech byla u obou pacientů diagnostikována recidiva onemocnění po 6 měsících. U 7 pacientů, kteří podstoupili resekci R1, byla po operaci zjištěna 4/7 (57 %) pozitivní ctDNA spojená s potvrzenou časnou recidivou onemocnění (po 3 až 7 měsících). Všech 15 pacientů (15/15, 100 %) podstupujících R2 resekci zůstalo po celou dobu sledování konstantně ctDNA pozitivní. Ve 22 případech recidivy byla pozitivita ctDNA zjištěna 22krát (22/22, 100 %) oproti 16/22 (73 %) recidivám dle zobrazovacích metod a 15/22 (68 %) případům zvýšených tumorových markerů.

Závěr: Cirkulující nádorová DNA se u pacientů s metastatickým CRC osvědčila jako vysoce specifický a citlivý nástroj pro potvrzení radikality chirurgické léčby a pro predikci časných recidiv onemocnění po operacích R0/R1. Ve srovnání se zobrazovacími metodami a nádorovými markery dokázala ctDNA dříve upozornit na recidivu onemocnění.

Podíl disertantky na publikaci:

- 1) participace na designu studie z cca 50 %
- 2) 100% dozor nad klinickou i laboratorní částí studie, zajištění jejího správného průběhu, komunikace se spoluautory
- 3) cca 30 % podíl na laboratorní části (izolace DNA a ctDNA, PCR s tvorbou heteroduplexů, analýza denaturační kapilární elektroforézou)
- 4) vyhodnocení a zpracování 100 % laboratorních a klinických dat
- 5) vytvoření tabulek a obrázků (100 %)
- 6) sepsání cca 40 % rukopisu



Prospective Study

Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA

Lucie Benešová, Tereza Hálková, Renata Ptáčková, Anastasiya Semyakina, Kateřina Menclová, Jiří Pudil, Miroslav Ryska, Miroslav Levý, Jaromír Šimša, Filip Pazdírek, Jiří Hoch, Milan Blaha, Marek Minárik

ORCID number: Lucie Benešová (0000-0001-7664-0520); Tereza Hálková (0000-0001-9320-4210); Renata Ptáčková (0000-0001-7705-7871); Anastasiya Semyakina (0000-0001-6550-681X); Kateřina Menclová (0000-0002-9930-8915); Jiří Pudil (0000-0002-6938-8408); Miroslav Ryska (0000-0003-1861-8506); Miroslav Levý (0000-0003-3321-6644); Jaromír Šimša (0000-0002-4051-7923); Filip Pazdírek (0000-0001-8247-8355); Jiří Hoch (0000-0002-8409-9030); Milan Blaha (0000-0002-2983-4928); Marek Minárik (0000-0002-0615-6116).

Author contributions: Benešová L, Minárik M, Ryska M, Hoch J and Levý M designed the study; Hálková T, Semyakina A, Ptáčková R, Menclová K, Pudil J, Pazdírek F, Šimša and Levý M performed the research; Blaha M and Minárik M analyzed the data; Benešová L, Hálková T and Ptáčková R wrote the paper; and Minárik M, Ryska M, Hoch J and Levý M revised the manuscript for final submission.

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, No. 15-27939A.

Institutional review board statement: The study was reviewed and approved by the Institutional Review Board of the Military University Hospital, Thomayer Hospital and Motol University Hospital, Prague.

Informed consent statement: All study participants provided informed written consent prior to

Lucie Benešová, Tereza Hálková, Renata Ptáčková, Anastasiya Semyakina, Marek Minárik, Centre for Applied Genomics of Solid Tumors, Genomac Research Institute, Prague CZ 161 00, Czech Republic

Kateřina Menclová, Jiří Pudil, Miroslav Ryska, Surgery Department, 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and Military University Hospital, Prague CZ 169 02, Czech Republic

Miroslav Levý, Jaromír Šimša, Surgery Department, 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague and Thomayer Hospital, Prague CZ 140 59, Czech Republic

Filip Pazdírek, Jiří Hoch, Surgery Department, 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and Motol University Hospital, Prague CZ 150 06, Czech Republic

Milan Blaha, Institute of Biostatistics and Analyses of the Masaryk University, Brno CZ 625 00, Czech Republic

Marek Minárik, Elphogene, Prague CZ 161 00, Czech Republic

Corresponding author: Lucie Benešová, RNDr., Ph.D., Director, Senior Scientist, Centre for Applied Genomics of Solid Tumors, Genomac Research Institute, Drnovská 1112/60, Prague CZ 161 00, Czech Republic. lbenešova@genomac.cz

Abstract

BACKGROUND

One of the most notable applications for circulating tumor DNA (ctDNA) detection in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) is a long-term postoperative follow-up. Sometimes referred to as a “liquid (re)biopsy” it is a minimally invasive procedure and can be performed repeatedly at relatively short intervals (months or even weeks). The presence of the disease and the actual extent of the tumor burden (tumor mass) within the patient’s body can be monitored. This is of particular importance, especially when evaluating radicality of surgical treatment as well as for early detection of disease progression or recurrence.

AIM

To confirm the radicality of surgery using ctDNA and compare available methods for detection of recurrence in metastatic colorectal cancer.

METHODS

study enrollment.

Conflict-of-interest statement: All authors declare no conflict of interest.

Data sharing statement: Technical and clinical data is available from the corresponding author at lbenesova@genomac.cz. Participants have consented to use of their data for further research and other non-commercial purposes.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Received: October 29, 2019

Peer-review started: October 29, 2019

First decision: November 22, 2019

Revised: December 5, 2019

Accepted: December 22, 2019

Article in press: December 22, 2019

Published online: December 28, 2019

P-Reviewer: Nag DS, Petrucciani N

S-Editor: Gong ZM

L-Editor: A

E-Editor: Ma YJ



A total of 47 patients with detected ctDNA and indications for resection of mCRC were enrolled in the multicenter study involving three surgical centers. Standard postoperative follow-ups using imaging techniques and the determination of tumor markers were supplemented by ctDNA sampling. In addition to the baseline ctDNA testing prior to surgery, a postoperative observation was conducted by evaluating ctDNA presence up to a week after surgery and subsequently at approximately three-month intervals. The presence of ctDNA was correlated with radicality of surgical treatment and the actual clinical status of the patient.

RESULTS

Among the monitored patients, the R0 (curative) resection correlated with postoperative ctDNA negativity in 26 out of 28 cases of surgical procedures (26/28, 93%). In the remaining cases of R0 surgeries that displayed ctDNA, both patients were diagnosed with a recurrence of the disease after 6 months. In 7 patients who underwent an R1 resection, 4 ctDNA positivities (4/7, 57%) were detected after surgery and associated with the confirmation of early disease recurrence (after 3 to 7 months). All 15 patients (15/15, 100%) undergoing R2 resection remained constantly ctDNA positive during the entire follow-up period. In 22 cases of recurrence, ctDNA positivity was detected 22 times (22/22, 100%) compared to 16 positives (16/22, 73%) by imaging methods and 15 cases (15/22, 68%) of elevated tumor markers.

CONCLUSION

ctDNA detection in patients with mCRC is a viable tool for early detection of disease recurrence as well as for confirmation of the radicality of surgical treatment.

Key words: Circulating tumor DNA; Metastatic colorectal cancer; Postoperative; Radicality of resection; Follow-up; Recurrence

©The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Circulating tumor DNA has shown itself to be a highly specific and sensitive tool for confirming the radicality of surgical treatment in patients with metastatic colorectal cancer and for the potential prediction of early disease recurrence after R0/R1 surgeries. Additionally, when compared to imaging methods and tumor markers, circulating tumor DNA more accurately indicates disease recurrence during follow-ups that are minimally invasive and are of low burden to the patient.

Citation: Benešová L, Hálková T, Ptáčková R, Semyakina A, Menclová K, Pudil J, Ryska M, Levý M, Šimša J, Pazdírek F, Hoch J, Blaha M, Minárik M. Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA. *World J Gastroenterol* 2019; 25(48): 6939-6948

URL: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v25/i48/6939.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v25.i48.6939>

INTRODUCTION

Around 50% of patients with colorectal cancer (CRC) are found to have synchronous liver or extrahepatic metastases at the time of diagnosis or will develop metachronous metastases within several years after surgery^[1]. It is known that radical surgical resection – the R0 resection which involves a complete removal of the diseased tissue – is the only effective treatment option, ideally in combination with perioperative chemotherapy^[2]. The 5-year survival rate for patients with surgical treatment ranges from 41% to over 70% compared to 5% if not treated^[3-5].

Besides removal of metastases, postoperative patient follow-up is no less important as it allows for the timely identification of any progression or recurrence of the disease and prompt therapeutical response – whether by surgery or modification of systematic therapy. The monitoring of patients with metastatic CRC is predominantly

based on imaging techniques such as ultrasonography (US), computed tomography (CT), positron emission tomography (PET), magnetic resonance imaging (MRI) or X-ray imaging (XRAY), usually with assessments of serum tumor markers carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9). Nowadays, molecular biology techniques also play an irreplaceable role in the management of patients with CRC, considering that the decisions on cancer therapy are ever more supported by the knowledge of biological characteristics and genetic profile of the disease^[6]. Most recently, the possibility for disease follow-up using circulating tumor DNA (ctDNA) has become available in addition to already implemented mutation profiling from tissue biopsies or resectates^[7,8].

The term ctDNA means short fragmented DNA, which has historically been observed in blood circulation of patients suffering with metastatic stages of cancers^[9,10]. ctDNA is often referred to as cell-free DNA to emphasize its exogenous nature in comparison to DNA originating from nuclei of the blood cells. Although the exact mechanism of its release into circulation is still subject to debate, there are several probable mechanisms of the ctDNA origin including: Apoptosis; necrosis; active release through lipoproteonucleotidic complexes (virtosomes); phagocytosis; and exocytosis^[11]. Due to its exclusive origin in cancerous cells, ctDNA retains the fundamental imprint of its cancer genome including cancer-specific aberrations such as somatic mutations. Therefore, the ctDNA analysis has recently been promoted using the term "liquid biopsy"^[12]. The main advantage of liquid biopsy, compared to the "classic" biopsy of tumor tissues is its minimal invasiveness and the associated minimal stress for the patient. Additionally, ctDNA is released to the bloodstream from all tumor foci, and thus a single blood sample contains the complete mutation spectrum of cancer clones present in the patient's body^[13].

Besides liquid biopsy, ctDNA testing has proven to be a very promising instrument for long-term, postoperative follow-ups of patients with CRC, particularly in advanced stages. Being minimally invasive, it can be repeated over short periods for a long time with no significant burden to the patient, and moreover, this test shows high sensitivity and specificity to patients with preoperative ctDNA positivity^[14]. The approach fundamentally relies on the applied methodology, which must be able to capture < 0.1% of ctDNA on the background of non-tumor DNA. Accordingly, the current techniques include dedicated approaches such as those based on digital PCR, BEAMing or deep sequencing^[15]. In all cases, tumor-specific DNA alterations (usually mutations) found in the tumor tissue or occurring with a certain significant frequency in the given cancer are used as ctDNA positivity markers. However, the above mentioned methods have their limitations, particularly in terms of higher demands on the input DNA amount and the costs. Another sensitive, efficient, rapid and affordable method based on the formation of heteroduplexes with subsequent detection using denaturing capillary electrophoresis (DCE) has been used at our center for 10 years. This method can be used to detect a mutated locus in plasma with the sensitivity of 0.03% to 1% depending on the mutation to be determined (Table 1) with input DNA amount of tens of pg^[16,17]. The specificity of this ctDNA test is 100%, which means that the presence of ctDNA always provides evidence that a tumor residue or tumor cells are present. As previously shown by us, ctDNA testing using DCE allows patient follow-up in real time, while ctDNA levels correlate very well with the current condition of the patient^[17]. As we reported in this paper about a group of patients with metastatic CRC, ctDNA can be used in clinical practice, particularly for the evaluation of the radicality of surgery and for the timely detection of any progression or recurrence of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

This study was conducted in cooperation with three prime surgery centers in the Czech Republic in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by ethics committees of the relevant hospitals. The forty-seven patients enrolled in the study had undergone the resection of synchronous or metachronous colorectal cancer metastases and tested positive for ctDNA before surgery, and were thus suitable candidates for postoperative ctDNA follow-up. Patient characteristics are listed in Table 2. All patients signed an informed consent form for the study. A tumor tissue sample was surgically obtained in each case. Peripheral blood samples for ctDNA analysis were collected in an anticoagulant solution before, 1 week after the surgery, and subsequently in several-month intervals during their follow-ups. Clinical patient data including tumor localization and type, surgical radicality, and CEA and CA 19-9 marker levels were also collected.

Table 1 Characteristics of the markers used for the mutation analysis^[16,17]

Marker	Exon number	Target codons	Size of PCR product (bp)	LOD (%)	DCE separation temperature (°C)
KRAS	2	12, 13	112	0.03	50
	3	59, 61	100	0.05	51
	4	117, 146	150	0.05	45
TP53	5	170-187	107	0.1	58
	6	187-224	169	0.5	52
	7	225-261	160	0.5	52
	8	262-307	151	0.03	56
APC	15	854-896	128	0.7	48
	15	1275-1308	100	0.7	48
	15	1290-1335	136	0.6	52
	15	1389-1446	174	0.3	48
	15	1430-1463	101	1	48
	15	1479-1530	156	1	51
PIK3CA	9	542	106	0.2	48
	20	1025, 1031, 1047	136	0.3	49
BRAF	15	600	230	0.05	48
CTNNB1	3	45	152	0.4	52

bp: Base pair; DCE: Denaturing capillary electrophoresis; LOD: Limit of detection.

DNA isolation and detection of mutations

Mutation profiles were determined in DNA isolated from tumor tissues, subsequently, the detected mutations were analyzed in plasma samples. Tumor DNA was isolated from the samples of native frozen (-20 °C) tissues using the GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MS, United States). ctDNA was isolated using the NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) from plasma according to the instructions of the manufacturer. Plasma was obtained by centrifugation of blood promptly after collection, and then immediately frozen at -20 °C. The mutations were identified using a panel for the detection of the most commonly mutated loci in the *KRAS*, *TP53*, *APC*, *PIK3CA*, *BRAF* and *CTNNB1* genes, which are characteristic for colorectal cancer (see [Table 1](#) for details). Tumor tissue and ctDNA mutations were detected using PCR with the formation of heteroduplexes and subsequent separation using DCE. The principle of the method has been described previously^[18].

Resection radicality and recurrence of the disease

The radicality of surgical removal of colorectal cancer metastases was determined by the pathologist based on examination of the resected samples' margins. Complete resections with no macroscopic or microscopic tumor residues were identified as R0. For R0 resections, the minimum distance of tumor cells from the resection line was > 0 mm. Microscopically incomplete resections, with a presence of tumor cells in the margin detected by the pathologist, were identified as R1. Macroscopically incomplete resections were identified as R2 and were classified as R2a (macroscopic presence of a residue of the primary tumor), R2b (macroscopic presence of distal metastases), R2c (macroscopic presence of any residue(s) of the primary tumor as well as of distal metastases)^[19]. The surgical radicality assessments were supplemented with an analysis of postoperative ctDNA.

Disease recurrence was longitudinally monitored and was assessed using imaging methods (most commonly CT, MRI, US, XRAY) and using CEA (normal levels ≤ 5 ng/mL) and CA19-9 (normal levels ≤ 37 U/mL) tumor marker levels. Any abnormalities detected by imaging techniques or elevated levels of at least one tumor marker were considered recurrences. This data were correlated with the presence of ctDNA. The ctDNA was evaluated until recurrence or during the patient's follow-up period.

Table 2 Clinical patient data

Characteristics		Value
Number of patients		47
Age	mean, range (yr)	63.6 ± 12.3, 32-87
Gender	Female/male	16/31
Localization of primary	Rectum	13
	Colon	14
	Rectosigmoid	8
	Sigmoid	7
	Cecum	3
	Others	2
Localization of metastasis	Liver only	35
	Liver and/or other	12
Surgical treatment		
Number of surgeries ¹		63
Synchronous mCRC	Combined (primary and liver)	12
	Primary before metastases	8
	Liver first	2
	Liver in the second stage	14
Metachronous mCRC	Liver	24
	Other metastases	3
Radicality	R0	40
	R1	7
	R2	16
Recurrence (R0 surgeries)	Number ²	27
	Mean time to recurrence, range (mo)	9.0 ± 5.1, 3-22

¹Postoperative ctDNA was available for 50 surgeries.

²All parameters for recurrence evaluation were available for 22 R0 surgeries. mCRC: Metastatic colorectal cancer; R0: Complete resection; R1: Microscopically incomplete resection; R2: Macroscopically incomplete resection.

RESULTS

Detailed information on the 47 patients enrolled in the study is available in [Supplementary Table 1](#). In total, 79 tumor tissue samples (25 from the primary tumor, 6 from lymph nodes and 48 from distal metastases) and 202 plasma samples (51 before surgery, 39 after surgery and 112 during follow-up) were collected over the course of the study. A detailed overview of the collected samples and mutations detected in tumor tissue is provided in [Supplementary Table 2](#).

Sixty-three resections were done during the study (including repeated resections during follow-up), which comprised 40 R0, 7 R1 and 16 R2 resections. A postoperative ctDNA sample to assess the correlation of ctDNA and surgery radicality was available for 39 patients undergoing 50 surgeries (28 R0, 7 R1 and 15 R2) ([Table 3](#); for detailed information see [Supplementary Table 1](#)). Among the 28 cases of R0 resection, postoperative ctDNA tested negative in 26 cases (26/28, 93%). After the first of the two remaining R0 surgeries, a RFA of a small metastasis in the liver, the patient continued displaying ctDNA and, subsequently, was diagnosed with disease recurrence within the scar 6 mo after the surgery. The second case of ctDNA positivity after R0 surgery was a right-sided hemicolectomy with metastasectomy. Also, in this case, the recurrence (two new liver metastases) was visible *via* imaging methods 6 months after the surgery.

In 7 cases with R1 resection, postoperative ctDNA was positive 4 times (4/7, 57%) with disease recurrence 3, 3, 4 and 7 mo after surgery in these cases. For the remaining 3 patients with negative ctDNA after R1 surgery (3/7, 43%), two of them had postoperative recurrence after 7 or 22 mo, and the third one has gone 5 months with no recurrence after surgery. Postoperative ctDNA was positive in all 15 patients with R2 resection (15/15, 100%).

Postoperative tumor recurrence was evaluated according to positive results of ctDNA testing, imaging methods and tumor marker assessments. In our set of 32

Table 3 Correlation of surgical radicality and postoperative circulating tumor DNA

	Number	State (time to recurrence or follow-up time)
R0	28	
ctDNA positive	2	2 recurrence (6 mo)
ctDNA negative	26	10 no recurrence (6-36 mo), 14 recurrence (4-22 mo) ¹
R1	7	
ctDNA positive	4	4 recurrence (3-7 mo)
ctDNA negative	3	1 no recurrence (5 mo), 2 recurrence (7 or 22 mo)
R2	15	
ctDNA positive	15	12/2/1 metastasis/primary tumor/both present
ctDNA negative	0	-

¹In two ctDNA negative R0 surgeries were missing follow-up information. ctDNA: Circulating tumor DNA; R0: Complete resection; R1: Microscopically incomplete resection; R2: Macroscopically incomplete resection.

patients undergoing R0 resections of liver metastases and long-term postoperative monitoring, 22 patients had recurrences (22/32, 69%, see [Supplementary Table 1](#)). In 17 patients, from whom all parameters for the detection of postoperative tumor recurrence were available, a total of 22 recurrences were confirmed (3 patients had repeated recurrences - 2 and 4 recurrences). Thirteen times (13/22, 59%) the recurrence was simultaneously detected by ctDNA, imaging methods and tumor markers. Seven times (7/22, 32%) the tumor markers were negative and 6 times (6/22, 27%) the imaging methods were without evidence of tumor. The ctDNA was not negative even once (0/22, 0%), making ctDNA in our study the most sensitive tool for detecting tumor recurrence of all three methods. In four patients (4/22, 18%) the tumor recurrence was detected by ctDNA only, while imaging methods and tumor markers were negative ([Table 4](#)).

DISCUSSION

Radicality of surgery is normally assessed based on histological examination of a resected sample and based on the results of imaging methods. However, these examinations cannot indicate any potential presence of circulating tumor cells found in the bloodstream or lymphatic pathways due to a metastatic process or dissemination during surgery. Potential presence of microscopic metastases cannot be demonstrated using histology or imaging methods either. Although the follow-up of tumor marker levels may be useful for detection, their sensitivity and specificity are low^[20]. ctDNA is a highly dynamic marker with an approximate half-life of 2 hours, and its levels correspond to the clinical condition of patients with mCRC^[17,21]. As we have shown in this paper, a postoperative presence of ctDNA correlates very well with surgery radicality, and its elevated levels in R0 and R1 resections may signal the occurrence of micrometastases and thus help to identify patients with an increased risk of early recurrence for a higher frequency of their follow-up assessments or for an indication of adjuvant therapy^[22-24].

To date, only three papers have been published studying the presence of ctDNA immediately after CRC resection. One study in 2005 focused on *KRAS* mutation persistence in the plasma of patients with colorectal cancer in various stages 3 days from radical surgery. As surprisingly indicated by the results, most patients with preoperatively detected *KRAS* mutations in plasma had the same mutations detected in plasma, also 3 days from radical surgery (7/9, 78%). Only two patients had no mutation detected in the postoperative period (2/9, 22%)^[25]. As mentioned in another study, ctDNA can provide information on radicality of primary resection of colorectal cancer, which was illustrated in the case of a patient where evidence of insufficient radicality of the primary surgery was provided based on the presence of postoperative ctDNA^[26]. The last study from 2016 showed a correlation between R0 resections and postoperative ctDNA negativity in 75% of patients (6/8) and a correlation between R2 resection and postoperative ctDNA positivity in 67% of patients (2/3), by presenting a set of 11 patients with preoperatively positive ctDNA results, undergoing R0 (8 times) or R2 (3 times) resection^[27].

Compared to the above mentioned studies, our study presents the largest group of patients so far with preoperatively detected ctDNA (47 in total) in whom postoperative ctDNA correlation with surgery radicality was followed, and this study

Table 4 Comparison of circulating tumor DNA and standard detection methods

Number of recurrences	ctDNA	Imaging methods	CA19-9 and/or CEA markers
13	+	+	+
3	+	+	-
2	+	-	+
4	+	-	-

Plus and minus symbols indicate positive and negative results of screening for recurrence, respectively. CA 19-9: Carbohydrate antigen 19-9; CEA: Carcinoembryonic antigen; ctDNA: Circulating tumor DNA.

is also the first to report ctDNA correlation with R1 resection. In our group of patients who underwent R1 resections, more than half of them were postoperative ctDNA positive. Considering that in these patients, only a small number of tumor cells were present in the resection margin that they are unlikely to release their DNA into the bloodstream, ctDNA positivity could indicate that there are still other micrometastases not detected by imaging methods. This corresponds to significantly shorter times without recurrence (3, 3, 4 and 7 mo) compared to patients with negative postoperative ctDNA (7 and 22 mo). The presence of micrometastases was also probably recognized in two postoperative ctDNA-positive patients undergoing R0 resection, as their time to recurrence was also very short (6 mo both) when compared to patients with negative R0 postoperative ctDNA (14 times recurrence after 4-22 mo, 10 times no recurrence in surveillance 6-36 mo). Unlike other studies, postoperative ctDNA positivity was captured in all R2 resections (15/15, 100%) in our study, which may be due to the sensitivity of the used detection methods. Our DCE method provides the limit of detection (LOD) of 0.03%-1% (see Table 1), while the studies referred to above used the Temperature Gradient Gel Electrophoresis method with LOD 1%-5%^[28] and the Quantitative Polymerase Chain Reaction assay based on allele-specific PCR with LOD 1%-2%^[29].

Liver metastatic recurrence occurs in approximately 50% of patients undergoing hepatectomy, while 12% have a recurrence more than once. Considering that repeated hepatectomy combined with systemic therapy may improve overall survival of these patients^[30-32], efficient follow-ups for the early detection of recurrence is very important^[33].

Tumor markers are commonly used for follow-ups, but so far cannot be used alone to diagnose recurrence, and imaging methods sometimes do not recognize small foci (micrometastases) or, on the contrary, find abnormalities that are not cancer. Examination of ctDNA could be another tool used during follow-up. Our detection method enables high reliability testing (the false positive probability of ctDNA is 0%). In our 22 cases of postoperative tumor recurrence imaging methods and tumor marker results detected a recurrence in 16/22 (73%) and 15/22 (68%) cases, respectively, ctDNA was present in 22/22 (100%) cases. Our results are consistent with the findings of several similar studies that have been performed on a comparable or smaller number of samples^[24,26,34-36]. Therefore, we consider our set of 22 recurrences after curative (R0) surgical treatment recorded in our study as adequate to confirm utility of the ctDNA test as a viable tool for the early detection of mCRC recurrence.

Compared to our overall ctDNA detection rate in patients with advanced CRC at the time of the diagnosis (55%-75%), the detection rate in patients previously tested positive for ctDNA is much higher. This data indicates that although the ctDNA release rate into the bloodstream due to the presence of tumor foci differs in various patients with mCRC, for each given patient this phenomenon is relatively stable; thus if ctDNA is detectable in the body when tumor foci are present, it is highly probable that after their complete removal and subsequent recurrence, ctDNA will be detected again.

Although ctDNA detection cannot replace traditional methods used in the follow-up scheme, it might be a useful supplementary instrument for both the prediction and earlier detection of recurrences, particularly in patients with a higher risk of liver metastatic recurrence^[37], and thus it may actually improve the overall survival odds of such patients.

ARTICLE HIGHLIGHTS

Research background

Around 50% of patients with colorectal cancer (CRC) are found to have synchronous liver or

extrahepatic metastases at the time of diagnosis, or will develop metachronous metastases within several years after surgery. It is known that radical surgical resection, the R0 resection which involves a complete removal of the diseased tissue, is the only effective treatment option, ideally in combination with perioperative chemotherapy. Besides removal of colorectal cancer metastases, postoperative patient follow-up is no less important as it allows for the timely identification of any progression or recurrence of the disease and prompt therapeutical response. The monitoring of patients is predominantly based on imaging techniques, usually with assessments of serum tumor markers. One of the promising tools for long-term postoperative follow-up is the detection of circulating tumor DNA (ctDNA) in the peripheral blood. Sometimes referred to as a "liquid (re)biopsy" it is a minimally invasive procedure and can be performed repeatedly at relatively short intervals (months or even weeks). The presence of the disease and the actual extent of the tumor burden (tumor mass) within the patient's body can be monitored. This is of particular importance, especially when evaluating radicality of surgical treatment as well as for early detection of disease progression or recurrence.

Research motivation

Radicality of surgery is normally assessed using histological examination of a resected sample and based on the results of imaging methods. However, these examinations cannot indicate any potential presence of circulating tumor cells or microscopic metastases. Also, the main tools used for postoperative patient follow-up, imaging methods and tumor markers, are often not sufficient in early detection of disease progression or recurrence. Tumor markers have low specificity and sensitivity so that they cannot be used alone to diagnose recurrence. Imaging methods are known to fail to detect small foci (micrometastases) or, on the contrary, find abnormalities that are not cancer. Moreover, they cannot be performed frequently due to the radiation exposure. The recently introduced ctDNA testing could present a useful alternative tool. It has proven to be very promising for long-term, postoperative follow-ups of patients with CRC, particularly in advanced stages. Being minimally invasive, it can be repeated frequently for a long time with no significant burden to the patient, and moreover, this test shows high sensitivity and specificity to patients with preoperative ctDNA positivity.

Research objectives

The main objectives of the study were to confirm the radicality of surgery using ctDNA and to compare available methods for detection of recurrence in metastatic CRC (mCRC). It is important to verify whether ctDNA can be used in clinical practice, particularly for the evaluation of the radicality of surgery and for the timely detection of any progression or recurrence of the disease.

Research methods

A total of 47 patients with detected ctDNA and indications for resection of mCRC were enrolled in the multicenter study involving three surgical centers. Standard postoperative follow-ups using imaging techniques and the determination of tumor markers were supplemented by ctDNA sampling. In addition to the baseline ctDNA testing prior to surgery, a postoperative observation was conducted by evaluating ctDNA presence up to a week after surgery and subsequently at approximately three-month intervals. The presence of ctDNA was correlated with radicality of surgical treatment and the actual clinical status of the patient. To test ctDNA, we performed a sensitive, efficient, rapid and affordable method based on the formation of heteroduplexes with subsequent detection using denaturing capillary electrophoresis (DCE). This method can be used to detect a mutated locus in plasma with the sensitivity of 0.03% to 1% depending on the mutation to be determined with input DNA amount of tens of pg. The specificity of this ctDNA test is 100%, which means that the presence of ctDNA always provides evidence that a tumor residue or tumor cells are present. As previously shown by us, ctDNA testing using DCE allows a patient follow-up in real time, while ctDNA levels correlate very well with the current condition of the patient.

Research results

Among the monitored patients, the R0 (curative) resection correlated with postoperative ctDNA negativity in 26 out of 28 cases of surgical procedures (93%). In the remaining cases of R0 surgeries that displayed ctDNA, both patients were diagnosed with a recurrence of the disease after 6 mo. In 7 patients who underwent an R1 resection, 4 ctDNA positivities (57%) were detected after surgery and associated with the confirmation of early disease recurrence (after 3-7 mo). All 15 patients undergoing R2 resection remained constantly ctDNA positive during the entire follow-up period. In 22 cases of recurrence, ctDNA positivity was detected 22 times (100%) compared to 16 positives (73%) by imaging methods and 15 cases (68%) of elevated tumor markers.

Research conclusions

Although ctDNA detection cannot replace traditional methods used in the follow-up scheme, it might represent a useful supplementary instrument for both the prediction and earlier detection of recurrences, particularly in patients with a higher risk of liver metastatic recurrence, and thus it may actually improve the overall survival odds of such patients. And it has also been shown that the ctDNA test is a highly specific and sensitive tool for confirming the radicality of surgical treatment and for the potential prediction of early disease recurrence after R0/R1 surgeries.

Research perspectives

In this study, the high sensitivity of the methodology used to test ctDNA after curative mCRC

surgical treatment and also to detect recurrence of the disease was shown. However, to confirm this hypothesis, testing on a larger sample set is required. In particular, it is desirable to obtain a greater number of ctDNA positive and negative results after R1 resections that could be correlated with time to disease recurrence. Similarly, expanding the set of long-term follow-up patients using standard approaches supplemented with ctDNA sampling is warranted.

REFERENCES

- 1 **Alhumaid A**, AlYousef Z, Bakhsh HA, AlGhamdi S, Aziz MA. Emerging paradigms in the treatment of liver metastases in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; **132**: 39-50 [PMID: 30447926 DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.09.011]
 - 2 **Groot Koerkamp B**, Sadot E, Kemeny NE, Gönen M, Leal JN, Allen PJ, Cercek A, DeMatteo RP, Kingham TP, Jarnagin WR, D'Angelica MI. Perioperative Hepatic Arterial Infusion Pump Chemotherapy Is Associated With Longer Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases: A Propensity Score Analysis. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 1938-1944 [PMID: 28426374 DOI: 10.1200/JCO.2016.71.8346]
 - 3 **Aloia TA**, Vauthery JN, Loyer EM, Ribero D, Pawlik TM, Wei SH, Curley SA, Zorzi D, Abdalla EK. Solitary colorectal liver metastasis: resection determines outcome. *Arch Surg* 2006; **141**: 460-466; discussion 466-467 [PMID: 16702517 DOI: 10.1001/archsurg.141.5.460]
 - 4 **Pulitanò C**, Bodingbauer M, Aldrighetti L, de Jong MC, Castillo F, Schulick RD, Parks RW, Choti MA, Wigmore SJ, Gruenberger T, Pawlik TM. Liver resection for colorectal metastases in presence of extrahepatic disease: results from an international multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol* 2011; **18**: 1380-1388 [PMID: 21136180 DOI: 10.1245/s10434-010-1459-4]
 - 5 **Pfannschmidt J**, Dienemann H, Hoffmann H. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: a systematic review of published series. *Ann Thorac Surg* 2007; **84**: 324-338 [PMID: 17588454 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2007.02.093]
 - 6 **Schmoll HJ**, Stein A. Colorectal cancer in 2013: Towards improved drugs, combinations and patient selection. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; **11**: 79-80 [PMID: 24445520 DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.254]
 - 7 **Bachet JB**, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, Normand C, Gornet JM, Artru P, Louafi S, Bonnetain F, Thiriot-Bidault A, Baumgaertner I, Coriat R, Tougeron D, Lecomte T, Mary F, Aparicio T, Marthey L, Taly V, Blons H, Vernerey D, Laurent-Puig P. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGE0 RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018; **29**: 1211-1219 [PMID: 29438522 DOI: 10.1093/annonc/mdy061]
 - 8 **García-Foncillas J**, Tabernero J, Élez E, Aranda E, Benavides M, Camps C, Jantus-Lewintre E, López R, Muñelo-Romay L, Montagut C, Antón A, López G, Díaz-Rubio E, Rojo F, Vivancos A. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2018; **119**: 1464-1470 [PMID: 30467411 DOI: 10.1038/s41416-018-0293-5]
 - 9 **Bendich A**, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science* 1965; **148**: 374-376 [PMID: 14261529 DOI: 10.1126/science.148.3668.374]
 - 10 **Leon SA**, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; **37**: 646-650 [PMID: 837366]
 - 11 **Thierry AR**, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016; **35**: 347-376 [PMID: 27392603 DOI: 10.1007/s10555-016-9629-x]
 - 12 **Diaz LA**, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; **486**: 537-540 [PMID: 22722843 DOI: 10.1038/nature11219]
 - 13 **Bettgowda C**, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 224ra24 [PMID: 24553385 DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094]
 - 14 **Chaudhuri AA**, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, Azad TD, Khodadoust MS, Esfahani MS, Liu CL, Zhou L, Scherer F, Kurtz DM, Say C, Carter JN, Merriott DJ, Dudley JC, Binkley MS, Modlin L, Padda SK, Gensheimer MF, West RB, Shrager JB, Neal JW, Wakelee HA, Loo BW, Alizadeh AA, Diehn M. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov* 2017; **7**: 1394-1403 [PMID: 28899864 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0716]
 - 15 **Heitzer E**, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; **61**: 112-123 [PMID: 25388429 DOI: 10.1373/clinchem.2014.222679]
 - 16 **Benesova L**, Belsanova B, Suchanek S, Kopeckova M, Minarikova P, Lipska L, Levy M, Visokai V, Zavoral M, Minarik M. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal Biochem* 2013; **433**: 227-234 [PMID: 22750103 DOI: 10.1016/j.ab.2012.06.018]
 - 17 **Levy M**, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, Zavoral M, Minarik M. Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2012; **32**: 1621-1626 [PMID: 22593440]
 - 18 **Benesova L**, Belsanova B, Kramar F, Halkova T, Benes V, Minarik M. Application of denaturing capillary electrophoresis for the detection of prognostic mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and isocitrate dehydrogenase 2 genes in brain tumors. *J Sep Sci* 2018; **41**: 2819-2827 [PMID: 29791066 DOI: 10.1002/jssc.201701473]
 - 19 **Wittekind C**, Compton C, Quirke P, Nagtegaal I, Merkel S, Hermanek P, Sobin LH. A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status. *Cancer* 2009; **115**: 3483-3488 [PMID: 19536900 DOI: 10.1002/ncr.24320]
- Duffy MJ**. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; **38**: 225-262

- 20 [PMID: 11451209 DOI: 10.1080/20014091084218]
- 21 **Flamini E**, Mercatali L, Nanni O, Calistri D, Nunziatini R, Zoli W, Rosetti P, Gardini N, Lattuneddu A, Verdecchia GM, Amadori D. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 6985-6988 [PMID: 17145818 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1931]
- 22 **Carrato A**. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2008; **2**: S42-S46 [PMID: 19343149]
- 23 **Grávalos C**, García-Escobar I, García-Alfonso P, Cassinello J, Malón D, Carrato A. Adjuvant chemotherapy for stages II, III and IV of colon cancer. *Clin Transl Oncol* 2009; **11**: 526-533 [PMID: 19661027 DOI: 10.1007/s12094-009-0397-8]
- 24 **Schøler LV**, Reinert T, Ørntoft MW, Kassetoft CG, Árnadóttir SS, Vang S, Nordentoft I, Knudsen M, Lamy P, Andreasen D, Mortensen FV, Knudsen AR, Stribolt K, Sivesgaard K, Mouritzen P, Nielsen HJ, Laurberg S, Ørntoft TF, Andersen CL. Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; **23**: 5437-5445 [PMID: 28600478 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0510]
- 25 **Lindfors U**, Zetterquist H, Papadogiannakis N, Olivecrona H. Persistence of K-ras mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res* 2005; **25**: 657-661 [PMID: 15816642]
- 26 **Reinert T**, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, Lamy P, Kannerup AS, Mortensen FV, Stribolt K, Hamilton-Dutoit S, Nielsen HJ, Laurberg S, Pallisgaard N, Pedersen JS, Ørntoft TF, Andersen CL. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* 2016; **65**: 625-634 [PMID: 25654990 DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308859]
- 27 **Norčić G**, Jelenc F, Cerkovnik P, Stegel V, Novakovic S. Role of specific DNA mutations in the peripheral blood of colorectal cancer patients for the assessment of tumor stage and residual disease following tumor resection. *Oncol Lett* 2016; **12**: 3356-3362 [PMID: 27900004 DOI: 10.3892/ol.2016.5078]
- 28 **Ahnhudt C**, Muche JM, Dijkstra K, Sterry W, Lukowsky A. An approach to the sensitivity of temperature-gradient gel electrophoresis in the detection of clonally expanded T-cells in cutaneous T-cell lymphoma. *Electrophoresis* 2001; **22**: 33-38 [PMID: 11197175 DOI: 10.1002/1522-2683(200101)22:1<33::AID-ELPS33>3.0.CO;2-X]
- 29 **Rapisuwon S**, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J* 2016; **14**: 211-222 [PMID: 27358717 DOI: 10.1016/j.csbj.2016.05.004]
- 30 **Jones NB**, McNally ME, Malhotra L, Abdel-Misih S, Martin EW, Bloomston M, Schmidt CR. Repeat hepatectomy for metastatic colorectal cancer is safe but marginally effective. *Ann Surg Oncol* 2012; **19**: 2224-2229 [PMID: 22207046 DOI: 10.1245/s10434-011-2179-0]
- 31 **Lintoiu-Ursut B**, Tulin A, Constantinoiu S. Recurrence after hepatic resection in colorectal cancer liver metastasis -Review article-. *J Med Life* 2015; **8** Spec Issue: 12-14 [PMID: 26361505]
- 32 **Matsuoka H**, Morise Z, Tanaka C, Hayashi T, Ikeda Y, Maeda K, Masumori K, Koide Y, Katsuno H, Tanahashi Y, Nakajima S, Hanai T, Kato Y, Sugioka A, Uyama I. Repeat hepatectomy with systemic chemotherapy might improve survival of recurrent liver metastasis from colorectal cancer-a retrospective observational study. *World J Surg Oncol* 2019; **17**: 33 [PMID: 30770753 DOI: 10.1186/s12957-019-1575-y]
- 33 **Vera R**, Aparicio J, Carballo F, Esteva M, González-Flores E, Santianes J, Santolaya F, Fernández-Cebrián JM. Recommendations for follow-up of colorectal cancer survivors. *Clin Transl Oncol* 2019; **21**: 1302-1311 [PMID: 30762206 DOI: 10.1007/s12094-019-02059-1]
- 34 **Diehl F**, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; **14**: 985-990 [PMID: 18670422 DOI: 10.1038/nm.1789]
- 35 **Tie J**, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, Silliman N, Tacey M, Wong HL, Christie M, Kosmider S, Skinner I, Wong R, Steel M, Tran B, Desai J, Jones I, Haydon A, Hayes T, Price TJ, Strausberg RL, Diaz LA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 346ra92 [PMID: 27384348 DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219]
- 36 **Frattini M**, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, Sozzi G, Bertario L, Leo E, Pilotti S, Pierotti MA. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008; **263**: 170-181 [PMID: 18395974 DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.021]
- 37 **Hill CR**, Chagpar RB, Callender GG, Brown RE, Gilbert JE, Martin RC 2nd, McMasters KM, Scoggins CR. Recurrence following hepatectomy for metastatic colorectal cancer: development of a model that predicts patterns of recurrence and survival. *Ann Surg Oncol* 2012; **19**: 139-144 [PMID: 21751045 DOI: 10.1245/s10434-011-1921-y]

3.3 Publikace 3

Přítomnost somatické mutace v 7. exonu genu *TP53* v indexových kolorektálních lézích predikuje časný výskyt metachronního kolorektálního adenomu

Hálková T., Ptáčková R., Semyakina A., Suchánek Š., Traboulsi E., Ngo O., Hejzmanová K., Májek O., Bureš J., Zavoral M., Minárik M., Benešová L.

Úvod: Volba optimálního intervalu pro absolvování kontrolní kolonoskopie u pacientů s kolorektálními lézemi je stále aktuálním tématem. Běžnou praxí je pacienty během počáteční (indexové) kolonoskopie řadit buď do skupiny s vysokým nebo nízkým rizikem recidivy na základě charakteristik indexové léze (velikost, počet, typ, stupeň dysplázie). Vysoce rizikovní pacienti pak absolvují kontrolní kolonoskopii po třech letech, pacienti s nízkým rizikem recidivy po deseti letech. Navržené intervaly však nejsou ideální a v reálné klinické praxi nebývají dodržovány (ze strany pacientů i lékařů). Nejnověji se zdá, že při volbě vhodného intervalu pro kontrolní kolonoskopie, tedy při predikci rizika recidivy kolorektálních lézí, by měla být brána v potaz i intratumorová mutační heterogenita indexových lézí.

Metodika: U 120 pacientů po endoskopické terapii pokročilé kolorektální neoplázie velikosti ≥ 10 mm (indexová léze) jsme sledovali výskyt časných metachronních adenomů v rámci kontrol po jednom nebo dvou letech od indexové kolonoskopie. Testovali jsme, zda nález metachronního adenomu koreluje se stupněm mutační heterogenity indexové léze, či s nálezem konkrétní mutace. 143 indexových lézí rozdělených do parafinových bloků bylo rozkrájeno do vzorků o velikosti cca 5mm³ s cílem co nejpodrobněji zachytit intratumorovou mutační heterogenitu. Z každého vzorku byla izolována DNA, provedena detekce somatických mutací v jedenácti genových lokusech a určeno procentuální zastoupení mutovaných alel. Z těchto údajů byl určen stupeň mutační heterogenity indexové léze. Dále byla provedena statistická korelace rizika výskytu časného metachronního adenomu se stupněm mutační heterogenity indexové léze a s jejím mutačním profilem. Statistická analýza byla provedena pomocí analýzy přežití s následným srovnáním pomocí log-rank testu a multivariátního modelu adjustovaného na pohlaví a věk.

Výsledky: Přítomnost mutace v exonu 7 genu *TP53* v indexové lézi významně korelovala s časným výskytem metachronního adenomu (log-rank test $p = 0,003$, poměr rizik 2,73, 95% interval spolehlivosti 1,14-6,56). Další testované parametry nebyly statisticky významně spojeny s rizikem výskytu metachronních adenomů.

Závěr: Mutační profil indexových lézí může být potenciálním ukazatelem rizika recidivy kolorektálních lézí. V námi testovaném souboru byla přítomnost mutace v 7. exonu genu *TP53* v indexové lézi statisticky významným prediktorem vzniku časného metachronního adenomu.

Podíl disertantky na publikaci:

- 1) participace na designu studie z cca 60 %
- 2) 50% dozor nad klinickou i laboratorní částí studie, zajištění jejího správného průběhu, komunikace se spoluautory
- 3) cca 30% podíl na laboratorní části (izolace DNA, PCR s tvorbou heteroduplexů, denaturační kapilární elektroforéza)
- 4) 100% podíl na vyhodnocení a zpracování laboratorních a klinických dat
- 5) vytvoření tabulek a obrázků (100 %)
- 6) sepsání celého rukopisu (100 %)

Article

Somatic Mutations in Exon 7 of the *TP53* Gene in Index Colorectal Lesions Are Associated with the Early Occurrence of Metachronous Adenoma

Tereza Hálková¹, Renata Ptáčková¹, Anastasiya Semyakina¹, Štěpán Suchánek^{2,3,*}, Eva Traboulsi⁴, Ondřej Ngo⁵, Kateřina Hejčmanová⁵, Ondřej Májek⁵, Jan Bureš³, Miroslav Zavoral^{2,3}, Marek Minárik^{1,6,7} and Lucie Benešová¹

- ¹ Centre for Applied Genomics of Solid Tumors (CEGES), Genomac Research Institute, Drnovská 1112/60, 161 00 Prague, Czech Republic; thalkova@genomac.cz (T.H.); rptackova@genomac.cz (R.P.); asemyakina@genomac.cz (A.S.); mminarik@elphogene.cz (M.M.); lbenešova@genomac.cz (L.B.)
 - ² Department of Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital Prague, U Vojenské Nemocnice 1200, 169 02 Prague, Czech Republic; miroslav.zavoral@uvn.cz
 - ³ Department of Gastrointestinal Oncology, Military University Hospital Prague, U Vojenské Nemocnice 1200, 169 02 Prague, Czech Republic; bures.jan@uvn.cz
 - ⁴ Department of Pathology, Military University Hospital Prague, U Vojenské Nemocnice 1200, 169 02 Prague, Czech Republic; eva.traboulsi@uvn.cz
 - ⁵ Faculty of Medicine, Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Czech Republic; ngo@iba.muni.cz (O.N.); hejčmanova@iba.muni.cz (K.H.); majek@iba.muni.cz (O.M.)
 - ⁶ Elphogene, Drnovská 1112/60, 161 00 Prague, Czech Republic
 - ⁷ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 00 Prague, Czech Republic
- * Correspondence: stepan.suchanek@uvn.cz



Citation: Hálková, T.; Ptáčková, R.; Semyakina, A.; Suchánek, Š.; Traboulsi, E.; Ngo, O.; Hejčmanová, K.; Májek, O.; Bureš, J.; Zavoral, M.; et al. Somatic Mutations in Exon 7 of the *TP53* Gene in Index Colorectal Lesions Are Associated with the Early Occurrence of Metachronous Adenoma. *Cancers* **2022**, *14*, 2823. <https://doi.org/10.3390/cancers14122823>

Academic Editors: Luis Bujanda, Ajay Goel and Ane Etxart

Received: 19 April 2022
Accepted: 5 June 2022
Published: 7 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Identifying patients with an increased risk of early recurrence of colorectal lesions is still a problem. In our study, we focused on improving this identification by determining the mutation profile of index lesions. We found a statistically significant association between the mutation in exon 7 of the *TP53* gene in the index lesion and the risk of early metachronous adenoma.

Abstract: (1) Background: this prospective study was focused on detailed analysis of the mutation heterogeneity in colorectal lesions removed during baseline (index) colonoscopy to identify patients at high risk of early occurrence of metachronous adenomas. (2) Methods: a total of 120 patients after endoscopic therapy of advanced colorectal neoplasia size ≥ 10 mm (index lesion) with subsequent surveillance colonoscopy after 10–18 months were included. In total, 143 index lesions and 84 synchronous lesions in paraffin blocks were divided into up to 30 samples. In each of them, the detection of somatic mutations in 11 hot spot gene loci was performed. Statistical analysis to correlate the mutation profiles and the degree of heterogeneity of the lesions with the risk of metachronous adenoma occurrence was undertaken. (3) Results: mutation in exon 7 of the *TP53* gene found in the index lesion significantly correlated with the early occurrence of metachronous adenoma (log-rank test $p = 0.003$, hazard ratio 2.73, 95% confidence interval 1.14–6.56). We did not find an association between the risk of metachronous adenomas and other markers monitored. (4) Conclusions: the findings of this study could lead to an adjustment of existing recommendations for surveillance colonoscopies in a specific group of patients with mutations in exon 7 of the *TP53* gene in an index lesion, where a shortening of surveillance interval may be warranted.

Keywords: colorectal cancer; colorectal adenomas; colonoscopy; index lesion; synchronous lesion; metachronous lesion; tumor heterogeneity; *TP53*

1. Introduction

It is well known that the incidence and mortality of colorectal cancer (CRC) is rising worldwide. Predictions of incidence and mortality show a continuing increase between years 2020 and 2040 for colon cancer by 55% and 70%, respectively, and for rectal cancer by 50% and 66%, respectively [1]. An important tool for reducing the incidence of colorectal cancer is screening followed by removal of precancerous lesions during index or surveillance colonoscopies [2]. Although there are guidelines for surveillance intervals based on clinical and histopathological characteristics of the lesion that classify patients as high- or low-risk, they are not optimal and are difficult to follow in practice.

In general, short surveillance intervals lead to the exceedance of the capacity of the colonoscopic units, which is followed by a waiting time prolongation, a decrease in patients' compliance, and an increase in the healthcare cost. Therefore, the general trend is to extend surveillance colonoscopy intervals. On the contrary, longer intervals might increase the risk of developing more severe colorectal neoplasia. According to current European Society for Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) guidelines updated in 2020 [3], surveillance colonoscopy intervals are 10 years for patients with a low risk and 3 years for patients with a high risk of colorectal neoplasia development. The low-risk patients have been defined as those with 1–4 adenomas, size <10 mm with low-grade dysplasia (LGD), or any serrated lesion size <10 mm with no dysplasia. High risk has been defined as the presence of at least 1 adenoma sized ≥ 10 mm and/or with high-grade dysplasia (HGD), or ≥ 5 adenomas, or any serrated lesion sized ≥ 10 mm or with dysplasia. However, in addition to the classical morphological features used to estimate the risk of metachronous lesion recurrence, the presence of somatic mutations in the index lesions could be equally important. In recent years, research on colorectal cancer and its premalignant lesions has increasingly progressed towards determining the presence, localization, and spread of genetic changes, mainly somatic mutations, within the tumor [4–8]. Mutations characterize the individual intratumor clones, especially in terms of their origin, development in space and time, and interrelationships with the environment. Most importantly, from a clinical point of view, mutations also determine the various biological properties of tumors. They influence the response to various types of treatment and drug resistance [9,10], course of the disease, recurrence, and ability to form metastases [11,12]. While the occurrence of mutations in early and advanced CRC is well mapped, heterogeneity of mutation profiles in index lesions is much less studied.

The major aim of our current study was to map in detail the mutational heterogeneity of colorectal lesions detected by index colonoscopy to help better identify patients at higher risk of early recurrence of metachronous lesions.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

This study was focused on 120 patients with at least one colorectal lesion ≥ 10 mm removed during index colonoscopy and undergoing surveillance colonoscopy after 10–18 months. All colorectal adenomas were sporadic, not familial ones in all cases. The cohort of 120 patients included 74 men, and 46 females, aged from 34 to 75 years, mean of 61, median of 64 years.

Detailed clinical, endoscopic, histopathological, and laboratory data were collected from all patients, including gender, age at diagnosis, number, size, location, morphological type, and degree of lesion dysplasia according to valid WHO criteria (World Health Organization Classification of Tumors, 2010) and method and radicality of resection.

The study complied with the ethical standards of the World Medical Association's Declaration of Helsinki. All patients signed informed consent to provide their clinical data as well as biological samples for molecular analyses. The study was approved by the Ethics Committee of the Military University Hospital, Prague, Czech Republic (Protocol number 108/9-59/2016) and the study protocol was registered at ClinicalTrials.gov with ID: NCT03434925. For all data obtained, all personal identification information was

removed in compliance with the European Union Regulation 2016/679 (General Data Protection Regulation).

2.2. Index and Surveillance Colonoscopy

Index and surveillance colonoscopies were performed at the Department of Gastrointestinal Endoscopy, Military University Hospital. All lesions ≥ 10 mm (regardless of other histopathological characteristics) found during an index colonoscopy were considered as index lesions and removed in one piece using en-bloc resection (endoscopic polypectomy, endoscopic mucosal resection, or endoscopic submucosal dissection). Other lesions found during index colonoscopy were considered as synchronous lesions. Surveillance colonoscopy was performed 10–18 months after index colonoscopy. All adenomas found at surveillance colonoscopy were considered as metachronous adenomas.

2.3. Samples

Histopathological analysis was performed at the Department of Pathology, Military University Hospital. Each index lesion was vertically cut into 2–7 parts and after formalin fixation and paraffin-embedding photo documentation was performed. Other lesions (synchronous and metachronous) were treated with standard procedures. All formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks were provided to the molecular genetics laboratory.

2.4. Molecular-Genetic Analysis

All index lesions (each cut into 2–7 paraffin blocks) and synchronous lesions (each cut into 1–5 paraffin blocks) were provided for molecular heterogeneity analysis. In the case of index lesions, each paraffin block was further divided into smaller parts so that the total volume of the analyzed tissue sample corresponded to a maximum of 5 mm³ in order to capture intratumoral heterogeneity in as much detail as possible. Synchronous lesions were subjected to less thorough analysis—each paraffin block was divided into samples with a volume of about 20 mm³. DNA was extracted from each sample using a Gen Elute FFPE DNA Purification kit (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) according to the manufacturer's instructions.

DNA was subjected to mutation analysis using a panel of 11 target hot spot mutation regions according to the Catalogue of Somatic Mutation in Cancer, COSMIC [13]. Specifically, it was *APC* exon 15—the mutation cluster region (MCR), *TP53* exons 5–8, *KRAS* exon 2, *PIK3CA* exon 9, and *BRAF* exon 15. Details of the mutation assay were described previously [14]. The analysis was performed using the PCR-based method with heteroduplex formation followed by their separation by denaturing capillary electrophoresis (DCE) at an optimal temperature in ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) as described previously [15]. This technique allows highly sensitive detection of even a small number of mutated alleles in an excess of non-mutated alleles. The hetero-duplex analysis results were visualized using Gene Marker v2.4.2. From the resulting electropherogram, the percentage of individual mutated alleles was determined from the peak heights as shown earlier [15].

2.5. Detection of TP53 Mutations in Metachronous Adenomas

Similarly to synchronous lesions, metachronous adenomas were divided into samples with a volume of about 20 mm³ and mutation analysis of exons 5, 6, 7, and 8 of the *TP53* gene was performed in each sample using the same technique as described above.

2.6. Determination of the Degree of Heterogeneity

Based on the number and percentage of individual mutated alleles across all samples of each index lesion, the degree of heterogeneity of the index lesions was determined according to Table 1. The percentage difference in the mutated fractions was equal to the difference between the parts of the lesion with the lowest and highest percentage of the mutation. For example, if the *KRAS* mutation was present in three samples of a given index

lesion at 4%, 13.5%, and 18%, the difference in the mutated fractions was 14%. If 2 or more mutant clones were present in the lesion (2 or more different mutations were found), the clone with the highest percentage difference in mutated fractions was used to determine the degree of heterogeneity. Three degrees of mutation fraction differences were defined:

Table 1. Determination of the degree of heterogeneity in index lesions.

Degree of Heterogeneity	Number of Mutation Clones	Percentage Difference in Mutated Fractions
I	0 or 1	low
II	1	middle
III	1	high
	2	low
IV	2	middle/high
	3	low
V	3	middle/high
	>3	low/middle/high

Highest—lowest percentage < 35%	low difference
Highest—lowest percentage \geq 35% < 70%	medium difference
Highest—lowest percentage \geq 70%	high difference

2.7. Statistical Analysis

A statistical analysis to determine the correlation between the occurrence of metachronous adenomas and the mutation profile or degree of heterogeneity of index lesion(s) was performed on a group of patients with all available input variables. Statistical analysis of the relationship between the mutation profile of lesions removed during index colonoscopy and the incidence of metachronous adenomas was further extended to include synchronous lesions. Survival curves showing the occurrence of metachronous adenomas were estimated by the Kaplan–Meier method. Comparison of curves was conducted by the log-rank test and by the Cox proportional hazard model adjusted for age and sex to estimate the hazard ratio. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. The data were processed in the Stata/IC 14 software (StataCorp, College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Surveillance Colonoscopy Results

Of the 120 patients, 52 (43%) had no lesion on a surveillance colonoscopy. Of the remaining 68 patients, 15 (22%) had hyperplastic polyps and 53 (78%) adenomas (8 advanced and 45 non-advanced). The majority of adenomas (39; 74%) were diminutive adenomas, only 14 (26%) adenomas were larger than 5 mm. No colorectal cancer was detected.

3.2. Mutation Analyses of Index and Synchronous Lesions

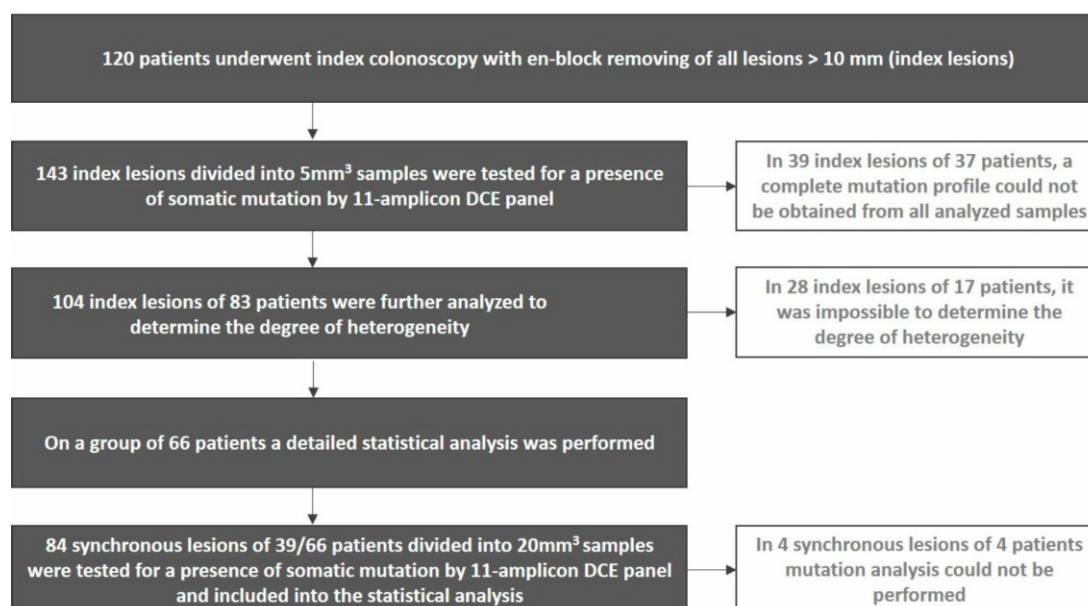
In a group of 120 patients 11 patients had more than 1 index lesion—4 patients had 2 lesions, 4 patients had 3 lesions, 1 patient had 4 lesions, and 2 patients had 5 lesions. Thus, a total of 143 index lesions (1325 samples) were analyzed. A complete mutation profile from all samples was obtained in 104 index lesions originating from 83 patients. The number of mutation clones in each lesion varied (see Table 2). Detailed results of mutation analysis of index lesions in all 83 patients and results of surveillance colonoscopy are shown in Supplementary Table S1.

Table 2. Numbers of mutational clones found in 104 index lesions and 80 synchronous lesions.

Number of Mutation Clones	Number of Index Lesions (%)	Number of Synchronous Lesions (%)
0	27 (26%)	44 (55%)
1	44 (42%)	30 (37.5%)
2	18 (17%)	6 (7.5%)
3	10 (10%)	0 (0%)
4	3 (3%)	0 (0%)
5	2 (2%)	0 (0%)

In 66 patients with 76 index lesions, the percentage of mutated fractions across all samples was successfully determined and allowed to determine the degree of heterogeneity within a given lesion. Thus, the lesions were classified into 5 degrees of heterogeneity with the following representation: grade I ($N = 29$; 38%), grade II ($N = 14$; 18%), grade III ($N = 5$; 7%), grade IV ($N = 15$; 20%), and grade V ($N = 13$; 17%). In the remaining 28 lesions of 17 patients, it was not possible to quantify the percentage of the mutated fractions in all samples and thus reliably determine the degree of heterogeneity.

In this group of 66 patients, 39 patients had synchronous lesions (a total of 84, divided into 117 samples). In 4 synchronous lesions of 4 patients, mutational analysis could not be performed due to DNA degradation. For more details, see the flow-diagram in Figure 1. The numbers of mutations found in the remaining 80 lesions are summarized in Table 2. No more than 2 mutations were found in any lesion.

**Figure 1.** Workflow scheme used for detailed characterization of index and synchronous colorectal lesions.

3.3. Statistical Analyses

In the same group of 66 patients, there were 36 patients with metachronous adenomas. A statistical analysis of the association between the occurrence of metachronous adenomas and the mutation profile of the index lesion as well as the degree of heterogeneity was performed. The relationship between the presence of a mutation in exon 7 of the *TP53* gene in the index lesion and the occurrence of metachronous adenomas proved to be statistically

significant ($p = 0.003$, log-rank test; hazard ratio 2.73, 95% confidence interval 1.14–6.56), see Figure 2.

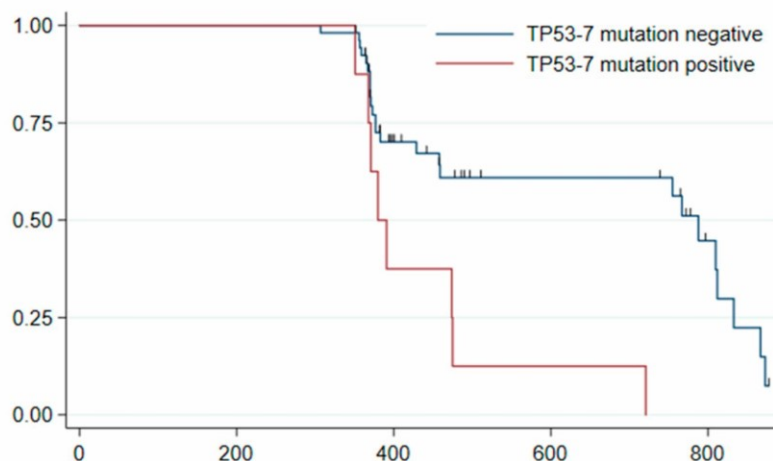


Figure 2. Mutations in exon 7 of the *TP53* gene found in the index lesion as a predictor of metachronous adenoma. Kaplan–Meier survival curves: observed event—detection of adenoma at surveillance colonoscopy in patients with versus without mutation in exon 7 of the *TP53* gene.

Mutations in exon 7 of the *TP53* gene were found in 8 index lesions of 8 patients, all of whom had metachronous adenomas. Interestingly, none of the metachronous adenomas in this group of patients had any *TP53* mutation. For more details see Table 3. Other tested variables including tumor suppressors, oncogenes, individual genes, gene loci (including other *TP53* exons), as well as the degree of heterogeneity of index lesions, were not shown to be statistically significant predictors of the risk of metachronous adenomas.

Statistical analysis of the correlation of the mutation profile and the incidence of metachronous adenomas was further performed on a set of all lesions found in 66 patients during index colonoscopy (index lesions + synchronous lesions). This analysis confirmed all the results of the original analysis. Since no mutation in exon 7 of the *TP53* gene was found in any synchronous lesion of any of the 66 patients, the statistically significant relationship between the mutation in exon 7 of the *TP53* gene present in the index lesion and the occurrence of metachronous adenoma was not modified.

Table 3. Characteristics of patients bearing mutation in exon 7 of the *TP53* gene in index lesion.

Patient ID/Gender	Number of Index Lesions	Mutations Found in Index Lesion(s)	Degree of Heterogeneity	Number of Synchronous Lesions	Mutations Found in Synchronous Lesion(s)	Interval to Surveillance Colonoscopy (Months)	Result of Surveillance Colonoscopy	<i>TP53</i> Mutations Found in Metachronous Adenoma(s)
11/M	1x hyperplastic polyp	<i>BRAF</i>	1	2	<i>BRAF</i>	18	1x sessile serrated lesion, no dysplasia 1x tubular adenoma, LGD	none
	1x hyperplastic polyp	<i>BRAF</i>	1					
	1x tubulovillous adenoma, predominantly LGD, in one section HGD	<i>TP53-ex7</i>	3					
	1x tubulovillous adenoma, LGD	<i>APC</i>	2					
39/M	1x sessile serrated lesion, no dysplasia	<i>TP53-ex7, TP53-ex8, TP53-ex5, BRAF, APC</i>	5	2	No mutation	12	1x tubular adenoma, LGD, 2x hyperplastic polyp	none
52/M	1x hyperplastic polyp, no dysplasia	<i>TP53-ex7, BRAF</i>	4	5	<i>APC</i>	15	2x tubular adenoma, LGD	none
58/M	1x tubular adenoma, LGD	none	1	2	No mutation	11	3x tubular adenoma, LGD, 1x tubular adenoma, predominantly LGD, sometimes HGD	none
	1x tubular adenoma, LGD	<i>TP53-ex7</i>	1					
74/M	1x sessile serrated lesion, no dysplasia	<i>TP53-ex7, TP53-ex8, TP53-ex5, BRAF</i>	5	3	<i>BRAF, APC</i>	12	3x tubular adenoma, LGD	none
86/M	1x tubulovillous adenoma, LGD	<i>TP53-ex7, TP53-ex8, TP53-ex5, KRAS</i>	5	3	<i>APC</i>	12	1x tubulovillous adenoma, LGD	none
126/F	1x tubulovillous adenoma, LGD	<i>TP53-ex7, TP53-ex8, APC</i>	5	3	<i>KRAS, BRAF</i>	12	2x tubular adenoma, LGD, 1x hyperplastic polyp	none
134/M	1x tubulovillous adenoma, LGD	<i>TP53-ex7</i>	not determined	3	No mutation	15	1x tubular adenoma, LGD	none

M = male; F = female; Ex = exon; LGD = low grade dysplasia; HGD = high grade dysplasia.

4. Discussion

The number of mutations in colorectal precancerous lesions has been shown to be the same, if not higher, than in carcinomas [16–18]. In addition, the frequency and distribution of mutations in precancerous lesions play an important role in their development into malignancy [19]. Therefore, there is the question of whether a detailed mutation profile of index lesions could help identify patients at high risk of lesion recurrence.

In this study, a detailed analysis of mutation heterogeneity by systematic sampling and genetic profiling of many areas of the same lesion was performed. The methodological approach used was unique in three aspects. First, all lesions ≥ 10 mm found during index colonoscopy were examined. Secondly, the index lesions were removed only by en-bloc resection; therefore, the specimen remained in one piece. This procedure is associated with a low to zero risk of local recurrence in the scar. Third, patients were followed with surveillance colonoscopy at a shorter interval than usual—from 10 to 18 months with focus on the presence of early metachronous adenomas.

The number of mutational clones found in the index lesions varied, but most often one (in 42% of the lesions), none (26%), or two (17%) mutation clones were found within one index lesion. The presence of mutation clones was as we expected lower in synchronous lesions—no mutation was detected in 55% of them, the remaining lesions had mostly 1 mutation (37.5%) and a maximum of 2 mutations (7.5%). This was due to the more advanced stage of index lesions compared to synchronous lesions.

Mutations were found in different parts of the lesion, in different numbers of parts of the lesion and in different percentages. For easier orientation in the mutational heterogeneity, a degree of heterogeneity was determined, which takes into account the “total mutation load”—i.e., the number of mutational clones and their percentage in different parts of the lesion. The higher the number of mutations and/or the greater the difference in the percentage of mutated alleles, the higher the degree of heterogeneity. Surprisingly, however, no statistical relationship was found between the degree of heterogeneity of an index lesion and the early onset of metachronous adenoma. This seems to depend on the presence of a particular mutation rather than on the “mutation load”.

As the results show, the mutation in exon 7 of the *TP53* gene is statistically related to the risk of metachronous adenoma, so patients harboring this mutation in index lesions likely have a higher risk of early metachronous adenoma occurrence. Adenoma was detected in all 8 of them during a surveillance colonoscopy. In this group of patients, we did not observe any noticeable differences from patients with other/no mutations in terms of a higher number/size/degree of dysplasia of the lesions in our study. In fact, all 8 patients with the *TP53* exon 7 mutation are very diverse in this respect, and apart from the occurrence of metachronous adenoma in a short time interval, we did not observe much in common. Thus, the mutation in exon 7 of the *TP53* gene itself seems to predispose individuals to the occurrence of metachronous adenoma but by what mechanism or manner remains unclear. For example, a mutation in exon 7 of the *TP53* gene could be caused by some kind of general molecular defect that affects the growth of metachronous lesions. Or, perhaps, there may be a link between a mutation in exon 7 of the *TP53* gene and the patient’s lifestyle, where the finding of this mutation as well as the occurrence of metachronous adenomas may be a manifestation of the same unhealthy behavior. Interestingly, mutations in other of the tested exons of the *TP53* gene, as well as mutations in the *TP53* gene in general, were not statistically significant predictors of the occurrence of metachronous adenoma.

We are aware of possible limits of our study. The question arises as to whether the adenomas found in surveillance colonoscopy in patients with the *TP53* exon 7 mutation in the index lesion were fast-growing metachronous lesions or interval lesions missed by index colonoscopy. In our cohort of 66 patients, such subsequent adenomas in one-year surveillance colonoscopy were found in 36 of them (54.5%), which is in agreement with another recently published study [20]. These adenomas were found in a different location than the index lesion, so they were not considered local residual neoplasia (LRN) in the post-resection scar. Moreover, none of the metachronous adenomas had the *TP53*

exon 7 mutation detected in the original index lesion. However, the question remains whether this mutation would not appear later in more advanced adenomas. Fully reliable, indisputable distinction between early metachronous lesions and possible interval sporadic colorectal neoplasia at a surveillance colonoscopy is difficult and demanding. To solve this issue, shorter interval between index and surveillance colonoscopy (1 year instead of 3 years recommended) were chosen. Diminutive polyps (<5 mm in size) are most probably early metachronous lesions. Advanced polyps (≥ 10 mm in size) might be interval lesions missed by index colonoscopy. We did not find any interval colorectal cancer. Another possible limit of our study is that we did not consider histopathology and left- and right-sided neoplasia, as the subgroups would be asymmetric in numbers of subjects for appropriate evaluation. It should further be emphasized that our analyses were performed with rather small sample sizes. Of the entire set of 104 index lesions and 80 synchronous lesions with complete mutation profiles, mutations in exon 7 of the *TP53* gene were found in only 8 index lesions of 8 patients. It is therefore necessary to take into account the possibility that a larger sample size could give different results.

The tumor suppressor gene *TP53* is the most frequently mutated gene across 12 major cancer types [21]. The product of the *TP53* gene, the p53 protein, is a cell stress-activated sequence-specific transcription factor that regulates gene expression in essential cellular processes [22]. The vast majority of *TP53* mutations occur in exons 5–8 in conserved regions of the DNA binding domain and lead to a formation of a stable mutant protein that loses its tumor suppressive activities, such as the induction of cell cycle arrest, apoptosis, senescence, or DNA repair. In addition, mutant proteins often acquire additional oncogenic functions that provide cells with benefits for growth, invasiveness, and survival [22–24].

Regarding colorectal cancer, previous works have shown that mutations in the *TP53* gene occur early in carcinogenesis and are associated with a transition from adenomas with low-grade dysplasia to high-grade dysplasia as well as with the transition from adenoma to carcinoma [25–27]. We confirmed this fact in our previous study, where we detected a mutation in the *TP53* gene more than three times more often in early and late carcinomas than in advanced adenomas [28]. It has also been suggested in the past that mutations in different regions of the *TP53* gene may have different effects on p53 protein function and therefore have different prognostic significance in colorectal cancer patients [29,30]. Patients with mutations in exon 5 appear to have a better prognosis than patients with mutations in exons 8 [30] or 7 [29]. However, we did not find any mention that individuals with a mutation in a particular exon were predisposed to a tumor relapse.

For colorectal precancerous lesions, to our knowledge, a study investigating the occurrence of *TP53* gene mutations in index lesions in relation to the incidence of metachronous lesions has not yet been performed and the results of this work are therefore unique. Similar results, but for mutations in the *KRAS* gene, were presented in a study by Juárez et al. [31]. However, we did not confirm the relationship between the presence of a mutation in the *KRAS* gene in the index lesion and the risk of metachronous adenomas in this study.

There is a retrospective study by Speroni et al. that describes the association of the p53 protein expression in colorectal adenomas with the risk of relapse or coexisting adenomas, but this study was performed in a different design to ours [32]. They used an immunohistochemical assay to detect the mutated protein p53, which is based on the fact that while wild-type p53 is present in healthy cells at low concentrations, mutant p53 proteins are often overexpressed and accumulated in the tumor cell nucleus [33,34]. This accumulation is due to an impaired ability to activate the expression of some target genes, e.g., *MDM2*, which mediates the degradation of p53 in proteasomes in the feedback loop [35]. During the Speroni study, the p53 protein accumulation due to *TP53* gene mutation in 100 FFPE samples of endoscopically resected sporadic colon adenomas from 79 patients was immunohistochemically determined and correlated with the occurrence of previous adenomas/carcinomas or coexisting adenomas. The data obtained clearly show that p53 protein expression is a risk factor in this regard, as 52.5% of patients with p53 expressing adenomas (regardless of the degree of dysplasia) had previous adenomas/carcinomas or coexisting adenomas.

However, a careful interpretation of the results is warranted, given that overexpression of nuclear p53 can sometimes occur without mutation and vice versa [36,37]. Nevertheless, we want to address the findings of Speroni's study in future research, which will focus on the detailed determination of mutational heterogeneity of metachronous lesions and its relationship to index and synchronous lesions. We also want to concentrate on explaining the specific location of risk mutations in exon 7 of the *TP53* gene (not in other exons), which has not yet been described in connection with colorectal adenoma/carcinoma and which may be related, for example, to a certain lifestyle of patients.

5. Conclusions

Our study utilizing extensive analysis of the mutational burden in colorectal index lesions found a statistically significant association between the mutation in exon 7 of the *TP53* gene and the risk of metachronous adenoma. The findings of our study could lead to an adjustment of existing recommendations for surveillance colonoscopies, possibly in patients with this specific mutation. In this group of patients, shortening the surveillance interval may be considered to decrease the risk of advanced neoplasia emerging after a prolonged follow-up time.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14122823/s1>, Table S1: Mutations found in index lesions and the occurrence of early metachronous adenoma.

Author Contributions: Conceptualization, L.B., R.P., T.H., Š.S., O.N. and O.M.; methodology, A.S., R.P., T.H., Š.S., E.T., K.H. and O.N.; design of clinical data collection, O.N. and O.M.; clinical data validation, Š.S., O.N., K.H. and O.M.; laboratory data analysis, R.P., L.B.; longitudinal data analysis, O.N., K.H. and O.M.; investigation, R.P., L.B., Š.S.; data curation, T.H., L.B., Š.S., E.T., K.H. and O.N.; writing—original draft preparation, T.H.; writing—review and editing, T.H., L.B., Š.S., O.N., K.H., O.M. and J.B.; supervision, L.B., M.M., Š.S., M.Z., J.B. and O.M.; project administration, R.P., A.S., T.H., E.T., K.H. and O.N.; funding acquisition, Š.S., M.M., O.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant Nr. 17-31909A.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Military University Hospital, Prague, Czech Republic (Protocol number 108/9-59/2016, date of approval 20 June 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Supplementary Table S1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

References

1. Ferlay, J.; Laversanne, M.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2020. Available online: <https://gco.iarc.fr/tomorrow> (accessed on 13 April 2022).
2. Brenner, H.; Chang-Claude, J.; Seiler, C.M.; Rickert, A.; Hoffmeister, M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: A population-based, case-control study. *Ann. Intern. Med.* **2011**, *154*, 22–30. [[CrossRef](#)]
3. Hassan, C.; Antonelli, G.; Dumonceau, J.M.; Regula, J.; Bretthauer, M.; Chaussade, S.; Dekker, E.; Ferlitsch, M.; Gimeno-Garcia, A.; Jover, R.; et al. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline-Update 2020. *Endoscopy* **2020**, *52*, 687–700. [[CrossRef](#)]
4. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **2012**, *487*, 330–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vaqué, J.P.; Martínez, N.; Varela, I.; Fernández, F.; Mayorga, M.; Derdak, S.; Beltrán, S.; Moreno, T.; Almaraz, C.; De Las Heras, G.; et al. Colorectal adenomas contain multiple somatic mutations that do not coincide with synchronous adenocarcinoma specimens. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119946.

6. Lee, S.H.; Jung, S.H.; Kim, T.M.; Rhee, J.K.; Park, H.C.; Kim, M.S.; Kim, S.S.; An, C.H.; Lee, S.H.; Chung, Y.J. Whole-exome sequencing identified mutational profiles of high-grade colon adenomas. *Oncotarget* **2017**, *8*, 6579–6588. [CrossRef] [PubMed]
7. Lin, S.H.; Raju, G.S.; Huff, C.; Ye, Y.; Gu, J.; Chen, J.S.; Hildebrandt, M.A.T.; Liang, H.; Menter, D.G.; Morris, J.; et al. The somatic mutation landscape of premalignant colorectal adenoma. *Gut* **2018**, *67*, 1299–1305. [CrossRef]
8. Lee, S.H.; Yoo, J.; Song, Y.S.; Lim, C.H.; Kim, T.M. Mutation analysis of colorectal and gastric carcinomas originating from adenomas: Insights into genomic evolution associated with malignant progression. *Cancers* **2020**, *12*, 325. [CrossRef] [PubMed]
9. Diaz, L.A., Jr.; Williams, R.T.; Wu, J.; Kinde, I.; Hecht, J.R.; Berlin, J.; Allen, B.; Bozic, I.; Reiter, J.G.; Nowak, M.A.; et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **2012**, *486*, 537–540. [CrossRef]
10. Misale, S.; Yaeger, R.; Hobor, S.; Scala, E.; Janakiraman, M.; Liska, D.; Valtorta, E.; Schiavo, R.; Buscarino, M.; Siravegna, G.; et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **2012**, *486*, 532–536. [CrossRef] [PubMed]
11. Yaeger, R.; Cowell, E.; Chou, J.F.; Gewirtz, A.N.; Borsu, L.; Vakiani, E.; Solit, D.B.; Rosen, N.; Capanu, M.; Ladanyi, M.; et al. RAS mutations affect pattern of metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer. *Cancer* **2015**, *121*, 1195–1203. [CrossRef]
12. Schweiger, T.; Liebmann-Reindl, S.; Glueck, O.; Starlinger, P.; Laengle, J.; Birner, P.; Klepetko, W.; Pils, D.; Streubel, B.; Hoetzenecker, K. Mutational profile of colorectal cancer lung metastases and paired primary tumors by targeted next generation sequencing: Implications on clinical outcome after surgery. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 6147–6157. [CrossRef]
13. COSMIC Database. Available online: <https://cancer.sanger.ac.uk> (accessed on 13 April 2022).
14. Benešová, L.; Hálková, T.; Ptáčková, R.; Semyakina, A.; Menclová, K.; Pudil, J.; Ryska, M.; Levý, M.; Šimša, J.; Pazdírek, F.; et al. Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 6939–6948. [CrossRef]
15. Benesova, L.; Belsanova, B.; Kramar, F.; Halkova, T.; Benes, V.; Minarik, M. Application of denaturing capillary electrophoresis for the detection of prognostic mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and isocitrate dehydrogenase 2 genes in brain tumors. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 2819–2827. [CrossRef]
16. Losi, L.; Baisse, B.; Bouzourene, H.; Benhattar, J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 916–922. [CrossRef] [PubMed]
17. Hershkovitz, D.; Simon, E.; Bick, T.; Prinz, E.; Noy, S.; Sabo, E.; Ben-Izhak, O.; Vieth, M. Adenoma and carcinoma components in colonic tumors show discordance for KRAS mutation. *Hum. Pathol.* **2014**, *45*, 1866–1871. [CrossRef]
18. Cappellesso, R.; Lo Mele, M.; Munari, G.; Rosa-Rizzotto, E.; Guido, E.; De Lazzari, F.; Pilati, P.; Tonello, M.; Farinati, F.; Realdon, S. Molecular characterization of “sessile serrated” adenoma to carcinoma transition in six early colorectal cancers. *Pathol. Res. Pract.* **2019**, *215*, 957–962. [CrossRef] [PubMed]
19. Harada, T.; Yamamoto, E.; Yamano, H.O.; Aoki, H.; Matsushita, H.O.; Yoshikawa, K.; Takagi, R.; Harada, E.; Tanaka, Y.; Yoshida, Y.; et al. Surface microstructures are associated with mutational intratumoral heterogeneity in colorectal tumors. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 1241–1252. [CrossRef] [PubMed]
20. Xi, X.; Fu, Z.; Liu, T.; Lin, Y.; Wu, W.; Li, J.; Luo, M.; Zhang, B. Establishment and Verification of Scoring System for Colorectal Adenoma Recurrence. *Risk Manag. Healthc. Policy* **2021**, *14*, 4545–4552. [CrossRef] [PubMed]
21. Kandoth, C.; McLellan, M.D.; Vandin, F.; Ye, K.; Niu, B.; Lu, C.; Xie, M.; Zhang, Q.; McMichael, J.F.; Wyczalkowski, M.A.; et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **2013**, *502*, 333–339. [CrossRef]
22. Robles, A.I.; Jen, J.; Harris, C.C. Clinical Outcomes of TP53 Mutations in Cancers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a026294. [CrossRef] [PubMed]
23. Rivlin, N.; Brosh, R.; Oren, M.; Rotter, V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 466–474. [CrossRef]
24. Nakayama, M.; Oshima, M. Mutant p53 in colon cancer. *J. Mol. Cell Biol.* **2019**, *11*, 267–276. [CrossRef]
25. Gafà, R.; Lanza, G. Espressione della proteina p53 nella sequenza adenoma-carcinoma del colon-retto [Expression of protein p53 in the adenoma-colorectal carcinoma sequence]. *Pathologica* **1998**, *90*, 351–356. (In Italian)
26. Saleh, H.A.; Aburashed, A.; Bober, P.; Tabaczka, P. P53 protein immunohistochemical expression in colonic adenomas with and without associated carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* **1998**, *93*, 980–984. [CrossRef]
27. Chang, P.Y.; Chen, J.S.; Chang, S.C.; Wang, M.C.; Chang, N.C.; Wen, Y.H.; Tsai, W.S.; Liu, W.H.; Liu, H.L.; Lu, J.J. Acquired somatic TP53 or PIK3CA mutations are potential predictors of when polyps evolve into colorectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 72352–72362. [CrossRef]
28. Minarikova, P.; Benesova, L.; Halkova, T.; Belsanova, B.; Suchanek, S.; Cyrany, J.; Tuckova, I.; Bures, J.; Zavoral, M.; Minarik, M. Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 4936–4945. [CrossRef]
29. Iniesta, P.; Vega, F.J.; Caldés, T.; Massa, M.; de Juan, C.; Cerdán, F.J.; Sánchez, A.; López, J.A.; Torres, A.J.; Balibrea, J.L.; et al. p53 exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett.* **1998**, *130*, 153–160. [CrossRef]
30. Vidaurreta, M.; Maestro, M.L.; Sanz-Casla, M.T.; Rafael, S.; Veganzones, S.; de la Orden, V.; Cerdán, J.; Arroyo, M.; Torres, A. Colorectal carcinoma prognosis can be predicted by alterations in gene p53 exons 5 and 8. *Int. J. Colorectal. Dis.* **2008**, *23*, 581–586. [CrossRef]

31. Juárez, M.; Egoavil, C.; Rodríguez-Soler, M.; Hernández-Illán, E.; Guarinos, C.; García-Martínez, A.; Alenda, C.; Giner-Calabuig, M.; Murcia, O.; Mangas, C.; et al. KRAS and BRAF somatic mutations in colonic polyps and the risk of metachronous neoplasia. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184937. [[CrossRef](#)]
32. Speroni, A.H.; Vanzulli, S.I.; Meiss, R.P. Adenomas of the colon: Overexpression of p53 protein and risk factors. *Endoscopy* **1998**, *30*, 623–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Remvikos, Y.; Laurent-Puig, P.; Salmon, R.J.; Frelat, G.; Dutrillaux, B.; Thomas, G. Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinomas by flow cytometry. *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 450–456. [[CrossRef](#)]
34. Rodrigues, N.R.; Rowan, A.; Smith, M.E.; Kerr, I.B.; Bodmer, W.F.; Gannon, J.V.; Lane, D.P. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7555–7559. [[CrossRef](#)]
35. Brazda, V.; Muller, P.; Brozkova, K.; Vojtesek, B. Restoring wild-type conformation and DNA-binding activity of mutant p53 is insufficient for restoration of transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351*, 499–506. [[CrossRef](#)]
36. Cripps, K.J.; Purdie, C.A.; Carder, P.J.; White, S.; Komine, K.; Bird, C.C.; Wyllie, A.H. A study of stabilisation of p53 protein versus point mutation in colorectal carcinoma. *Oncogene* **1994**, *9*, 2739–2743.
37. Dix, B.; Robbins, P.; Carrello, S.; House, A.; Iacopetta, B. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br. J. Cancer* **1994**, *70*, 585–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3.4 Publikace 4

Prognostická role mutací *KRAS* detekovaných v aspirační a tekuté biopsii pacientů s karcinomem pankreatu

Hálková T., Bunganič B., Traboulsi E., Minárik M., Zavoral M., Benešová L.

Úvod: Prognóza pacientů v pokročilých stádiích duktálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC) je obecně špatná, typicky se celkové přežití pacientů pohybuje v rozmezí dnů až měsíců od diagnózy. Existují však vzácné případy pacientů, kteří po zahájení léčby přežívají delší dobu. Molekulární markery, které by umožnily odhad prognózy pacientů s PDAC, by proto byly vítaným nástrojem pro racionální plánování terapie s ohledem na zachování co nejlepší kvality života pacienta. Potenciálními prognostickými markery jsou různé somatické mutace v protoonkogenu *KRAS*, které se celkově u PDAC vyskytují přibližně v 90 % případů.

Metodika: Do studie bylo zahrnuto 118 pacientů s PDAC ve stádiu II-IV, u kterých byla diagnóza potvrzena pomocí EUS-FNAB. DNA byla izolována z cytologických preparátů po standardním cytologickém zhodnocení z frakce nádorových buněk označené cytologem. CtDNA byla detekována ve vzorcích plazmy 45 pacientů ve IV. stádiu onemocnění, kteří byli ochotni poskytnout vzorek krve. Jednotlivé typy mutací *KRAS* v exonu 12 a 13 byly v obou typech vzorků detekovány denaturační kapilární elektroforézou, která je schopna odhalit až 0,03 % mutované *KRAS* frakce. Pro všechny nalezené typy mutací *KRAS* byly nakonec porovnány rozdíly v přežívání pacientů pomocí Kaplan-Meierových křivek.

Výsledky: Mutace *KRAS* byla detekována v 90 % vzorků tkáně (106/118) a ve 44 % vzorků plazmy (20/45). Všechny mutace byly lokalizovány v exonu 2, kodonu 12. Nejčastěji detekovanou mutací byla G12D (GGT>GAT) ve 44 % EUS-FNAB vzorků (47/106) a 65 % (13/20) ctDNA, následovaly další typy: G12V (GGT>GTT) v 31 % (33/106) EUS-FNAB a 10 % (2/20) ctDNA, G12R (GGT>CGT) v 17 % (18/106) EUS-FNAB a 10 % (2/20) ctDNA, G12C (GGT/TGT) v 5 % (5/106) EUS-FNAB a 0 % (0/20) ctDNA a G12S (GGT/AGT) v 1 % (1/106) EUS-FNAB a 5 % (1/20) ctDNA. Dva pacienti měli dvě mutace současně (G12V + G12S a G12D + G12S) v obou typech vzorků (2 %, 2/106 EUS-FNAB a 10 %, 2/20 ctDNA).

Při detekci z tkáňových vzorků byl medián přežití pacientů s G12D méně než poloviční ve srovnání s ostatními pacienty (101 dnů, 95% CI: 80-600 vs. 228 dnů, 95% CI: 184-602) se statisticky významným celkovým rozdílem v přežití ($P=0,0080$, long-rank test) a ve srovnání s pacienty se všemi ostatními typy mutací dohromady (101 dní, 95% CI: 80-600 vs. 210 dnů, 95% CI: 161-602, $P=0,0166$). Při stejné analýze z ctDNA byl medián přežití šestkrát nižší ve srovnání s pacienty bez mutace G12D (27 dnů, 95% CI: 8-334 vs. 161 dnů, 95% CI: 107-536, $P=0,0200$).

Pacienti s detekovanou mutací G12R v EUS-FNB přežívali téměř dvakrát déle než ostatní pacienti (286 dnů, 95% CI: 70-602 vs. 162 dnů, 95% CI: 122-600, $P=0,0374$) nebo pacienti s jinými mutacemi *KRAS* (286 dní, 95% CI: 70-602 vs. 137 dny, 95% CI: 107-600, $P=0,0257$).

Závěr: V analyzovaném souboru pacientů s PDAC v klinickém stádiu II-IV podstupujících chirurgickou, adjuvantní, paliativní i symptomatickou léčbu byly identifikovány mutace *KRAS* G12D a G12R, jejichž přítomnost v nádorové tkáni nebo ctDNA má negativní (G12D) či pozitivní (G12R) prognostickou roli. G12D se zdá být samostatným, na léčbě nezávislým, negativním prognostickým markerem, zatímco pozitivní účinek G12R je nejzřetelnější u pacientů podstupujících kurativní operaci. Studie byla designována s maximálním ohledem na proveditelnost daných genetických vyšetření v reálné klinické praxi (dostupnost vzorku, nízké personální, přístrojové i finanční nároky).

Podíl disertantky na publikaci:

- 1) participace na designu studie z cca 80 %
- 2) 100% dozor nad klinickou i laboratorní částí studie, zajištění jejího správného průběhu, komunikace se spoluautory
- 3) cca 80% podíl na laboratorní části (izolace DNA, ctDNA, PCR s tvorbou heteroduplexů, denaturační kapilární elektroforéza)
- 4) vyhodnocení a zpracování všech laboratorních a klinických dat (100 %)
- 5) vytvoření tabulek a obrázků (100 %)
- 6) sepsání celého rukopisu (100 %)

Article

Prognostic Role of Specific *KRAS* Mutations Detected in Aspiration and Liquid Biopsies from Patients with Pancreatic Cancer

Tereza Hálková^{1,2}, Bohuš Bunganič³, Eva Traboulsi⁴, Marek Minárik⁵ , Miroslav Zavoral³ and Lucie Benešová^{1,*}

¹ Centre for Applied Genomics of Solid Tumors (CEGES), Genomac Research Institute, Drnovská 1112/60, 161 00 Prague, Czech Republic

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8/2030, 128 00 Prague, Czech Republic

³ Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital, U Vojenské Nemocnice 1200, 169 02 Prague, Czech Republic

⁴ Department of Pathology, Military University Hospital Prague, U Vojenské Nemocnice 1200, 169 02 Prague, Czech Republic

⁵ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8/2030, 128 00 Prague, Czech Republic; mminarik@email.com

* Correspondence: lbenesova@genomac.cz

Abstract: Background/Objectives: Although the overall survival prognosis of patients in advanced stages of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is poor, typically ranging from days to months from diagnosis, there are rare cases of patients remaining in therapy for longer periods of time. Early estimations of survival prognosis would allow rational decisions on complex therapy interventions, including radical surgery and robust systemic therapy regimens. Understandably, there is great interest in finding prognostic markers that can be used for patient stratification. We determined the role of various *KRAS* mutations in the prognosis of PDAC patients using biopsy samples and circulating tumor DNA. **Methods:** A total of 118 patients with PDAC, clinically confirmed by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNB), were included in the study. DNA was extracted from cytological slides following a standard cytology evaluation to ensure adequacy (viability and quantity) and to mark the tumor cell fraction. Circulating tumor DNA (ctDNA) was extracted from plasma samples of 45 patients in stage IV of the disease. *KRAS* mutations in exons 12 and 13 were detected by denaturing capillary electrophoresis (DCE), revealing a minute presence of mutation-specific heteroduplexes. Kaplan–Meier survival curves were calculated for individual *KRAS* mutation types. **Results:** *KRAS* mutations were detected in 90% of tissue (106/118) and 44% of plasma (20/45) samples. All mutations were localized at exon 2, codon 12, with G12D (GGT > GAT) being the most frequent at 44% (47/106) and 65% (13/20), followed by other types including G12V (GGT > GTT) at 31% (33/106) and 10% (2/20), G12R (GGT > CGT) at 17% (18/106) and 10% (2/20), G12C (GGT/TGT) at 5% (5/106) and 0% (0/20) and G12S (GGT/AGT) at 1% (1/106) and 5% (1/20) in tissue and plasma samples, respectively. Two patients had two mutations simultaneously (G12V + G12S and G12D + G12S) in both types of samples (2%, 2/106 and 10%, 2/20 in tissue and plasma samples, respectively). The median survival of patients with the G12D mutation in tissues was less than half that of other patients (median survival 101 days, 95% CI: 80–600 vs. 228 days, 95% CI: 184–602), with a statistically significant overall difference in survival ($p = 0.0080$, log-rank test), and furthermore it was less than that of all combined patients with other mutation types (101 days, 95% CI: 80–600 vs. 210 days, 95% CI: 161–602, $p = 0.0166$). For plasma samples, the survival of patients with this mutation was six times shorter than that of patients without the G12D mutation (27 days, 95% CI: 8–334 vs. 161 days, 95% CI: 107–536, $p = 0.0200$). In contrast, patients with detected *KRAS* G12R in the tissue survived nearly twice as long as other patients in the aggregate (286 days, 95% CI: 70–602 vs. 162 days, 95% CI: 122–600, $p = 0.0374$) or patients with other *KRAS* mutations (286 days, 95% CI: 70–602 vs. 137 days, 95% CI: 107–600, $p = 0.0257$). **Conclusions:** Differentiation of specific *KRAS* mutations in EUS-FNB and ctDNA (above all, the



Citation: Hálková, T.; Bunganič, B.; Traboulsi, E.; Minárik, M.; Zavoral, M.; Benešová, L. Prognostic Role of Specific *KRAS* Mutations Detected in Aspiration and Liquid Biopsies from Patients with Pancreatic Cancer. *Genes* **2024**, *15*, 1302. <https://doi.org/10.3390/genes15101302>

Academic Editor: Stefania Bortoluzzi

Received: 20 August 2024

Revised: 28 September 2024

Accepted: 3 October 2024

Published: 7 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

crucial G12D and G12R) is feasible in routine management of PDAC patients and imperative for assessment of prognosis.

Keywords: *KRAS*; mutation type; prognosis; EUS-FNB; ctDNA; liquid biopsy; pancreatic cancer

1. Introduction

Pancreatic carcinoma, particularly the most common subtype, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), is one of the most fatal malignancies. It is the 12th most common cancer worldwide, with the highest incidence and mortality rates in advanced countries [1]. The insidious nature of PDAC consists predominantly of the absence or nonspecificity of its symptoms, resulting in late diagnosis, usually in an inoperable stage of the disease. Most patients are diagnosed with metastatic disease (stage IV) [2], when the disease progression is very rapid, with survival time typically being less than 5 months from diagnosis. Only in a minority of cases is the disease diagnosed when the tumor is surgically resectable, which, at present provides the only chance for a cure. Even if the tumor is removed completely and has not spread to any lymph nodes, the five-year survival does not exceed 40% [3].

As PDAC patients often exhibit a poor performance status and the effect of treatment is negligible, systemic therapy should be carefully considered with regard to the quality of life, especially for unresectable tumors. On the other hand, individual cases of patients with significantly longer overall survival do exist (based on our experience, about 2% of patients in stage IV survive for more than 1.5 years), and these patients benefit from surgical or systemic therapy. However, no reliable prognostic biomarkers are currently available to estimate the prognosis of patients with PDAC, and their discovery is therefore highly desirable.

From a genetic point of view, the carcinogenesis of PDAC is usually triggered by a mutation in the *KRAS* gene, which is an early and characteristic genetic event in PDAC [4]. *KRAS* is a proto-oncogene encoding a small G-protein, Kras, which is localized in the inner surface of the plasma membrane and transmits signals regulating cell growth, proliferation and survival, from the cell surface receptor into the nucleus [5]. Ras proteins cycle between GTP-bound active and GDP-bound inactive states. Ras activation (exchange of GDP for GTP) is initiated by guanine exchange factors (GEFs). Depending on the specific GEF protein, activated Ras initiates RAS/RAF/MAPK, RAS/PI3K/PDK1/AKT or RAS/RAL signal transduction pathway. Under physiological conditions, Ras is again inactivated in a short time by the hydrolysis of GTP [5–8]. However, *KRAS* mutations make the hydrolysis of GTP-bound Ras impossible, leading to permanent activity of the Ras oncoprotein, which subsequently interacts with various effectors. Thus, its role in affected cells becomes much more complex than the role of Ras protein in healthy cells [9].

Due to its frequent occurrence in PDAC tissue samples (about 90%), the prognostic value of *KRAS* mutation status has traditionally been discussed. In previous studies, we presented routine assessments of *KRAS* mutations in cytological smears of bioptic PDAC samples [10–12], and, in agreement with investigators from other groups [13–17], we have not observed any correlation between the presence or absence of *KRAS* mutation and survival [11]. There is one older meta-analysis of 17 *KRAS* studies in PDAC [18] whose results report significantly shorter overall survival (OS) for patients harboring *KRAS* mutations compared to those without them. Although this work has certain limitations, in particular the low number of patients (10 studies included fewer than 80 patients) and the low detection of *KRAS* mutations (11 studies reported less than 70% detection of *KRAS* mutations), it still contains several important works suggesting that *KRAS* mutations certainly play some role in the prognosis of PDAC patients, but the question is to what extent they are involved and how.

For example, as shown in a study performed in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, not all activating *KRAS* mutations are clinically equivalent because various

forms of Ras oncoproteins exhibit different types of biological behavior, have different effects on downstream signaling pathways and thus may also have different effects on patient prognosis [19]. More specifically, Kras G12D activates PI3K and MAPK signaling, whereas the presence of Kras G12C or Kras G12V activates RAL signaling and reduces growth-factor-dependent AKT activation. Depending on the specific *KRAS* mutation in the tumor tissue, differences in progression free survival (PFS) were observed in the same study. NSCLC patients with *KRAS* G12C and G12V had worse PFS than patients with other *KRAS* mutations or wild-type *KRAS* [19]. However, as demonstrated in a study by Eser et al., activation of downstream signaling molecules is not only allele-specific but also tissue-specific. It has been shown that the Pdk1 effector from the PI3K pathway is essential for *KRAS* G12D-driven PDAC but not for G12D-driven lung cancer [20]. It is therefore possible that the role of individual *KRAS* mutations in downstream signaling may differ between NSCLC and PDAC. Nevertheless, emerging scientific work supports the assumption of different impacts of specific *KRAS* mutations on prognosis even in PDAC patients [15,21,22].

In addition to tissue samples, circulating tumor DNA (ctDNA) is often studied in PDAC patients. It is short, fragmented DNA released from the tumor mass into the bloodstream of cancer patients. Due to its exclusive origin in cancerous cells, ctDNA harbors cancer-specific aberrations, such as somatic mutations [23]. Therefore, the presence of a *KRAS* mutation in the plasma indicates the presence of ctDNA. As ctDNA-positive patients with various types of solid tumors, including PDAC, have worse prognosis than ctDNA-negative patients [24,25], the presence of a *KRAS* mutation in ctDNA is also usually related to a worse prognosis.

The incidence of ctDNA in plasma correlates with the stage of the disease, and typically, it is most common in patients with metastatic disease (stage IV) [26]. Undoubtedly, the most important advantage of ctDNA testing is non-invasive sampling, allowing for *KRAS* testing without a biopsy-associated burden on the patient. Another advantage is that a single plasma sample contains all the mutated alleles present in the tumor tissue. This does not apply to endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNB) samples, in which the collected tissue is only a minimal part of the tumor tissue and is, moreover, inhomogeneous and pervaded with fibers, giving a highly heterogeneous representation of the mutated cells. Although ctDNA testing is not as sensitive as the determination of *KRAS* mutations from a tissue sample, it may be a useful tool in PDAC cases where the tissue biopsy is contraindicated or when repeated sampling is required.

In the current work, we therefore verified the prognostic role of individual *KRAS* mutations in our cohort of 118 PDAC patients and assessed whether individual *KRAS* mutations could serve as useful prognostic markers for managing disease and guiding rational treatment decisions that would ensure the longest survival with an adequate quality of life. In addition, we introduced in a subgroup of 45 patients a simple and low-cost method for *KRAS* mutation detection from ctDNA as a source material, including the determination of mutation subtypes.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Samples

A total of 118 patients aged 67.9 ± 9.4 years were prospectively enrolled in the study. Diagnosis of PDAC was based on EUS with an FNB collection and subsequent cytological assessment of the aspirate.

A tissue biopsy sample was obtained from each of the 118 patients at the time of diagnosis, and additionally, a blood sample for ctDNA analysis was collected from every patient in stage IV of the disease who agreed to the collection (45/58) at the time of diagnosis before initiation of any treatment. All patients signed the study's informed consent form, and the study protocol was approved by the ethics committee of the Military University Hospital in Prague.

EUS was performed using a GF UCT 180 linear echoendoscope (Olympus, Tokyo, Japan) and a sonographic system (Aloka Pro Sound Alpha 10, Tokyo, Japan). Tumor FNBs were collected using standard 22-gauge needles (EZ Shot 2, Olympus, Tokyo, Japan) and Expect needles (Boston Scientific, Natick, MA, USA), intended for standard cytological assessments. The cellular material was spread on cytological slides on-site, and dry cytological smears were examined by the pathologist after being stained using the May–Grünwald–Giemsa technique. Furthermore, the pathologist highlighted areas with a major incidence of tumor cells (approx. 80%) on the slides.

Plasma was separated by centrifugation from the blood samples immediately after collection and was then frozen to $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Nucleic Acid Extraction and Detection of KRAS Mutations

Tumor cells were dissected from the cytological preparations from areas with major incidences of tumor cells and transferred to a microtube. DNA was extracted using a Recover All Total Nucleic Acid isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions but specifically leaving out the first step of isolation (deparaffinization). ctDNA was isolated from the plasma samples using a NucleoSpin Plasma XS kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Somatic mutations in *KRAS* exons 12 and 13 were detected using the PCR method followed by the formation of heteroduplexes and subsequent heteroduplex analysis using capillary gel electrophoresis at an optimal temperature using the ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), as in previous studies [10–12]. Details can be found in Supplementary Materials and Methods. The heteroduplex analysis results were visualized using Gene Marker v2.4.2, and individual types of *KRAS* mutations were identified by comparing them to standard DNAs with specific mutant alleles (see Figure 1).

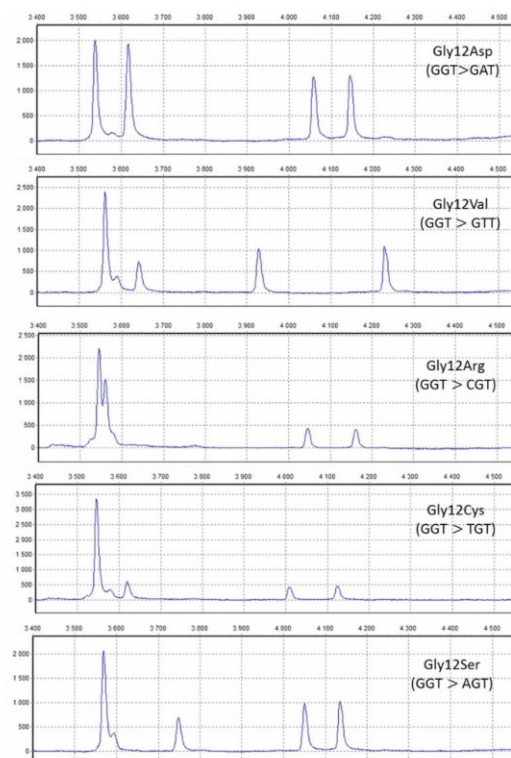


Figure 1. If a mutation is present in the sample (in this case *KRAS* mutation), four peaks are visible in the electropherogram: wildtype homoduplex, mutant homoduplex and two heteroduplexes (from left

to right). The figure illustrates electropherograms of standard samples with the most commonly detected *KRAS* mutations in PDAC tissues. Note that different *KRAS* mutations have different positions of peaks in the electroferogram. If no mutation is present in the sample, only one peak corresponding to the wildtype homoduplex is visible in the electroferogram.

2.3. Statistical Analysis

The mean age of the patients was calculated using the mean and standard deviation. Survival curves were constructed using the Kaplan–Meier method and described by the median survival and its 95% CI for all patient groups tested. Comparison of survival curves was conducted using the log-rank test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. The software MedCalc v 19.1.7 was used for statistical analysis.

3. Results

Basic patient characteristics are summarized in Table 1.

Table 1. Characteristics of studied group of patients.

Monitored Characteristic	Number of Patients	
All cases	118 (100%)	
Age	67.9 ± 9.4	
Gender	Male	64 (54%)
	Aged	44–92 years, median 69
	Female	54 (46%)
Location of PDAC	Aged	44–87 years, median 66
	Head	81 (69%)
	Body	28 (24%)
Disease stage	Tail	9 (8%)
	II	3 (3%)
	III	56 (47%)
	IV	58 (49%)
	Unknown	1 (1%)
Treatment	Surgery + adjuvant chemotherapy	16 (14%)
	Surgery alone	11 (9%)
	Chemotherapy alone	44 (37%)
	Supportive care	44 (37%)
	Unknown	3 (3%)

KRAS mutations were detected in 90% (106/118) of tissue samples and in 44% (20/45) of plasma samples. All mutations were found in exon 2, codon 12 (see Table 2).

Table 2. *KRAS* mutation tumor tissue and plasma samples.

Result of <i>KRAS</i> Analysis	Tissue Sample (<i>n</i> = 118)	Plasma Sample (<i>n</i> = 45)
<i>KRAS</i> wild type	12/118 (10%)	25/45 (56%)
<i>KRAS</i> mutant	106/118 (90%)	20/45 (44%)
GGT/GAT (G12D)	47/106 (44%)	13/20 (65%)
GGT/GTT (G12V)	33/106 (31%)	2/20 (10%)

Table 2. Cont.

Result of KRAS Analysis	Tissue Sample (n = 118)	Plasma Sample (n = 45)
GGT/CGT (G12R)	18/106 (17%)	2/20 (10%)
GGT/TGT (G12C)	5/106 (5%)	0
GGT/AGT (G12S)	1/106 (1%)	1/20 (5%)
GGT/GTT (G12V) + GGT/AGT (G12S)	1/106 (1%)	1/20 (5%)
GGT/GAT (G12D) + GGT/AGT (G12S)	1/106 (1%)	1/20 (5%)

3.1. Tumor Tissue Samples

In patients with known survival time ($n = 116$), the OS of patients with detected *KRAS* mutations ($n = 106$) was compared to that of patients with no such mutations ($n = 10$). To ensure the homogeneity of the group, individuals with two *KRAS* mutations ($n = 2$, OS 155 and 186 days) and one patient who was additionally diagnosed with a second type of cancer (rectal cancer, OS 122 days) were excluded. Comparing the OS of patients with and without *KRAS* mutation in tumor tissue, no statistically significant difference was achieved (median OS 184 days, 95% CI: 31–474 vs. 296 days, 95% CI: 31–474, $p = 0.3251$, Figure 2a).

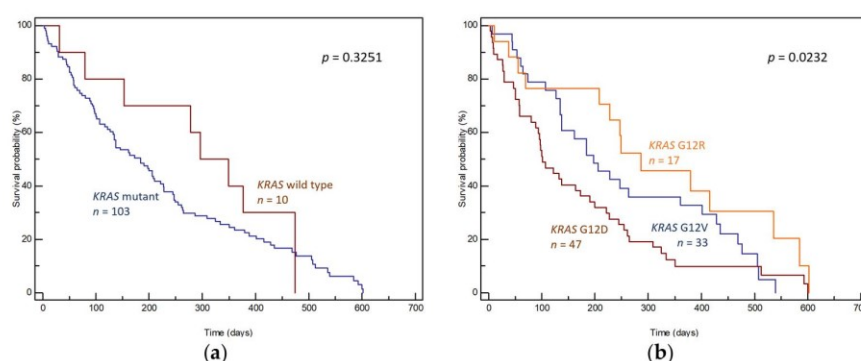


Figure 2. Overall survival curves (a) according to the presence of *KRAS* mutations in tumor tissue and (b) according to the presence of the three most common *KRAS* mutation subtypes in tumor tissue.

However, the overall survival of patients varied significantly depending on the specific type of *KRAS* mutation. The median OS times of patients with the three most common *KRAS* mutations, namely, G12D, G12V and G12R, were 101 days (95% CI: 80–600), 198 days (95% CI: 134–540) and 286 days (95% CI: 70–602), respectively, $p = 0.0232$ (Figure 2b).

The effects of individual mutations on prognoses were determined by comparing the OS of patients with the given mutation and patients without the given mutation (wild-type *KRAS* + other *KRAS* mutations; Figures 3a, 4a and 5a) and by comparing the OS of patients with the given mutation and patients with other *KRAS* mutations (Figures 3b, 4b and 5b).

Regarding the effect of the individual *KRAS* mutations, the G12D mutation was found to correlate significantly with a worse prognosis. This was apparent in comparisons with both the group lacking *KRAS* G12D (median OS 101 days, 95% CI: 80–600 vs. 228 days, 95% CI 184–602, $p = 0.0080$, Figure 3a) and the group with other *KRAS* mutations (median OS 101 days, 95% CI: 80–600 vs. 210 days, 95% CI: 161–602, $p = 0.0166$, Figure 3b). In addition, the prognosis of patients harboring *KRAS* G12D was significantly worse than that of other participants regardless of whether patients underwent radical surgery (Supplementary Figure S1a, $p = 0.0075$) or not (Supplementary Figure S1b, $p = 0.0113$).

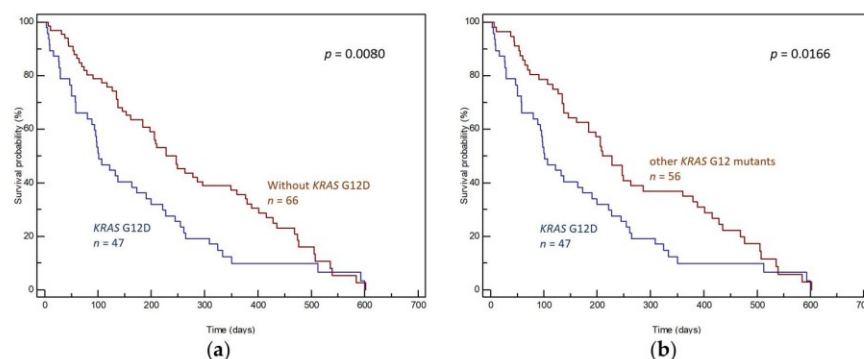


Figure 3. Differences in OS of (a) patients with and without *KRAS* G12D in tumor tissue and (b) patients with *KRAS* G12D and patients with other *KRAS* mutations in tumor tissue.

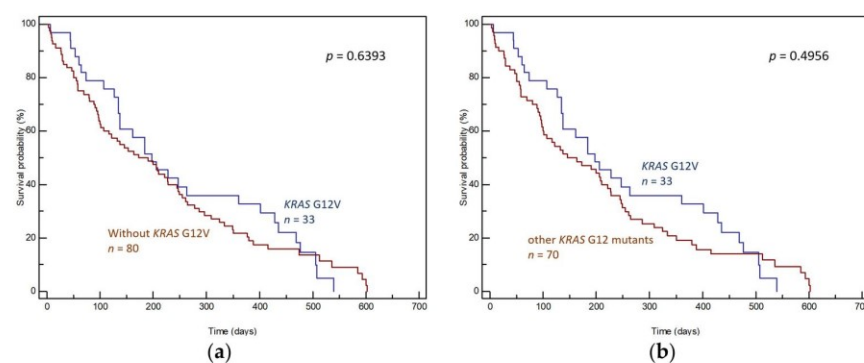


Figure 4. Differences in OS of (a) patients with and without *KRAS* G12V in tumor tissue and (b) patients with *KRAS* G12V and patients with other *KRAS* mutations in tumor tissue.

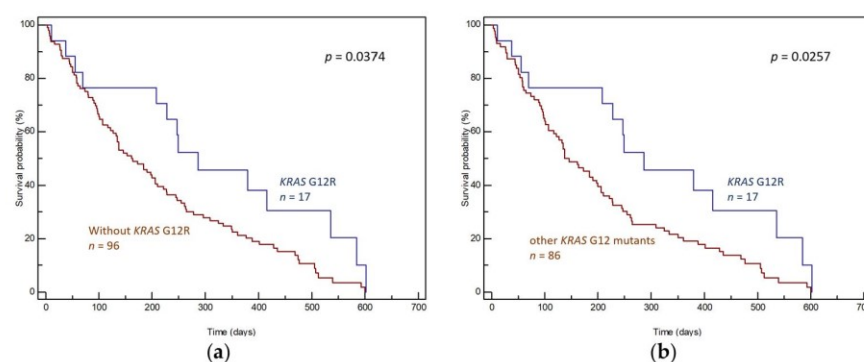


Figure 5. Differences in OS of (a) patients with and without *KRAS* G12R in tumor tissue and (b) patients with *KRAS* G12R and patients with other *KRAS* mutations in tumor tissue.

The G12V mutation did not correlate with prognosis, whether compared to all patients without this mutation (median OS 198 days, 95% CI: 134–540 vs. 173 days, 95% CI: 101–602, $p = 0.6393$, Figure 4a) or compared to patients with other *KRAS* mutations (median OS 198 days, 95% CI: 134–540 vs. 146 days, 95% CI: 98–602, $p = 0.4956$, Figure 4b).

In contrast, the G12R mutation correlated with better prognosis. Patients with G12R had significantly longer median OS than patients without G12R (median OS 286 days, 95% CI: 70–602 vs. 162 days, 95% CI: 122–600, $p = 0.0374$, Figure 5a) or patients with other *KRAS* mutations (median OS 286 days, 95% CI: 70–602 vs. 137 days, 95% CI: 107–600, $p = 0.0257$,

Figure 5b). The positive effect of G12R on survival was also significant in patients treated with radical surgery (Supplementary Figure S2a, $p = 0.0408$); however, it was suppressed in the subset of patients who did not undergo surgery (Supplementary Figure S2b, $p = 0.3090$).

3.2. ctDNA Samples

Patient survival was compared based on the presence or absence of *KRAS* mutations in plasma samples. In general, the presence of a *KRAS* mutation in ctDNA had no significant effect on patient survival (median OS 74 days, 95% CI: 17–536 vs. 184 days, 95% CI: 94–228, $p = 0.2715$, Figure 6).

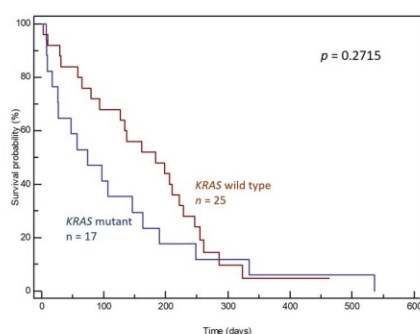


Figure 6. Overall survival curves according to the presence of *KRAS* mutations in ctDNA.

Additionally, the effect of the most commonly detected mutation, G12D, on OS was assessed. Patients with a detected G12D mutation had a significantly shorter median survival rate than other patients (median OS 27 days, 95% CI: 8–334 vs. 161 days, 95% CI: 107–536, $p = 0.0200$, Figure 7a), and a similar trend was evident when compared to patients with other *KRAS* mutations, although this trend lacked statistical significance (median OS 27 days, 95% CI: 8–334 vs. 146 days, 95% CI: 74–536, $p = 0.1151$, Figure 7b). No other analyses were performed, given the low number of ctDNA samples.

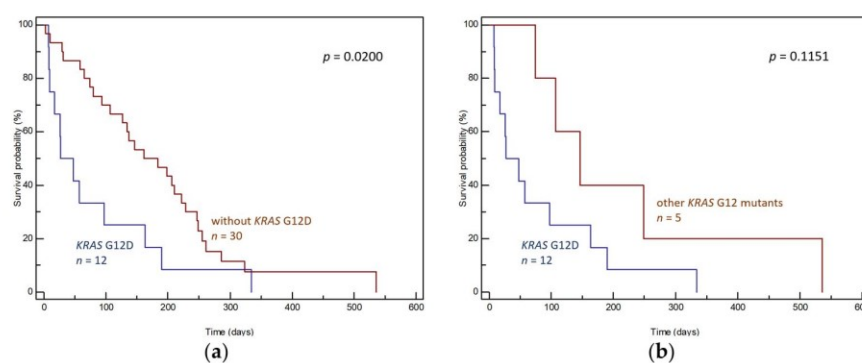


Figure 7. Differences in OS of (a) patients with and without *KRAS* G12D in ctDNA and (b) patients with *KRAS* G12D and patients with other *KRAS* mutations in ctDNA.

4. Discussion

KRAS mutations are found in various types of cancer, but their frequency is diverse. Most commonly among all malignancies, *KRAS* is mutated in PDAC tissue (66% according to the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, COSMIC [27], or 90% according to this study and similar recent studies, e.g., [4,28,29]); furthermore, *KRAS* mutations are common in colorectal tumors (33%) and lung cancer (16%) [27]. The distribution of specific types of *KRAS* mutations is similarly heterogeneous. In this study, in accordance with similar studies [15,16,21,22] and COSMIC [27], we showed that the three most common mutations

found in PDAC tissue were G12D, G12V and G12R, unlike colorectal cancer, where the most common mutations are G12D, G12V and G12C, and lung cancer, where G12C is most common, followed by G12V and G12D [27]. Previously, this variability was the subject of several studies, gradually revealing the heterogeneous behavior of individual mutant Ras proteins. Some *KRAS* mutations cause tumors to behave more aggressively than others [30,31], and the various *KRAS* mutations exhibit different sensitivity levels to medications [32–34] or cause activation of different downstream signaling effectors [19].

The importance of individual mutant forms of *KRAS* has also recently come to light thanks to the tremendous success of pharmacological research. After decades of rather unsuccessful effort to find a treatment targeted against the Kras oncoprotein [35,36], an inhibitor of Kras G12C, which occurs in 13.6% of all *KRAS*-mutated tumors, was found [37]. This led to the clinical validation of two targeted therapies: sotorasib and adagrasib [38–40]. This is particularly good news for the treatment of lung cancer, where G12C is the most common *KRAS* subtype and accounts for about half of all *KRAS* mutation types [41,42]. In PDAC, unfortunately, the incidence of G12C is only about 1% [4,37] (5% in this study). However, the importance of specific *KRAS* mutations, rather than just the division into mutated and non-mutated, has become clear.

We have reported in the past that *KRAS* mutations detected in pancreatic masses themselves do not show any prognostic value [11], and we confirmed this finding again in this study with a new group of patients. We also show here that patients with *KRAS* G12D mutations have significantly shorter survival rates than patients without this mutation, irrespective of whether they have undergone surgical treatment. Similar results linking G12D to worse OS in a single-center study have been published by several authors. Bournet et al. [15] studied a group of patients with advanced unresectable PDAC tumors treated with chemotherapy or supportive care. In accordance with our study, the authors reported that the G12D *KRAS* mutation was an independent negative prognostic marker both in the entire patient group and in the subgroup of patients treated with chemotherapy. With respect to the above and to our results, the G12D mutation seems to be a therapy-independent negative prognostic factor. In their study, Bournet et al. also used EUS-FNB materials, although their materials took the form of fresh cellular aspirate remaining in the needle catheter after cytological and histological examination, while in our study we used cytological slides, which are more appropriate for determining *KRAS* mutations based on our experience, particularly given their low rate of false negatives [12]. This may explain the higher rate of *KRAS* mutations captured in our study vs. the study of Bournet et al. (90% vs. 67%). Similar results were also reported by Oldani et al. [14], who used the samples of resected PDAC tumors of elderly patients undergoing radical surgical procedures. The authors observed a trend of a shorter survival rates in patients with the G12D *KRAS* mutation, although statistical significance was not reached. Other examples of studies reporting significantly worse OS and disease-free survival (DFS) in patients with *KRAS* G12D are a recent study by Dai et al. [21] and one by McIntyre et al. [43] conducted on PDAC surgical specimens collected during radical surgery, as well as a current large-sample-size study by Yousef et al. [22]. In Yousef's study, samples from 803 patients in different stages of PDAC were retrospectively analyzed, and *KRAS* G12D mutant tumors were associated with significantly worse OS. On the other hand, another recent study reported that the *KRAS* G12D mutation subtype was not significantly associated with worse survival in PDAC patients globally; only patients with resectable disease harboring G12D had shorter median survival than other PDAC patients in the aggregate [44].

Regarding the *KRAS* G12R mutation, this study revealed significantly improved OS survival in PDAC patients with this mutation. Its positive prognostic effect was reflected in the group of all patients as well as in the subgroup of operated patients, but surprisingly, it was not shown in the group of non-operated patients. It is therefore possible that the improved OS of the *KRAS* G12R was enhanced by radical surgery. However, this hypothesis should be tested on a larger group of patients. Similar to our results, improved OS and progression free survival (PFS) for *KRAS* G12R were also reported by Diehl et al. in a group

of patients with locally advanced or metastatic PDAC [45]. Another study supporting our findings is the abovementioned study by Yousef et al., where patients with *KRAS* G12R and wild type *KRAS* had improved OS compared to patients with *KRAS* G12D [22]. An opposite effect of *KRAS* G12R was seen in an earlier study performed in the Japanese population, where the G12D and G12R mutations were negative prognostic factors for OS [46].

In the same manner as the authors of several recent studies [17,47–55], we applied the concept of determining the prognosis of patients with PDAC according to the *KRAS* mutation type found in ctDNA. For this purpose, we used plasma samples from patients with metastatic PDAC, who usually have the worst performance status and are therefore most burdened by traditional biopsy. The overall rate of captured mutations was lower with ctDNA than with EUS-FNB (44% vs. 90%), which is in agreement with the results of similar studies, where it ranges between 26% [47] and 72.3% [51]. The results of the analyses were similar to those using EUS-FNB samples, and the presence of *KRAS* mutation in plasma had no considerable impact on the overall survival of the patients; however, patients with the G12D subtype had a statistically significantly shorter OS than the other patients. Circulating tumor DNA can thus be used as an alternative to EUS-FNB as a source from which to determine the patient prognosis based on various *KRAS* mutations.

Similar studies determining *KRAS* mutations in the plasma of patients with PDAC have been conducted predominantly in the Asian population [17,48–52,54,55], and their results vary. Some authors did not observe any significant association between the presence of a *KRAS* mutation and survival in agreement with our findings [49,51], but some of them observed worse OS in patients with a detected *KRAS* mutation in ctDNA [52–55], while others did not observe any effect of *KRAS* mutations on survival based on tissue sample analysis but did observe significantly shorter survival in patients with a *KRAS* mutation based on plasma assessment [17,48,50]. Thus far, only one pilot study has been conducted in a European population [47]; it reports a significantly shorter OS for patients with *KRAS* mutations in plasma but does not focus on individual *KRAS* mutations. Regarding individual mutations, Kinugasa et al. [48] and Cheng et al. [51] observed significantly shorter survival in patients with G12V, but Hadano et al. [50] reported no differences in OS by *KRAS* subtype, whereas Guo et al. [55] observed significantly shorter OS in *KRAS* G12D patients, in agreement with our study. To our knowledge, this is the first study focused on the determination of any prognostic roles of individual *KRAS* mutation types in plasma samples in the European population.

We are aware of the limitations in our study, resulting mainly from the smaller cohort of patients and thus its division into even smaller subgroups having individual *KRAS* mutations. The results may, therefore, not have sufficient statistical power and should not be generalized. However, this is not unusual, as shown by similar works studying *KRAS* mutations in PDAC patients and often reaching barely 70 tissue samples or 50 ctDNA samples [14,18]. The present study tried to maintain, as much as possible, a rational testing procedure that could feasibly be implemented in clinical practice. We worked with a set of real patients, eliminating only patients with no known survival time and patients with severe comorbidity (colorectal cancer). We utilized FNB samples that are routinely available from PDAC diagnostics and verified the potential prognostic role of a single genetic marker, *KRAS*, which is routinely determined in all molecular biological and diagnostic laboratories. Lack of information about the presence of other somatic mutations can be seen as another limiting factor. However, wide genomic analysis of the samples was not the aim of the study and would not even be implementable in clinical practice, given the increased requirements for sample quantity and quality and the need for instrumentation that is not commonly found in routine diagnostic laboratories. Moreover, with regard to real clinical practice, blood samples were only collected from patients with stage IV disease, in which the potential investigation of liquid biopsy instead of tissue biopsy makes the most sense. Therefore, the number of samples for ctDNA analysis was also relatively low.

5. Conclusions

The prognosis of PDAC patients appears to be dependent on the specific subtype of *KRAS* mutation present in the tumor. In our cohort of 118 patients, G12D (GGT > GAT) confers the worst prognosis and G12R (GGT > CGT) the best prognosis, resulting in a shortening and prolongation of median survival by approximately half (4 months) in patients with the G12D and the G12R mutations, respectively. *KRAS* testing from EUS-FNB cytology slides, or from plasma samples in cases where tissue biopsy is contraindicated, could represent a useful tool in the rational decision-making process of PDAC therapy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes15101302/s1>, Supplementary Materials and Methods, Figure S1: Differences in OS of patients with and without *KRAS* Gly12Asp in tumor tissue (a) in the subgroup of operated patients and (b) in the subgroup of non-operated patients. Figure S2: Differences in OS of patients with and without *KRAS* Gly12Arg in tumor tissue (a) in the subgroup of operated patients and (b) in the subgroup of non-operated patients.

Author Contributions: Conceptualization, L.B., T.H., M.M. and B.B.; Methodology, T.H., B.B. and E.T.; Software, T.H. and L.B.; Validation, M.M. and M.Z.; Formal Analysis, T.H.; Investigation T.H., L.B. and B.B.; Resources, B.B., E.T. and M.Z.; Data Curation, T.H., L.B. and B.B.; Writing—Original Draft Preparation, T.H.; Writing—Review and Editing, L.B., M.M., B.B., E.T. and M.Z.; Visualization, T.H.; Supervision, L.B., M.M. and M.Z.; Project Administration, T.H. and B.B.; Funding Acquisition, L.B., M.M. and M.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant number NT/13638-4.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Military University Hospital, Prague, Czech Republic (protocol code 108/8-39/2015, date of approval 16 June 2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Technical and clinical data presented in this study are available from the corresponding author at lbnesova@genomac.cz.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

References

1. Ilic, I.; Ilic, M. International patterns in incidence and mortality trends of pancreatic cancer in the last three decades: A jointpoint regression analysis. *World J. Gastroenterol.* **2022**, *28*, 4698–4715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Whitley, A.; Kocián, P.; Nikov, A.; Krejčí, D.; Pehalová, L.; Blaha, M.; Dušek, L.; Gürlich, R. Early-onset pancreatic cancer: A national cancer registry study from the Czech Republic and review of the literature. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* **2023**, *30*, 1324–1333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lewis, R.; Drebin, J.A.; Callery, M.P.; Fraker, D.; Kent, T.S.; Gates, J.; Vollmer, C.M., Jr. A contemporary analysis of survival for resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB* **2013**, *15*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Luo, J. *KRAS* mutation in pancreatic cancer. *Semin. Oncol.* **2021**, *48*, 10–18. [[CrossRef](#)]
5. Goodsell, D.S. The molecular perspective: The ras oncogene. *Oncologist* **1999**, *4*, 263–264. [[CrossRef](#)]
6. Downward, J. Control of ras activation. *Cancer Surv.* **1996**, *27*, 87–100.
7. Boguski, M.S.; McCormick, F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **1993**, *366*, 643–654. [[CrossRef](#)]
8. Castellano, E.; Downward, J. RAS Interaction with PI3K, More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 261–274. [[CrossRef](#)]
9. Castagnola, P.; Giaretti, W. Mutant *KRAS*, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1756*, 115–125. [[CrossRef](#)]
10. Salek, C.; Benesova, L.; Zavoral, M.; Nosek, V.; Kasperova, L.; Ryska, M.; Strnad, R.; Traboulsi, E.; Minarik, M. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 3714–3720. [[CrossRef](#)]

11. Salek, C.; Minarikova, P.; Benesova, L.; Nosek, V.; Strnad, R.; Zavoral, M.; Minarik, M. Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 1803–1810. [PubMed]
12. Benesova, L.; Halkova, T.; Bunganic, B.; Belsanova, B.; Zavoral, M.; Traboulsi, E.; Minarik, M. Comparison of Native Aspirates and Cytological Smears Obtained by EUS-Guided Biopsies for Effective DNA/RNA Marker Testing in Pancreatic Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 379–385. [CrossRef] [PubMed]
13. Schultz, N.A.; Roslind, A.; Christensen, I.J.; Horn, T.; Høgdall, E.; Pedersen, L.N.; Kruhøffer, M.; Burcharth, F.; Wøjdemann, M.; Johansen, J.S. Frequencies and prognostic role of KRAS and BRAF mutations in patients with localized pancreatic and ampullary adenocarcinomas. *Pancreas* **2012**, *41*, 759–766. [CrossRef] [PubMed]
14. Oldani, A.; De Rosa, C.; Monni, M.; Terrone, A.; Miglio, U.; Garavoglia, M.; Boldorini, R. KRAS mutation analysis in ductal carcinoma of the pancreas; prognostic implications in elderly patients. *BMC Surg.* **2013**, *13* (Suppl. S1), A31. [CrossRef]
15. Bournet, B.; Muscari, F.; Buscail, C.; Assenat, E.; Barthet, M.; Hammel, P.; Selves, J.; Guimbaud, R.; Cordelier, P.; Buscail, L. KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2016**, *7*, e157. [CrossRef]
16. Haas, M.; Ormanns, S.; Baechmann, S.; Remold, A.; Kruger, S.; Westphalen, C.B.; Siveke, J.T.; Wenzel, P.; Schlitter, A.M.; Esposito, I.; et al. Extended RAS analysis and correlation with overall survival in advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 1462–1469. [CrossRef]
17. Lee, M.R.; Woo, S.M.; Kim, M.K.; Han, S.S.; Park, S.J.; Lee, W.J.; Lee, D.E.; Choi, S.I.; Choi, W.; Yoon, K.A.; et al. Application of plasma circulating KRAS mutations as a predictive biomarker for targeted treatment of pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **2024**, *115*, 1283–1295. [CrossRef]
18. Tao, L.Y.; Zhang, L.F.; Xiu, D.R.; Yuan, C.H.; Ma, Z.L.; Jiang, B. Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: A meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.* **2016**, *14*, 146. [CrossRef]
19. Ihle, N.T.; Byers, L.A.; Kim, E.S.; Saintigny, P.; Lee, J.J.; Blumenschein, G.R.; Tsao, A.; Liu, S.; Larsen, J.E.; Wang, J.; et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. *J. Natl. Cancer Inst.* **2012**, *104*, 228–239. [CrossRef]
20. Eser, S.; Reiff, N.; Messer, M.; Seidler, B.; Gottschalk, K.; Dobler, M.; Hieber, M.; Arbeiter, A.; Klein, S.; Kong, B.; et al. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 406–420. [CrossRef]
21. Dai, M.; Jahanzaib, R.; Liao, Y.; Yao, F.; Li, J.; Teng, X.; Chen, K.; Cheng, W. Prognostic value of KRAS subtype in patients with PDAC undergoing radical resection. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 1074538. [CrossRef] [PubMed]
22. Yousef, A.; Yousef, M.; Chowdhury, S.; Abdilleh, K.; Knafl, M.; Edelkamp, P.; Alfaro-Munoz, K.; Chacko, R.; Peterson, J.; Smaglo, B.G.; et al. Impact of KRAS mutations and co-mutations on clinical outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *NPJ Precis. Oncol.* **2024**, *8*, 27. [CrossRef] [PubMed]
23. Benesova, L.; Belsanova, B.; Suchanek, S.; Kopeckova, M.; Minarikova, P.; Lipska, L.; Levy, M.; Visokai, V.; Zavoral, M.; Minarik, M. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal. Biochem.* **2013**, *433*, 227–234. [CrossRef] [PubMed]
24. Pessoa, L.S.; Heringer, M.; Ferrer, V.P. ctDNA as a cancer biomarker: A broad overview. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *155*, 103109. [CrossRef]
25. Guven, D.C.; Sahin, T.K.; Yildirim, H.C.; Aktepe, O.H.; Dizdar, O.; Yalcin, S. A systematic review and meta-analysis of the association between circulating tumor DNA (ctDNA) and prognosis in pancreatic cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, *168*, 103528. [CrossRef]
26. Bettgowda, C.; Sausen, M.; Leary, R.J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Agrawal, N.; Bartlett, B.R.; Wang, H.; Lubner, B.; Alani, R.M.; et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 224ra24. [CrossRef]
27. COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer). Available online: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue> (accessed on 19 August 2024).
28. Stefanoudakis, D.; Frountzas, M.; Schizas, D.; Michalopoulos, N.V.; Drakaki, A.; Toutouzas, K.G. Significance of TP53, CDKN2A, SMAD4 and KRAS in Pancreatic Cancer. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, *46*, 2827–2844. [CrossRef]
29. Nusrat, F.; Khanna, A.; Jain, A.; Jiang, W.; Lavu, H.; Yeo, C.J.; Bowne, W.; Nevler, A. The Clinical Implications of KRAS Mutations and Variant Allele Frequencies in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 2103. [CrossRef]
30. Andreyev, H.J.; Norman, A.R.; Cunningham, D.; Oates, J.R.; Clarke, P.A. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The multicenter “RASCAL” study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 675–684. [CrossRef]
31. Al-Mulla, F.; Milner-White, E.J.; Going, J.J.; Birnie, G.D. Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *J. Pathol.* **1999**, *187*, 433–438. [CrossRef]
32. De Roock, W.; Jonker, D.J.; Di Nicolantonio, F.; Sartore-Bianchi, A.; Tu, D.; Siena, S.; Lamba, S.; Arena, S.; Frattini, M.; Piessevaux, H.; et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* **2010**, *304*, 1812–1820. [CrossRef] [PubMed]
33. Garassino, M.C.; Marabese, M.; Rusconi, P.; Rulli, E.; Martelli, O.; Farina, G.; Scanni, A.; Brogini, M. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 235–237. [CrossRef] [PubMed]

34. Tejpar, S.; Celik, I.; Schlichting, M.; Sartorius, U.; Bokemeyer, C.; Van Cutsem, E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3570–3577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cox, A.D.; Fesik, S.W.; Kimmelman, A.C.; Luo, J.; Der, C.J. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 828–851. [[CrossRef](#)]
36. McCormick, F. Progress in targeting RAS with small molecule drugs. *Biochem. J.* **2019**, *476*, 365–374. [[CrossRef](#)]
37. Hofmann, M.H.; Gerlach, D.; Misale, S.; Petronczki, M.; Kraut, N. Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 924–937. [[CrossRef](#)]
38. Hong, D.S.; Fakih, M.G.; Strickler, J.H.; Desai, J.; Durm, G.A.; Shapiro, G.I.; Falchook, G.S.; Price, T.J.; Sacher, A.; Denlinger, C.S.; et al. KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1207–1217. [[CrossRef](#)]
39. Skoulidis, F.; Li, B.T.; Dy, G.K.; Price, T.J.; Falchook, G.S.; Wolf, J.; Italiano, A.; Schuler, M.; Borghaei, H.; Barlesi, F.; et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 2371–2381. [[CrossRef](#)]
40. Bekaii-Saab, T.S.; Yaeger, R.; Spira, A.I.; Pelster, M.S.; Sabari, J.K.; Hafez, N.; Barve, M.; Velastegui, K.; Yan, X.; Shetty, A.; et al. Adagrasib in Advanced Solid Tumors Harboring a KRAS(G12C) Mutation. *J. Clin. Oncol.* **2023**, *41*, 4097–4106. [[CrossRef](#)]
41. Fiala, O.; Pesek, M.; Finek, J.; Benesova, L.; Belsanova, B.; Minarik, M. The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet.* **2013**, *206*, 26–31. [[CrossRef](#)]
42. Ghimessy, A.; Radeckzy, P.; Laszlo, V.; Hegedus, B.; Renyi-Vamos, F.; Fillinger, J.; Klepetko, W.; Lang, C.; Dome, B.; Megyesfalvi, Z. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 1159–1177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. McIntyre, C.A.; Lawrence, S.A.; Richards, A.L.; Chou, J.F.; Wong, W.; Capanu, M.; Berger, M.F.; Donoghue, M.T.A.; Yu, K.H.; Varghese, A.M.; et al. Alterations in driver genes are predictive of survival in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer* **2020**, *126*, 3939–3949. [[CrossRef](#)]
44. Shen, H.; Lundy, J.; Strickland, A.H.; Harris, M.; Swan, M.; Desmond, C.; Jenkins, B.J.; Croagh, D. KRAS G12D Mutation Subtype in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Does It Influence Prognosis or Stage of Disease at Presentation? *Cells* **2022**, *11*, 3175. [[CrossRef](#)]
45. Diehl, A.C.; Hannan, L.M.; Zhen, D.B.; Coveler, A.L.; King, G.; Cohen, S.A.; Harris, W.P.; Shankaran, V.; Wong, K.M.; Green, S.; et al. KRAS Mutation Variants and Co-occurring PI3K Pathway Alterations Impact Survival for Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Oncologist* **2022**, *27*, 1025–1033. [[CrossRef](#)]
46. Ogura, T.; Yamao, K.; Hara, K.; Mizuno, N.; Hijioka, S.; Imaoka, H.; Sawaki, A.; Niwa, Y.; Tajika, M.; Kondo, S.; et al. Prognostic value of K-ras mutation status and subtypes in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens from patients with unresectable pancreatic cancer. *J. Gastroenterol.* **2013**, *48*, 640–646. [[CrossRef](#)]
47. Earl, J.; Garcia-Nieto, S.; Martinez-Avila, J.C.; Montans, J.; Sanjuanbenito, A.; Rodriguez-Garrote, M.; Lisa, E.; Mendia, E.; Lobo, E.; Malats, N.; et al. Circulating tumor cells (Ct) and kras mutant circulating free DNA (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 797. [[CrossRef](#)]
48. Kinugasa, H.; Nouse, K.; Miyahara, K.; Morimoto, Y.; Dohi, C.; Tsutsumi, K.; Kato, H.; Matsubara, T.; Okada, H.; Yamamoto, K. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer* **2015**, *121*, 2271–2280. [[CrossRef](#)]
49. Singh, N.; Gupta, S.; Pandey, R.M.; Chauhan, S.S.; Saraya, A. High levels of cell-free circulating nucleic acids in pancreatic cancer are associated with vascular encasement, metastasis and poor survival. *Cancer Investig.* **2015**, *33*, 78–85. [[CrossRef](#)]
50. Hadano, N.; Murakami, Y.; Uemura, K.; Hashimoto, Y.; Kondo, N.; Nakagawa, N.; Sueda, T.; Hiyama, E. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **2016**, *115*, 59–65. [[CrossRef](#)]
51. Cheng, H.; Liu, C.; Jiang, J.; Luo, G.; Lu, Y.; Jin, K.; Guo, M.; Zhang, Z.; Xu, J.; Liu, L.; et al. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 2344–2350. [[CrossRef](#)]
52. Perets, R.; Greenberg, O.; Shentzer, T.; Semeništy, V.; Epelbaum, R.; Bick, T.; Sarji, S.; Ben-Izhak, O.; Sabo, E.; Hershkovitz, D. Mutant KRAS Circulating Tumor DNA Is an Accurate Tool for Pancreatic Cancer Monitoring. *Oncologist* **2018**, *23*, 566–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Groot, V.P.; Mosier, S.; Javed, A.A.; Teinor, J.A.; Gemenetzi, G.; Ding, D.; Haley, L.M.; Yu, J.; Burkhart, R.A.; Hasanain, A.; et al. Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 4973–4984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Watanabe, F.; Suzuki, K.; Tamaki, S.; Abe, I.; Endo, Y.; Takayama, Y.; Ishikawa, H.; Kakizawa, N.; Saito, M.; Futsuhara, K.; et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0227366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Guo, S.; Shi, X.; Shen, J.; Gao, S.; Wang, H.; Shen, S.; Pan, Y.; Li, B.; Xu, X.; Shao, Z.; et al. Preoperative detection of KRAS G12D mutation in ctDNA is a powerful predictor for early recurrence of resectable PDAC patients. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 857–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4 Diskuze

Ačkoliv všechny solidní nádory vznikají díky genetickým změnám zdravé tkáně a platí pro ně obecné zákonitosti uvedené v kapitolách 1.1 - 1.3, je zároveň každé nádorové onemocnění jedinečné. U každého typu solidního nádoru se řeší specifické otázky a problémy. Proto je onkogenetický výzkum velmi heterogenním odvětvím, ať už z pohledu klinických či genetických charakteristik daného nádoru, nebo z pohledu metodiky, pomocí které jsou detekovány genetické alterace specifické pro daný nádor. Například, kromě klasických jedno či více nukleotidových mutací jsou PTC typické výskytem fúzních genů, u CRC se vyskytují hypermethylace CpG ostrůvků a u PDAC zase delece a ztráty heterozygoty. Dále je onkogenetický výzkum extrémně dynamické odvětví. Je obdivuhodné, kolik nových poznatků neustále přináší, zvláště v posledních dvou desetiletích, nepochybně díky rozvoji citlivých metodik, zejména NGS.

Příkladem tohoto pokroku je genetický výzkum **PTC**, kde v roce 2015 bylo známo celkem 18 různých *RET/PTC* přeskupení, včetně mnou nově objeveného *RET/PTC1ex9* prezentovaného v **Publikaci 1**. O 10 let později je jich známo více než 50, přičemž 20 různých typů bylo detekováno pouze v jediné studii pomocí NGS (Bulanova Pekova 2023). Došlo tím mimo jiné i k přesnější představě o prevalenci *RET/PTC*, jehož přítomnost byla nalezena pouze v PTC tkáni, v žádném jiném typu karcinomu štítné žlázy ani v benigních lézích nebylo detekováno. Během svého studia pediatrického souboru 47 pacientů s PTC jsem pomocí real-time PCR detekovala *RET/PTC* přeskupení v 10 případech (21 %, výsledky zde nejsou prezentovány), aktuálně ve studii doktorky Bulanové Pekové jeho výskyt rovněž v souboru pediatrických pacientů stoupl na 30 % při použití NGS. Záchyt v kompletním souboru včetně vzorků dospělé populace pak byl 113/993 PTC, tedy 11.4 %.

Dále, zatímco z dřívějších výzkumů vyplývalo, že přítomnost *BRAF* mutace predisponuje pacienta k agresivnímu projevu onemocnění (Xing *et al.* 2005, Oler *et al.* 2009), nyní je prediktivní význam této mutace přehodnocován (Lai *et al.* 2024). Z pohledu agresivity je závažnější mutace *TERT* (Liu *et al.* 2024), ale právě i přítomnost *RET/PTC* přeskupení, která je v 75 % případů spojena s metastazováním do přilehlých lymfatických uzlin a v 19 % s přítomností vzdálených metastáz (Bulanova Pekova 2023). Podobné závěry potvrzuje další recentní studie, kdy pediatrické PTC pozitivní na fúzní geny byly významně asociovány s větší velikostí nádoru, extratyreoidální extenzí, přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a v plicích a s horší prognózou než PTC mající mutaci

BRAF (Lee et al., 2021). Tím je podpořen předpoklad, který uvádím v Publikaci 1, že přeskupení *RET/PTC1ex9* bylo zřejmě příčinou agresivního projevu onemocnění u chlapce, v jehož PTC tkáni bylo nalezeno (přítomnost plicních metastáz bilaterálně, opakovaná recidiva onemocnění).

Enormní metodický rozvoj se samozřejmě týká i výzkumu kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu. Zde však mají své nenahraditelné místo stále i tradiční robustní metodiky detekce genetických alterací. Zřejmě je to dáno především vyšší prevalencí CRC a PDAC v porovnání s PTC, tedy i mnohem větším počtem vzorků a potřebných vyšetření. I proto je ve všech výzkumných projektech týkajících se CRC a PDAC, kterých jsem se účastnila, kladen důraz na racionalitu vyšetření a uplatnění v rutinní klinické praxi.

Například vyšetřování ctDNA pro monitoring recidivy pacientů s **CRC** může být v klinické praxi velmi účinnou a dokonce přesnější alternativou k tumorovým markerům a zobrazovacím metodám, jak ukazuje **Publikace 2**. Ačkoliv fenomén cirkulující DNA je v onkologickém výzkumu znám už řadu let (Bendich *et al.* 1965, Leon *et al.* 1977), teprve v posledních letech, opět díky rozvoji vysoce citlivých metod, je mu věnována patřičná pozornost. Možnost vyšetřovat ctDNA z krve onkologických pacientů je dnes už pevně zakořeněna v obecném povědomí, je atraktivní a ze strany lékařů žádaná. Ovšem plošnému zavedení vyšetření ctDNA do praxe brání nutnost speciálního přístrojového vybavení, s ním spojené nároky na vysokou kvalitu a množství vzorku, na odborné pracovníky, a také stále ještě vysoká cena vyšetření. Všechny tyto překážky jsou překonány při použití metodiky založené na detekci mutačně specifických heteroduplexů pomocí běžného kapilárního DNA analyzátoru, kterou popisuji v kapitole 1.5.5.2.

V posledních letech přibyly dvě studie provedené na relevantním počtu pacientů, jejichž výsledky lze srovnávat s výsledky Publikace 2 (Tie *et al.* 2021, Bansal *et al.* 2024). Studie Tie a kol. zahrnuje 54 pacientů s metastatickým CRC indikovaných k resekci metastáz, z nich u 46 byla předoperačně detekována ctDNA a byly tedy vhodnými kandidáty pro její pooperační sledování (versus 47 pacientů v Publikaci 2). 12 pacientů mělo pooperačně detekovatelnou ctDNA, u většiny z nich (10/12, 83 %) došlo následně k recidivě. V Publikaci 2 bylo v průběhu studie provedeno celkově 50 resekcí. CtDNA byla pooperačně detekována 21krát a vždy (21/21, 100 %) došlo k recidivě. Dále, zatímco Tie a kol. pozorovali recidivu onemocnění u 30 % pacientů, kteří byli po operaci ctDNA negativní, v našem souboru to bylo 55 % (16/29). Nejnovější studie podobného designu jako Publikace 2 zahrnuje 31 pacientů a jejími autory jsou Bansal *et al.* Autoři uvádí

pooperačně detekovanou ctDNA u 19 pacientů, z nichž všichni (19/19, 100 %) měli postupně recidivu. U 12 pacientů ctDNA pooperačně detekována nebyla a 58 % z nich (7/12) nakonec mělo recidivu. Lze tedy říct, že výsledky Publikace 2 jsou v souladu s aktuálními konkurenčními výsledky. Žádná ze dvou uvedených publikací se však nezabývá korelací radikality provedené resekce s pooperační detekcí ctDNA. V tomto ohledu zůstává Publikace 2 unikátní.

Jak je ukázáno v **Publikaci 4**, ctDNA je možné využívat také v managementu karcinomu pankreatu, i když pro zcela odlišné účely. Publikace 4 shrnuje výsledky studie, jejímž smyslem bylo především najít jednoduchý prognostický marker, který by co nejvíce usnadnil lékařům rozhodování o tom, jaký terapeutický režim pro pacienta zvolit s ohledem na zachování co nejvyšší kvality života. Vzhledem k tomu, že testování mutace *KRAS* se běžně provádí ve většině molekulárně-biologických laboratoří k potvrzení diagnózy PDAC, nabízí se jako ideální volba studium vlivu různých typů *KRAS* mutací na prognózu pacientů.

U PDAC není racionální využívat ctDNA k jakémukoliv dlouhodobému sledování pacientů, zkoumání dynamiky *KRAS* mutací v ctDNA ani jejich korelaci s progresí onemocnění a odpovědí na terapii. Takové studie jsou reálné u kolorektálního karcinomu (např. Publikace 2) nebo karcinomu plic (např. Benešová *et al.* 2022), bohužel PDAC je složitější případ. Zatímco u pacientů s kolorektálním karcinomem není výjimkou tříleté přežití, medián celkového přežití u pacientů s PDAC je 4 měsíce. Pacienti často přicházejí ve špatném výkonnostním stavu a naše dosavadní zkušenosti ukazují, že opakované odběry krve odmítají (zejména z důvodu opakovaného dojíždění do nemocnice). Studii jsme proto plánovali s co největším ohledem na pacienty a ctDNA jsme vyšetřovali jen pacientům ve IV. stádiu, kde má největší smysl případně zavést do klinické praxe tekutou biopsii jako náhradu tkáňové biopsie. V naší studii 22 % (13/58) pacientů ve stádiu IV nemoci odmítlo, byť jen jediný odběr krve.

Ještě komplikovaněji vnímáme sledování odpovědi na léčbu pomocí ctDNA. Např. v našem souboru 118 pacientů jsme nebyli schopni správně zvážit všechny léčebné modalitty. 37 % pacientů bylo léčeno chemoterapií, 9 % chirurgicky a 11 % chirurgicky s následnou adjuvantní chemoterapií. Chemoterapie byla až na 2 výjimky (Folfirinox, Folfox 4) založena na Gemcitabinu. Gemcitabin byl 7x kombinován s dalším režimem, z toho 1x v rámci adjuvantní terapie. Chemoterapie byla snášena různě – od 1 dávky až po 7 cyklů Gemcitabinu. Otázkou tedy je, od kolika dávek je správné počítat chemoterapii jako

ukončenou. A dále, skupiny pacientů s odlišnými mutacemi *KRAS*, které byly předmětem studia, by se stratifikací podle léčby rozdělily na ještě menší skupiny s nedostatečnou statistickou významností. Z těchto důvodů jsme do statistických analýz jako jediný typ léčby zahrnuli operaci, která může nejvíce zlepšit přežití.

Ze studie vyplynulo, stejně jako z naší předchozí studie provedené na jiném souboru PDAC pacientů (Salek *et al.* 2009), že přítomnost či nepřítomnost mutace *KRAS* jako takové nemá žádný vliv na prognózu pacientů. Pokud ale testujeme jednotlivé typy *KRAS* mutací, je situace jiná. *KRAS* mutace G12D (GGT > GAT) byla negativním prediktorem prognózy a pacienti mající tuto mutaci měli průměrnou dobu přežití o 127 dní kratší než ostatní pacienti (101 vs 228 dní). Bohužel je tato mutace u PDAC nejčastější, v naší studii byla detekována u 44 % pacientů. Naopak pozitivním prognostickým markerem byla mutace G12R (GGT > CGT), protože pacienti s touto mutací přežívali o 124 dní déle než ostatní (286 vs 162 dní). Mutace G12R byla nalezena v 17 % PDAC. Stejná situace, kdy různé typy *KRAS* mutací různě ovlivňují prognózu, byla popsána také u rakoviny plic (Ihle *et al.* 2012). Zdá se tedy, že do budoucna nebude stačit rozlišovat jen je-li *KRAS* mutovaný či nemutovaný, ale bude nutná i znalost konkrétní mutace. Význam jednotlivých mutantních forem onkoproteinu *KRAS* nedávno vyšel najevo také díky obrovskému úspěchu farmakologického výzkumu, kdy byl po letech spíše neúspěšného úsilí nalezen inhibitor onkoproteinu *KRAS* G12C, který se exprimuje u 13,6 % všech nádorů majících mutovaný *KRAS* (Hofmann *et al.* 2022), bohužel u PDAC jen minimálně (u 5 % pacientů v naší studii). Snad je jen otázkou času, kdy budou nalezeny inhibitory i ostatních forem a bude možné cílená protinádorová terapeutika plně využít také v léčbě PDAC podobně, jak je to dnes již běžné u CRC.

CRC patří k nádorovým onemocněním s nejširší nabídkou schválených cílených léčiv, a také k nádorovým onemocněním s nejdetailněji popsaným genetickým pozadím, o čemž svědčí zápis z letošního kolorektálního symposia na Brněnských onkologických dnech (Redakce BOD 2024). Při tom ze studia intratumorové mutační heterogenity kolorektálních prekancerózních lézí v posledních letech se zdá, že kolorektální adenomy mohou být mutačně ještě rozmanitější než karcinomy.

Ačkoliv je od roku 1990 akceptováno, že CRC se vyvíjí z adenomu (Fearon a Vogelstein 1990), byl historicky molekulárně-genetický výzkum CRC soustředěn převážně na karcinomy. Na adenomy se pozornost začala obracet až o 15 let později, kdy byla formulována myšlenka, že intratumorová mutační heterogenita zřejmě během progresu

CRC spíše klesá, a to vlivem selekce jen těch mutačních klonů, které zaručují nejpriznivější podmínky pro progresi karcinomu (Losi *et al.* 2005). Ukázalo se, že pochopení molekulárně-genetických dějů v adenomech by mohlo být klíčem k pochopení chování karcinomů a tím byly položeny základy pro studium ITH prekancerózních kolorektálních lézí.

ITH kolorektálních lézí se dlouhodobě zabýváme i na našem pracovišti. V roce 2016 jsme publikovali výsledky studie provedené na rozsáhlém souboru 159 velkých adenomů (> 1 cm), 74 raných karcinomů (stádium I a II) a 64 pokročilých karcinomů (stádium III a IV), která však klesající ITH s pokročilostí nádoru jednoznačně nepotvrdila. Respektive vždy záleželo na konkrétní mutaci ve vazbě na konkrétní lokalizaci nádoru. Například výskyt mutací v protoonkogenech *KRAS* a *BRAF* klesal s pokročilostí léze jen v levém tračníku a rektu, zatímco v pravém tračníku naopak stoupal (Minarikova *et al.* 2016).

Studiu ITH prekancerózních kolorektálních lézí se v ještě větším detailu věnuje **Publikace 3**. Léze > 1 cm odstraněné při screeningové (indexové) kolonoskopii byly zpracovány do miniaturních vzorků, v každém z nich byly stanoveny nejčastější mutace typické pro CRC, a pokud byla přítomna mutace, bylo vypočítáno její množství vyjádřené jako procenta mutované frakce. Vznikl tak detailní obraz o kompletní ITH dané léze. Publikace 3 je zaměřena hlavně na možnost využití znalosti ITH indexových lézí k predikci rizika recurence onemocnění. S tím úzce souvisí také volba správného intervalu následných kontrolních kolonoskopií. V souladu s aktuálními doporučeními Evropské společnosti pro gastrointestinální endoskopii (ESGE) aktualizovaných v roce 2020 (Hassan *et al.* 2020) jsou z hlediska recidivy všechny léze větší než 1 cm hodnoceny jako rizikové a doporučené intervaly kontrolních kolonoskopií jsou pak 3 roky. Jak ale vyplývá z Publikace 3, tento interval může být příliš dlouhý např. pro pacienty mající mutaci v 7. exonu tumor supresorového genu *TP53*. V našem souboru 66 pacientů byla u 8 pacientů (8/66, 12 %) detekována tato mutace a u všech 8 pacientů byl nalezen metachronní adenom (nebo adenomy) již při kolonoskopii s ročním odstupem od indexové. Ani v jednom případě se přitom nejednalo o recidivu v jizvě, navíc indexové léze byly odstraněny pouze tzv. en-block resekcí, kdy léze zůstane v jednom kuse. Tento výkon je spojen s nízkým až nulovým rizikem lokální recidivy v jizvě.

Z publikace 3 vyplývá důležitost studia ITH a obecně molekulárních markerů v prekancerózních kolorektálních lézích. Zdá se, že podobně jako při léčbě CRC, by v budoucnu i při stanovení vhodných intervalů kontrolních kolonoskopií, mohly molekulární markery nalézt své uplatnění.

5 Shrnutí a závěr

Onkologický výzkum je náročná komplexní disciplína kombinující znalosti mnoha přírodovědných oborů, zejména medicíny, biochemie, molekulární biologie a genetiky. Každý pokrok v onkologickém výzkumu tak přináší i pokrok pro tyto dílčí obory. Mojí snahou bylo, aby z předkládané práce vyplynula zejména důležitost znalosti biochemie a biochemických metod v onkologii, což jsem se snažila demonstrovat na čtyřech exemplárních publikacích. Dokládají, že znalost principů biochemických metod může pomoci zdokonalit stávající metodiky nebo vyvíjet metodiky nové. Díky nim jsme pak schopni detekovat nové genetické alterace, rychleji, s vyšší citlivostí... Znalost obecných biochemických principů je zase klíčem k pochopení příčin vzniku nádorového bujení, složitého fungování intratumorového prostředí i jeho nesmírné rozmanitosti.

V průběhu mojí práce se podařilo:

1. Detekovat nový fúzní gen *RET/PTC1ex9* u papilárního karcinomu štítné žlázy.
2. Optimalizovat metodiky detekce cirkulující nádorové DNA tak, aby mohla být rutinně využívána v klinické praxi.
3. Zavést na pracovišti funkční metodiku pro analýzu intratumorové mutační heterogenity kolorektálních prekancerozních lézí. Identifikovat mutaci v 7. exonu genu *TP53* jako možného prediktora vzniku časných metachronních kolorektálních adenomů.
4. Zoptimalizovat metodiku izolace DNA z cytologických preparátů karcinomu pankreatu a snížit tak množství falešně negativních (nemutovaných) *KRAS* vzorků. Odhalit odlišný význam různých *KRAS* mutací pro prognózu pacientů s karcinomem pankreatu a navrhnout možné racionální využití této skutečnosti v klinické praxi.

6 Seznam použité literatury

Ahmadi S, Landa I. The prognostic power of gene mutations in thyroid cancer. *Endocr Connect.* 2024 Jan 16;13(2):e230297. doi: 10.1530/EC-23-0297

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988; 53(4): 549-554. doi: 10.1016/0092-8674(88)90571-5

Alzahrani AS, Alswailem M, Alswailem AA, Al-Hindi H, Goljan E, Alsudairy N, Abouelhoda M. Genetic Alterations in Pediatric Thyroid Cancer Using a Comprehensive Childhood Cancer Gene Panel. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020; 105(10): dgaa389. doi: 10.1210/clinem/dgaa389

Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1992; 98: 13-24. doi:10.1289/ehp.929813

Arighi, E., Borrello, M. G., and Sariola, H. (2005). RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 441–467.

Bahar ME, Kim HJ, Kim DR. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8(1): 455. doi: 10.1038/s41392-023-01705-z

Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, LiVolsi VA, Papotti MG, Sobrinho-Simões M, Tallini G, Mete O. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol.* 2022; 33(1): 27-63. doi: 10.1007/s12022-022-09707-3

Bansal VV, Belmont E, Godley F 4th, Dhiman A, Witmer HD, Li S, Liao A, Eng OS, Turaga KK, Shergill A. Utility of Circulating Tumor DNA Assessment in Characterizing Recurrence Sites after Optimal Resection for Metastatic Colorectal Cancer. *J Am Coll Surg.* 2024; 238(6): 1013-1020. doi: 10.1097/XCS.0000000000001028

Belic J, Koch M, Ulz P, Auer M, Gerhalter T, Mohan S, Fischereder K, Petru E, Bauernhofer T, Geigl JB, Speicher MR, Heitzer E. Rapid Identification of Plasma DNA Samples with Increased ctDNA Levels by a Modified FAST-SeqS Approach. *Clin Chem.* 2015; 61(6): 838-849. doi: 10.1373/clinchem.2014.234286

Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science.* 1965; 148(3668): 374-376. doi: 10.1126/science.148.3668.374

Benesova L, Halkova T, Bunganic B, Belsanova B, Zavoral M, Traboulsi E, Minarik M. Comparison of Native Aspirates and Cytological Smears Obtained by EUS-Guided Biopsies for Effective DNA/RNA Marker Testing in Pancreatic Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26(1): 379-385. doi: 10.1007/s12253-018-0490-9

Benesova L, Ptackova R, Halkova T, Semyakina A, Svaton M, Fiala O, Pesek M, Minarik M. Detection and Quantification of ctDNA for Longitudinal Monitoring of Treatment in

Non-Small Cell Lung Cancer Patients Using a Universal Mutant Detection Assay by Denaturing Capillary Electrophoresis. *Pathol Oncol Res.* 2022; 28:1610308. doi: 10.3389/pore.2022.1610308

Benesova L, Ptackova R, Halkova T, Semyakina A, Svaton M, Fiala O, Pesek M, Minarik M. Detection and Quantification of ctDNA for Longitudinal Monitoring of Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Using a Universal Mutant Detection Assay by Denaturing Capillary Electrophoresis. *Pathol Oncol Res.* 2022; 28:1610308. doi: 10.3389/pore.2022.1610308

Benešová, L. Využití moderních molekulárně-genetických metod v prevenci, časně diagnóze, predikci léčby a prognóze nádorových onemocnění. Disertační práce 2007, Univerzita Karlova v Praze.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014; 6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094

Bhatia V, Varadarajulu S. Endoscopic ultrasonography-guided tissue acquisition: How to achieve excellence. *Dig Endosc.* 2017; 29(4): 417-430. doi: 10.1111/den.12823

Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073-2087.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064

Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(1): 223-228.

Booth AL, Taggart MW, Ono Y, Gonzalez RS. From Mixed Hyperplastic/Adenomatous Polyp to Sessile Serrated Lesion: A Long and Winding Road for Long and Winding Crypts. *Arch Pathol Lab Med.* 2021; 145(10): 1289-1296. doi: 10.5858/arpa.2020-0591-RA

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. The TNM classification of malignant tumours, 8th Edition. Editors: Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, Oxford: Wiley Blackwell 2017, ISBN: 978-1-119-26357-9.

Brown KGM, Solomon MJ, Mahon K, O'Shannassy S. Management of colorectal cancer. *BMJ.* 2019; 366: 14561. doi: 10.1136/bmj.14561

Bulanova Pekova B, Sykorova V, Mastnikova K, Vaclavikova E, Moravcova J, Vlcek P, Lancova L, Lastuvka P, Katra R, Bavor P, Kodetova D, Chovanec M, Drozenova J, Matej R, Astl J, Hlozek J, Hrabal P, Vcelak J, Bendlova B. RET fusion genes in pediatric and

adult thyroid carcinomas: cohort characteristics and prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 2023; 30(12): e230117. doi: 10.1530/ERC-23-0117

Burriss HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. *J Clin Oncol*. 2023; 41(36): 5482-5492. doi: 10.1200/JCO.22.02777

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 1994; 8(1): 27-32. doi: 10.1038/ng0994-27. Erratum in: *Nat Genet* 1994; 8(4): 410.

Caldas C. Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nat Biotechnol*. 2012; 30(5): 408-410. doi: 10.1038/nbt.2213. PMID: 22565966

Cazacu IM, Semaan A, Stephens B, Swartzlander DB, Guerrero PA, Singh BS, Lungulescu CV, Danciulescu MM, Cherciu Harbiyeli IF, Streat I, Popescu C, Saftoiu A, Roy-Chowdhuri S, Maitra A, Bhutani MS. Diagnostic value of digital droplet polymerase chain reaction and digital multiplexed detection of single-nucleotide variants in pancreatic cytology specimens collected by EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc*. 2021; 93(5): 1142-1151.e2. doi: 10.1016/j.gie.2020.09.051

Cortas C, Charalambous H. Tyrosine kinase inhibitors for radioactive iodine refractory differentiated thyroid cancer. *Life (Basel)* 2023; 14: 22. doi: 10.3390/life14010022

COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer). Dostupný online: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue> [Navštíveno 11.1.2025]

Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*. 2011; 2011: 902674. doi: 10.4061/2011/902674

D'Cruz JR, Misra S, Menon G, Shamsudeen S. Pancreaticoduodenectomy (Whipple Procedure). 2024. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. PMID: 32809582.

De Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev*. 2006; 27(5): 535-560. doi: 10.1210/er.2006-0017

De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(7): 1017. doi: 10.3390/cancers11071017

De Rosa M, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Niglio A, Izzo P, Pace U, Delrio P. The biological complexity of colorectal cancer: insights into biomarkers for early detection and personalized care. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016; 9(6): 861-886. doi: 10.1177/1756283X16659790

- Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012; 486(7404):537-540. doi: 10.1038/nature11219
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(45): 16368-16373.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008; 14(9): 985-90. doi: 10.1038/nm.1789
- Fagin JA, Krishnamoorthy GP, Landa I. Pathogenesis of cancers derived from thyroid follicular cells. *Nat Rev Cancer*. 2023; 23(9): 631-650. doi:10.1038/s41568-023-00598-y
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759-767. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i
- Fernandes LC, Kim SB, Matos D. Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging and prognosis of colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(5): 645-648.
- Foretová L, Macháčková E., Gaillyová R *et al.* Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi. Grada Publishing 2022, s. 500, ISBN: 978-80-271-1293-7.
- Gerriets V, Kasi A. Bevacizumab. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2025.
- Gholami G, Aghaee A, Shafiei S, Rasoulia B, Askari E, Zare Namdar S, Zakavi SR. Comparison of 8th and 7th editions of TNM staging in terms of mortality, persistent disease, and response to treatment in patients with differentiated thyroid cancer. *Nuklearmedizin*. 2024; 63(6): 359-368. doi: 10.1055/a-2344-6638
- Ginestà MM, Mora J, Mayor R, Farré A, Peinado MA, Busquets J, Serrano T, Capellá G, Fabregat J. Genetic and epigenetic markers in the evaluation of pancreatic masses. *J Clin Pathol*. 2013; 66(3): 192-7. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201123
- Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, DeNobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E, Kirsch IR. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 12(8): 755-762.
- Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018; 32(19-20): 1267–1284. doi: 10.1101/gad.314617.118
- Grega T, Zavoral M, Suchánek Š. Výsledky a doporučení pro screening karcinomu tlustého střeva. *Vnitr Lek* 2024; 70(8): 484-489. doi: 10.36290/vnl.2024.095

- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 1996; 271(5247): 350-353. doi: 10.1126/science.271.5247.350
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet*. 2000; 37(11): 817-827. doi: 10.1136/jmg.37.11.817
- Hassan C, Antonelli G, Dumonceau JM, Regula J, Bretthauer M, Chaussade S, Dekker E, Ferlitsch M, Gimeno-Garcia A, Jover R, Kalager M, Pellisé M, Pox C, Ricciardiello L, Rutter M, Helsingen LM, Bleijenberg A, Senore C, van Hooft JE, Dinis-Ribeiro M, Quintero E. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2020. *Endoscopy*. 2020; 52(8): 687-700. doi: 10.1055/a-1185-3109
- Havlík R, Loveček M, Klos D, Ghothim M, Neoral Č. Synchronní invazivní duktální adenokarcinomy pankreatu a jejich klinický význam. *Onkologie*. 2010, 4(6), 342-343. ISSN 1802-4475. Dostupné také z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/06/05.pdf> [Navštíveno 11.1.2025]
- He K, Wang Z, Luo M, Li B, Ding N, Li L, He B, Wang H, Cao J, Huang C, Yang J, Chen HN. Metastasis organotropism in colorectal cancer: advancing toward innovative therapies. *J Transl Med*. 2023; 21(1): 612. doi: 10.1186/s12967-023-04460-5
- Hlavsa J, Man M, Kala Z, Procházka V, Svatoň R, Válek V, Vášová I, Novotný I, Stará K, Kiss I, Prášek J. Nádory pankreatu. *Med Pro Praxi* 2008; 5: 388-392.
- Hofmann MH, Gerlach D, Misale S, Petronczki M, Kraut N. Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discov*. 2022; 12(4): 924-937. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1331
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25(5): 579-586. doi: 10.1097/00000478-200105000-00003
- Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol*. 2000; 156(6): 1821-1825. doi:10.1016/S0002-9440(10)65054-7
- Hu Z, Ding J, Ma Z, Sun R, Seoane JA, Scott Shaffer J, Suarez CJ, Berghoff AS, Cremolini C, Falcone A, Loupakis F, Birner P, Preusser M, Lenz HJ, Curtis C. Quantitative evidence for early metastatic seeding in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2019; 51(7): 1113-1122. doi: 10.1038/s41588-019-0423-x

- Chen L, Liu S, Tao Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1): 90. doi:10.1038/s41392-020-0196-9
- Chi KR. The tumour trail left in blood. *Nature.* 2016; 532(7598): 269-271. doi: 10.1038/532269a
- Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer.* 2002; 101(5):403-408. doi: 10.1002/ijc.10635. PMID: 12216066.
- Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, Tsao A, Liu S, Larsen JE, Wang J, Diao L, Coombes KR, Chen L, Zhang S, Abdelmelek MF, Tang X, Papadimitrakopoulou V, Minna JD, Lippman SM, Hong WK, Herbst RS, Wistuba II, Heymach JV, Powis G. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104(3): 228-239. doi: 10.1093/jnci/djr523.
- IJspeert JE, Vermeulen L, Meijer GA, Dekker E. Serrated neoplasia-role in colorectal carcinogenesis and clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(7):401-9. doi: 10.1038/nrgastro
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429): 558-5561. doi: 10.1038/363558a0
- Iyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Suzuki K, Ashizawa M, Ookouchi C, Suzuki S, Mizunuma H, Fukushima T, Suzuki S, Yamashita S. Identification of Three Novel Fusion Oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L2/RET, and PPFIBP2/RET, in Thyroid Cancers of Young Patients in Fukushima. *Thyroid.* 2017; 27(6): 811-818. doi: 10.1089/thy.2016.0673
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1659-1665. PubMed PMID: 11245480.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58(2): 71-96. doi: 10.3322/CA.2007.0010
- Ji P, Chen T, Li C, Zhang J, Li X, Zhu H. Comprehensive review of signaling pathways and therapeutic targets in gastrointestinal cancers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2024; 206: 104586. doi: 10.1016/j.critrevonc.2024.104586
- Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Detection of serum tumor markers in the diagnosis and treatment of patients with pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2004; 3(3): 464-468.
- John S. Současný pohled na léčbu pokročilého/metastatického kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 2020; 14(3): 126–130.

- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 2008; 321(5897): 1801-1806. doi: 10.1126/science.1164368
- Juhlin CC, Mete O, Baloch ZW. The 2022 WHO classification of thyroid tumors: novel concepts in nomenclature and grading. *Endocr Relat Cancer*. 2022; 30(2): e220293. doi: 10.1530/ERC-22-0293
- Kahai P, Mandiga P, Wehrle CJ, Lobo S. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Large Intestine. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
- Khatawkar AV, Awati SM. Thyroid gland - Historical aspects, Embryology, Anatomy and Physiology. *IAIM*, 2015; 2(9): 165-171.
- Kim J, Gosnell JE, Roman SA. Geographic influences in the global rise of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Jan;16(1):17-29. doi: 10.1038/s41574-019-0263-x
- Kim TM, An CH, Rhee JK, Jung SH, Lee SH, Baek IP, Kim MS, Lee SH, Chung YJ. Clonal origins and parallel evolution of regionally synchronous colorectal adenoma and carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6(29): 27725-35. doi: 10.18632/oncotarget.4834. PMID: 26336987; PMCID: PMC4695021.
- Kiss I, Tomášek J. Nová doporučení ESMO pro klinickou praxi u metastatického kolorektálního karcinomu – komentář ke změnám v systémové léčbě. *Klin Onkol* 2023; 36(6): 473-476. doi: 10.48095/ccko2023473
- Kitahara CM, Schneider AB. Epidemiology of Thyroid Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2022; 31(7): 1284-1297. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-21-1440
- Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 16022. doi: 10.1038/nrdp.2016.22. PMID: 27158978
- Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24 Suppl 6: vi64-72. doi: 10.1093/annonc/mdt354
- Lai HF, Hang JF, Kuo PC, Kuo CS, Yao SF, Chen JY, Lee CH. BRAF V600E Mutation Lacks Association with Poorer Clinical Prognosis in Papillary Thyroid Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2024; 31(5): 3495-3501. doi: 10.1245/s10434-024-14935-4
- Landa I, Cabanillas ME. Genomic alterations in thyroid cancer: biological and clinical insights. *Nat Rev Endocrinol*. 2024; 20(2): 93-110. doi: 10.1038/s41574-023-00920-6

- Lauer EM, Mutter J, Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applications, and perspectives for translational research. *Leukemia* 2022; 36(9): 2151-2164. doi: 10.1038/s41375-022-01618-w
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37(3): 646-650.
- Levy M, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, Zavoral M, Minarik M. Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 2012; 32(5): 1621-1626.
- Liggett LA, DeGregori J. Changing mutational and adaptive landscapes and the genesis of cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017; 1867(2): 84-94. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.01.005
- Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA.* 2017; 317(13): 1338-1348. doi:10.1001/jama.2017.2719
- Lipsick J. A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020; 12(2): a035907. doi:10.1101/cshperspect.a035907
- Liu R, Zhu G, Tan J, Shen X, Xing M. Genetic trio of BRAF and TERT alterations and rs2853669TT in papillary thyroid cancer aggressiveness. *J Natl Cancer Inst.* 2024; 116(5): 694-701. doi: 10.1093/jnci/djad265
- Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, Murugan AK, Guan H, Yu H, Wang Y, Sun H, Shan Z, Teng W, Xing M. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(6): E1130-6. doi: 10.1210/jc.2013-4048
- Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis.* 2005; 26(5): 916-922. doi: 10.1093/carcin/bgi044
- Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol.* 2021; 48(1): 10-18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.02.003
- Mabeta P, Steenkamp V. The VEGF/VEGFR Axis Revisited: Implications for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(24): 15585. doi: 10.3390/ijms232415585
- Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv Clin Chem.* 2010; 51: 71-119. doi: 10.1016/s0065-2423(10)51004-7
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361(25): 2449-2460. doi: 10.1056/NEJMra0804588
- Memon A, Rogers I, Paudyal P, Sundin J. Dental X-Rays and the Risk of Thyroid Cancer and Meningioma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Current Epidemiological Evidence. *Thyroid.* 2019; 29(11): 1572-1593. doi: 10.1089/thy.2019.0105

Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019; 17(5.5): 599-601. doi: 10.6004/jnccn.2019.5014.

Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Suchanek S, Cyrany J, Tuckova I, Bures J, Zavoral M, Minarik M. Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(20): 4936-4945. doi: 10.3748/wjg.v22.i20.4936

Mino P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int J Oncol*. 2010; 37(3): 707-718. doi: 10.3892/ijo_00000720

Mitry E, Guiu B, Cosconea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut*. 2010; 59(10): 1383-1388. doi: 10.1136/gut.2010.211557

Mohebati A, Shaha AR. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. *Clin Anat*. 2012; 25(1): 19-31. doi: 10.1002/ca.21220

Moini J, Badolato C, Ahangari R. Epidemiology of Endocrine Tumors, Chapter 1 - Endocrine Glands, Editors: Moini J, Badolato C, Ahangari R, Elsevier 2020, Pages 3-28, ISBN 9780128221877. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/thyroid-gland> [Navštíveno 11.1.2025]

Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010; 2(3): 151-158. doi: 10.4251/wjgo.v2.i3.151

Nam SH, Bae MR, Roh JL, Gong G, Cho KJ, Choi SH, Nam SY, Kim SY. A comparison of the 7th and 8th editions of the AJCC staging system in terms of predicting recurrence and survival in patients with papillary thyroid carcinoma. *Oral Oncol*. 2018; 87: 158-164. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.11.003

Nelsen EM, Buehler D, Soni AV, Gopal DV. Endoscopic ultrasound in the evaluation of pancreatic neoplasms-solid and cystic: A review. *World J Gastrointest Endosc*. 2015; 7(4): 318-327. doi:10.4253/wjge.v7.i4.318

Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW Jr, Alizadeh AA, Diehn M. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014; 20(5): 548-554. doi: 10.1038/nm.3519

Nikiforov YE, Nikiforova MN: Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 569–580.

Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2002; 13(1): 3-16. doi: 10.1385/ep:13:1:03

Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 2002; 10(1): 15-22. doi: 10.1177/106689690201000104

Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 2018; 17: 159-168. doi:10.17179/excli2017-948

Ogura T, Yamao K, Sawaki A, Mizuno N, Hara K, Hijioka S, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Shimizu Y, Bhatia V, Higuchi K, Hosoda W, Yatabe Y. Clinical impact of K-ras mutation analysis in EUS-guided FNA specimens from pancreatic masses. *Gastrointest Endosc.* 2012; 75(4): 769-774. doi: 10.1016/j.gie.2011.11.012

Oler G, Cerutti JM. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer.* 2009; 115(5): 972-980. doi: 10.1002/cncr.24118

Pacas P, Lukáč A. Léčba metastatického kolorektálního karcinomu – 3. a vyšší linie. *Onkologie* 2023; 17(4): 241-245. doi: 10.36290/xon.2023.046

Pankow BG, Michalak J, McGee MK. Adult human thyroid weight. *Health Phys.* 1985; 49(6): 1097-1103.

Patai AV, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(5): 607-15. doi: 10.3748/wjg.v19.i5.607

Pekova B, Sykorova V, Dvorakova S, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Astl J, Vlcek P, Kodetova D, Vcelak J, Bendlova B. RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid.* 2020; 30(12): 1771-1780. doi: 10.1089/thy.2019.0802

Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, Massard C, Cassier PA, Miranda S, Clark J, Denholm KA, Thway K, Gonzalez De Castro D, Attard G, Molife LR, Kaye SB, Banerji U, de Bono JS. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One.* 2012; 7(11):e47020. doi: 10.1371/journal.pone.0047020

Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, Greco A, Pilotti S, Sozzi G. Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996; 16(1): 1-14. doi: 10.1002/(SICI)1098-2264(199605)16:1<1::AID-GCC1>3.0.CO;2-4

Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2059-2072. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065. PMID: 20420946

Pokorná P, Al Tukmachi , Trachtová K, Pálová H, Adamcová S, Koželková K, Múdry P, Pavelka Z, Štěrba J, Slabý O. Využití analýzy fúzních genů metodou cíleného RNA sekvenování jako nástroje pro diagnostiku a terapeutické plánování u dětských pacientů se solidními nádory. *Klin Onkol* 2022; 35(Suppl 1): 107-109. DOI: 10.48095/ccko20221S107

- Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016; 14:211-222. doi: 10.1016/j.csbj.2016.05.004
- Redakce BOD (Brněnských onkologických dnů). Realita léčby kolorektálního karcinomu v roce 2024, *Klin Onkol* 2024; 37(6): 472-476.
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3291-310. doi: 10.1038/sj.onc.1210422
- Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012; 3: 54. doi:10.3389/fendo.2012.00054
- Rosman AS, Korsten MA. Effect of verification bias on the sensitivity of fecal occult blood testing: a meta-analysis. *J Gen Intern Med*. 2010; 25(11):1211-1221. doi: 10.1007/s11606-010-1375-0.
- Rossi ED, Baloch Z. The Impact of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms on Everyday Practice of Cytopathology. *Endocr Pathol*. 2023; 34(1): 23-33. doi: 10.1007/s12022-023-09756-2
- Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. Serum tumor markers in pancreatic cancer-recent discoveries. *Cancers (Basel)* 2010; 2(2): 1107-1124. doi:10.3390/cancers2021107
- Russell MD, Shonka DC Jr, Noel J, Karcioğlu AS, Ahmed AH, Angelos P, Atkins K, Bischoff L, Buczek E, Caulley L, Freeman J, Kroeker T, Liddy W, McIver B, McMullen C, Nikiforov Y, Orloff L, Scharpf J, Shah J, Shaha A, Singer M, Tolley N, Tuttle RM, Witterick I, Randolph GW. Preoperative Evaluation of Thyroid Cancer: A Review of Current Best Practices. *Endocr Pract*. 2023; 29(10): 811-821. doi: 10.1016/j.eprac.2023.05.009
- Ryska M, Strnad R, Belina F, Zavoral M, Sálek C, Hrabal P, Buric I, Lásziková E, Kvicerová H, Jurenka B, Holcátová I. Radikální resekce u nemocných s karcinomem hlavy pankreatu. Retrospektivní analýza přežívání u souboru 307 nemocných [Radical resection in patients with pancreatic head carcinomas. A retrospective survival analysis in a group of 307 subjects]. *Rozhl Chir*. 2007; 86(8): 432-439. Czech.
- Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minarik M. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(27): 3714-3720. doi: 10.3748/wjg.v13.i27.3714
- Salek C, Minarikova P, Benesova L, Nosek V, Strnad R, Zavoral M, Minarik M. Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29(5): 1803-1810.

- Sano W, Hirata D, Teramoto A, Iwatate M, Hattori S, Fujita M, Sano Y. Serrated polyps of the colon and rectum: Remove or not? *World J Gastroenterol* 2020; 26(19): 2276-2285. doi: 10.3748/wjg.v26.i19.2276.
- Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Fusco A. Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(23): 2954-64. doi: 10.1007/s00018-004-4276-8
- Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol.* 1993; 142(5): 1534-1543.
- Shaikh R, Bhattacharya S, Prajapati BG. Microsatellite instability: A potential game-changer in colorectal cancer diagnosis and treatment. *Results in Chemistry* 2024; 7: 101461. doi: 10.1016/j.rechem.2024.101461.
- Shen C, Geng R, Zhu S, Huang M, Liang J, Li B, Bai Y. Characterization of tumor suppressors and oncogenes evaluated from TCGA cancers. *Am J Clin Exp Immunol.* 2024; 13(4): 187-194. doi: 10.62347/XMZW6604
- Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, Marjoram P, Siegmund K, Press MF, Shibata D, Curtis C. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet.* 2015; 47(3): 209-216. doi: 10.1038/ng.3214
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 906: 161-168
- Suchánek Š, Ambrožová M, Grega T, Chloupková R, Hejcmanová K, Ngo O, Májek O, Hejduk K, Dušek L, Zavoral M. Screening kolorektálního karcinomu v České republice – minulost, současnost a budoucnost. *Gastroenterol hepatol* 2024; 78(5): 378-387. doi: <https://doi.org/10.48095/ccgh2024378>
- Sykorova V, Dvorakova S, Vcelak J, Vaclavikova E, Halkova T, Kodetova D, Lastuvka P, Betka J, Vlcek P, Reboun M, Katra R, Bendlova B. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing. *Anticancer Res.* 2015; 35(4): 2029-2036.
- Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell.* 1985; 42(2): 581-588. doi: 10.1016/0092-8674(85)90115-1
- Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E. Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: potential clinical implications. *Med Sci Monit.* 2006; 12(9): RA186-193.
- Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, Atochin I, Link DR, Griffiths AD, Pallier K, Blons H, Bouché O, Landi B, Hutchison JB, Laurent-Puig P. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 2013; 59(12): 1722-1731. doi: 10.1373/clinchem.2013.206359

Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, Higashiyama M, Kodama K, Imamura F, Kato K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(24): 7808-7815. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1712

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993; 260(5109): 816-819. doi: 10.1126/science.8484122

Tie J, Wang Y, Cohen J, Li L, Hong W, Christie M, Wong HL, Kosmider S, Wong R, Thomson B, Choi J, Fox A, Field K, Burge M, Shannon J, Kotasek D, Tebbutt NC, Karapetis C, Underhill C, Haydon A, Schaeffer J, Ptak J, Tomasetti C, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P. Circulating tumor DNA dynamics and recurrence risk in patients undergoing curative intent resection of colorectal cancer liver metastases: A prospective cohort study. *PLoS Med.* 2021; 18(5):e1003620. doi: 10.1371/journal.pmed.1003620

Tivey A, Church M, Rothwell D, Dive C, Cook N. Circulating tumour DNA - looking beyond the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022; 19(9): 600-612. doi: 10.1038/s41571-022-00660-y

Trna J, Kala Z, Kunovský L a kol. *Klinická pankreatologie, 2., přepracované a doplněné vydání 2021.* Maxdorf Jessenius 2021, ISBN 978-80-7345-697-9. Prvních 20 starn dostupných z: https://eshop.maxdorf.cz/user/documents/upload/data/dl/Klinicka-pankreatologie_2-vyd.pdf [Navštíveno 11.1.2025]

ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR), autorský kolektiv: Krejčí D, Mužík J, Dušek L. *Novotvary 2019-2021 ČR, Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice.* Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008447/novotvary2019-2021.pdf> [Navštíveno 11.1.2025]

Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25 Suppl 3: iii1-9. doi: 10.1093/annonc/mdu260. Erratum in: *Ann Oncol.* 2015; 26 Suppl 5:v174-177. doi: 10.1093/annonc/mdv204

Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(41): 11767-1176. doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11767

Vlček P. *Nádory štítné žlázy. Kapitola v monografii: Límanová Z. Štítná žláza. Edice: Trendy soudobé endokrinologie 2, Galén Praha 2006, s. 299–314, ISBN-13:80-7262-400-8.*

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319(9): 525-32. doi: 10.1056/NEJM198809013190901

Wang J, Zhang Z, Liu H, Liu N, Hu Y, Guo W, Li X. Identification of 8 candidate microsatellite instability loci in colorectal cancer and validation of the ACVR2A mechanism in the tumor progression. *Sci Rep.* 2024; 14(1): 14145. doi: 10.1038/s41598-024-62753-1

- Wang X, Gao J, Ren Y, Gu J, Du Y, Chen J, Jin Z, Zhan X, Li Z, Huang H, Lv S, Gong Y. Detection of KRAS gene mutations in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for improving pancreatic cancer diagnosis. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106(12): 2104-11. doi: 10.1038/ajg.2011.281
- Weng YY, Huang MY. The CpG Island Methylator Phenotype Status in Synchronous and Solitary Primary Colorectal Cancers: Prognosis and Effective Therapeutic Drug Prediction. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(10): 5243. doi: 10.3390/ijms25105243
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Wayne JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 1977-1981. doi: 10.1056/NEJM199312303292701
- Wittekind C, Compton C, Quirke P, Nagtegaal I, Merkel S, Hermanek P, Sobin LH. A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status. *Cancer*. 2009; 115(15): 3483-8. doi: 10.1002/cncr.24320
- Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*. 2022; 163(2): 386-402.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2022.03.056
- Worden F. Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2014; 6(6): 267-79. doi: 10.1177/1758834014548188
- Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5(1): 22. doi:10.1038/s41392-020-0116-z
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(12): 6373-6379. doi: 10.1210/jc.2005-0987
- Yang G, Pu J, Zhu S, Shi Y, Yang Y, Mao J, Sun Y, Zhao B. Optimizing Levothyroxine Replacement: A Precision Dosage Model for Post-Thyroidectomy Patients. *Int J Gen Med*. 2024; 17:377-386. doi: 10.2147/IJGM.S438397
- Yang J, Du XL, Li ST, Wang BY, Wu YY, Chen ZL, Lv M, Shen YW, Wang X, Dong DF, Li D, Wang F, Li EX, Yi M, Yang J. Characteristics of Differently Located Colorectal Cancers Support Proximal and Distal Classification: A Population-Based Study of 57,847 Patients. *PLoS One*. 2016; 11(12): e0167540. doi: 10.1371/journal.pone.0167540
- Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M. Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(24): 2897-2908. doi:10.3748/wjg.v17.i24.2897
- Zavoral M, Vojtěchová G, Suchánek Š. Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 2013; 7(4): 172–175.

Zhang BO, Xu CW, Shao Y, Wang HT, Wu YF, Song YY, Li XB, Zhang Z, Wang WJ, Li LQ, Cai CL. Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation. *Exp Ther Med*. 2015; 9(4): 1383-1388. doi: 10.3892/etm.2015.2221

Zhang S, Xiao X, Yi Y, Wang X, Zhu L, Shen Y, Lin D, Wu C. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2024; 9(1): 149. doi: 10.1038/s41392-024-01848-7

Zhang Y, Xing Z, Liu T, Tang M, Mi L, Zhu J, Wu W, Wei T. Targeted therapy and drug resistance in thyroid cancer. *Eur J Med Chem*. 2022; 238: 114500. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114500

Zheng Z, Yu T, Zhao X, Gao X, Zhao Y, Liu G. Intratumor heterogeneity: A new perspective on colorectal cancer research. *Cancer Med*. 2020; 9(20): 7637-7645. doi:10.1002/cam4.3323

Zonta E, Garlan F, Pécuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, Didelot A, Fabre E, Blons H, Laurent-Puig P, Taly V. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0159094. doi: 10.1371/journal.pone.0159094