

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program

Vnitřní nemoci

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

**S100 proteins in inflammatory bowel disease
and colorectal neoplasia**

MUDr. Paula Morávková

Školitel: **Doc. MUDr. Darina Kohoutová, Ph.D.**
Školitel konzultant: **Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc., FCMA**

Hradec Králové, 2019

Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 2019

MUDr. Paula Morávková

Poděkování

Děkuji své školitelce, doc. MUDr. Darině Kohoutové, Ph.D., která se podílela na výběru tématu pro mé postgraduální studium. Děkuji za cenné rady a připomínky, odborné vedení a pomoc se statistickým zpracováním dat. Děkuji za trpělivost, vždy vstřícný a lidský přístup a podporu.

Děkuji prof. MUDr. Janu Burešovi, CSc., FCMA, vedoucímu Katedry interních oborů Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Jako školitel konzultant zaštiťoval celou práci a podílel se na jednotlivých krocích, díky kterým práce mohla vzniknout.

Děkuji Ing. Jaroslavě Vávrové, Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové a RNDr. Marcele Drahošové z Ústavu klinické imunologie a alergologie LF UK a FN Hradec Králové, které provedly měření proteinů S100.

Děkuji prof. MUDr. Marcele Kopáčové, Ph.D. a prof. MUDr. Stanislavu Rejchrtovi, Ph.D., kteří mi umožnili realizaci studie na pracovišti II. interní gastroenterologické kliniky LF UK a FN Hradec Králové.

Děkuji také všem ostatním kolegům a sestřám endoskopického pracoviště II. interní kliniky gastroenterologické LF UK Hradec Králové, kteří se podíleli na získání vzorků.

Děkuji svým blízkým za podporu, pomoc a pochopení.

Paula Morávková

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

O B S A H

1. Seznam použitých zkratk	7
2. Úvod	11
2.1. Sporadický kolorektální karcinom	11
2.1.1. Kolorektální karcinom: incidence a mortalita	11
2.1.2. Charakteristika kolorektálního karcinomu a jeho vývoj	11
2.1.3. Role střevního mikrobiomu v patogeneze kolorektálního karcinomu	14
2.1.4. Kolorektální karcinom: staging a grading	16
2.1.5. Role nesteroidních antiflogistik v chemoprevenci kolorektálního karcinomu	19
2.2. Idiopatické střevní záněty	20
2.3. Proteiny S100	24
2.4. Funkce vybraných proteinů S100 a jejich vztah k idiopatickým střevním zánětům a kolorektálnímu karcinomu	27
2.4.1. Protein S100A4	27
2.4.2. Protein S100A6	28
2.4.3. Proteiny S100A8 a S100A9	30
2.4.4. Protein S100A11	32
2.4.5. Protein S100P	33
3. Cíle disertační práce	36
3.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů	36
3.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu S100A4 pacientů s idiopatickými střevními záněty	36

3.1.2. Určit diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4 v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů	36
3.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií	36
3.2.1. Určit asociaci proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P) s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií	36
3.2.2. Stanovit pozitivní a negativní prediktivní hodnotu proteinů S100 u kolorektálních neoplázií a určit možné klinické využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií	36
4. Metodika	37
4.1. Charakteristika skupin pacientů pro jednotlivé vyšetřované proteiny S100	37
4.1.1. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100A4	37
4.1.2. Charakteristika souboru pro stanovení proteinů S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11	38
4.1.3. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100P	39
4.2. Odběr vzorků a stanovení sérové koncentrace proteinů S100	40
4.3. Informovaný souhlas a Etická komise	41
4.4. Statistické zpracování a hodnocení	41
4.4.1. Protein S100A4	41
4.4.2. Proteiny S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11.....	42
4.4.3. Protein S100P	42

5. Výsledky	59
5.1. Protein S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty	59
5.2. Vybrané proteiny S100 u pacientů s kolorektální neoplázií	65
5.2.1. Protein S100A6	65
5.2.2. Proteiny S100A8 a S100A9	65
5.2.3. Protein S100A11	66
5.3. Protein S100P u pacientů s kolorektálním karcinomem	70
6. Diskuse	75
6.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů	75
6.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií	77
6.2.1. Proteiny S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11	77
6.2.2. Protein S100P a kolorektální karcinom	81
7. Závěry	83
7.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů	83
7.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty	83
7.1.2. Diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4 v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů	83
7.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií	84
7.2.1. Asociace proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P) s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií	84

7.2.2. Stanovení pozitivní a negativní prediktivní hodnoty proteinů S100 u kolorektálních neoplázií a určení možného klinického využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií	84
8. Literatura	85
9. Přílohy	108

1. Seznam použitých zkratek

5-ASA: 5-aminosalicylová kyselina (5-aminosalicylic acid)

AIEC: adherentní a invazivní kmeny *Escherichia coli*

anti-EGFR: protilátka proti receptoru epidermálního růstového faktoru (anti-epidermal growth factor receptor)

APC gen: gen pro adenomatózní polypózu střeva (adenomatous polyposis coli)

CacyBP/SIP: calcyclin binding protein/Siah-1 interacting protein

CaCyBP: calcyclin binding protein

CD: Crohnova choroba (Crohn's disease)

COX-1, COX-2: cyklooxygenasa 1, cyklooxygenasa 2

CpG: 5'-cytozin-fosfát-guanin-3'

CRC: kolorektální karcinom (colorectal cancer)

CtBP1: protein-1 vázající se na C-konec (C-terminal binding protein-1)

DAMPs: molekulární vzory asociované s poškozením, které inciuji a udržují neinfekční zánětlivou odpověď (damage-associated molecular patterns)

DEAE-celulóza: dietyl-aminoetyl celulóza

DSS: dextransulfát sodný

EHEC: enterohemoragická *Escherichia coli*

EMT: epitelo-mezenchymální tranzice

EPEC: enteropatogenní *Escherichia coli*

ERK 1/2: extracelulárně regulovaná kinasa 1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2)

FLOT1: Flotillin-1

FSP1: fibroblast specifický protein 1 (fibroblast specific protein 1)

GSK-3 β : glykogensyntáza kinasa 3 beta (glycogen synthase kinase 3 β)

HSF: faktor teplotního šoku (heat shock factor)

HSP: protein teplotního šoku (heat shock protein)

IBD: idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel disease)

IFN- γ : interferon γ

IL: interleukin

kDa: kilodalton

KRAS: gen kódující protein, který aktivuje signální dráhy regulující růst a dělení buňky (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

LEF: T-cell factor (TCF)-lymphocyte enhancer factor

LOH: ztráta heterozygoty (loss of heterozygosity)

MAPK: mitogenem aktivované proteinkinasy (mitogen-activated protein kinases)

MCR: oblast nahromaděných mutací (mutation cluster region)

MDP: muramyl dipeptid

MDSC: myeloidní supresorová buňka (myeloid-derived supressor cell)

MMR: reparace chybného párování (mismatch repair)

Mts-1: metastatin-1

NF- κ B: nukleární faktor- κ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells)

NLRs: nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptors

NMIIA: non-muskulární myosin IIA

NSAID: nesteroidní antiflogistika (non-steroidal anti-inflammatory drugs)

PGE₂: prostaglandin E₂

PI3KCA: fosfatidylinositol 3-kinasa

PKC: protein kinasa C

PRA: protein asociovaný s receptorem prolaktinu (prolactin receptor associated protein)

PRR: receptory rozeznávající molekulární vzory (pattern-recognition receptors)

Rad54B, Rad51: DNA-dependentní ATP-ázy

RAGE: receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (receptor for advanced glycation end products)

ROR γ t: receptor asociovaný s transkripčním faktorem kyseliny retinové (transcription factor retinoic acid receptor-related orphan receptor)

SAPK/JNK: stresem aktivovaná proteinkináza/c-jun N-terminal kináza (stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase)

SMAD: small mothers against decapentaplegic proteins

SOCE: store-operated Ca²⁺ entry

STRs: krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeats)

TGF- β : transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)

TLR-4: toll-like receptor 4

TNF: tumor nekrotizující faktor

UC: ulcerózní kolidida (ulcerative colitis)

2. Úvod

2.1. Sporadický kolorektální karcinom

2.1.1. Kolorektální karcinom: incidence a mortalita

Sporadický kolorektální karcinom (CRC) představuje v celosvětovém měřítku třetí nejčastější nádorové onemocnění u mužů (po karcinomu plic a prostaty) a druhé nejčastější nádorové onemocnění u žen (po karcinomu prsu) [1]. V České republice je uváděná roční incidence 79/100 tisíc (přibližně 8000 nově diagnostikovaných pacientů ročně, 95/100 tisíc u mužů, 64/100 tisíc u žen) a mortalita 38/100 tisíc (45/100 tisíc u mužů, 31/100 tisíc u žen) [2]. Dostupná statistická data poukazují na pokles incidence a mortality kolorektálního karcinomu, který mezi lety 2003–2014 představoval 16 % v případě incidence kolorektálního karcinomu a v případě mortality kolorektálního karcinomu došlo k poklesu o 37,7 % [3]. I přes významný pokrok v diagnostice a efektivitě screeningového programu v České republice v populaci s nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem tvoří téměř 50 % pacienti v pokročilém klinickém stadiu onemocnění (34/100 tisíc v klin. stadiu III+IV) [zdroj www.svod.cz].

2.1.2. Charakteristika kolorektálního karcinomu a jeho vývoj

Pod pojmem kolorektální karcinom je zahrnuta heterogenní skupina karcinomů postihující tračník a konečník, části gastrointestinálního traktu, které se liší nejen v lokalizaci, ale také v genetickém podkladu vzniku karcinomu, který určuje jejich chování, schopnost tvorby metastáz, odpověď na podanou léčbu, prognózu a celkové přežití pacienta. Dle lokalizace rozlišujeme pravostranný a levostranný kolorektální karcinom. Většina autorů považuje za hranici mezi pravým a levým tračníkem oblast lineární flexury, i když z hlediska embryologického vývoje tračníku je tato hranice posunuta proximálně na rozhraní střední a

distální třetiny colon transversum [4]. Boeckx et al. analyzovali dostupné studie zabývající se vztahem mezi lokalizací primárního karcinomu u metastazujícího kolorektálního karcinomu a odpovědí na podanou onkologickou léčbu, expresi biomarkerů a biologické charakteristiky [5]. Karcinomy pravého tračnicku vykazují vyšší výskyt nestability mikrosatelitů (MSI, microsatellite instability) a vyšší rezistenci na anti-EGFR (anti-epidermal growth factor receptor) terapii, zatímco u karcinomů levého tračnicku jsou častější projevy chromozomální nestability [5]. Na začátku vzniku sporadického kolorektálního karcinomu stojí první mutagenní inzult označovaný jako nádorová iniciace. Obvykle se jedná o mutaci, která navodí vznik neoplastického fenotypu buňky. Následuje tzv. nádorová promoce, která představuje soubor dalších mutací nebo epigenetických změn, které vedou k růstu mutovaného klonu. Proces, kdy je tumor klinicky detekovatelný, je označován jako nádorová progresse [6]. Fearon a Vogelstein v roce 1990 definovali sekvenci adenom → karcinom jako genetický model přeměny normální sliznice tlustého střeva v nádorovou tkáň, podle kterého jsou určité fáze transformace epitelu tlustého střeva přímým důsledkem konkrétních mutací [7]. Základní mutaci, která indukuje proces karcinogeneze u většiny sporadických kolorektálních karcinomů, představuje mutace v APC genu. APC gen (adenomatous polyposis coli) patří mezi tzv. tumor supresorové geny. Jeho produktem je bílkovina, která po vazbě s Axin/Axin-2 a GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β) vytváří komplex, který zajišťuje ubikvitinaci β -kateninu. Ubikvitinace je proces, při kterém se pomocí ubikvitinačního komplexu označí konkrétní bílkovina určená k degradaci. Somatická mutace APC genu v oblasti kodonu 1271-1256 (tzv. mutation cluster region – MCR) má za následek snížení degradace β -kateninu, který je následně translokován do buněčného jádra. V buněčném jádře β -katenin působí jako koaktivátor LEF (T-cell factor (TCF)-lymphocyte enhancer factor) a indukuje transkripci regulačních genů cyclin-D1 a c-Myc [8]. Cyclin-D1 a c-Myc jsou protoonkogeny, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy [9]. Dow et al. poukazují na to, že ztráta genu

APC vede k defektní buněčné diferenciaci, která je závislá na CtBP1 (C-terminal binding protein-1) a vede k iniciaci adenomových změn ve sliznici, zatímco aberantní proliferace

a akumulace β -kateninu v jádře vyžaduje další mutaci KRAS [10 Dow]. Mutace v genu APC jsou časně, mutace supresorového genu TP53 jsou pozdní. Progrese adenomu a následný vznik kolorektálního karcinomu jsou velmi pomalé (zdvojovací čas karcinomu je 620 dní), jedná se o mnohastupňový proces, ve kterém se kromě aktivace Wnt/ β -kateninové signální dráhy uplatňuje rovněž kumulace dalších mutací a epigenetických změn vedoucích k ovlivnění intracelulárních signálních drah jako jsou p53, Ras-Raf-MAPK, PI3KCA a TGF- β /Smad signální dráha [6]. Souhrnně se tyto změny dělí do třech základních typů označovaných jako:

(1) chromozomální nestabilita (CIN) – vede ke strukturálním a numerickým změnám chromozomů, které zahrnují chromozomální a subchromozomální aberace nebo amplifikace a ztrátu heterozygosity (LOH – loss of heterozygosity), která je zjištěná až u 3/4 sporadických kolorektálních karcinomů na chromozomech 5q, 17q nebo 18q [11]; je důsledkem řady mutací vznikajících v průběhu růstu adenomu. Klíčovými geny vedoucími k chromozomální nestabilitě jsou mutace v oblasti tumor supresorových genů jako APC, TP53, TGFBR2 a Smad4 a protoonkogenů KRAS, BRAF a PI3KCA [11, 12].

(2) nestabilita mikrosatelitů (MSI) – je odrazem defektní funkce MMR systému (mismatch repair proteinů), které za normálních okolností zajišťují opravy drobných chyb vzniklých při replikaci DNA. U sporadického kolorektálního karcinomu vznikají jako důsledek somatické mutace hlavních komponent systému MMR: MLH1, MSH2, PMS2 a MSH6. Mikrosatelity, někdy označované i jako STRs (Short Tandem Repeats), představují krátké opakující se sekvence jednoho až šesti párů nukleotidů, které jsou většinou lokalizovány v nekódující části genu [13]. Tyto sekvence jsou díky své uniformitě náchylné k chybám při replikaci DNA. Defektní systém mismatch repair proteinů pak není schopen opravy v oblasti mikrosatelitních

lokusů, a to vede k narušené syntéze nebo úplnému zastavení syntézy produktu takto postiženého genu [6].

(3) CpG metylace – CpG (5'- cytozin – fosfát – guanin – 3') představují dinukleotidové sekvence, které jsou u více než poloviny genů lokalizovány obvykle na jejich 5'-konci, kde jsou označovány jako CpG ostrůvky [14, 15]. Hypermetylace CpG ostrůvku uvnitř promotoru tumor supresorového genu vede k jeho inaktivaci. Mezi geny ovlivněné hypermetylací u kolorektálního karcinomu patří APC, MLH1, MGMT [16].

2.1.3. Role střevního mikrobiomu v patogeneze kolorektálního karcinomu

Tlusté střevo (a to jak na úrovni sliznice, tak i ve střevním lumen) vytváří mimořádně diverzní prostředí pro různé druhy bakterií, které hrají klíčovou roli v patogenezi sporadického kolorektálního karcinomu. Doklady jsou k dispozici z klinických i experimentálních studií [17-19]. Bakterie mohou ovlivňovat střevní prostředí svými enzymatickými aktivitami, produkcí metabolitů jak s prokancerogenními, tak i antikancerogenními účinky, dále syntézou nebo aktivací prokancerogenů (nitrosaminy a další N-nitroso-sloučeniny), či ovlivněním biotransformace xenobiotik [20]. Produkce folátů a biotinu střevními mikrobioty se jeví jako velmi důležitý preventivní faktor [20]. Oba vitaminy jsou zavzaty do epigenetické regulace slizniční proliferace tlustého střeva [20]. Střevní bakterie působí na sliznici tlustého střeva také přímo: ovlivnění složení hlenu, deskvamace sliznice, nebo neuro-humorální regulace [20]. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem bakteriálního původu jsou důležitým energetickým substrátem pro kolonocyty. Obecně lze konstatovat, že nežádoucí jsou především bakterie, které svými metabolickými aktivitami mění primární žlučové kyseliny na sekundární nebo bakterie, které jsou schopny měnit sulfáty na sirovodík [20]. Nejdůležitějším indukovatelným enzymatickým systémem střevních bakterií je beta-glukuronidasa [20]. Tento enzym se podílí na hydrolýze konjugátů kyseliny glukuronové, které slouží k vylučování xenobiotik,

cizorodých látek, které jsou vylučovány z těla a často představují látky s potenciálně karcinogenním účinkem. Pacienti s kolorektálním karcinomem mají aktivitu vysokou a osoby s nízkým rizikem vzniku kolorektálního karcinomu mají naopak aktivitu tohoto enzymu v tlustém střevě nízkou [21]. Dalším klíčovým bakteriálním enzymem je 7-alfa-dehydroxylasa, která v tlustém střevě konvertuje kyselinu cholovou na deoxycholovou kyselinu a chenodeoxycholovou na kyselinu lithocholovou [20]. Tyto sekundární žlučové kyseliny jsou kancerogenní a svým působením přispívají k selekci buněk rezistentních vůči apoptóze a způsobují nežádoucí interakci s některými signálními systémy (secondary messenger signalling systems) [20]. Důležitým faktorem ovlivňujícím enzymatickou aktivitu střevních bakterií představují dietní vlivy. Dieta bohatá na červené maso a živočišné tuky bakteriální aktivitu beta-glukuronidasy stimuluje, naopak fermentovatelná vláknina ji tlumí [20]. Vysokotučná strava zvyšuje koncentraci žlučových kyselin. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, především butyrát, snižují intraluminální pH. Nízké pH tlumí některé nežádoucí bakteriální enzymatické aktivity (beta-glukuronidasa, 7-alfa-dehydroxylasa aj.), dále vede k supresi střevních bakterií produkujících mutagenní a genotoxické látky a stimuluje produkci kolicinů (peptidů a proteinů s doloženým protinádorovým účinkem) [20]. Je zřejmé, že střevní milieu je komplexním metabolickým prostředím. Nízké intraluminální pH, vápník a některé bakteriální produkty (mastné kyseliny s krátkým řetězcem, foláty, biotin aj.) harmonizují proliferaci a vyzrání sliznice tlustého střeva (inhibicí cyklo-oxygenasy a dalšími mechanismy), ovlivňují metylaci DNA, slizniční imunitu a stimuluji apoptózu [20].

2.1.4. Kolorektální karcinom: staging a grading

V klinické praxi u každého pacienta s nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem určujeme stupeň histologické diferenciaci karcinomu, grading a rozsah postižených tkání karcinomem, staging. Stupeň histologické diferenciaci je určený procentuálním zastoupením glandulárních struktur ve tkáni kolorektálního karcinomu. Rozlišujeme tak karcinomy dobře diferencované, G1, s přítomností více než 95 % žlázek, karcinomy středně diferencované, G2, obsahující 50–95 % glandulárních struktur a karcinomy nízké diferencované s méně než 50% zastoupením žlázek [22]. Staging kolorektálního karcinomu je posuzován na základě TNM klasifikace, která určuje hloubku invaze primárního tumoru (T-tumor), postižení regionálních lymfatických uzlin (N-nodus) a přítomnost vzdálených metastáz (M-metastáza), **Tabulka 2.1.4.1.** [23]. Přesné stanovení stagingu kolorektálního karcinomu vede k určení klinického stadia, **Tabulka 2.1.4.2.** Rozsah karcinomu a jeho histologická diferenciaci patří mezi základní kritéria, podle kterých je zvolena léčebná strategie a určena prognóza nemocného. V potaz je třeba dále vzít celkový stav pacienta, jeho věk a preference [23-26].

Primární tumor (T)	
Tx	primární tumor nelze posoudit
T0	primární tumor neprokázán
Tis	carcinoma in situ – intraepiteliální (neinvazivní karcinom; nepřesahující bazální membránu) intramukózní karcinom (invazivní karcinom; nepřesahující lamina muscularis mucosae)
T1	invaze do tunica submucosa
T2	invaze přes lamina muscularis propria
T3	invaze do tunica serosa nebo perirektální tkáň
T4	invaze primárního tumoru na viscerální peritoneum, přilehlé orgány a struktury
Postižení regionálních lymfatických uzlin (N)	
Nx	postižení regionálních lymfatických uzlin nelze hodnotit
N0	neprokázáno postižení regionálních lymfatických uzlin
N1	pozitivní 1-3 regionální lymfatické uzliny
N2	≥ 4 pozitivních regionálních lymfatických uzlin
Přítomnost vzdálených metastáz (M)	
M0	bez přítomnosti vzdálených metastáz
M1	prokázané vzdálené metastázy

Tabulka 2.1.4.1. TNM klasifikace kolorektálního karcinomu [23]

Klinické stadium	TNM klasifikace
Stadium 0	Tis N0 M0
Stadium I	T1-T2 N0 M0
Stadium II	T3-T4 N0 M0
Stadium III	jakékoliv T N1-N2 M0
Stadium IV	jakékoliv T jakékoliv N M1

Tabulka 2.1.4.2. Klinická stadia kolorektálního karcinomu dle TNM klasifikace (NCCN guidelines version 4.2018) [23]

2.1.5. Role nesteroidních antiflogistik v chemoprevenci kolorektálního karcinomu

Chemoprevence představuje jednu z možných alternativ vedoucích k prevenci vzniku kolorektální neoplázie vlivem užívání konkrétních léčiv. Jednou ze strategií je ovlivnění zánětlivých procesů v nádorovém mikroprostředí. Dostupné studie poukazují na příznivý efekt léků ze skupiny nesteroidních antiflogistik (NSAID) zahrnujících kyselinu acetylsalicylovou (aspirin) a non-aspirinová nesteroidní antiflogistika: naproxen, sulindak, celecoxib, likofelon, diklofenak [27-32]. Chemopreventivní účinek je zprostředkovaný supresí aktivity cyklooxygenázy (COX-1 a COX-2), která vede k inhibici syntézy prostaglandinu E2. Ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu má význam blokáda inducibilního enzymu COX-2, který se ve zdravé tkáni tlustého střeva téměř nevyskytuje. Eberhart potvrdil zvýšenou expresi COX-2 ve tkáni kolorektálních adenomů a kolorektálního karcinomu [33]. Zvýšená exprese COX-2 je asociovaná s progresí kolorektálního karcinomu, nádorovou angiogenezou a tvorbou metastáz [34, 35]. Kagbo-Kue et al. nedávno popsali aspirinem indukovanou sníženou expresi TLR-4 (toll-like receptor 4) vedoucí k inhibici tvorby metastáz kolorektálního karcinomu [36]. Zajímavá je práce Hanif et al., kteří ve své práci popsali NSAID zprostředkovanou inhibici proliferace kolorektálního karcinomu nezávislou na prostaglandinech [37]. Zdá se, že tento efekt je zprostředkován remodelací intracelulárního metabolismu vápníku. Za fyziologických podmínek je intracelulární homeostáza vápníku regulovaná prostřednictvím transportních kanálků v plasmatické membráně, membráně endoplasmatického retikula, mitochondrií a jiných buněčných organel. Snížení intracelulární koncentrace vápníku vede k aktivaci transportních mechanismů označovaných jako SOCE (store-operated Ca^{2+} entry), který je vystupňovaný u kolorektálního karcinomu [38, 39]. Změny intracytoplasmatické koncentrace vápníku jsou rozpoznány proteiny vázajícími vápník a jejich prostřednictvím dochází k aktivaci příslušných signálních drah ovlivňujících růst a diferenciaci buňky. V našem přehledovém

člátku jsme poukázali na významné postavení proteinů vázajících vápník ze skupiny proteinů S100 při rozvoji kolorektální neoplázie [40]. Nesteroidní antiflogistika se podílí na regulaci cytoplasmatické koncentrace vápníku a inhibici SOCE, která vede u kolorektálního karcinomu k ovlivnění buněčné proliferace a migrace [41].

2.2. Idiopatické střevní záněty

Idiopatické střevní záněty (IBD) jsou neinfekční chronická zánětlivá střevní onemocnění neznámé etiologie způsobené imunologickou dysregulací. Patří mezi ně ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD). Svou incidencí, která vykazuje tzv. severojižní a západovýchodní gradient [42, 43], jsou idiopatické střevní záněty považovány za onemocnění moderních a vyspělých států s nejvyšší prevalencí v Severní Americe a v západní a severní Evropě [44]. Zatímco v celosvětovém měřítku je incidence ulcerózní kolitidy dlouhodobě stabilní, incidence Crohnovy choroby vykazuje trvale vzestupný charakter. Recentní kohortové studie z Afriky, Asie a Jižní Ameriky však poukazují na zvyšující se incidenci ve vztahu k narůstající industrializaci a urbanizaci i v méně vyspělých státech [45-47]. Etiopatogeneze idiopatických střevních zánětů je multifaktoriální. U geneticky predisponovaného jedince dochází vlivem faktorů zevního prostředí k narušení rovnováhy a bariérových slizničních mechanismů, a k abnormální imunologické odpovědi, což má za následek vznik zánětlivé reakce v trávicím traktu. Je přítomna vystupňovaná imunologická reakce na střevní mikrobiom, který u pacientů s idiopatickými střevními záněty vykazuje známky nestability. Bylo pozorováno nižší zastoupení kmenů *Firmicutes* a *Bacteroides* a vyšší zastoupení kmenů *Enterobacteriaceae*, mukolytických bakterií *Ruminococcus spp.* a adherentních a invazivních kmenů *E. Coli* (AIEC) [48-51]. V reakci na přítomný mikrobiom se uplatňuje systém PRR (pattern-recognition receptors) zahrnující TLR (toll-like receptor) a NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptors) receptory. Toll-like receptory jsou schopny rozeznávat

lipopolysacharidy na povrchu patologických bakterií (TLR-2 a TLR-4 v tenkém střevě) a flagelin bakteriálních bičků (TLR-5 v tlustém střevě) [52]. Receptor NOD2, produkt genu NOD2 identifikovaného v roce 2001, je schopen rozeznat intracelulární MDP (muramyl dipeptid) [53]. MDP je dipeptid, který se nachází v peptidoglykanech gram-pozitivních a gram-negativních bakterií [54]. Vazba MDP s NOD2 aktivuje faktor NF- κ B (Nuclear factor kappa B), který následně aktivuje proces autofagocytózy a kontrolovanou zánětlivou reakci na přítomnost intraluminálního patogenu, která je provázená produkcí cytokinů a antimikrobiálních peptidů [55]. V etiopatogeneze idiopatických střevních zánětů se také uplatňují genetické defekty/mutace vedoucí k alteraci fyziologických slizničních mechanismů. Jostins et al. popsali celkem 163 genů asociovaných s idiopatickými střevními záněty, z nichž 30 bylo asociováno výhradně s Crohnovou chorobou a 23 s ulcerózní kolitidou, 110 genů bylo asociováno s oběma nemocemi [56]. Mutace NOD2 genu vedoucí k poruše funkce NOD2 receptoru paradoxně indukuje zvýšení exprese faktoru NF- κ B, ke které dochází alternativní cestou prostřednictvím nadměrné stimulace TLR-2 [57]. To má za následek nadprodukcii interleukinu 12 a dále excesivní aktivaci Th1 lymfocytů [57]. Vystupňovaná produkce zánětlivých cytokinů (IL-6, IL-1 β , TNF, IL-18) buňkami vrozené imunity vede k diferenciaci naivních T-lymfocytů na efektorové: Th1 lymfocyty (predominantně u Crohnovy choroby s nadprodukcí IL-2 a IFN- γ), Th2 lymfocyty (predominantně u ulcerózní kolitidy s nadprodukcí IL-5 a IL-13), Th9 lymfocyty (produkující IL-9), Th17 lymfocyty (detekovány jak u ulcerózní kolitidy i u Crohnovy choroby, produkující IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, ROR γ t – transcription factor retinoic acid receptor-related orphan receptor) a regulační T-lymfocyty (produkující protizánětlivé cytokiny IL-10, TGF- β) [55]. Produkce zánětlivých cytokinů T-lymfocyty tak přispívá nejen k udržení lokální zánětlivé reakce, ale produkované cytokiny působí chemotakticky na další imunitní buňky, což má za následek jejich přestup do místa

zánětu ze systémové cirkulace a vede k další stimulaci zánětlivé reakce a poškození postižené tkáně [58].

V klinické praxi používáme k popisu Crohnovy choroby mezinárodně uznávanou Montrealskou klasifikaci, která popisuje věk v době diagnózy (A – age), lokalizaci (L – location) a chování Crohnovy choroby (B – behaviour), **Tabulka 2.2.1.** [59]. Význam klasifikace spočívá především k odhalení vysoce rizikových skupin pacientů s Crohnovou chorobou určených k časnému zahájení imunosupresivní nebo biologické léčby. Za rizikové faktory predisponující k těžkému a komplikovanému průběhu Crohnovy choroby je považována manifestace nemoci do 40 let, extenzivní ileokolické postižení vyžadující léčbu systémovými kortikosteroidy v době diagnózy a perianální postižení [60].

Věk v době diagnózy (A)	Specifikace
A1	≤ 16 let
A2	17-40 let
A3	> 40 let
Lokalizace (L)	
L1	ileum
L2	tlusté střevo
L3	ileum a tlusté střevo (ileokolické postižení)
L4	izolované postižení horní části trávicího traktu ¹
Chování (B)	
B1	nestenzující-nepenetrující
B2	stenozující
B3	penetrující
p	perianální postižení ²

Tabulka 2.2.1 Montrealská klasifikace Crohnovy choroby [59]

¹ L4 je modifikátor, který je přidáván samostatně k L1-L3 při postižení trávicího traktu orálně od ilea

² p je modifikátor, který je přidáván k B1-B3 při perianálním postižení

2.3. Proteiny S100

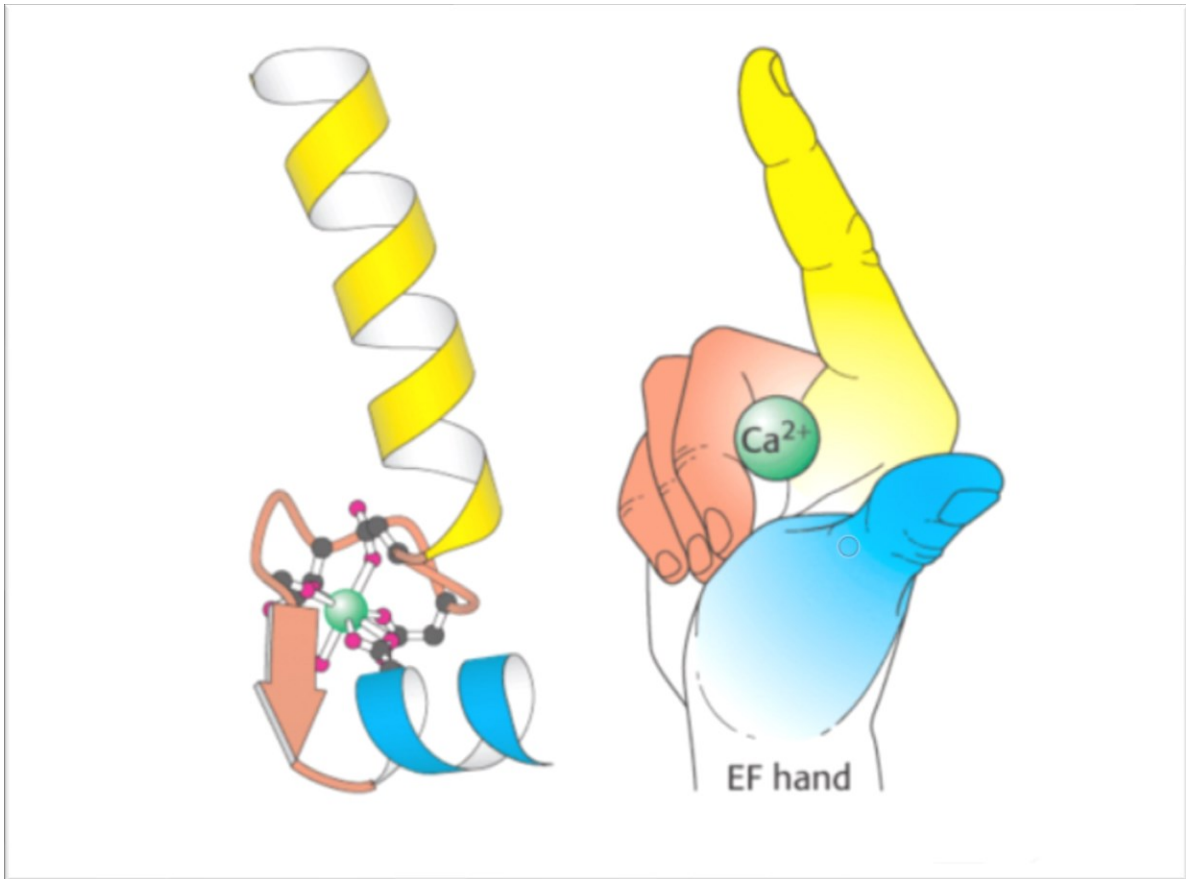
Proteiny S100 představují skupinu malých bílkovin s molekulovou hmotností 9-13 kDa. Patří do rodiny tzv. EF-hand proteinů. Základní strukturální jednotkou je EF-hand motiv, který je složený ze dvou α -helixů „E“ (schopného vázat vápenaté ionty) a „F“. Oba α -helixy jsou navzájem propojeny smyčkou [61, 62]. Typicky jsou vždy dva "EF-hand motivy" uspořádány v párech a tvoří potom základní strukturální jednotku "EF-hand proteinu", monomér, označovaný též jako EF-lobe [61, 63]. Moore a McGregor v roce 1965 jako první publikovali práci, ve které zmiňují „relativně malé acidické“ proteiny. Porovnáním nálezů chromatografie na DEAE-celulóze (diethyl-aminoethyl celulóze) z tkáně králičího mozku a jater prokázali přítomnost dvou proteinů (později specifikovaných jako S100A1 a S100B) vyskytujících se v mozkové tkáni a v minimální koncentraci v jaterní tkáni [64-66]. Název skupiny proteinů S100 je odvozen od jejich rozpustnosti ve 100% roztoku síranu amonného při neutrálním pH [67]. Zvláštní postavení proteinů S100 uvnitř EF-hand rodiny je určeno vlastnostmi, které je odlišují od ostatních EF-hand proteinů:

- **struktura:** zatímco oba α -helixy EF-hand proteinů jsou tvořeny 12 aminokyselinami, u proteinů S100 je tento počet zachován pouze u jednoho helixu, který je označován jako C-konec (kanonický – „cannonical“), který váže ionty vápníku stejným způsobem jako ostatní EF-hand proteiny [62]. Druhý, označovaný jako N-konec (pseudokanonický – „pseudo-cannonical“) je tvořený 14 aminokyselinami. Ten je schopen vazby s ionty vápníku obvykle s nižší afinitou ve srovnání C-terminálním koncem. Tato vazba vede ke konformačním změnám uvnitř daného proteinu S100 - otevření S100 proteinu [63].
- **dimerizace:** proteiny S100 vytvářejí obvykle homodiméry. Příkladem je S100A3, S100A4, S100B a S100P [68-71]. Některé se vyskytují v oligomérní formě jako homotetramér S100A3, oligomér S100A4, hexamér S100A12, homotetramér S100B či homoheksamér S100B [70, 72-74]. Výjimku tvoří protein S100G (kalbindin), vyskytující se výhradně

v monomerní formě. Jeho struktura je zkrácená a neumožňuje dimerizaci [63, 75]. Některé proteiny S100 jsou schopny tyto podjednotky navzájem mezi sebou s různým stupněm afinity vyměňovat a vytvářet tak různě stabilní heterodiméry (S100A1/S100B, S100A8/S100A9) [76, 77].

- **exprese:** proteiny S100 se vyskytují výhradně u obratlovců, jejich exprese je specifická nejen v závislosti na konkrétní tkáni, ale je specifická i buněčně a mnohdy i v závislosti na buněčném cyklu [63, 78]
- **schopnost vazby s ionty vápníku:** zatímco se EF hand proteiny podílejí výhradně na intracelulární transdukcii vápníku, proteiny S100 jsou schopny zprostředkovávat vápníkovými ionty indukované signály i mimo buňku [78]

Schopnost vazby s vápenatými ionty umožňuje proteinům S100 vstupovat do řady procesů uvnitř buňky i extracelulárně [40]. Intracelulárně se podílejí na regulaci kalciové homeostázy, buněčného cyklu, vstupují do procesů buněčného růstu a diferenciaci. Extracelulárně se proteiny S100 podílejí zejména na regulaci buněčné migrace. Santamaria-Kisiel ve své práci dělí kalcium-dependentní funkce proteinů S100 do pěti základních oblastí: (a) regulace fosforylace zprostředkované pomocí proteinkináz, (b) modulace enzymatické aktivity, (c) regulace buněčné motility a tvaru buňky, (d) ovlivňování signálních drah, (e) udržování kalciové homeostázy [78]. Zatímco existuje celá řada cílových receptorů pro jednotlivé proteiny S100, obráceně platí, že jeden a ten samý receptor je receptorem pro více jednotlivých S100 proteinů. Vzájemná interakce se navzájem liší místem vazby proteinu S100 na daný receptor a následně typem indukované signální dráhy. Tento typ reakce navíc podléhá tkáňové a buněčné specifitě působení proteinu S100.



Obr. 2.3.1. Struktura S100 proteinů

Zdroj: Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ jr., Stryer L (eds). Biochemistry. 8th Ed. New York: WH Freeman & Co, 2015. ISBN-13: 978-1-4641-2610-9.

2.4. Funkce vybraných proteinů S100 a jejich vztah k idiopatickým střevním zánětům a kolorektálnímu karcinomu

2.4.1. Protein S100A4

Protein S100A4, známý také jako metastin-1 (Mts-1), p9Ka, FSP1 (fibroblast specific protein1) nebo kalvaskulin, je lokalizován v buněčném jádře, cytoplasmě nebo extracelulárně. Barraclough et al. v prokázali v roce 1982 zvýšenou expresi acidického proteinu s molekulovou hmotností 9 kDa v myoepiteliálních mammárních buňkách a později doložili jeho podobnost s S100 proteiny [79, 80]. Ebraldze v roce 1989 popsal zvýšenou expresi genu Mts-1 v metastatických buňkách karcinomu prsu, která byla projevem jejich zvýšeného metastatického potenciálu [81]. Fyziologicky se protein S100A4 vyskytuje ve fibroblastech, makrofázích, lymfocytech a v buňkách kostní dřeně. Podobně jako jiné proteiny S100 i S100A4 vstupuje do regulace buněčných mechanismů na více úrovních v závislosti na své lokalizaci, která může být extracelulární i intracelulární [40]. Intracelulárně se vyskytuje jak v buněčném jádře, tak v cytoplasmě. Extracelulárně lokalizovaný protein S100A4 vazbou s RAGE (receptor for advanced glycation end products) vede k aktivaci MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases/ extracellular-regulated kinase) signální dráhy, která se podílí na buněčné proliferaci a vyžívání [82]. V nádorovém mikroprostředí působí protein S100A4 chemotakticky na imunitní buňky a ovlivňuje tak nepřímo sekreci zánětlivých cytokinů, které se podílejí na progresi tumoru, nádorové angiogeneze a prometastatické aktivitě nádorových buněk [82]. Vazba s RAGE vede současně k translokaci intracelulární frakce proteinu S100A4 do buněčného jádra, kde ovlivňuje transkripci genů důležitých pro regulaci buněčné migrace a invaze [83]. Boye et al. prokázali horší prognózu u pacientů s kolorektálním karcinomem, jehož imunohistochemický profil se vyznačoval vyšší nukleární expresí genu S100A4 [84]. Gen S100A4 je považován za přímý transkripční cíl β -kateninu [85]. Intracelulárně se protein

S100A4 prostřednictvím protein kinázy C (PKC) rovněž podílí na fosforylaci těžkých řetězců NMIIA (non-muskulární myosin IIA) [86]. Studie dokazují, že protein S100A4 se uplatňuje nejen v oblasti nádorové progresy, ale hraje roli v regulaci nenádorových onemocnění jako revmatoidní artritida, idiopatické zánětlivé myopatie, plicní arteriální hypertenze, a hypertrofická kardiomyopatie [82]. Cerezo et al. doložili zvýšenou produkci zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β a IL-6) po stimulaci periferních mononukleárních buněk proteinem S100A4. Tato reakce byla zprostředkována vazbou s TLR-4 a aktivací faktoru NF- κ B [87]. Je dokumentováno, že aberantní TLR signalizace a stimulace faktoru NF- κ B se uplatňují i v regulaci zánětlivé odpovědi ve sliznici postižené idiopatickým střevním zánětem. Cunningham et al. prokázali zvýšenou expresi S100A4 ve fibroblastech a imunitních buňkách v resekátech ilea u pacientů s Crohnovou chorobou a demonstrovali TGF- β 1 indukovanou zvýšenou expresi S100A4 [88].

2.4.2. Protein S100A6

Protein S100A6 je známý také jako kalcyklin. V literatuře je uváděn též pod synonymy 2A9, 5B10, CABP, CaCy či PRA (prolactin receptor associated protein) [89]. První zmínka v souvislosti s proteinem S100A6 je uvedena v práci Hirchhorna z roku 1984 [90]. Autor popsal *in vitro* zvýšenou expresi 2A9 mRNA v G1 buněčné fázi ve stimulovaných buněčných klonech z ledvin hlodavců a poukázal na jeho podíl v regulaci buněčné proliferace [90]. Kuźnicki a Filipek izolovali samotný protein S100A6 (CABP) z buněk Ehrlichova ascitického tumoru a později prokázali jeho interakci s CacyBP/SIP (calcyclin binding protein/Siah-1 interacting protein) [91, 92]. CacyBP/SIP hraje významnou roli v ubikvitinaci β -kateninu a podílí se na regulaci proliferace a diferenciace buněk. Protein S100A6 se přirozeně vyskytuje ve fibroblastech, myofibroblastech, endoteliálních buňkách a je exprimován také v epiteliálních buňkách tlustého střeva [93]. V jedné ze studií provedené na našem pracovišti Stulík a kolektiv

dokumentovali zvýšenou expresi S100A6 ve tkáni adenomů a kolorektálního karcinomu ve srovnání s normální sliznicí tlustého střeva, která korelovala s maligním potenciálem kolorektální neoplázie [94]. Autoři popsali zvýšenou expresi S100A6 nejen v invazivních okrajích kolorektálního karcinomu, ale i v mikrometastatických ložiskách pojivové tkáně. Nepřímo tak prokázali úlohu proteinu S100A6 v regulaci proliferace a ovlivnění invazivního potenciálu buněk kolorektálního karcinomu [94]. Duan později demonstroval vliv S100A6 v regulaci buněčné proliferace a migrace prostřednictvím aktivace MAPK (mitogen-activated protein kinase) signální dráhy [95]. MAPK představuje soubor proteinů podílejících se na regulaci proliferace a diferenciaci buňky a regulaci karcinogenezy, který zahrnuje ERK (extracellular-regulated kinase), p38 kinázu a SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase). S100A6 indukovaná proliferace je zprostředkována aktivací ERK, zatímco migrace je důsledkem změn aktivity p38 kinázy [95]. Dalším významným pojítkem proteinu S100A6 ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu je jeho interakce s β -kateninem a tumor supresorovým genem TP53. Kilańczyk pozoroval zvýšenou intracytoplasmatickou a nukleární imunohistochemickou pozitivitu proteinu S100A6 a β -kateninu v buňkách kolorektálního karcinomu ve srovnání s periferní expresí obou proteinů v buňkách normální tlustostřevní sliznice a poukázal na možnou přímou regulaci syntézy proteinu S100A6 β -kateninem [96]. Nedávno Feng et al. publikovali výsledky z experimentů na lidských buněčných liniích kolorektálního karcinomu, které potvrzují účinek S100A6 na kalcium-dependentní translokaci CacyBP/SIP (calyculin binding protein/Siah-1 interacting protein) z cytoplasmy do buněčného jádra [97]. Intranukleární translokace CacyBP/SIP je spojena s proliferací buněk kolorektálního karcinomu [98].

2.4.3. Proteiny S100A8 a S100A9

Proteiny S100A8 a S100A9 jsou známé pod synonymy kalgranulin A a kalgranulin B a rovněž jako MRP8 a MRP14. Oba proteiny jsou exprimovány myeloidními buňkami – neutrofily a monocyty, nacházejí se ale také v makrofázích, supresorových myeloidních buňkách (MDSC – myeloid-derived suppressor cell) a jejich exprese byla popsána i v epiteliálních a nádorových buňkách [99, 100]. Za fyziologických podmínek vytváří tyto proteiny uvnitř buňky heterodiméry, jejichž tvorba je nezávislá na přítomnosti iontů vápníku. Následná vazba s vápenatými ionty vede k vytvoření heterotetramérů S100A8/S100A9 (tvořených dvěma proteiny S100A8 a dvěma proteiny S100A9) známých také jako kalprotektin, který je uvnitř buňky schopen vazby s buněčnými mikrotubuly. Tato vazba vede k jejich polymerizaci [101]. Podílí se tak na utváření cytoskeletonu buňky a tím ovlivňuje její migrační schopnosti. Kromě vazby s ionty vápníku je kalprotektin schopen vazby s ionty zinku a manganu, což je determinantou jeho antimikrobiálních vlastností [102, 103]. Jedním z mechanismů antimikrobiálního působení kalprotektinu je jeho excesivní uvolnění do střevního lumen, kde se uplatňuje právě jeho vysoká afinita k výše zmíněným iontům, které slouží jako mikronutrienty pro střevní bakterie. Jejich „spotřebování“ po vazbě s kalprotektinem vede následně k inhibici bakteriálního růstu. Kromě zajištění této „nutriční imunity“ se kalprotektin významně podílí na regulaci zánětlivých procesů a regulaci imunitní odpovědi v místě zánětu. Po aktivaci neutrofilů a/nebo po adhezi monocytů k endotelu dochází k jeho extracelulární sekreci. Sekrece kalprotektinu může být pasivní – z rozpadlých myeloidních buněk v místě zánětu nebo aktivní, mediovaná ionty vápníku, nezávislá na funkci Golgiho aparátu [104]. Ve vztahu k idiopatickým střevním zánětům je kalprotektin řazen mezi DAMPs (damage-associated molecular patterns). DAMPs zahrnují strukturálně odlišné nepatogenní látky, které jsou schopny vazby s PRRs a jsou uvolňovány pasivně do extracelulárního prostoru po rozpadu buněk v důsledku nekrózy a nekroptózy. Také mohou být uvolňovány aktivně, a to stresem

indukovanými buňkami nezávisle na endoplasmatickém retikulu a/nebo Golgiho aparátu, což vede v extracelulárním prostředí ke změně jejich fyziologické funkce ve funkci proinflamatorní [105]. Prozánětlivé působení kalprotektinu je zprostředkované jeho vazbou s glykosaminoglykany a s RAGE cévního endotelu v místě zánětu, která umožňuje migraci myeloidních buněk do místa zánětu [106, 107]. Vazba kalprotektinu s TLR-4 na povrchu epitelálních a myeloidních buněk vede k aktivaci faktoru NF- κ B [108]. Funkce kalprotektinu v mediaci zánětu je tedy komplexní, kdy na jedné straně působí protektivně ovlivněním nutriční imunity uvnitř trávicího traktu a na druhé straně se podílí na sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β a IL-6. Okada poukázal na vyšší expresi S100A9 mRNA v makrofázích rekta u myši s indukovanou ulcerózní kolitidou [109]. Je zajímavé, že hodnoty S100A9 mRNA byly vyšší než S100A8 mRNA a potažmo S100A8/A9 mRNA [109]. Tyto vyšší hodnoty byly pozorovány pouze v rektu na rozdíl od jiných částí tlustého střeva [109]. Nedávno tito autoři publikovali práci, ve které poukazují na možný antiinflamatorní efekt S100A8 vedoucí ke snížení exprese IL-6 mRNA [110]. Vztah kalprotektinu ke kolorektálním neopláziím zmiňujeme ve studii z našeho pracoviště již v roce 1999 v práci Stulíka et al., který potvrdil vyšší tkáňovou expresi proteinů S100A8 a S100A9 u kolorektálního karcinomu ve srovnání s expresí těchto proteinů v přilehlé normální tlustostřevní sliznici [111, 112]. Další práce dokládají asociaci zvýšené tkáňové exprese obou proteinů se stupněm diferenciaci kolorektálního karcinomu a přítomností lymfatických a vzdálených metastáz i velikostí tumoru [113-115]. Směrem ke kancerogeneze je efekt kalprotektinu závislý na jeho tkáňové koncentraci: vysoké koncentrace S100A8/S100A9 působí apoptoticky na nádorové buňky, zatímco nízké koncentrace kalprotektinu vedou k potenciaci nádorového růstu a stimulaci buněčné migrace [116-118]. Duan potvrdil zvýšenou expresi β -kateninu vlivem působení S100A8 a S100A9, a tím jejich podíl na regulaci Wnt/ β -kateninové dráhy [113]. Ang et al. srovnával expresi S100A8 a S100A9 ve stromálních buňkách obsažených ve tkáni

kolorektálního karcinomu v závislosti na jejich Smad4 statusu [115]. U Smad4-negativních karcinomů byla pozorovaná významná redukce S100A8-pozitivních stromálních buněk, zatímco podíl S100A9-pozitivních stromálních buněk ve tkáni kolorektálního karcinomu se nezměnil. Je dokumentováno, že alterace TGF- β /Smad signální dráhy je asociovaná s nádorovou progresí [119]. *In vitro* zkoušky potvrdili efekt S100A8 a S100A9 na migrační a proliferační potenciál nádorových buněk, který byl zprostředkován RAGE-dependentní aktivací Smad4 [115]. Další možné působení kalprotektinu v mediaci nádorové progresi u kolorektálního karcinomu je RAGE-dependentní aktivace NF- κ B, která se pravděpodobně podílí i na vzniku kolorektálního karcinomu asociovaného s ulcerózní kolitidou [118, 120].

2.4.4. Protein S100A11

Protein S100A11 (kalgizarrin, S100C) byl objeven DeVriesovou v roce 1989 [121]. Fyziologicky je exprimován v placentě, srdci, plicích a ledvinách, v malém množství se vyskytuje také v příčně pruhované svalovině, játrech a v mozkové tkáni [122]. Protein S100A11, podobně jako ostatní proteiny S100, nevykazuje enzymatickou aktivitu. Jeho působení je tedy zprostředkované vazbou s jinými cílovými proteiny nebo receptory, což vede k jejich konformačním změnám a aktivaci cílových signálních drah. Intracelulárně je za fyziologických podmínek S100A11 lokalizován predilekčně v buněčném jádře, zatímco u nádorových buněk dochází k jeho translokaci do buněčné cytoplasmy [93]. Protein S100A11 se podílí na regulaci buněčného růstu dvojím způsobem: intranukleárně v důsledku zvýšené koncentrace Ca²⁺ a působením TGF- β se S100A11 podílí na inhibici syntézy DNA, která vede následně k inhibici buněčného růstu [123], zatímco extracelulárně lokalizovaný protein S100A11 vazbou s RAGE působí jako růstový stimulátor [124]. Extracelulární sekrece S100A11 je zajišťovaná intaktní sítí mikrotubulů a probíhá nezávisle na endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu [125]. Další funkce proteinu S100A11 jsou zprostředkovány jeho

interakcí s annexinem I a annexinem II. Annexiny patří mezi proteiny schopné vazby s vápníkem, které se podílejí na procesech exocytózy, formování iontových kanálů plasmatické membrány, buněčné apoptóze a nádorové proliferaci [125]. Heterokomplex S100A11-annexin I hraje roli při regulaci motility a přežívání nádorových buněk [126]. Buňky kolorektálního karcinomu vykazují zvýšenou expresi proteinu S100A11 ve srovnání s normální tlustostřevní sliznicí [112, 127, 128]. Niu et al. poukázali na translokaci S100A11 do buněčného jádra u pokročilých kolorektálních karcinomů a kolorektálních karcinomů s metastatickým potenciálem [129]. Obě intracelulární frakce proteinu S100A11 (cytoplasmatická a nukleární) vedly k aktivaci Smad signální dráhy prostřednictvím zvýšené exprese FLOT1 (Flotillin-1) a histonu H1 a aktivace této signální dráhy vedla ke zvýšené expresi LASP1 (LIM a SH3 protein 1) [129]. FLOT-1, H1 a LASP1 patří mezi proteiny, které se podílejí na procesu EMT (epithelial-mesenchymal transition). EMT je biologický proces, při kterém epiteliální buňky ztrácejí buněčnou polaritu a získávají fenotyp mezenchymálních buněk schopných migrace a invaze [130]. Je zajímavé, že vazba LASP1-S100A11 vede ke stabilizaci a další zvýšené expresi samotného proteinu S100A11 [129].

2.4.5. Protein S100P

Protein S100P byl poprvé izolován v roce 1992 z buněk lidské placenty [131, 132]. Na rozdíl od většiny proteinů S100, kterých geny jsou lokalizované na chromozomu 1q21, je gen pro protein S100P (společně s genem pro S100B, S100G a S100Z) lokalizován na chromozomu 4p16 [133, 134]. V přítomnosti vápenatých iontů je protein S100P schopen interakce s mnoha proteiny, které se podílejí na regulaci buněčné migrace a proliferace [135]. Fyziologicky se protein S100P vyskytuje ve vysoké koncentraci v plicích, srdci, slezině, příčně pruhovaných svalech a v leukocytech. V nižších koncentracích byl také prokázán v jaterní tkáni, thymu, prostatě a ovariu [136]. Role proteinu S100P v kancerogenezi a nádorové progresi je

komplexní, neboť S100P vstupuje do procesu kancerogeneze hned na několika úrovních. Regulace buněčné proliferace a přežívání nádorových buněk je jednak odrazem autokrinního působení proteinu, kdy S100P vyloučený extracelulárně vede po vazbě s RAGE k aktivaci faktoru NF- κ B a ERK1/2 (extracellular regulated kinase 1/2) [137, 138] a podílí se na indukci AP-1 dependentní exprese onkogenní mi-RNA-21 [139]. Intracelulárně lokalizovaný S100P je schopen vazby s CaCyBP (calcyclin binding protein) a E3-ubiquitin ligázou. E3-ubiquitin ligáza se podílí na regulaci degradace β -kateninu a na regulaci dalších proteinů důležitých pro kolorektální kancerogenezi jako p53, Smad-1, HSP70 (heat shock protein 70), HSP90, HSF1 (heat shock factor 1) [140]. Absence účinku E3-ubiquitin ligázy, k níž dojde po vazbě s proteinem S100P, má za následek snížené odbourávání β -kateninu a abnormální transkripci proto-onkogenů cyklin-D1 a c-Myc [9, 140]. Protein S100P vstupuje také do procesů ovlivňujících buněčnou migraci. Intracelulárně je protein S100P po vazbě s ezrinem schopen aktivovat jeho funkci. Ezrin/radixin/moezin je transmembránový protein, který interakcí mezi aktinovými filamenty cytoplasmy a plasmatickou membránou ovlivňuje migrační schopnost buňky [141, 142]. Leiphrakpam et al. popsali zvýšenou expresi p-ezrinu v buňkách kolorektálního karcinomu v jaterních metastázách [143]. Dalšími proteiny, které interagují s proteinem S100P, a podílejí se na ovlivnění buněčné migrace jsou NMII (non-muskulární myosin II), integrin α 7 a extracelulárně katepsin Z, jehož aktivace vazbou s S100P vede k poruše adhezivních mechanismů buňky, které následně usnadňují její migrační schopnosti [140]. Parkkila et al. demonstrovali zvýšenou expresi proteinu S100P v epiteliálních buňkách všech etáží sliznice tlustého střeva s nejvyšší imunohistochemickou pozitivitou na povrchu Lieberkühnových krypt [144]. Další práce prokázaly vyšší expresi proteinu S100P ve tkáni kolorektálního karcinomu ve srovnání s jeho expresí ve zdravé sliznici tlustého střeva [137, 145-149]. Lin et al. v roce 2017 popsali zvýšenou expresi S100P na základě působení Trx-1 (tioredoxin-1) v oblasti promotoru genu S100P v buňkách kolorektálního karcinomu a regulaci

této exprese pozitivní zpětnou vazbou [150]. Thioredoxinový systém (TrxR/Trx: thioredoxin reduktáza/thioredoxin) se podílí na regulaci mnoha buněčných mechanismů: inhibuje buněčnou apoptózu, ovlivňuje intracelulární produkci volných kyslíkových radikálů a podílí se na regulaci proliferace nádorových buněk. Stejný kolektiv autorů publikoval nedávno práci, ve které popisuje Trx-1/S100P zprostředkovanou nadprodukcí S100A4, která vedla k indukci EMT (epithelial-mesenchymal transition) u buněk kolorektálního karcinomu [151]. Podíl proteinu S100P na vzniku kolorektálního karcinomu a doložená vyšší tkáňová exprese u kolorektálního karcinomu nabízí využití proteinu S100P nejenom léčebně jako jednu z potenciálních cílových molekul k ovlivnění nádorové progresy, ale současně i jako možný diagnostický a prognostický biomarker [152-154].

3. Cíle disertační práce

3.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů

3.1.1. Stanovení diagnostického přínosu sérové koncentrace proteinu

S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty

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

Předpoklad: nulovou hypotézu bude možno zamítnout.

3.1.2. Určit diagnostický přínos sérových koncentrací proteinu S100A4

v predikci jednotlivých fenotypů a tíže idiopatických střevních zánětů

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

Předpoklad: nulovou hypotézu bude možno zamítnout.

3.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií

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

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

Předpoklad: nulovou hypotézu bude možno zamítnout.

3.2.2. Stanovit pozitivní a negativní prediktivní hodnotu proteinů S100

u kolorektálních neoplázií a určit možné klinické využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií

4. Metodika

Pro stanovení jednotlivých proteinů S100 byly vybrány tři soubory: pacienti s kolorektální neoplázií, nemocní s idiopatickým střevním zánětem (ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou) a kontrolní zdravé osoby s normálním nálezem při koloskopii. Celkem bylo zahrnuto 253 osob: 40 jedinců ve skupině kontrol (**Obr. 4.1.1.- 4.1.8.**), 16 pacientů s ulcerózní kolitidou (**Obr. 4.2.1.-4.2.3.**), 93 nemocných s Crohnovou chorobou (**Obr. 4.3.1.-4.3.6.**), 20 osob s nepokročilým kolorektálním adenomem (**Obr. 4.4.1.-4.4.2.**), 22 pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem (**Obr. 4.5.1.-4.5.2.**) a 62 nemocných s kolorektálním karcinomem (**Obr. 4.6.1.-4.6.4.**). Do skupiny kontrol byly zařazeny zdravé osoby s normálním koloskopickým nálezem. Tito jedinci měli negativní osobní anamnézu kolorektální neoplázie a idiopatických střevních zánětů a patřili do populace s průměrným rizikem pro vznik kolorektálního karcinomu.

4.1. Charakteristika skupin pacientů pro jednotlivé vyšetřované proteiny S100

4.1.1. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100A4

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

pacienti užívali současně imunosupresivní léčbu – azathioprin. Žádný z pacientů s ulcerózní kolitidou nebyl léčený blokátory tumor nekrotizujícího faktoru α (anti-TNF- α). Trvání Crohnovy choroby bylo 1-39 let, průměr 15 ± 9 . Tři pacienti s Crohnovou chorobou byli v době vyšetření bez farmakoterapie, 46 nemocných bylo léčeno kyselinou 5-aminosalicylovou a 44 osob užívalo imunosupresivní léčbu (systémové glukokortikoidy a/nebo azathioprin a/nebo protilátky proti tumor nekrotizujícímu faktoru α a/nebo cyklosporin). Celkem 18 % (17/93) pacientů s Crohnovou chorobou bylo léčeno blokátory TNF- α : 4 nemocní byli léčeni adalimumabem a 13 osob infliximabem. V době odběru bylo šest pacientů ze skupiny s Crohnovou chorobou léčeno antibiotiky (ciprofloxacinem a/nebo metronidazolem): jeden nemocný ze skupiny léčené mesalazinem a pět osob s konkomitantní imunosupresivní léčbou. Pacienti s Crohnovou chorobou byli klasifikováni dle Montrealské klasifikace, **Tabulka 2.2.1.** [59] a rozdělení do jednotlivých podskupin dle chování a lokalizace nemoci, **Tabulka 4.1.1.**

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

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

v osobní anamnéze. Pokročilý adenom byl definován jako jakýkoliv adenom velikosti ≥ 10 mm a/nebo jakýkoliv kolorektální adenom s potvrzeným vysokým stupněm intraepiteliální neoplázie a/nebo histologicky potvrzenou vilózní komponentou [155]. Popisná statistika je uvedena v **Tabulce 4.1.2.**

4.1.3. Charakteristika souboru pro stanovení proteinu S100P

Soubor pacientů pro stanovení sérové koncentrace proteinu S100P zahrnoval celkem 79 jedinců, kteří byli rozděleni do skupiny kontrol a skupiny s kolorektálním karcinomem. Kontrolní skupina zahrnovala 36 zdravých jedinců (14 mužů, 22 žen ve věku 23-80 let, průměr 55 ± 14), které měli normální koloskopický nálezn, negativní osobní anamnézu kolorektální neoplázie a/nebo idiopatického střevního zánětu a patřili do populace s průměrným rizikem kolorektálního karcinomu. Skupina s kolorektálním karcinomem zahrnovala 43 pacientů (20 mužů a 23 žen ve věku 46-86 let, průměr 67 ± 11). Podíl nemocných ve skupině s kolorektálním karcinomem lokalizovaným v pravé části tračníku představoval 30 % (13/43). Pacienti s karcinomem v levé části tračníku tvořili 70 % (30/43) všech pacientů s kolorektálním karcinomem. Za hranici mezi pravým a levým tračníkem byla považovaná lienální flexura. Pacienti s kolorektálním karcinomem byli klasifikováni dle TNM klasifikace, NCCN guidelines version 4.2018 a stupně diferenciac (gradingu) tumoru [22, 23]. Stupeň diferenciac byl hodnocený u 74 % (32/43) pacientů z chirurgického resektátu, 19 % (8/43) nemocných nebylo indikovaných k radikální chirurgické resekcii a stupeň diferenciac byl u těchto pacientů hodnocen z odebraných bioptických vzorků. U 7 % (3/43) pacientů nebyl stupeň diferenciac karcinomu z odebraných bioptických vzorků primárně hodnotitelný: u dvou osob došlo po neoadjuvantní léčbě ke kompletní regresi karcinomu a v resektčním materiálu karcinom nebyl přítomný, u jednoho pacienta byl v resektátu popsán středně diferencovaný kolorektální karcinom v terénu pilovitého adenomu. Tito tři nemocní ze skupiny s kolorektálním

karcinomem nebyli do jednotlivých subanalýz dle gradingu onemocnění zahrnuti. Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem dle gradingu přítomného karcinomu jednotlivé podskupiny zahrnovaly 11 % (5/43) nemocných s dobře diferencovaným karcinomem (G1), 56 % (24/43) se středně diferencovaným karcinomem (G2) a 26 % (11/43) s nízkým stupněm diference (G3). U 7 % (3/43) nebyl stupeň diference hodnotitelný (viz výše). Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem podle stadiu onemocnění jednotlivé podskupiny zahrnovaly 21 % (9/43) nemocných v klinickém stadiu I, 16 % (7/43) v klinickém stadiu II, 30 % (13/43) v klinickém stadiu III a 30 % (13/43) v klinickém stadiu IV. Do subanalýzy podskupin dle klinického stadia kolorektálního karcinomu nebyl zařazen jeden pacient, u kterého v době statistického zpracování nebylo možné dle dostupných zobrazovacích metod přesné určení klinického stadia. Základní popisná statistika je shrnuta v **Tabulce 4.1.3.**

4.2. Odběr vzorků a stanovení sérové koncentrace proteinů S100

Sérové koncentrace jednotlivých proteinů S100 byly stanoveny ze vzorků periferní žilní krve, která byla odebrána při zavádění periferní žilní kanyly před diagnostickou a/nebo terapeutickou koloskopií na oddělení endoskopií II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky pro stanovení proteinů S100A4, S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 byly ihned po odběru transportovány na Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zde byly vzorky centrifugovány (2000 otáček/minutu po dobu 10 minut) a získaná séra byla uskladněna při -80°C až do stanovení. Vzorky periferní žilní krve pro měření proteinu S100P byly ihned po odběru transportovány na Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zde byla provedena centrifugace vzorků (2500 otáček/minutu po dobu 15 minut) a získaná séra byla

uskladněna při -30°C do doby stanovení. Stanovení sérových koncentrací proteinů S100 bylo provedeno metodou ELISA za použití souprav Human Protein S100-A4 ELISA Kit (MyBio Source, San Diego, Kalifornie, USA), ELISA Kit for Calcium Binding Protein A6/S100A6, A8/S100A8, A9/S100A9, A11/S100A11 (Wuhan USCN, Čína) a CircuLex S100P ELISA Kit CY-8060 (CycLex Co., Nagano, Japonsko).

4.3. Informovaný souhlas a Etická komise

Všechny osoby zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas (**Příloha 1**), projekt byl schválený Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Realizace studie a zpracování získaných dat bylo provedeno v souladu s Metodickým návodem Ministerstva zdravotnictví České republiky (*k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírky o péči o zdraví lidu v platném znění*).

4.4. Statistické zpracování a hodnocení

4.4.1. Protein S100A4

Získané výsledky měření proteinu S100A4 byly hodnoceny metodami popisné statistiky. U jednotlivých skupin byla prokázána normální distribuce dat a výsledky jednotlivých měřených skupin byly porovnány pomocí nepárového t-testu. Ke statistickému zpracování byl použitý statistický software STATISTICA, verze 13, 2013, Tulsa, OK, USA.

4.4.2. Proteiny S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11

Výsledky měření proteinů S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 byly hodnoceny metodami popisné statistiky. Skupiny s normální distribucí dat byly porovnány pomocí parametrického nepárového t-testu. Skupiny s nenormální distribucí dat byly hodnoceny neparametrickým Mann-Whitneyovým testem. Ke statistickému hodnocení byl použitý statistický software STATISTICA, verze 13, Tulsa, OK, USA a statistický software SigmaStat, verze 3.1., Jandel Corp., Erkrath, Německo.

4.4.3. Protein S100P

Výsledky měření proteinu S100P byly hodnoceny metodami popisné statistiky. Naměřená data vykazovala nenormální distribuci a jednotlivé skupiny byly hodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitneyova testu. Ke statistickému hodnocení byl použitý statistický software STATISTICA, verze 13, Tulsa, OK, USA.

Chování nemoci	N (%)	M/Ž	Věk	
			rozmezí	průměr±SD
B1	20/93 (22%)	4/16	22–64	40±14
B2	19/93 (20%)	11/8	23–79	48±15
B3	20/93 (21%)	13/7	24–59	39±12
B2+B3	34/93 (37%)	16/18	24–78	47±14
perianální postižení	27/93 (29%)	13/14	24–69	43±14
Lokalizace nemoci				
L1	15/93 (16%)	9/6	22–63	41±13
L2	14/93 (15%)	4/10	22–64	45±12
L3	64/93 (69%)	31/33	22–79	44±15

Tabulka 4.1.1. Skupina pacientů s Crohnovou chorobou (popisná statistika)

N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální podíl ve skupině, M/Ž = muži/ženy, SD = směrodatná odchylka

B1 = nestenózující-nepenetrující forma, B2 = stenózující forma, B3 = penetrující forma, L1 = izolované postižení ilea, L2 = postižení tlustého střeva, L3 = ileo-kolické postižení

Skupina	N	M/Ž	Věk		Pacienti s neoplázií v době odběru (%)*
			rozmezí	průměr±SD	
Kontroly	20/84 (24 %)	7/13	23–74	55±14	---
Non-AA	20/84 (24 %)	10/10	41–82	62±11	75 % (15/20)
AA	22/84 (26 %)	15/7	49–80	64±8	45 % (10/22)
CRC-S100A	22/84 (26 %)	12/10	49–86	69±10	32 % (7/22)

Tabulka 4.1.2. Soubor pacientů pro měření proteinů S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11, popisná statistika sledovaných skupin

N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální podíl ve skupině, M/Ž = muži/ženy, SD = směrodatná odchylka

Non-AA = skupina s nepokročilým kolorektálním adenomem, AA = skupina s pokročilým kolorektálním adenomem, CRC-S100A = skupina s kolorektálním karcinomem

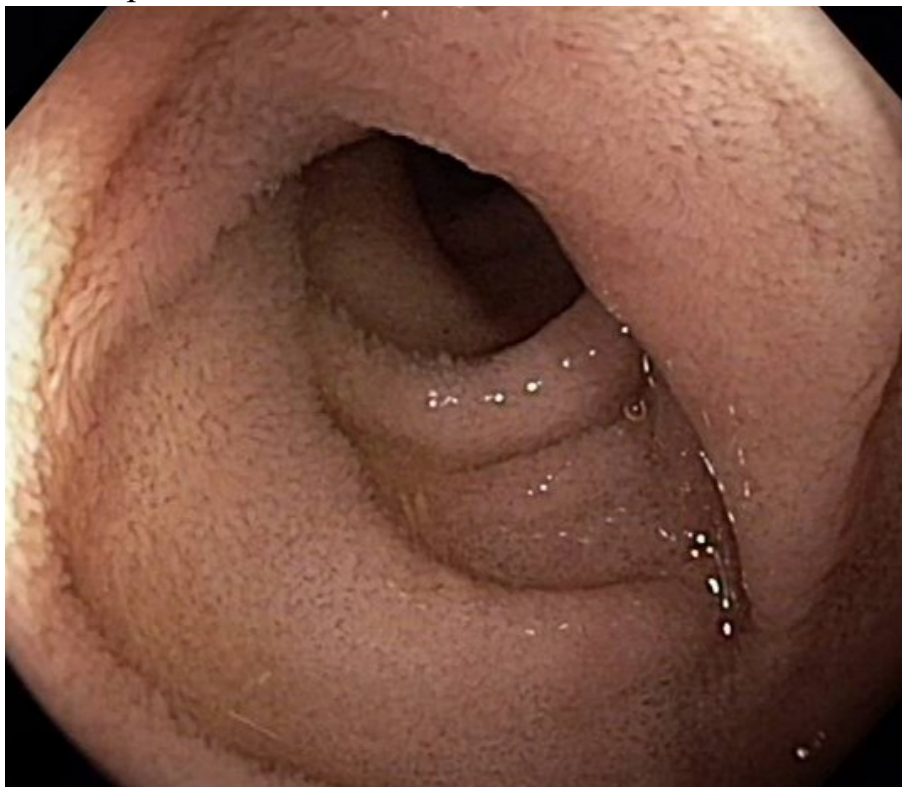
Skupina	N (%)	M/Ž	Věk	
			rozmezí	průměr±SD
Kontroly	36/79 (46 %)	14/22	23–80	55±14
CRC-S100P	43/79 (54 %)	20/23	46–86	67±11
CRC-R	13/43 (30 %)	7/6	49–86	66±12
CRC-L	30/43 (70 %)	13/17	46–83	67±11
Stadium I	9/43 (21 %)	6/3	49–78	63±11
Stadium II	7/43 (16 %)	3/4	53–86	70±13
Stadium III	13/43 (30 %)	6/7	50–83	65±10
Stadium IV	13/43 (30 %)	5/8	46–81	68±11
G1	5/43 (11 %)	3/2	52–67	63±6
G2	24/43 (56 %)	11/13	46–86	68±12
G3	11/43 (26 %)	4/7	50–78	64±10

Tabulka 4.1.3. Soubor pacientů pro měření proteinu S100P, popisná statistika jednotlivých skupin

N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální podíl ve skupině, M/Ž = muži/ženy, SD = směrodatná odchylka

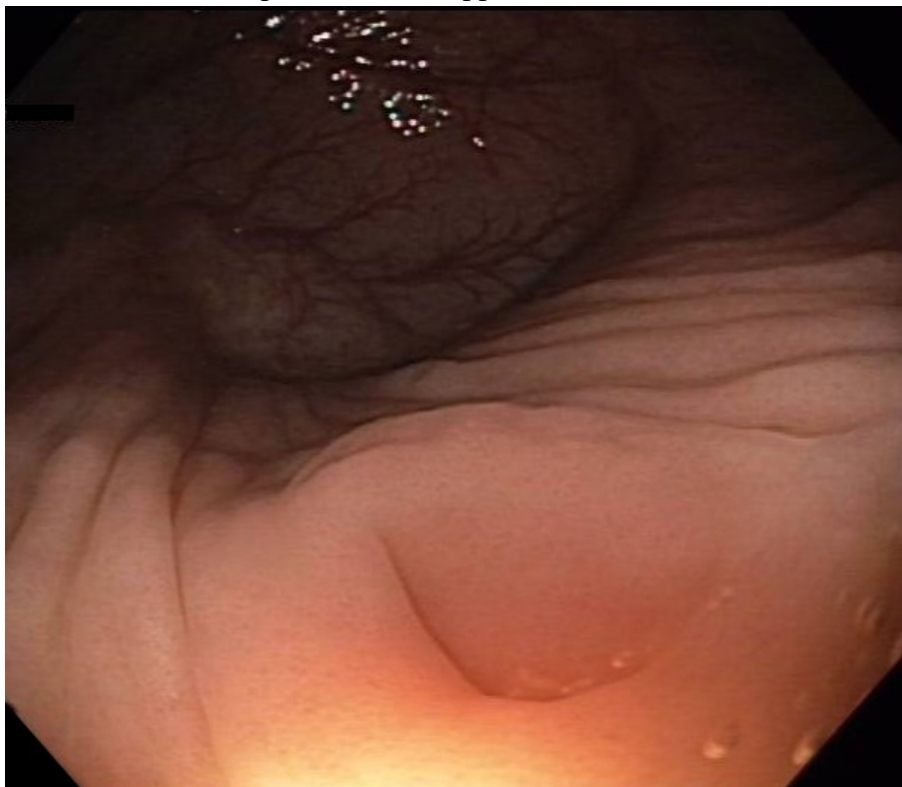
CRC-S100P = skupina s kolorektálním karcinomem, CRC-R = skupina s kolorektálním karcinomem v pravé části tračníku, CRC-L = skupina s kolorektálním karcinomem v levé části tračníku, G1 = dobře diferencovaný karcinom, G2 = středně diferencovaný karcinom, G3 = níže diferencovaný karcinom

Normální endoskopický obraz; vysokorozlišovací (high resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle



Obr. 4.1.1. Terminální ileum

Obr. 4.1.2. Cékum, pohled na ústí appendixu

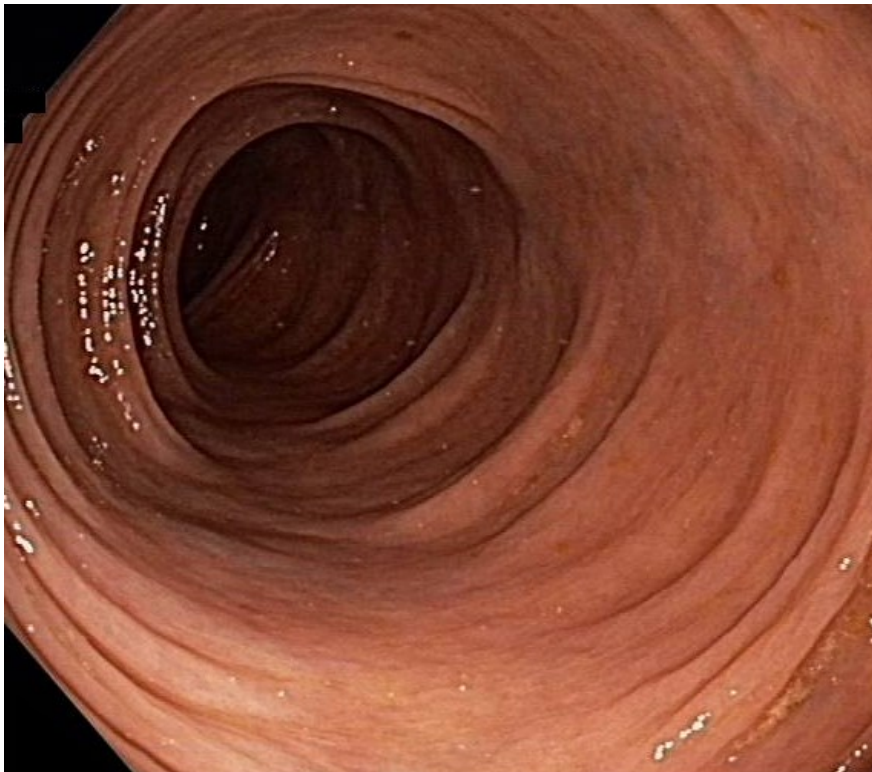


Normální endoskopický obraz; vysokorozlišovací (high resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle

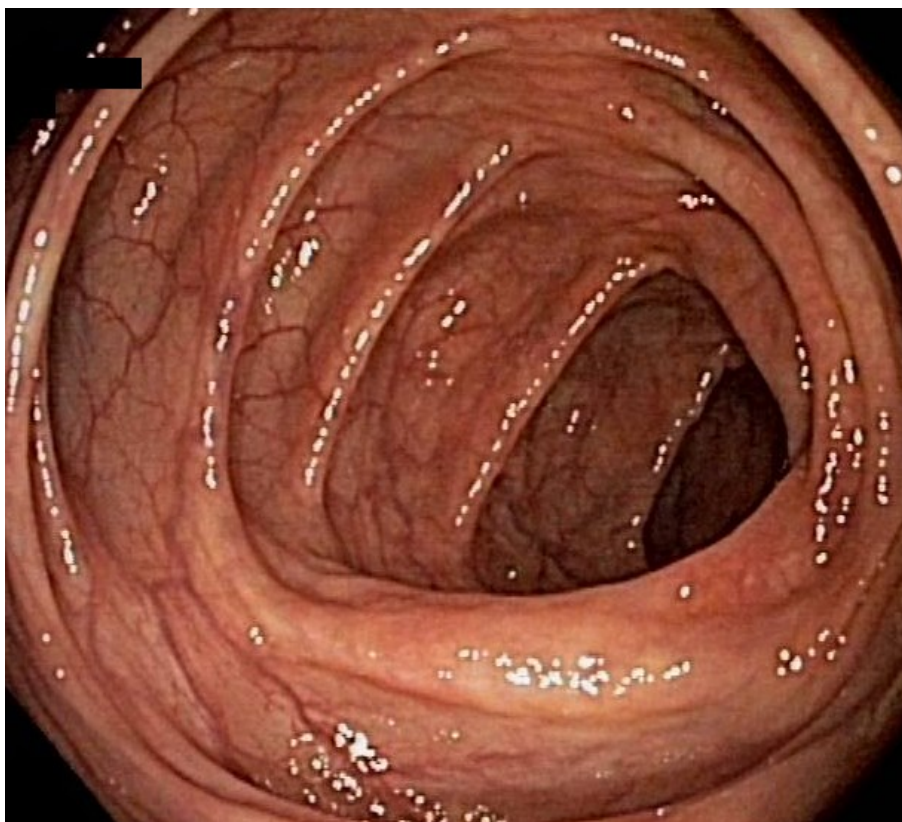


Obr. 4.1.3. Bauhinská chlopeň

Obr. 4.1.4. Colon ascendens

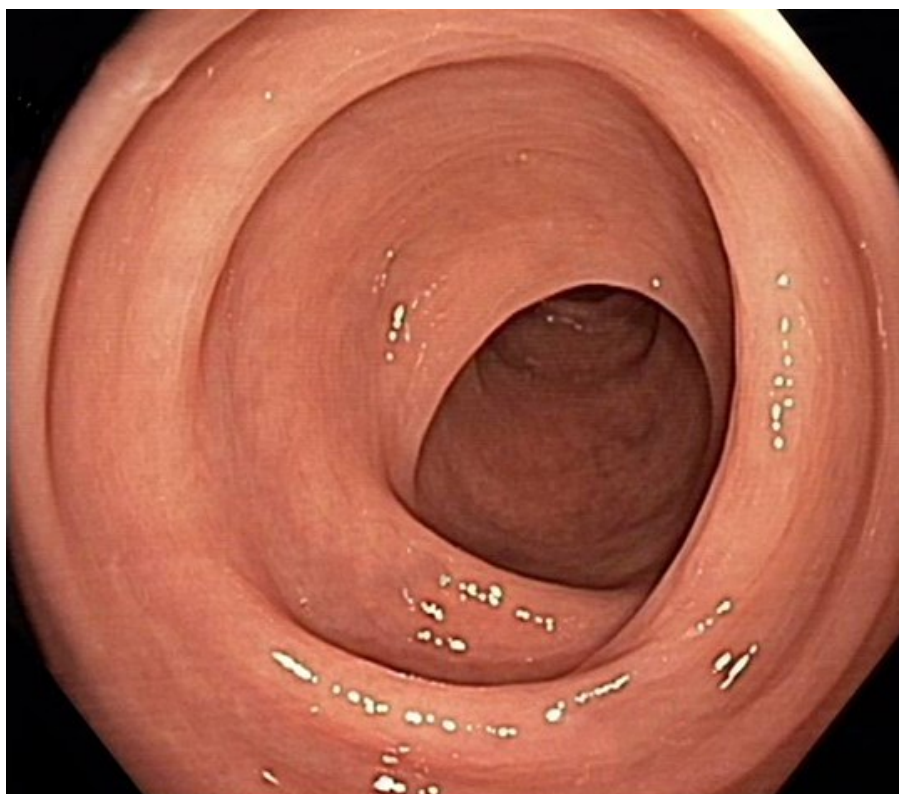


Normální endoskopický obraz; vysokorozlišovací (high resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle

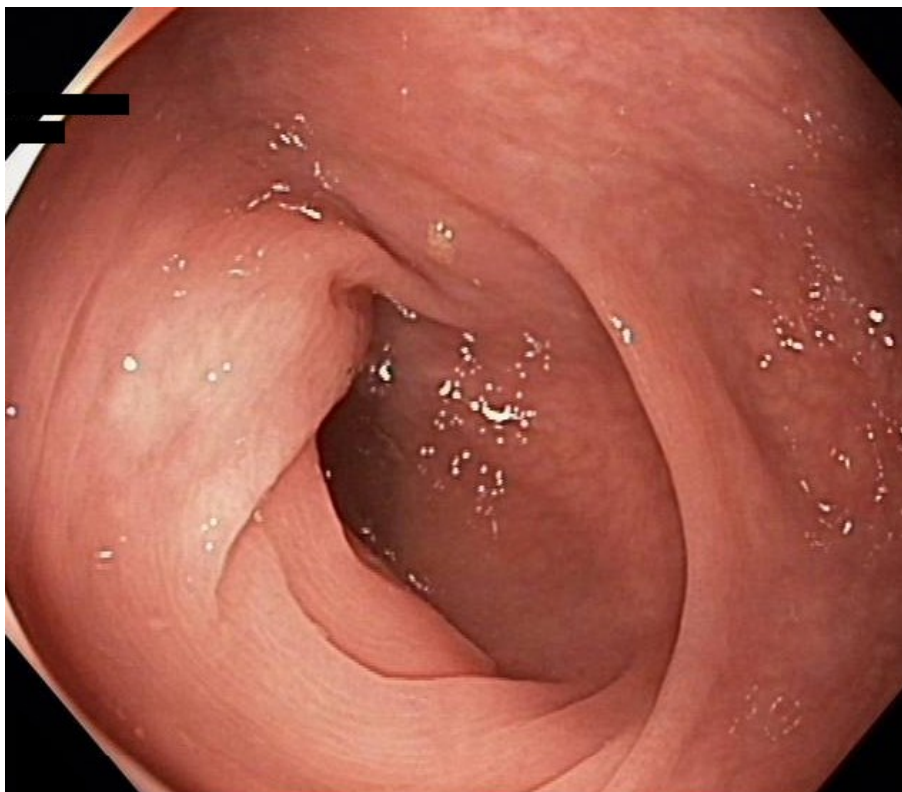


Obr. 4.1.5. Colon transversum

Obr. 4.1.6. Colon descendens

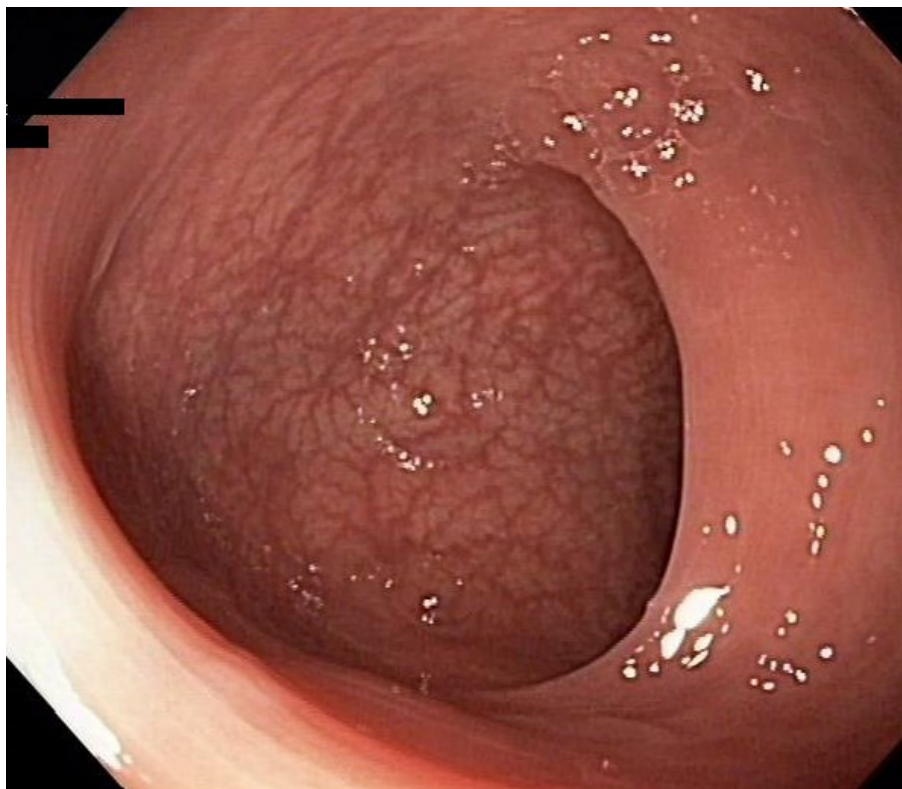


Normální endoskopický obraz; vysokorozlišovací (high resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle

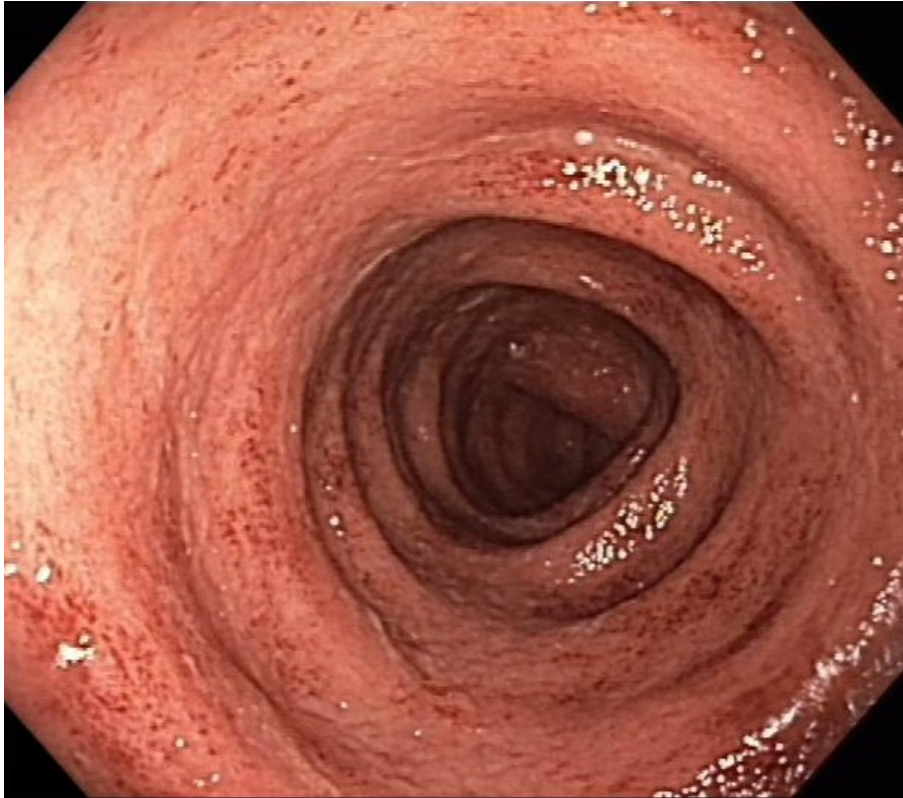


Obr. 4.1.7. Colon sigmoideum

Obr. 4.1.8. Rektum

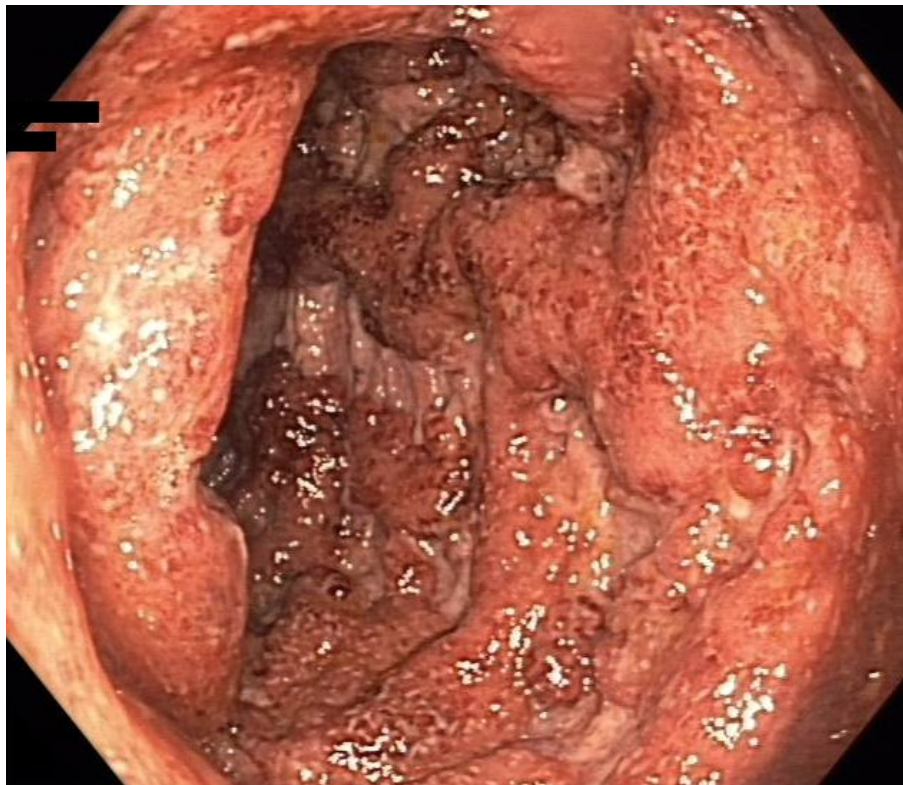


Endoskopický obraz ulcerózní kolitidy

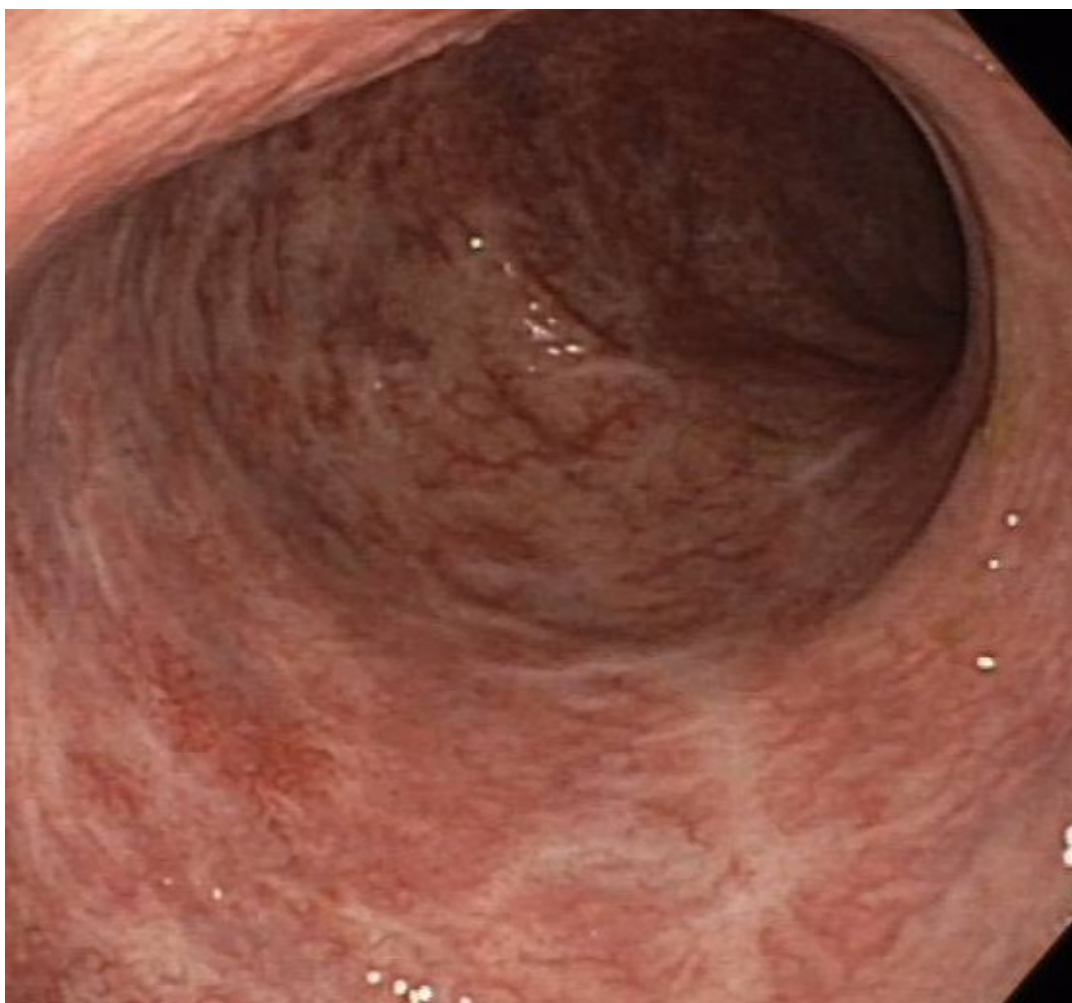


Obr. 4.2.1. Středně těžká ulcerózní kolitida (erytém, absence podslizniční cévní kresby, granulární vzhled sliznice, eroze)

Obr. 4.2.2. Těžká ulcerózní kolitida (ulcerace)



Endoskopický obraz ulcerózní kolitidy



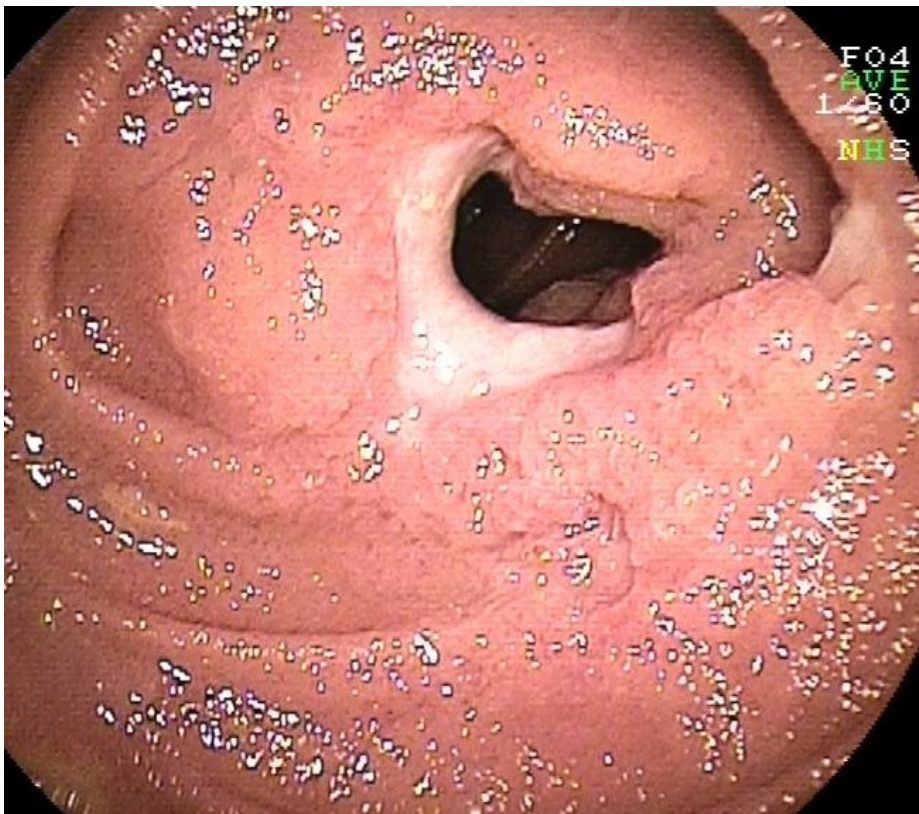
Obr. 4.2.3. Jizvení na sliznici tlustého střeva po zhojené ulcerózní kolitidě

Endoskopický obraz Crohnovy choroby

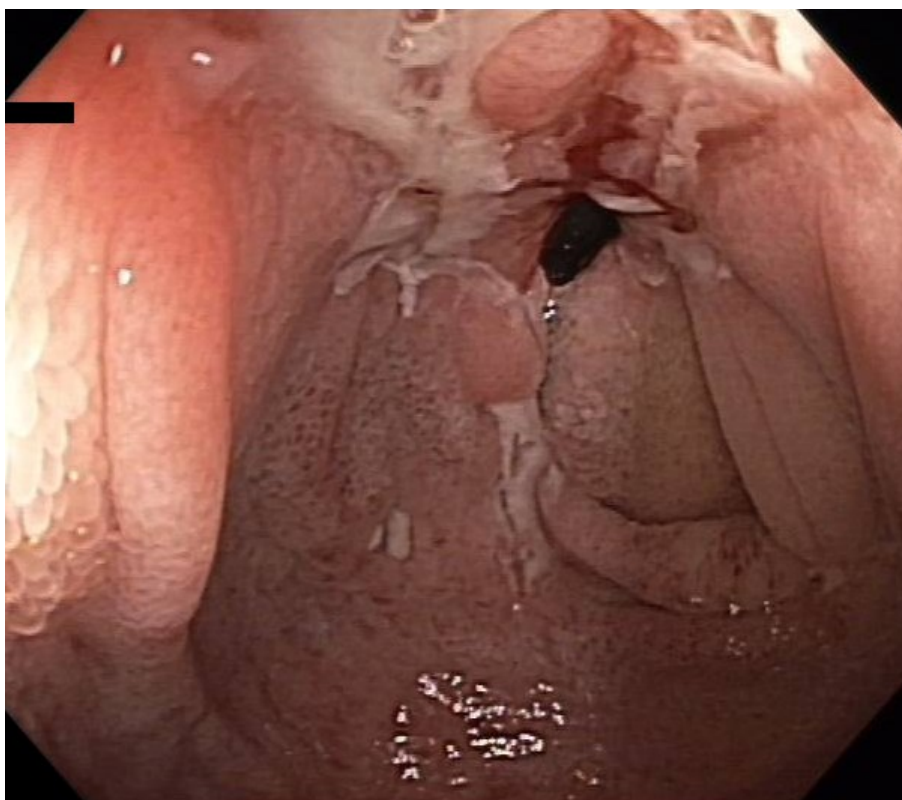


Obr. 4.3.1. Postižení duodena

Obr. 4.3.2. Postižení jejunum (stenóza s ulcerací, prestenotická dilatace)

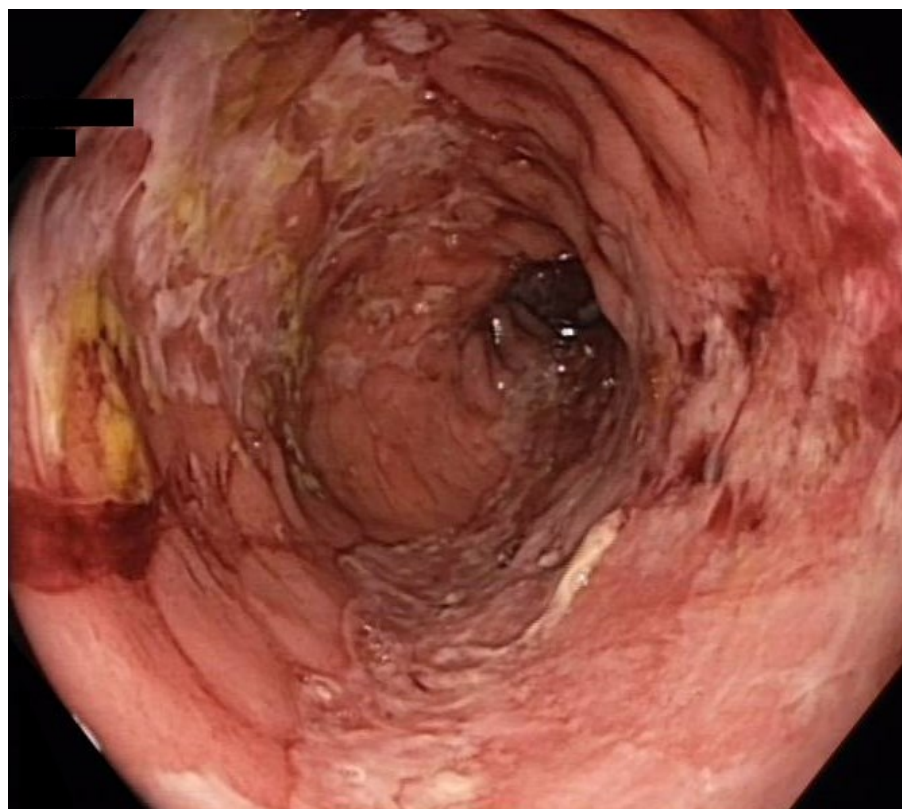


Endoskopický obraz Crohnovy choroby

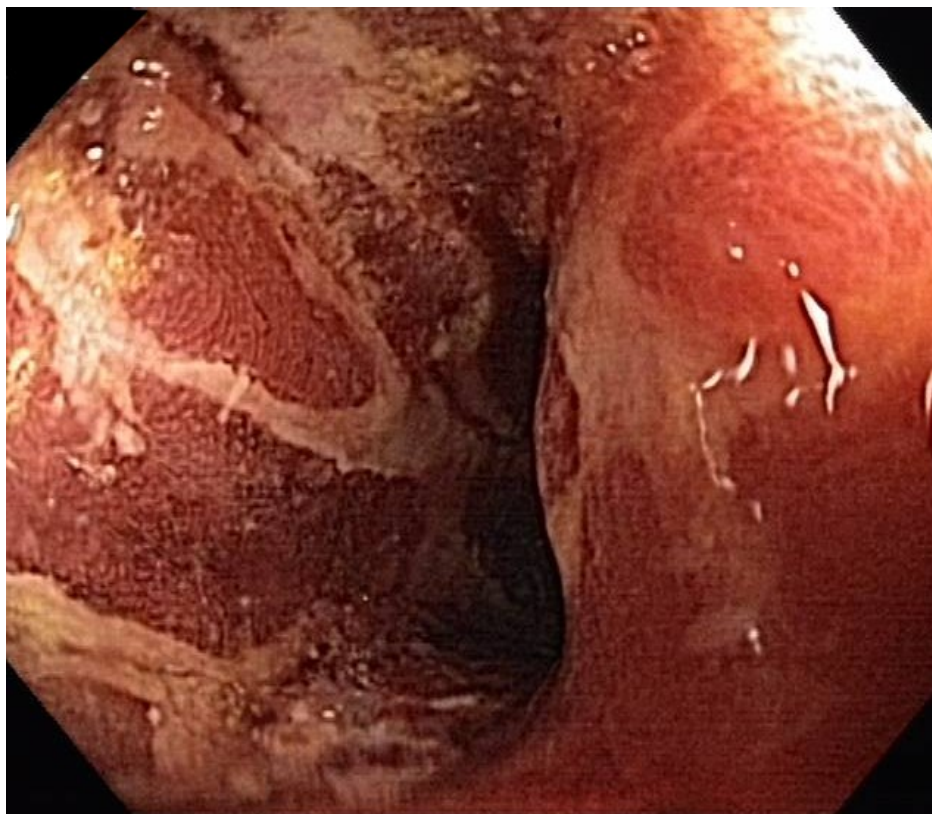


Obr. 4.3.3. Postižení terminálního ilea (plazivé ulcerace, stenóza)

Obr. 4.3.4. Těžká kolitida



Endoskopický obraz Crohnovy choroby



Obr. 4.3.5. Perianální postižení – postižení anu

Obr. 4.3.6. Perianální postižení – jizvení a perianální píštěle s drény in situ

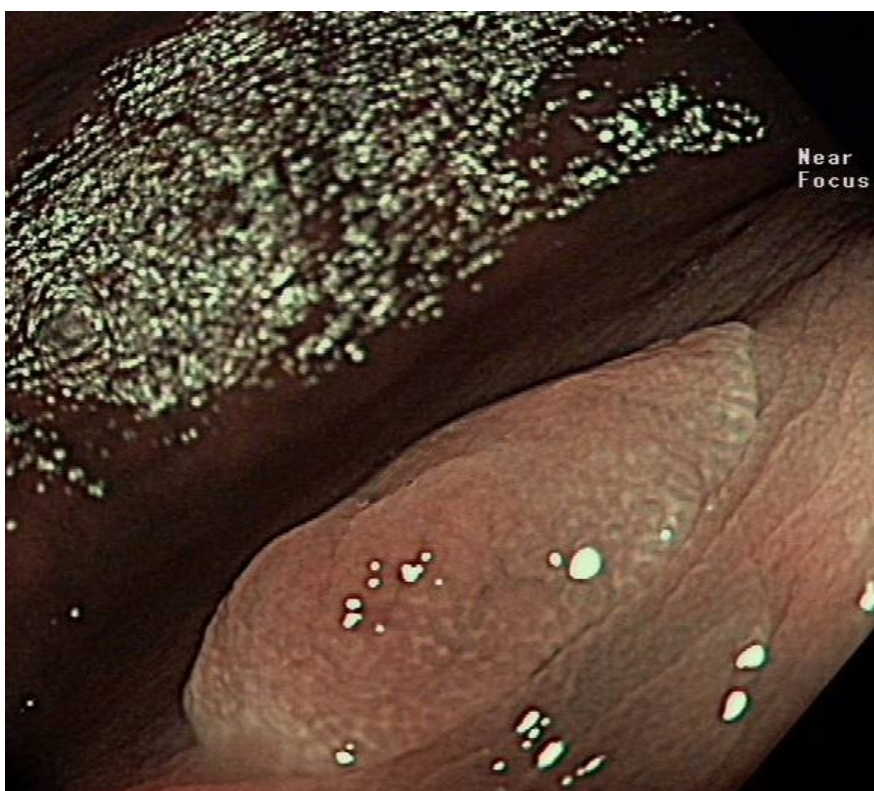


Nepokročilá kolorektální neoplázie

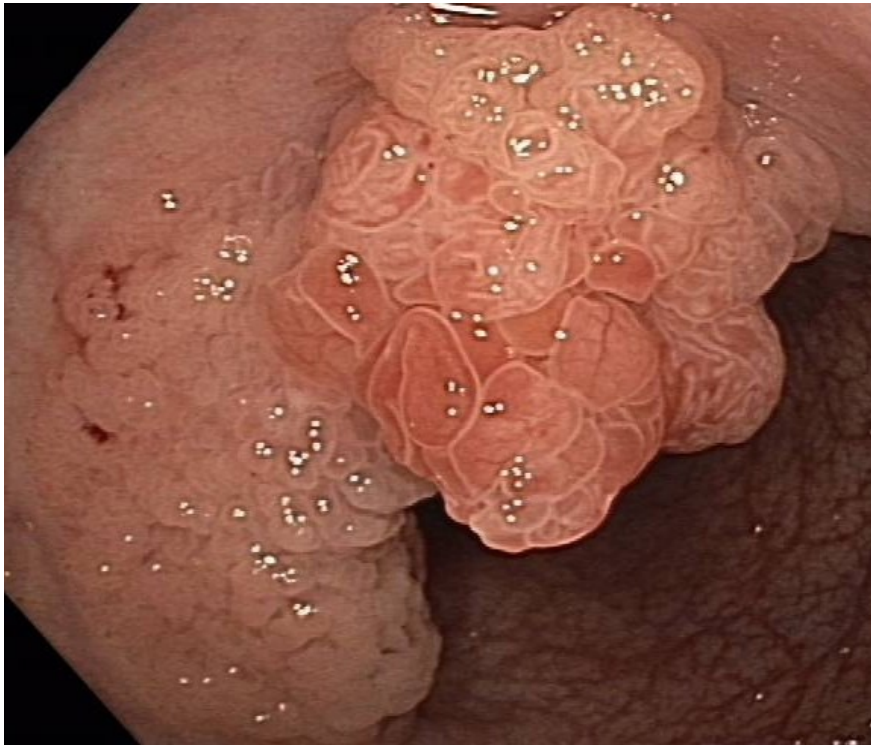


Obr. 4.4.1. Tubulární adenom rekta s nízkým stupněm dysplázie; vysokorozlišovací (high resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle

Obr. 4.4.2. Tubulární adenom rekta s nízkým stupněm dysplázie; vysokorozlišovací (high resolution) endoskopie, zobrazení pomocí narrow band imaging (NBI) s použitím zvětšení (near focus)

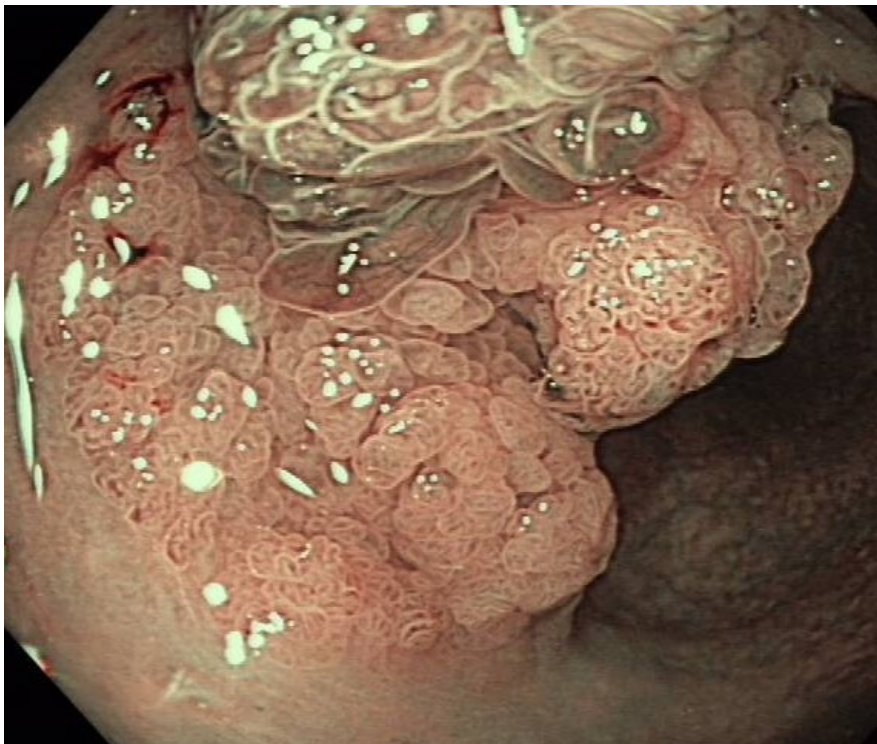


Pokročilá kolorektální neoplázie

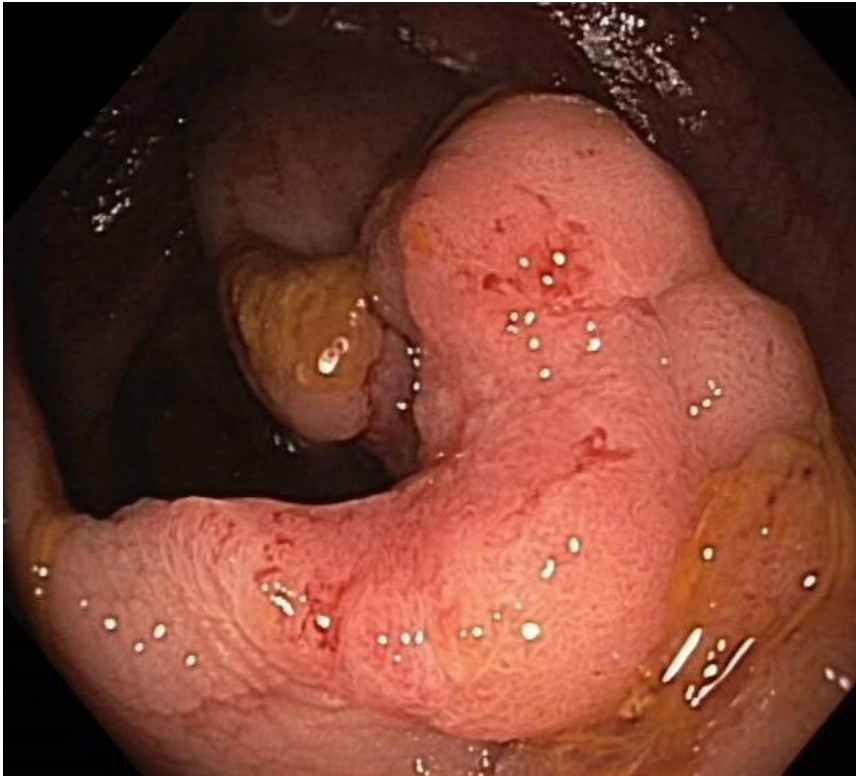


Obr. 4.5.1. Tubulovilózní adenom rekta s vysokým stupněm dysplázie; vysokorozlišovací (high-resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle

Obr. 4.5.2. Tubulovilózní adenom rekta s vysokým stupněm dysplázie; vysokorozlišovací (high-resolution) endoskopie, zobrazení pomocí narrow band imaging (NBI)

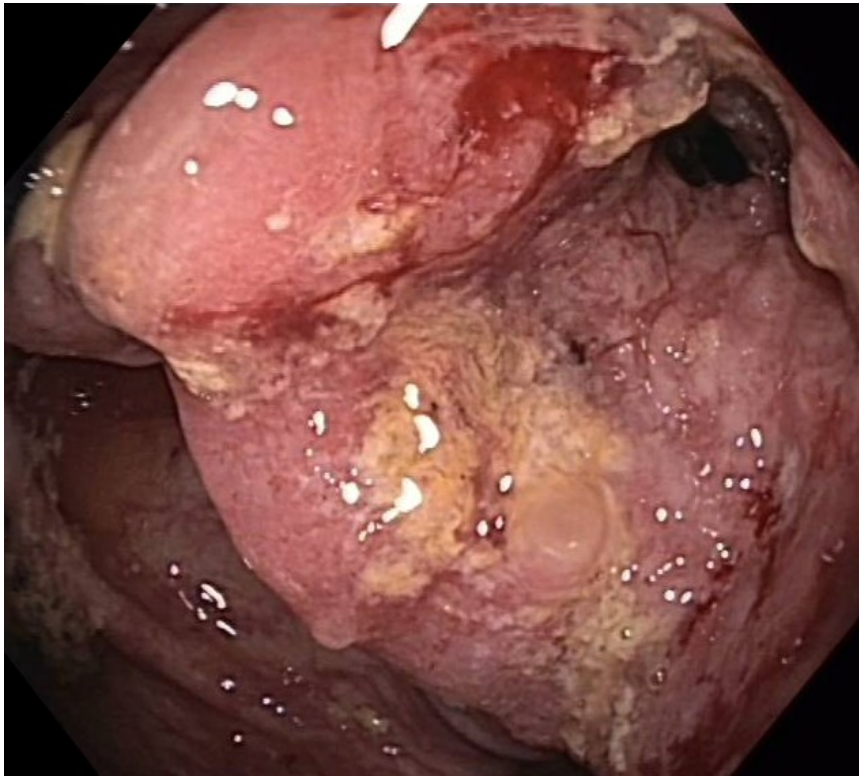


Kolorektální karcinom, vysokorozlišovací (high-resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle

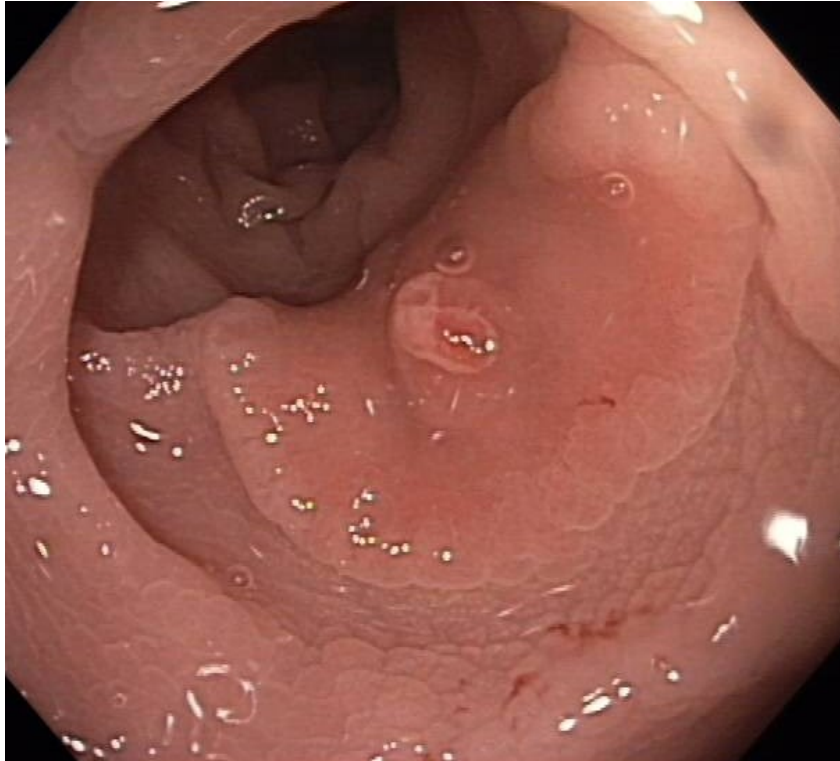


Obr. 4.6.1. Nestenózující karcinom pravého tračníku: nízce diferencovaný adenokarcinom colon ascendens

Obr. 4.6.2. Stenózující karcinom pravého tračníku: středně diferencovaný adenokarcinom colon ascendens

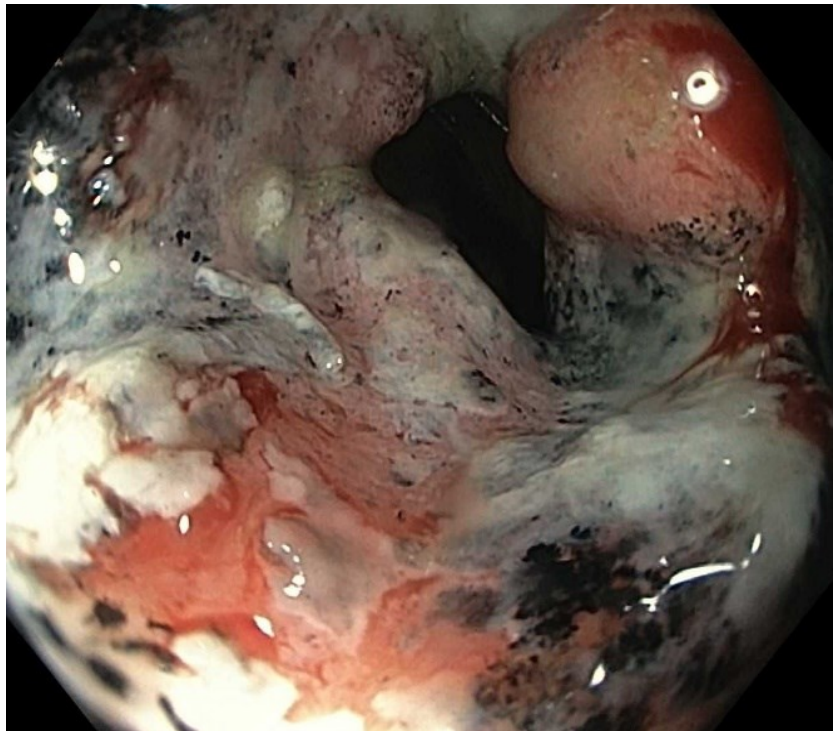


Kolorektální karcinom, vysokorozlišovací (high-resolution) endoskopie, zobrazení v bílém světle



Obr. 4.6.3. Nestenózující karcinom levého tračníku:
dobře diferencovaný adenokarcinom colon sigmoideum

Obr. 4.6.4. Stenózující karcinom levého tračníku:
exulcerovaný nízcce diferencovaný adenokarcinom colon descendens



5. Výsledky

5.1. Protein S100A4 u pacientů s idiopatickými střevními záněty

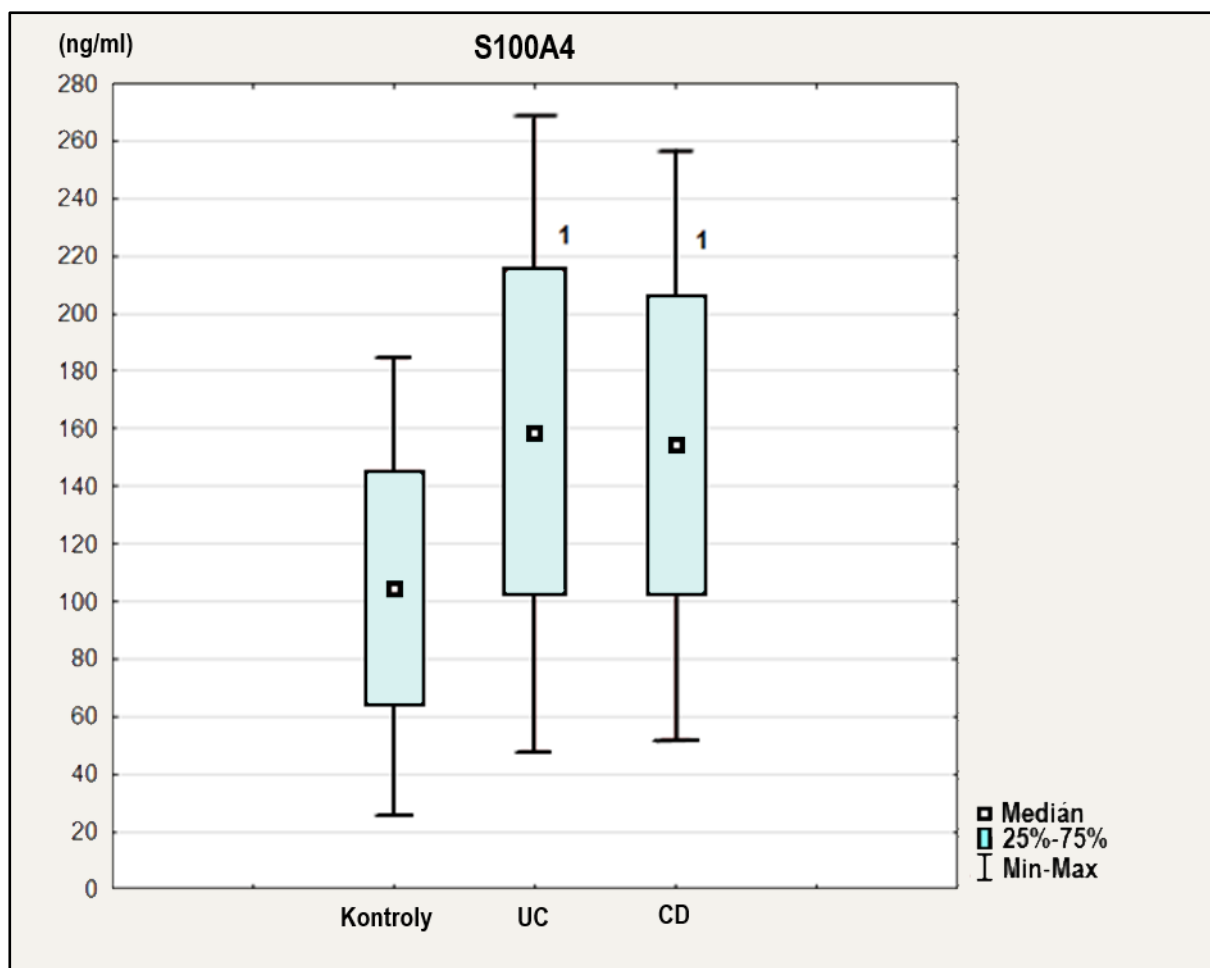
Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml) byly sérové koncentrace proteinu S100A4 signifikantně vyšší jak u pacientů s ulcerózní kolitidou (průměr 159 ± 56 ng/ml), $p=0,019$, tak i u pacientů s Crohnovou chorobou (průměr 154 ± 52 ng/ml), $p=0,007$. Při porovnání výsledků sérových koncentrací proteinu S100A4 u pacientů s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, $p=0,771$. Popisná statistika je uvedena v **Tabulce 5.1.1**. Grafické znázornění výsledků uvádí **Graf 5.1.1**. Po rozdělení pacientů s Crohnovou chorobou do podskupin podle chování a lokalizace Crohnovy choroby dle Montrealské klasifikace [59] byly sérové koncentrace proteinu S100A4 porovnány s výsledky proteinu S100A4 v séru pacientů kontrolní skupiny. Všechny podskupiny při rozdělení podle chování Crohnovy choroby vykazovaly ve srovnání s kontrolní skupinou významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A4, $p < 0,05$. Při porovnání jednotlivých podskupin se sérové koncentrace proteinu S100A4 mezi podskupinami navzájem statisticky významně nelišily, $p > 0,05$. Popisná statistika je uvedena v **Tabulce 5.1.2**. Grafické znázornění výsledků je uvedeno v **Grafu 5.1.2**. Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml) byly významně vyšší koncentrace proteinu S100A4 v podskupině s izolovaným postižením tlustého střeva (L2, průměr 145 ± 44 ng/ml), $p=0,041$ a v podskupině s ileokolickým postižením (L3, průměr 163 ± 53 ng/ml), $p=0,002$. Při vzájemném porovnání podskupin pacientů s Crohnovou chorobou při rozdělení podle lokalizace nemoci dle Montrealské klasifikace [59] byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi podskupinou s izolovaným ileálním postižením (L1) a podskupinou L3, $p=0,017$. Viz **Tabulka 5.1.3**. a **Graf 5.1.3**. Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml) byly sérové koncentrace proteinu S100A4 významně vyšší jak u pacientů bez přítomného perianálního postižení (průměr 151 ± 48 ng/ml), $p=0,008$, tak i u

pacientů s perianálním postižením (průměr 163 ± 61 ng/ml), $p=0,011$. Sérové koncentrace proteinu S100A4 mezi oběma skupinami nevykazovaly statisticky signifikantní rozdíly, $p>0,05$. Pacienti s Crohnovou chorobou bez biologické léčby (průměr 154 ± 49 ng/ml) vykazovali statisticky významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A4 ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml), $p=0,005$. Statisticky významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A4 byly potvrzeny i u pacientů s Crohnovou chorobou léčených biologickou léčbou (průměr 155 ± 65 ng/ml) ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 105 ± 41 ng/ml), $p=0,049$. Sérové koncentrace proteinu S100A4 se v obou skupinách statisticky významně nelišily, $p>0,05$. Popisná statistika je uvedena v **Tabulce 5.1.4. – 5.1.5.**

Skupina	N (%)	Min	Max	Průměr	SD
Kontroly	9/118 (8 %)	68	167	105	41
UC	16/118 (13 %)	59	283	159	56
CD	93/118 (79 %)	35	293	154	52

Tabulka 5.1.1. Protein S100A4 (ng/ml) u pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) a Crohnovou chorobou (CD), popisná statistika

N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka



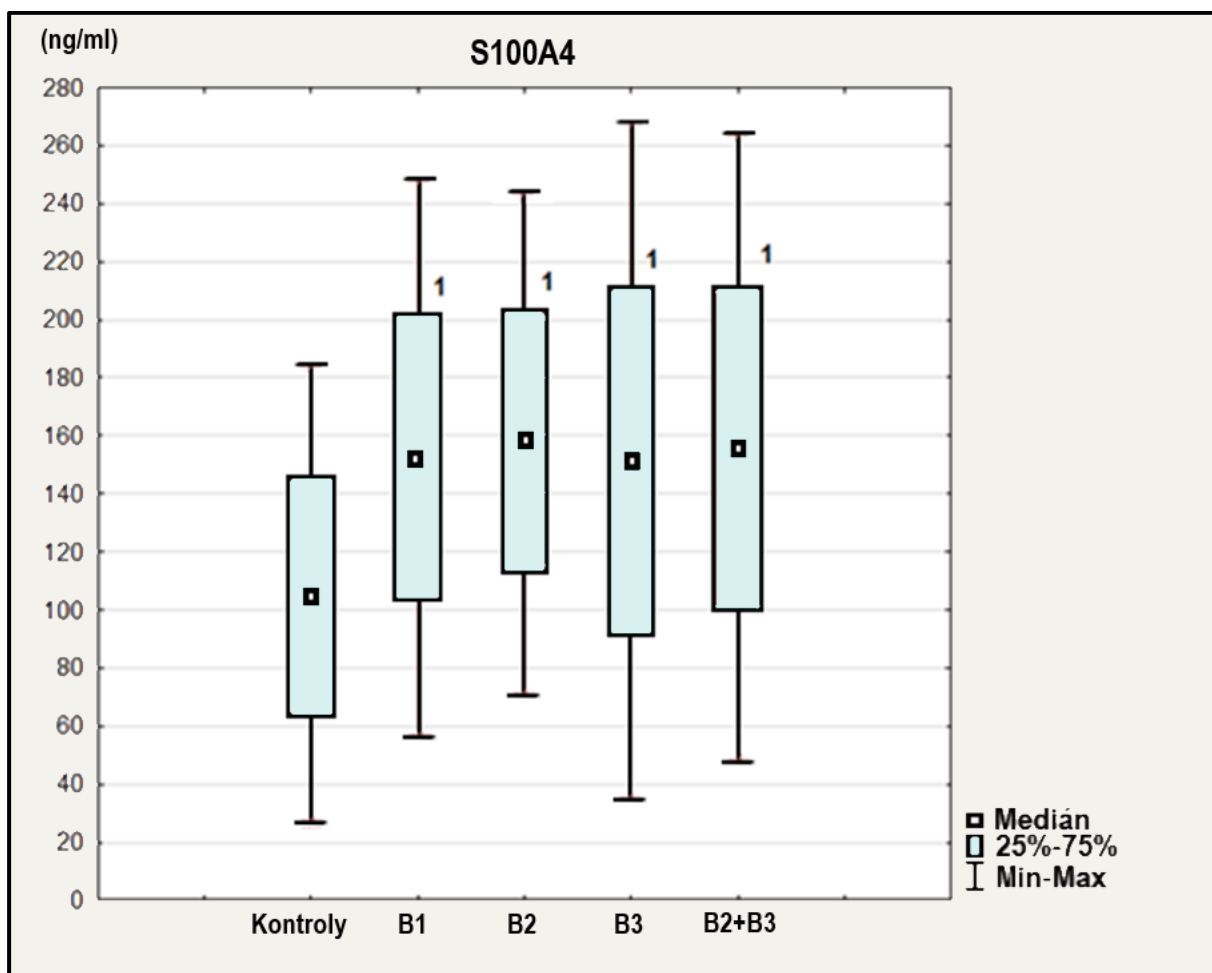
Graf 5.1.1. Protein S100A4 v séru pacientů s idiopatickými střevními záněty: srovnání kontrolní skupiny, skupiny s ulcerózní kolitidou (UC) a Crohnovou chorobou (CD)

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	Min	Max	Průměr	SD
Kontroly	9/118 (8 %)	68	167	105	41
B1	20/93 (22 %)	72	246	152	50
B2	19/93 (12 %)	50	232	158	45
B3	20/93 (21 %)	46	293	151	59
B2+B3	34/93 (37 %)	35	255	156	55

Tabulka 5.1.2. Protein S100A4 (ng/ml) u pacientů s Crohnovou chorobou při rozdělení do podskupin podle fenotypu Crohnovy choroby (Montrealská klasifikace [59]), popisná statistika

B1 = nestenozující-nepenetrující forma, B2 = stenozující forma, B3 = penetrující forma Crohnovy choroby, N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka



Graf 5.1.2. Protein S100A4 v séru pacientů s Crohnovou chorobou: srovnání kontrolní skupiny a podskupin při rozdělení podle fenotypu Crohnovy choroby (Montrealská klasifikace [54])

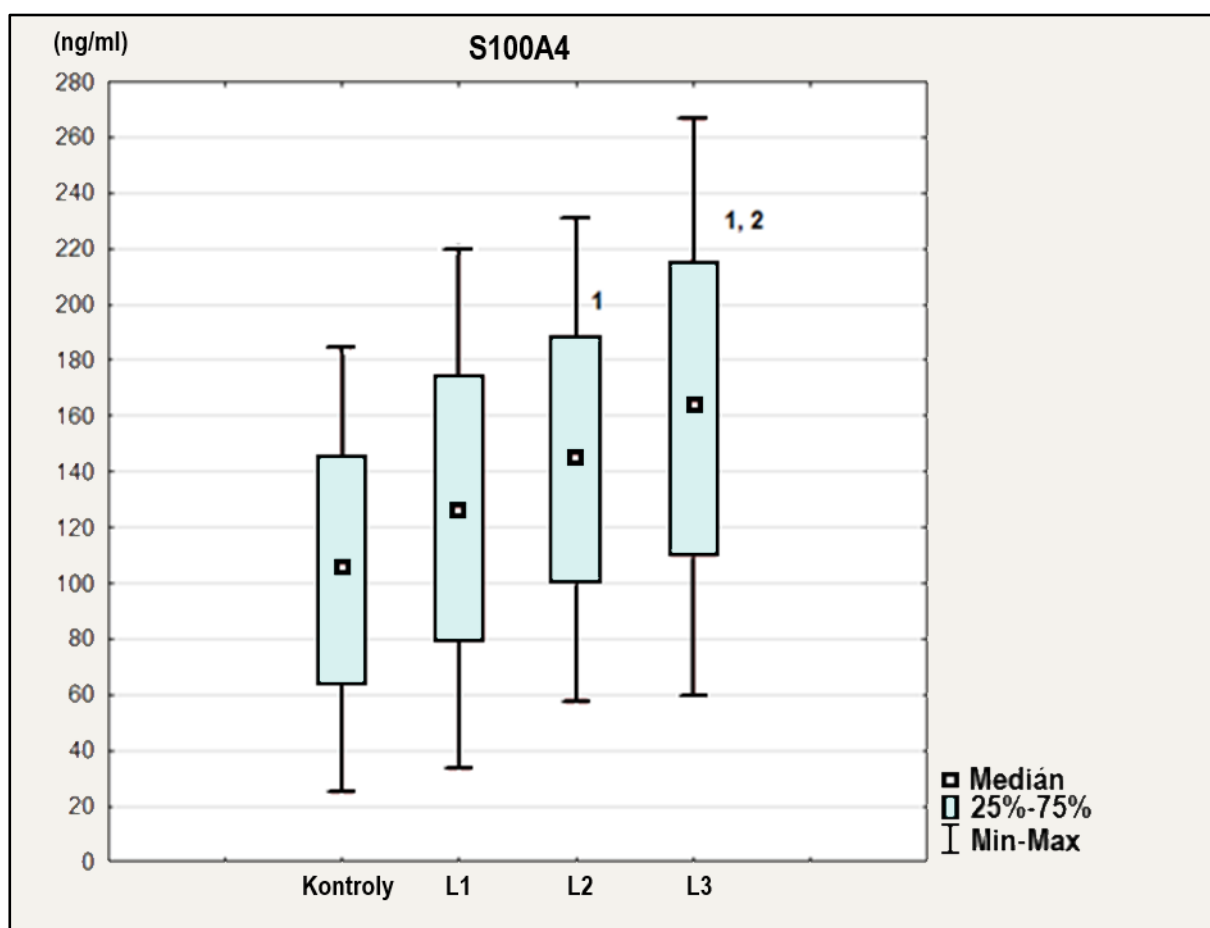
B1 = nestenozující-nepenetrující forma, B2 = stenozující forma, B3 = penetrující forma Crohnovy choroby

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	Min	Max	Průměr	SD
Kontroly	9/118 (8 %)	68	167	105	41
L1	15/93 (16 %)	50	213	127	48
L2	14/93 (15 %)	57	198	145	44
L3	64/93 (69 %)	35	293	163	53

Tabulka 5.1.3. Protein S100A4 (ng/ml) u pacientů s Crohnovou chorobou při rozdělení do podskupin podle lokalizace Crohnovy choroby (Montrealská klasifikace [59]), popisná statistika

L1 = izolované postižení ilea, L2 = izolované postižení tlustého střeva, L3 = ileokolické postižení, N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka



Graf 5.1.3. Protein S100A4 v séru pacientů s Crohnovou chorobou: srovnání kontrolní skupiny a podskupin při rozdělení podle lokalizace Crohnovy choroby (Montrealská klasifikace [54])

L1 = izolované postižení ilea, L2 = izolované postižení tlustého střeva, L3 = ileokolické postižení

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

2: statisticky významný rozdíl ve srovnání s L1 podskupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	Min	Max	Průměr	SD
Kontroly	9/118 (8 %)	68	167	105	41
p ⁻	66/93 (71 %)	47	246	151	48
p ⁺	27/93 (29 %)	35	293	163	61

Tabulka 5.1.4. Protein S100A4 (ng/ml) u pacientů s Crohnovou chorobou, rozdělení podle přítomnosti perianálního postižení, popisná statistika p⁻ = pacienti bez perianálního postižení, p⁺ = pacienti s přítomným perianálním postižením, N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka

Skupina	N (%)	Min	Max	Průměr	SD
Kontroly	9/118 (8 %)	68	167	105	41
BL ⁻	76/93 (82 %)	46	255	154	49
BL ⁺	17/93 (18 %)	35	293	155	65

Tabulka 5.1.5. Protein S100A4 (ng/ml) u pacientů s Crohnovou chorobou, rozdělení podle terapie biologickou léčbou v době odběru, popisná statistika

BL⁻ = pacienti bez současné biologické léčby, BL⁺ = pacienti léčení biologickou léčbou, N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení v skupině, SD = směrodatná odchylka

5.2. Vybrané proteiny S100 u pacientů s kolorektální neoplázií

5.2.1. Protein S100A6

Ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 11308 ± 2968 pg/ml) byly prokázány významně nižší sérové koncentrace proteinu S100A6 u pacientů s kolorektálním karcinomem (skupina CRC-S100A, průměr 8530 ± 4743 pg/ml), $p = 0,035$. Průměrná sérová koncentrace proteinu S100A6 ve skupině s pokročilým adenomem (skupina AA) byla 8715 ± 5376 pg/ml. Tyto hodnoty ve srovnání s kontrolní skupinou vykazovaly trend ke statistické významnosti, $p=0,069$ (uváděná síla provedeného testu 0,322). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl při srovnání sérových koncentrací proteinu S100A6 u pacientů s nepokročilým adenomem (skupina non-AA, medián 8807 pg/ml, interkvartilové rozpětí (IQR) 5161-12726 pg/ml) a kontrolní skupinou (medián 11156 pg/ml, IQR 9508-13426 pg/ml), $p > 0,05$. Základní popisná statistika je uvedena v **Tabulce 5.2.1.**, grafické znázornění viz **Graf 5.2.1.**

5.2.2. Proteiny S100A8 a S100A9

Ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 2513 pg/ml, IQR 2111-4881 pg/ml) byly sérové koncentrace proteinu S100A8 statisticky významně vyšší ve skupině s pokročilým adenomem (medián 11955 pg/ml, IQR 2681-34756 pg/ml), $p=0,009$ a ve skupině s kolorektálním karcinomem (medián 27532 pg/ml, IQR 6794-35092 pg/ml), $p < 0,001$. Skupina s nepokročilým adenomem vykazovala trend směrem ke statistické významnosti (medián 19293 pg/ml, IQR 2117-39344 pg/ml) ve srovnání s kontrolami, $p=0,058$ (síla provedeného testu 0,967). Popisná statistika je uvedena v **Tabulce 5.2.2.** Grafické znázornění uvádí **Graf 5.2.2.** Vypočítaná senzitivita a specificita pro protein S100A8 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem byla 94 % a 73 %. Pozitivní prediktivní hodnota pro protein S100A8 byla 68 %, negativní prediktivní hodnota byla 95 %.

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

5.2.3. Protein S100A11

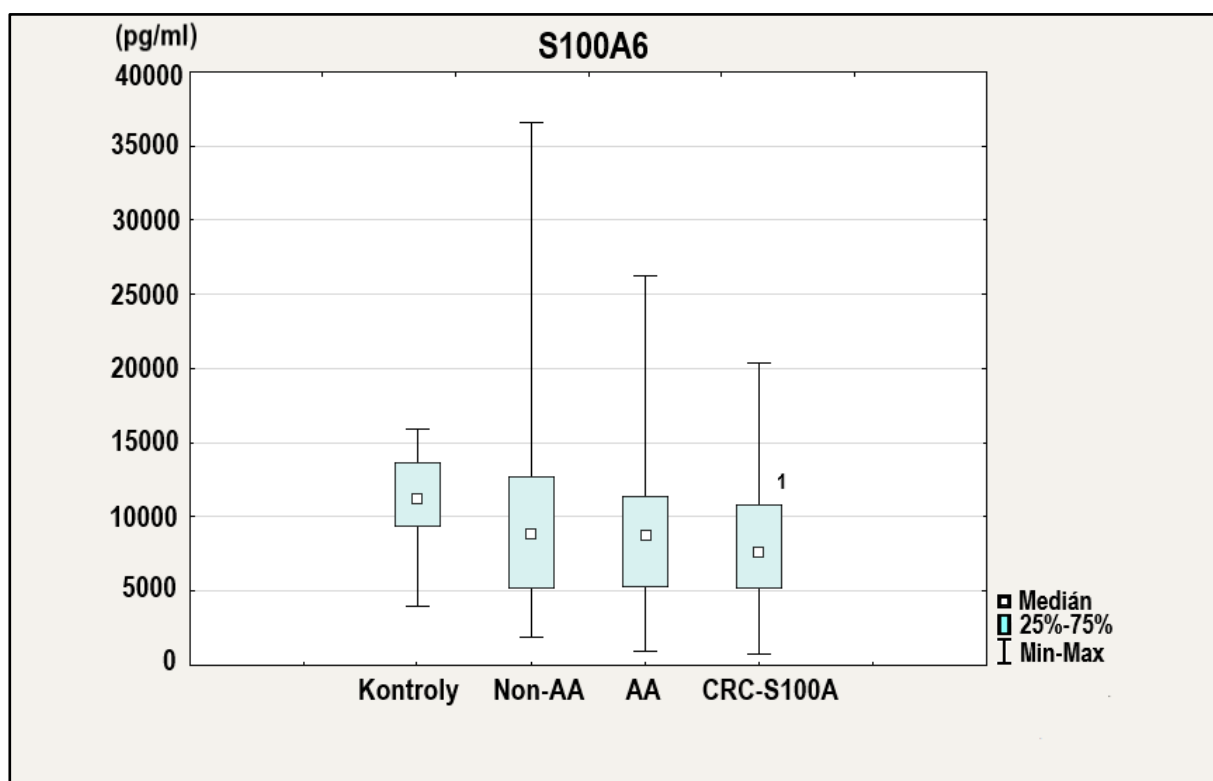
Sérové koncentrace proteinu S100A11 byly statisticky významně nižší ve skupině s nepokročilým adenomem (průměr $3,5 \pm 2,4$ ng/ml), $p=0,004$ a ve skupině s kolorektálním karcinomem (průměr $3,4 \pm 2,4$ ng/ml), $p=0,002$ ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr $5,9 \pm 2,5$ ng/ml). U skupiny s pokročilým adenomem (průměr $4,3 \pm 3,0$ ng/ml) byl pozorován trend ke statistické významnosti ve srovnání se skupinou kontrol, $p=0,07$ (uváděna síla provedeného testu 0,319). Popisná statistika je uvedena v **Tabulce 5.2.3**. Grafické znázornění uvádí **Graf 5.2.3**.

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

Ze statistického hodnocení byly vyloučeny tyto odlehlé hodnoty: u proteinu S100A6 - 62486 pg/ml ze skupiny kontrol a 55086 pg/ml ze skupiny s kolorektálním karcinomem; u proteinu S100A8 - 36080 pg/ml ze skupiny kontrol; u proteinu S100A9 - 166196 pg/ml ze skupiny kontrol a 145445 pg/ml ze skupiny s kolorektálním karcinomem; u proteinu S100A11 - 19.2 ng/ml ze skupiny s kolorektálním karcinomem.

Skupina	N (%)	Min	Max	25. percentil	75. percentil	Medián	Průměr	SD
Kontroly	20 (24 %)	3955	15869	9508	13426	11156	11308	2968
Non-AA	20 (24 %)	1885	36606	5161	12726	8807	10605	7943
AA	22 (26 %)	956	26260	5277	11354	8724	8715	5376
CRC-S100A	22 (26 %)	737	20343	5033	11215	7598	8530	4743

Tabulka 5.2.1. Protein S100A6 u kolorektálních neoplázií (pg/ml), popisná statistika
 Non-AA = pacienti s nepokročilým kolorektálním adenomem, AA = pacienti s pokročilým kolorektálním adenomem, CRC-S100A = pacienti s kolorektálním karcinomem; N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka



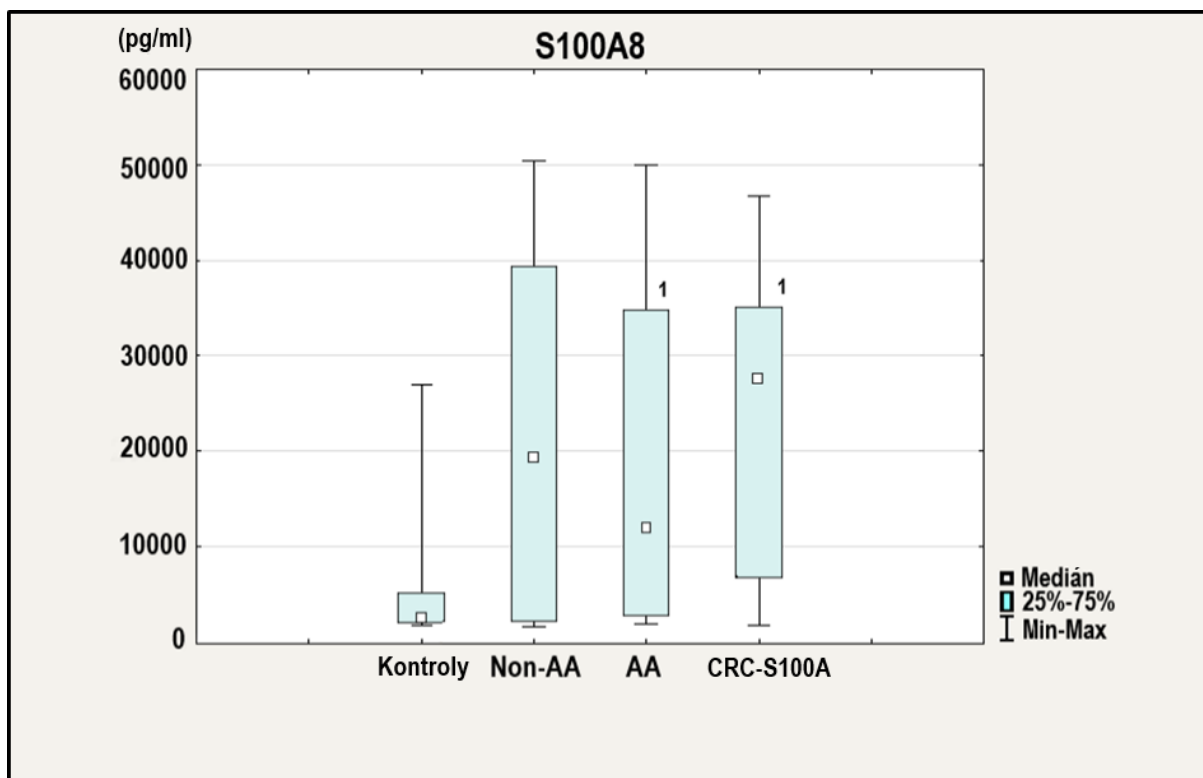
Graf 5.2.1. Protein S100A6 v séru pacientů s kolorektální neoplázií: srovnání kontrolní skupiny, skupiny s nepokročilým a pokročilým kolorektálním adenomem a skupiny s kolorektálním karcinomem

Non-AA = nepokročilý kolorektální adenom, AA = pokročilý kolorektální adenom, CRC-S100A = kolorektální karcinom

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	Min	Max	25. percentil	75. percentil	Medián	Průměr	SD
Kontroly	20 (24 %)	1813	26965	2111	4881	2513	4603	5739
Non-AA	20 (24 %)	1627	50399	2117	39344	19293	21508	18219
AA	22 (26 %)	1827	49955	2681	34756	11955	18126	17088
CRC-S100A	22 (26 %)	1657	46740	6794	35091	27532	23253	14777

Tabulka 5.2.2. Protein S100A8 u kolorektálních neoplázií (pg/ml), popisná statistika
 Non-AA = pacienti s nepokročilým kolorektálním adenomem, AA = pacienti s pokročilým kolorektálním adenomem, CRC-S100A = pacienti s kolorektálním karcinomem; N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka

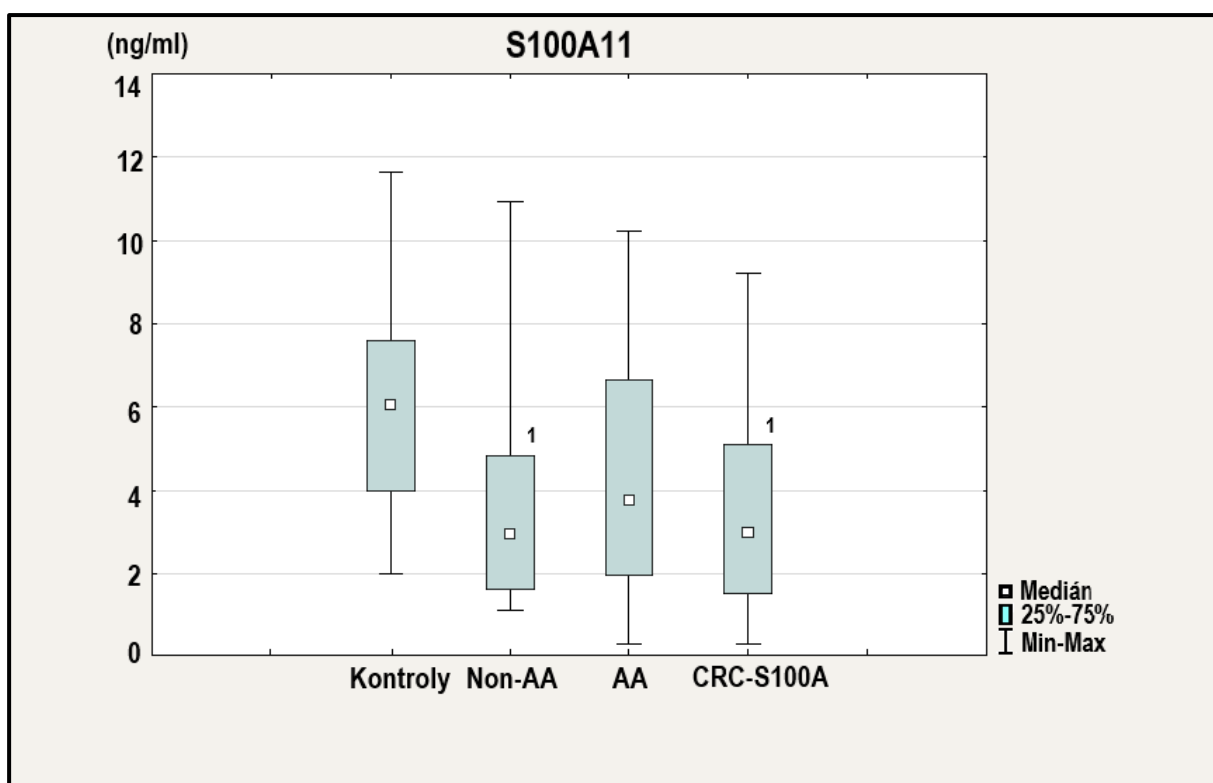


Graf 5.2.2. Protein S100A8 v séru pacientů s kolorektální neoplázií: srovnání kontrolní skupiny, skupiny s nepokročilým a pokročilým kolorektálním adenomem a skupiny s kolorektálním karcinomem
 Non-AA = nepokročilá kolorektální neoplázie, AA = pokročilá kolorektální neoplázie, CRC-S100A = kolorektální karcinom

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	Min	Max	25. percentil	75. percentil	Medián	Průměr	SD
Kontroly	20 (24 %)	2,0	11,7	4,0	7,6	6,0	5,9	2,5
Non-AA	20 (24 %)	1,1	10,9	1,6	4,8	3,0	3,5	2,4
AA	22 (26 %)	0,3	10,2	2,0	6,7	3,8	4,3	3,0
CRC-S100A	22 (26 %)	0,3	9,2	1,4	5,1	3,0	3,4	2,4

Tabulka 5.2.3. S100A11 protein u kolorektálních neoplázií (ng/ml), popisná statistika
 Non-AA = skupina s nepokročilou kolorektálním adenomem, AA = pacienti s pokročilým kolorektálním adenomem, CRC-S100A = pacienti s kolorektálním karcinomem; N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině, SD = směrodatná odchylka



Graf 5.2.3. Protein S100A11 v séru pacientů s kolorektální neoplázií: srovnání kontrolní skupiny, skupiny s nepokročilým a pokročilým kolorektálním adenomem a skupiny s kolorektálním karcinomem

Non-AA = nepokročilý kolorektální adenom, AA = pokročilý kolorektální adenom, CRC-S100A = kolorektální karcinom

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

5.3. Protein S100P u pacientů s kolorektálním karcinomem

Sérové koncentrace proteinu S100P byly statisticky významně vyšší ve skupině s kolorektálním karcinomem (medián 1251, IQR 731-1749 ng/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 765, IQR 545-1158 ng/l), $p=0,012$. Při porovnání kontrolní skupiny s podskupinami podle lokalizace kolorektálního karcinomu byly ve srovnání s kontrolní skupinou sérové koncentrace S100P významně vyšší ve skupině s kolorektálním karcinomem v levé části tračníku (medián 1426, IQR 739–1925 ng/l), $p=0,005$. Sérové koncentrace S100P skupiny s kolorektálním karcinomem v pravé části tlustého střeva (medián 1113, IQR 469–1406 ng/l) nevykazovaly statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou, $p=0,396$. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl při srovnání sérových koncentrací S100P mezi oběma testovanými podskupinami (CRC-L a CRC-R), $p=0,135$; viz **Tabulka 5.3.1.** a **Graf 5.3.1.**

Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem podle určení klinického stadia onemocnění byly sérové koncentrace proteinu S100P signifikantně vyšší u pacientů s kolorektálním karcinomem v klinickém stadiu IV (medián 1622, IQR 778-2154 ng/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 765, IQR 545-1158 ng/l), $p=0,008$. Podskupiny s nižším klinickým stadiem nevykazovaly signifikantní rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou: $p=0,086$ pro klinické stadium I (medián 1391, IQR 644-2508 ng/l), $p=0,565$ pro klinické stadium II (medián 868, IQR 650-1544 ng/l) a $p=0,282$ pro klinické stadium III (medián 1112, IQR 680-1470 ng/l); viz **Tabulka 5.3.2.** a **Graf 5.3.2.**

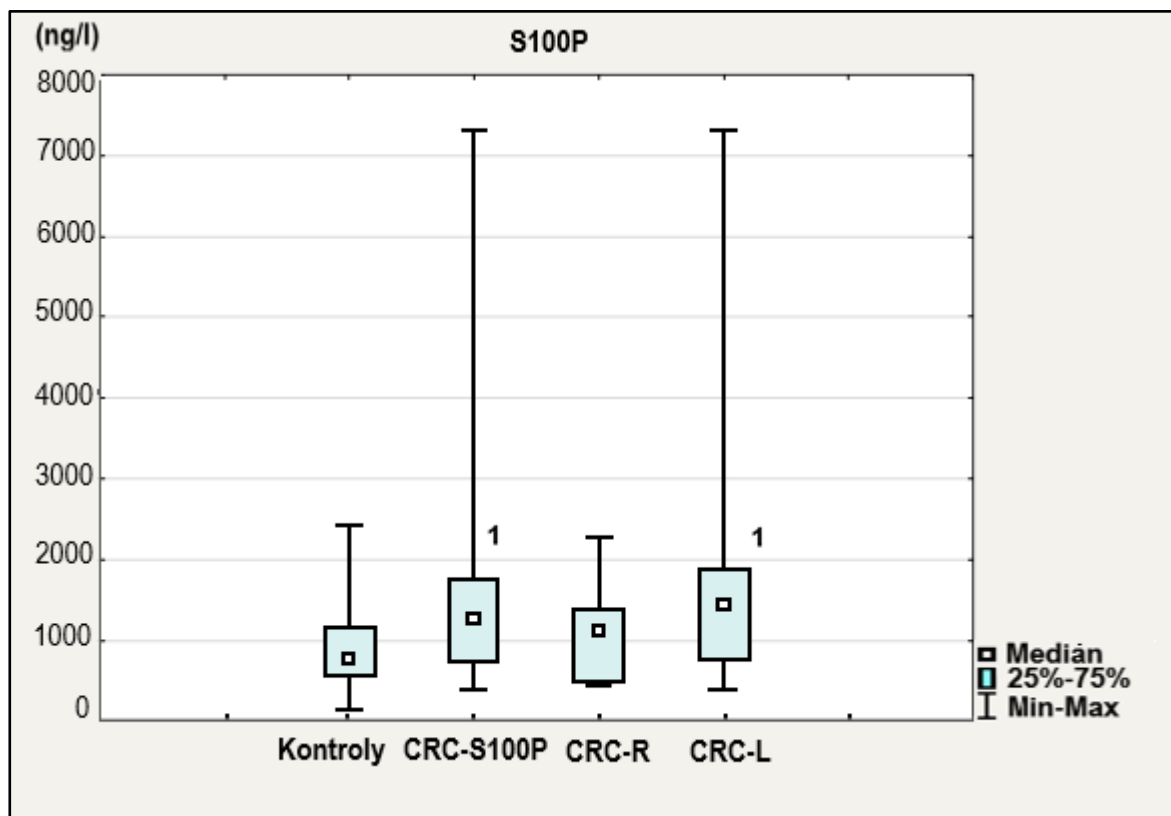
Při rozdělení skupiny s kolorektálním karcinomem podle stupně diferenciací kolorektálního karcinomu byly sérové koncentrace S100P signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolami (medián 765, IQR 545-1158 ng/l) u pacientů se středně diferencovaným karcinomem (G2, medián 1318, IQR 853-1879 ng/l), $p=0,005$. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ve skupině G1 (dobře diferencovaný karcinom, medián 812, IQR 582-1570 ng/l), $p=0,678$ a ve

skupině G3 (nízce diferencovaný karcinom, medián 1113, IQR 581-2260 ng/l), $p=0,253$ ve srovnání se skupinou kontrolní. Viz **Tabulka 5.3.3.** a **Graf 5.3.3.** Byl pozorován statisticky významný rozdíl ve skupině G2+G3 (medián 1251, IQR 742-1883 ng/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (medián 765, IQR 545-1158 ng/l), $p=0,007$.

Skupina	N (%)	25. percentil	75. percentil	Medián
Kontroly	36/79 (46 %)	545	1158	765
CRC-S100P	43/79 (54 %)	731	1749	1251
CRC-R	13/43 (30 %)	469	1406	1113
CRC-L	30/43 (70 %)	739	1925	1426

Tabulka 5.3.1. Protein S100P (ng/l) u pacientů s kolorektálním karcinomem, rozdělení podle lokalizace kolorektálního karcinomu, popisná statistika

CRC-100P = pacienti s kolorektálním karcinomem, CRC-R = pacienti s kolorektálním karcinomem v pravé části tlustého střeva, CRC-L = pacienti s kolorektálním karcinomem v levé části tlustého střeva, N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině

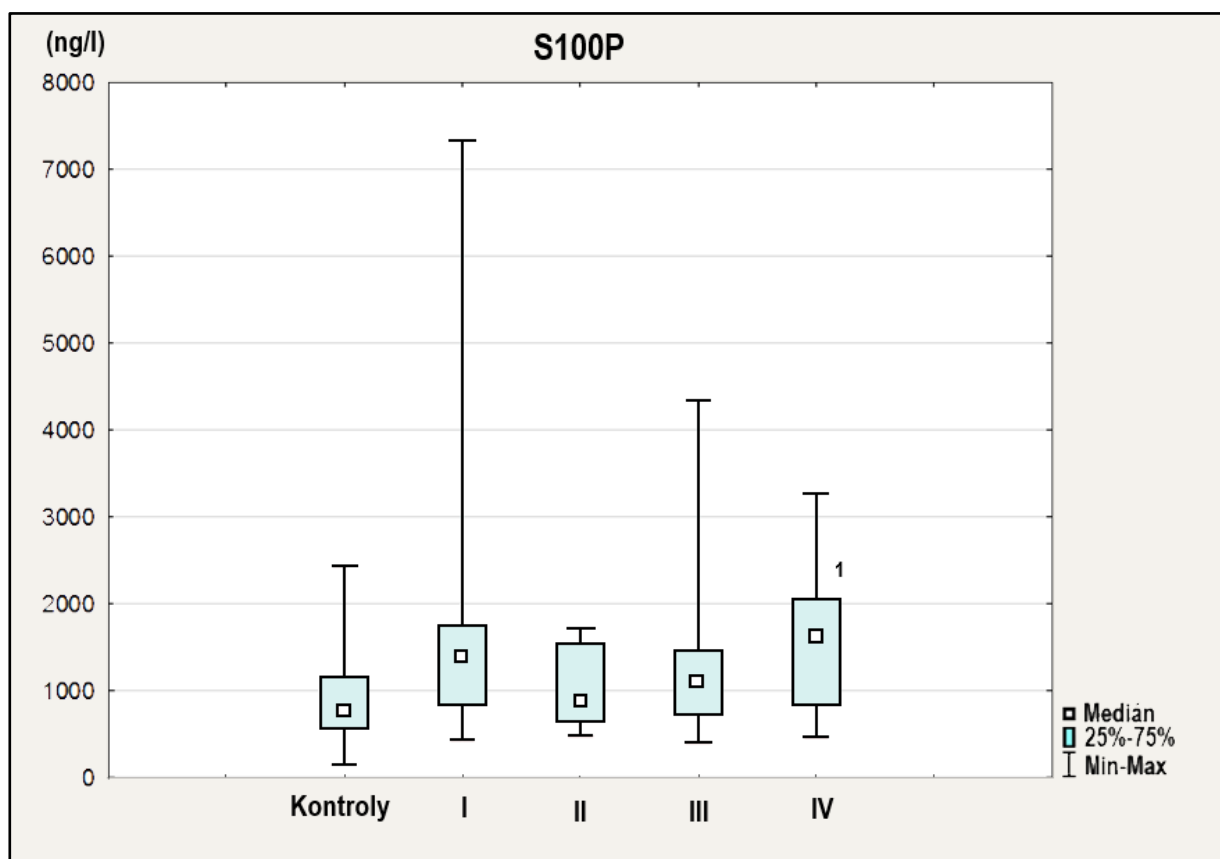


Graf 5.3.2. Protein S100P v séru pacientů s kolorektálním karcinomem: srovnání kontrolní skupiny, skupiny s kolorektálním karcinomem (CRC-S100P) a podskupin s lokalizací kolorektálního karcinomu v pravé (CRC-R) a levé (CRC-L) části tračníku

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	25. percentil	75. percentil	Medián
Kontroly	36/79 (46 %)	545	1158	765
Stadium I	9/43 (21 %)	644	2508	1391
Stadium II	7/43 (16 %)	650	1544	868
Stadium III	13/43 (30 %)	680	1470	1112
Stadium IV	13/43 (30 %)	778	2154	1622

Tabulka 5.3.2. Protein S100P (ng/l) u pacientů s kolorektálním karcinomě, popisná statistika, rozdělení podle klinického stadia kolorektálního karcinomu
N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině

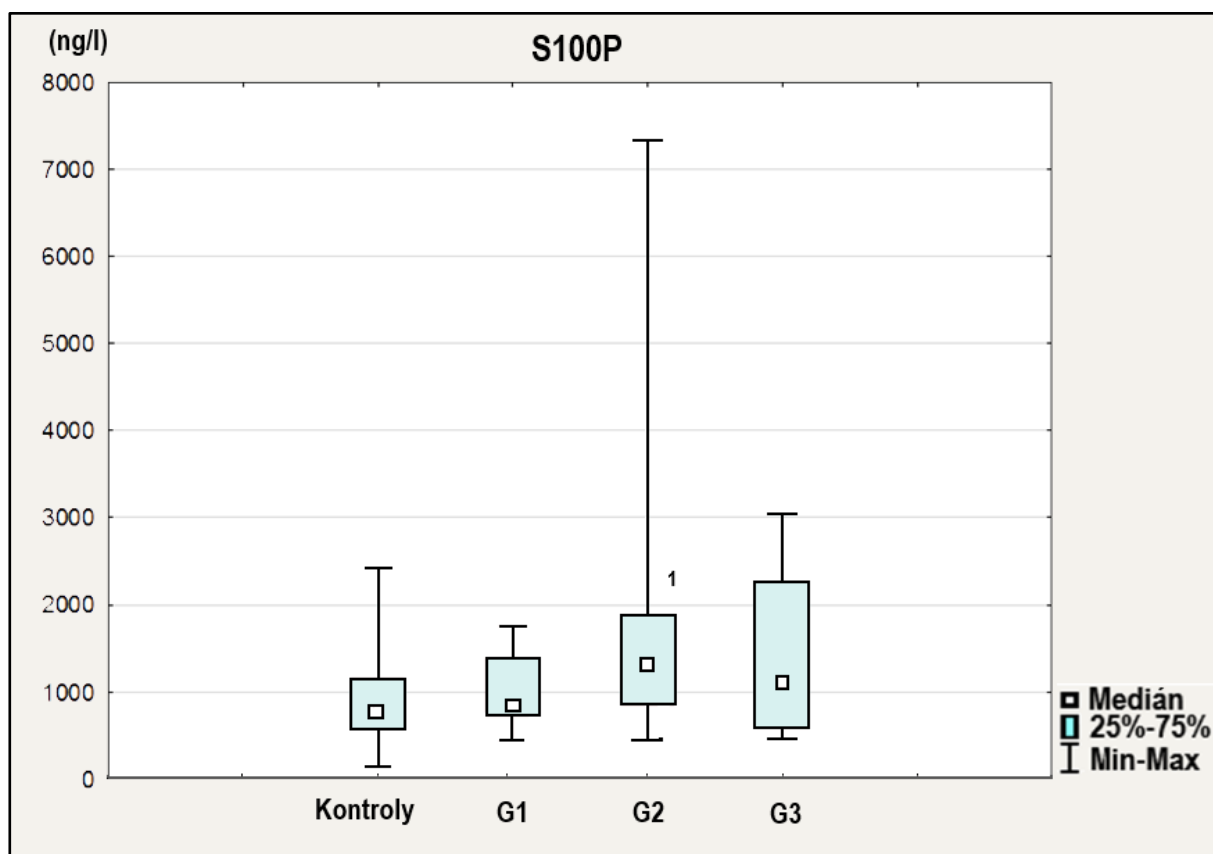


Graf 5.3.2. Protein S100P v séru pacientů s kolorektálním karcinomě: srovnání kontrolní skupiny a podskupin rozdělených podle klinického stadia kolorektálního karcinomu

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

Skupina	N (%)	25. percentil	75. percentil	Medián
Kontroly	36/79 (46 %)	545	1158	765
G1	5/43 (11 %)	582	1570	812
G2	24/43 (56 %)	853	1789	1318
G3	11/43 (26 %)	581	2260	1113

Tabulka 5.3.3. Protein S100P (ng/l) u pacientů s kolorektálním karcinomem, popisná statistika, rozdělení podle stupně diferenciace kolorektálního karcinomu
G (grading) - určení histopatologického stupně; G1 = dobře diferencovaný karcinom, G2 = středně diferencovaný karcinom, G3 = nízké diferencovaný karcinom, N (%) = absolutní počet pacientů a procentuální zastoupení ve skupině



Graf 5.3.2. Protein S100P v séru pacientů s kolorektálním karcinomem: srovnání kontrolní skupiny a podskupin rozdělených podle stupně diferenciace kolorektálního karcinomu

1: statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$

6. Diskuse

6.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů

V naší studii jsme prokázali zvýšené hodnoty S100A4 v séru pacientů s idiopatickými střevními záněty. Hodnota S100A4 byla ve srovnání se zdravými jedinci významně vyšší jak u pacientů s ulcerózní kolitidou, tak u pacientů s Crohnovou chorobou. Neprokázali jsme významný rozdíl mezi skupinou s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou. Výsledky našich měření jsou ve shodě s dostupnými daty, které potvrzují významnou roli proteinu S100A4 v mediaci a regulaci zánětlivých procesů [156]. Zhang et al. nedávno publikovali práci, ve které demonstrovali vliv S100A4 na vznik *Citrobacter rodentium*-indukované kolitidy [157]. Kolitida způsobená infekcí *Citrobacter rodentium* u myší je využívána jako model pro výzkum některých gastrointestinálních chorob, zahrnujících Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu, a ke zkoumání virulentních mechanismů enteropatogenních a enterohemoragických kmenů *E.coli* (EPEC, EHEC, tzv. A/E patogeny) [158]. U S100A4^{-/-} deficitních myší po infekci *Citrobacter rodentium* byla pozorována minimální lokální a systémová zánětlivá reakce a byla významně nižší sekrece prozánětlivých chemotaktických faktorů a zánětlivých cytokinů: IL-6, IL-17A, IL-27 a IFN- γ [157]. Významná redukce zánětlivé odpovědi ve sliznici tlustého střeva byla prokázána i u S100A4 deficitních myší po expozici DSS (dextransulfát sodný, látka využívaná v experimentech k indukci kolitidy na zvířecích modelech) [159]. Je tedy zřejmé, že role proteinu S100A4 v ovlivnění průběhu idiopatického střevního zánětu je komplexní. V souvislosti s idiopatickými střevními záněty je však zřejmé, že S100A4 působí jednak cestou sekrece prozánětlivých cytokinů v místě zánětu [159], dále indukuje sekreci chemotaktických faktorů, které umožňují migraci imunitních buněk, zejména makrofágů, do místa zánětu [160] a přímo ovlivňuje migrační schopnosti těchto imunitních buněk [160, 161]. Strutz et al. v roce 1995 identifikovali gen kódující protein FSP-1 (fibroblast-specific protein 1) a potvrdili jeho zvýšenou expresi v procesu přeměny epiteliálních buněk na fibroblasty [162]. Zvýšená exprese

S100A4 v procesu EMT (epithelial-mesenchymal transition) je zprostředkována TGF- β [163]. Ve vztahu ke Crohnově chorobě Cunningham et al. zkoumali profil S100A4 v resekátech terminálního ilea na souboru vzorků od 15 pacientů, kteří podstoupili chirurgickou resekci pro fibrostenózní formu Crohnovy choroby [88]: práce potvrdila významně zvýšenou expresi S100A4 mRNA a proteinu S100A4 v oblastech postižených fibrózou a jizvením ve srovnání s expresí S100A4 mRNA a proteinu S100A4 v přilehlé zdravé tenkostřevní sliznici. Yan et al. potvrdili asociaci zvýšených koncentrací S100A4 v séru pacientů s významnou jaterní fibrózou [164]. V našem souboru pacientů s Crohnovou chorobou všechny podskupiny při rozdělení podle chování Crohnovy choroby dle Montrealské klasifikace [59] vykazovaly významně vyšší sérové koncentrace S100A4 ve srovnání se zdravými kontrolami. Předpoklad, že sérové koncentrace proteinu S100A4 budou vyšší u pacientů se stenózní formou Crohnovy choroby, jsme v naší studii nepotvrdili. Při vzájemném porovnání podskupin pacientů s Crohnovou chorobou při rozdělení podle chování nemoci se hladiny proteinu S100A4 vzájemně významně nelišily. Domníváme se, že zvýšená exprese S100A4 u fibrostenózní formy Crohnovy odráží lokální situaci v postižené tkáni, zatímco zvýšení S100A4 v séru pacientů pravděpodobně odpovídá jeho prozánětlivé aktivitě. Toto je v souladu s výsledky studie Ošlejškové, která potvrdila asociaci plazmatických koncentrací S100A4 s mírou zánětlivé aktivity u pacientů s revmatoidní artritidou [165]. Autoři této studie dále poukázali na pokles multimérických forem S100A4 vlivem léčby adalimumabem (monoklonální protilátkou proti TNF α) u pacientů, kteří dosáhli klinické remise po podání biologické léčby. Tento pokles byl výsledkem změny poměru koncentrace biologicky aktivních multimérických forem S100A4 a méně biologicky aktivních dimérických forem [165]. Celková plazmatická koncentrace S100A4 u těchto nemocných se vlivem anti-TNF α léčby tedy nezměnila [159]. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky naší studie, která nepotvrdila vliv přítomné biologické léčby na sérové koncentrace proteinu S100A4 u pacientů s Crohnovou chorobou. I přesto, že celá skupina vykazovala

významně vyšší hodnoty S100A4 oproti zdravé kontrolní skupině, v podskupinách pacientů s a bez biologické léčby se hodnoty S100A4 v séru významně nelišily. Podobně jsme neprokázali vliv přítomného perianálního postižení na sérovou koncentraci S100A4 u pacientů s Crohnovou chorobou. Při porovnání podskupin uvnitř skupiny pacientů s Crohnovou chorobou jsme pozorovali významně vyšší hodnoty S100A4 u pacientů s postižením tlustého střeva. Hodnoty S100A4 byly ve srovnání s kontrolní skupinou významně vyšší jak u skupiny s izolovaným postižením tračníku, tak u skupiny s ileokolickým postižením, která vykazovala statisticky významně vyšší sérové koncentrace i ve srovnání se skupinou s izolovaným postižením ilea. I přesto, že na základě současných poznatků nemáme pro tyto výsledky jednoznačné vysvětlení, prokázaná asociace sérových koncentrací proteinu S100A4 s postižením tlustého střeva idiopatickým střevním zánětem, kterou jsme potvrdili jak u pacientů s ulcerózní kolitidou, tak u pacientů s Crohnovou chorobou, upozorňuje na možnou souvislost s rizikem vzniku kolorektálního karcinomu asociovaného s idiopatickým střevním zánětem. Zhang ve své práci demonstroval úlohu S100A4 v procesu tumorigenézy asociované s ulcerózní kolitidou [159]. Deplece S100A4 na zvířecím modelu vedla k významné redukci rizika vzniku kolorektální neoplázie a potlačení aktivity NF- κ B signální dráhy uvnitř makrofágů infiltrujících místo zánětu [159]. Ta hraje klíčovou roli v indukci proliferačních procesů premaligních intraepiteliálních buněk vlivem stimulace sekrece růstových cytokinů [87, 159].

6.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií

6.2.1 Proteiny S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11

Naše studie navazuje na předchozí práce z našeho pracoviště, ve kterých byla prokázána rozdílná tkáňová exprese proteinu S100A6, S100A8, S100A9 a S100A11 v normální, preneoplastické a neoplastické sliznici tlustého střeva [94, 111, 112]. Vzhledem k tomu, že hodnocení tkáňové exprese proteinů S100 je v běžné klinické praxi obtížně dostupné, v naší

současné práci jsme se zaměřili na posouzení sérové koncentrace jednotlivých S100 proteinů u pacientů s kolorektální neoplázií.

Dosažené výsledky ukazují významně nižší hodnoty proteinu S100A6 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině s pokročilým adenomem jsme pozorovali trend ke statistické významnosti. V literatuře doposud bylo publikováno pouze šest studií, které se zabývaly vyšetřením sérové koncentrace proteinu S100A6 ve vztahu k nádorovému onemocnění u lidí. Čtyři studie prokázaly zvýšené sérové koncentrace S100A6 u pacientů s karcinomem žaludku, uroteliálním karcinomem, karcinomem ovaria a u časných stadií nemalobuněčného karcinomu plic [166-169]. Další dvě studie se zabývaly úlohou proteinu S100A6 u pacientů s cholangiogenním karcinomem: Loosen et al. i přes potvrzenou zvýšenou tkáňovou expresi S100A6 neprokázali změny S100A6 v séru pacientů s cholangiogenním karcinomem [170]. Naproti tomu Onsurathum et al. ve své studii potvrdili významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100A6 u pacientů s cholangiogenním karcinomem [171]. Tyto hodnoty dosahovaly statistické významnosti již v časném stadiu cholangiogenního karcinomu [171]. Vysvětlením může být asociace cholangiogenního karcinomu s infekcí *Opisthorchis viverrini*, která je poměrně častá u thajské populace ve srovnání s populací evropskou [170, 171]. Feng et al. ve své studii na tkáňových kulturách lidského kolorektálního karcinomu potvrdili funkci proteinu S100A6, který zajišťuje kalcium dependentní translokaci CacyBP/SIP (calcium binding protein/Siah-1 interacting protein) z cytoplasmy do buněčného jádra [97]. CacyBP/SIP je součástí komplexu zajišťujícího ubikvitinaci (tzn. označení proteinů určených k odbourání) a degradaci β -kateninu. Vazba S100A6 s CacyBP/SIP a translokace tohoto komplexu do buněčného jádra tak vede k aktivaci Wnt/ β -kateninové dráhy, která představuje jeden ze základních procesů iniciace kolorektální karcinogeneze. Tato translokace proteinu S100A6 v průběhu vzniku kolorektálního karcinomu by mohla vysvětlit paradoxně zvýšené tkáňové exprese proteinu S100A6 a současně normální

či dokonce snížené hodnoty S100A6 v séru pacientů s kolorektální neoplázií, které byly pozorovány i v rámci naší studie.

Významně nižší sérové koncentrace u pacientů s kolorektálním karcinomem jsme prokázali i v případě proteinu S100A11. Hodnoty tohoto proteinu byly statisticky významně nižší i ve skupině s nepokročilým kolorektálním adenomem. Skupina s pokročilým kolorektálním adenomem vykazovala trend ke statistické významnosti. Vztah S100A11 ke kolorektální karcinogenezi je doložen v řadě studií, které potvrzují zvýšenou expresi S100A11 ve tkáni kolorektálního karcinomu [112, 127, 128]. Na rozdíl od ostatních proteinů S100 je S100A11 za fyziologických okolností lokalizován predominantně v buněčném jádře [122, 125]. Další studie dokládají význam S100A11 v regulaci buněčné proliferace vlivem interakce s DNA-dependentními ATPázami buněčného jádra Rad54B a Rad51, které zajišťují reparaci poškozených úseků buněčné DNA [172, 173]. Imunohistochemická studie Crosse et al. prokázala zvýšenou expresi S100A11 ve tkáni kolorektálního karcinomu, avšak tato byla na rozdíl od normální tkáně lokalizovaná v buněčné cytoplasmě [93]. Za jistých podmínek tedy zřejmě dochází uvnitř buňky s maligním potenciálem k nukleocytoplasmatické translokaci proteinu S100A11, která vede k dysfunkci DNA reparačních mechanismů a poklesu p21 a p13 (proteinů suprimujících nádorový růst). Důsledkem je pak hromadění chromozomálních aberací a akcelerace buněčného růstu [172, 173]. Dalším důsledkem nukleocytoplasmatické translokace proteinu S100A11 by mohla zřejmě být jeho snížená extracelulární produkce, kterou jsme pozorovali v naší studii. Vzhledem k významné redukci S100A11 u pacientů s nepokročilým kolorektálním adenomem lze spekulovat o tom, že k těmto procesům dochází již v časných stádiích vzniku kolorektální neoplázie. V současné době ale chybí v literatuře dostatek dat, která by toto tvrzení podpořila.

Zajímavé výsledky byly pozorovány v případě proteinů S100A8 a S100A9. Sérové koncentrace proteinu S100A8 byly významně vyšší u pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem a ve

skupině s kolorektálním karcinomem, zatímco protein S100A9 nevykazoval statisticky významně odlišné hodnoty ani u jedné z porovnávaných skupin. Oba proteiny jsou součástí heterokomplexu kalprotektinu (S100A8/S100A9), který se podílí na regulaci zánětlivých dějů a procesů karcinogeneze. U pacientů s kolorektálním karcinomem byly potvrzeny významně vyšší hodnoty fekálního kalprotektinu, avšak ty nekorelovaly s lokalizací karcinomu, jeho velikostí, stupněm diferenciací a klinickým stadiem [174, 175]. Lehmann et al. měřili fekální kalprotektin u pacientů s kolorektálním karcinomem před chirurgickou resekcí karcinomu a tři měsíce po ní v souboru 80 pacientů [176]. U všech pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří měli zvýšenou hodnotu fekálního kalprotektinu (celkem 71 % z celého měřeného souboru), došlo tři měsíce po operaci k jeho významnému poklesu [176]. Studie dále potvrdila významně vyšší hodnoty fekálního kalprotektinu u pacientů s T3 a T4 karcinomy ve srovnání s T1 a T2 karcinomy [176]. Je zajímavé, že fekální kalprotektin nekoreloval se stupněm zánětlivé intra- a peritumorální infiltrace buňkami imunitního systému [176]. Pezzilli et al. ve své studii z roku 2008 potvrdili zvýšenou hodnotu kalprotektinu ve stolici pacientů s přítomnými kolorektálními polypy, která byla významně vyšší nejen ve srovnání s jedinci s normálním koloskopickým nálezem ale i ve srovnání s pacienty s divertikulární chorobou [177]. Již v minulosti byla na našem pracovišti prokázána zvýšená exprese S100A8 a S100A9 v tkáni kolorektálního karcinomu ve srovnání se zdravou okolní sliznicí [111]. Naše současné výsledky jsou v souladu s pozdějšími analýzami Duana et al., kteří prokázali zvýšenou tkáňovou expresi obou proteinů v buňkách kolorektálního karcinomu za použití monoklonálních anti-S100A8 a anti-S100A9 protilátek [113]. V naší studii sérové koncentrace S100A9 neodrážely v literatuře doloženou zvýšenou expresi tohoto proteinu u kolorektálního karcinomu [111, 118, 178]. Lze předpokládat, že naše výsledky by mohly reflektovat závěry práce Kima et al., kteří nedávno poukázali na anti-tumorózní efekt S100A9: studie *in vitro* demonstrovala schopnost buněk kolorektálního karcinomu vychytávat extracelulární S100A9 [179]. Internalizace S100A9 byla

spojená s redukcí proliferace a zvýšenou mírou apoptózy nádorových buněk [179]. Za zmínku stojí skutečnost, že autoři v této studii testovali kromě buněčných linií kolorektálního karcinomu také buněčné linie karcinomu prsu, žaludku, ovaria a cervixu. Internalizace S100A9 byla však pozorována pouze u buněk kolorektálního karcinomu [179].

6.2.2. Protein S100P a kolorektální karcinom

Naše studie potvrdila asociaci sérových koncentrací proteinu S100P s kolorektálním karcinomem. Prokázali jsme významně vyšší sérové koncentrace S100P u pacientů v klinickém stadiu TNM IV. Dostupné studie ukazují, že zvýšená tkáňová exprese proteinu S100P je spojená s proliferací nádorových buněk, podílí se na regulaci jejich motility a tím schopnosti invaze a vzniku metastáz [154, 180]. Studie Kita et al. a později také studie Lama et al. doložily zvýšenou expresi proteinu S100P již ve tkáni kolorektálních adenomů [182, 183]. Zvýšená tkáňová exprese proteinu S100P u kolorektálního karcinomu v práci Shena korelovala s přítomností vzdálených metastáz [154]. Naopak, down-regulace proteinu S100P byla spojená s poklesem invazivního a metastatického potenciálu buněk kolorektálního karcinomu [154]. Nedávno publikovaná studie Zuo et al. prokázala vzájemnou interakci S100P a Trx-1, která vedla k indukci procesů EMT (epithelial-mesenchymal transition), která je považovaná za základní mechanismus přeměny nádorové buňky v buňku mezenchymálního typu schopnou invaze a vzdálené migrace [151]. Vyšší hodnoty S100P u pacientů v pokročilých stádiích kolorektálního karcinomu, které jsme pozorovali v naší studii, jsou v souladu s dostupnými daty, které dokládají zvýšenou expresi S100P u kolorektálního karcinomu. Naše studie dále prokázala významně vyšší sérové koncentrace proteinu S100P u pacientů se středně diferencovaným kolorektálním karcinomem. I přesto, že jsme u nízké diferencovaných karcinomů signifikantní rozdíly neprokázali, při srovnání skupin G2+G3 s kontrolní skupinou byl rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky významný. Důvodem může být malá

velikost souboru G3 skupiny. V literatuře jsou dostupné pouze ojedinělé studie, ve kterých jejich autoři zkoumali korelaci mezi stupněm diferenciací kolorektálního karcinomu a tkáňovou expresí proteinu S100P [152-154]. Ani jedna studie vztah mezi stupněm diferenciací a zvýšenou tkáňovou expresí S100P u kolorektálního karcinomu neprokázala. Naše studie jako první dokládá nejen korelaci sérových koncentrací proteinu S100P ale i jeho možný vztah ke stupni diferenciací přítomného kolorektálního karcinomu. V naší studii jsme nepotvrdili závěry dřívějších prací, které dokumentovali vyšší tkáňovou expresi S100P u nádorů v pravém tračníku [137, 153]. V našem souboru byly sérové koncentrace S100P vyšší u pacientů s kolorektálním karcinomem v levé polovině tračníku. Vysvětlením může být především skutečnost, že tato skupina byla zastoupena ve 37 % (11 z 30) pacienty v TNM stadiu IV. Ve srovnání s touto skutečností, skupina pacientů s karcinomem v pravé polovině tračníku zahrnovala pouze 3 pacienty (3 z 13) s kolorektálním karcinomem ve IV. stadiu nemoci. Dalším vysvětlením může být absence korelace sérové koncentrace proteinu S100P s jeho tkáňovou expresí, kterou jsme v naší studii neprováděli. Vzhledem k tomu, že časná stadia kolorektálního karcinomu probíhají asymptomaticky, je v současné době snahou kromě optimalizace screeningových metod identifikovat takový biomarker, který by umožnil: 1. časnou detekci nádoru, 2. predikovat chování nádoru, 3. lépe určit prognózu onemocnění, 4. stratifikovat odpověď karcinomu na podanou protinádorovou terapii a 5. časnou detekci lokální recidivy a/nebo metastatického procesu [135]. Vyšší exprese proteinu S100P ve tkáni kolorektálního karcinomu a v séru pacientů s kolorektálním karcinomem je asociována s horší prognózou a menším počtem nemocných s pětiletým přežitím [149, 152]. Výsledky naší studie ukazují, že sérový protein S100P by mohl být vhodným biomarkerem u pacientů s kolorektálním karcinomem.

7. Závěry

7.1. Protein S100A4 u idiopatických střevních zánětů

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

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

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

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

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

7.2. Proteiny S100 u kolorektálních neoplázií

7.2.1. Asociace proteinů S100 (S100A6, S100A8, S100A9, S100A11, S100P)

s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií

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

7.2.2. Stanovení pozitivní a negativní prediktivní hodnoty proteinů S100

u kolorektálních neoplázií a určení možného klinického využití jako biomarkeru kolorektálních neoplázií

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

8. Literatura

1. International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, IARC, Lyon, France, 2013. [online]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
2. Gregor J, Malúšková D, Mužík J, Šnajdrová L. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno. [online]. Available from: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>
3. Suchánek Š, Grega T, Zavoral M. Colorectal cancer screening. *Vnitr Lek* 2018; 64(6): 679-83.
4. Shen H, Yang J, Huang Q, Jiang MJ, Tan YN, Fu JF, Zhu LZ, Fang XF, Yuan Y. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided coloncancers. *World J Gastroenterol* 2015; 21(21): 6470-78.
5. Boeckx N, Janssens K, Van Camp G, Rasschaert M, Papadimitriou K, Peeters M, Op de Beeck K. The predictive value of primary tumor localization in patients with metastatic colorectal cancer: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 121: 1-10.
6. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel)* 2018; 6(2): E31.
7. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
8. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, Broadbent T, Sarkar S, Burt RW, Jones DA. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009; 137: 623–34.
9. Li T, Zhang L, Huo X. Inhibitory effects of aesculetin on the proliferation of colon cancer cells by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol Lett* 2018; 15(5): 7118-22.

10. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H, Lowe SW. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell* 2015; 161: 1539–52.
11. Walther A, Houlston R, Toulinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Gut* 2008; 57: 941–50.
12. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 489–99.
13. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5(6): 435-45.
14. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-18.
15. Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology* 2004; 127(5): 1578-88.
16. Král J, Slyšková J, Vodička P, Špičák J. Molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Klin Onkol* 2016; 29(6): 419-27.
17. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015; 6: 20.
18. Ahn J, Sinha R, Pei Z, Dominianni C, Wu J, Shi J, Goedert JJ, Hayes RB, Yang L. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(24): 1907-11.
19. Kohoutova D, Drahosova M, Cihak M, Moravkova P, Bures J. Anti-Outer membrane protein C antibodies in colorectal neoplasia. *Folia Microbiol (Praha)* 2016; 61(4): 295-99.
20. Bureš J. Maligní nádory tlustého střeva (s. 423-430). In: Bureš J, Horáček J, Malý J et al. *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén, 2013.

21. Kim DH, Jin YH. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 2001; 24(6): 564-67.
22. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3: 153–73.
23. Benson AB 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Enzinger PC, Fichera A, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffs S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, Willett CG, Wu CS, Gregory KM, Freedman-Cass D. Colon Cancer, Version 4.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. [online]: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon_blocks.pdf
24. van der Sluis FJ, van Westreenen HL, van Etten B, van Leeuwen BL, de Bock GH. Pretreatment identification of patients likely to have pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2018; 33(2): 149-57.
25. Kim MJ, Jeong SY, Choi SJ, Ryoo SB, Park JW, Park KJ, Oh JH, Kang SB, Park HC, Heo SC, Park JG. Survival paradox between stage IIB/C (T4N0) and stage IIIA (T1-2N1) colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(2): 505-12.
26. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(19): 1420-25.
27. Patrignani P, Sacco A, Sostres C, Bruno A, Dovizio M, Piazzuelo E, Di Francesco L, Contursi A, Zucchelli M, Schiavone S, Tacconelli S, Patrono C, Lanas A. Low-Dose Aspirin Acetylates Cyclooxygenase-1 in Human Colorectal Mucosa: Implications for the Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2017; 102(1): 52-61.

28. Elsheikh W, Blackler RW, Flannigan KL, Wallace JL. Enhanced chemopreventive effects of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug (ATB-346) in experimental colorectal cancer. *Nitric Oxide* 2014; 41: 131-37.
29. Takayama T, Nagashima H, Maeda M, Nojiri S, Hirayama M, Nakano Y, Takahashi Y, Sato Y, Sekikawa H, Mori M, et al. Randomized double-blind trial of sulindac and etodolac to eradicate aberrant crypt foci and to prevent sporadic colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3803–11.
30. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnolli M. Adenoma Prevention with Celecoxib (APC) Study Investigators. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 2005; 352: 1071–80.
31. Mohammed A, Janakiram NB, Li Q, Choi CI, Zhang Y, Steele VE, Rao CV. Chemoprevention of colon and small intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice by licofelone, a novel dual 5-LOX/COX inhibitor: Potential implications for human colon cancer prevention. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 2015–26.
32. Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1999; 96: 5292–97.
33. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Du-Bois RN. Upregulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183–88.
34. Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappiè O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001; 121(6): 1339-47.

35. Hsu HH, Lin YM, Shen CY, Shibu MA, Li SY, Chang SH, Lin CC, Chen RJ, Viswanadha VP, Shih HN, Huang CY. Prostaglandin E2-Induced COX-2 Expressions via EP2 and EP4 Signaling Pathways in Human LoVo Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2017; 25: 18(6).
36. Kagbo-Kue S, Ajose T, Bakinde N. Aspirin inhibited the metastasis of colon cancer cells by inhibiting the expression of toll-like receptor 4. *Cell Biosc* 2018; 8: 36.
37. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Shiff SI, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 237–45.
38. Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7: 1–12.
39. Sobradillo D, Hernández-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Nuñez L, Villalobos C. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2014; 289: 28765–82.
40. Moravkova P, Kohoutova D, Rejchrt S, Cyrany J, Bures J. Role of S100 Proteins in Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterol Res Pract* 2016; 2016: 2632703.
41. Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017; 1864(6): 843-49.
42. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? results of the european collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39: 690–97.
43. Burisch J, Pedersen N, Čukovic-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut* 2014; 63: 588–97.

44. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142(1): 46-54.
45. Ng S, Kaplan GG, Tang W et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease from 13 countries in Asia-Pacific: results from Asia-Pacific Crohn's and Colitis epidemiologic study 2011–2013. *Gastroenterol* 2016; 150(suppl 1): S21.
46. Yang SK. How Does the Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease Differ between East and West? A Korean Perspective. *Inflamm Intest Dis* 2017; 2(2): 95-101.
47. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50(8): 942-51.
48. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ, Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012; 13(9): R79.
49. Sokol H, Lepage P, Seksik P, Doré J, Marteau P. Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3172-77.
50. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127(2): 412-21.
51. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 2018; 11(1): 1-10.

52. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174(8): 4453-60.
53. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603–6.
54. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278(8): 5509-12.
55. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol* 2018; 53(4): 379-89.
56. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012; 491: 119–24.
57. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004; 5(8): 800-8.
58. Fischer A, Zundler S, Atreya R, et al. Differential effects of a4b7 and GPR15 on homing of effector and regulatory T cells from patients with UC to the inflamed gut in vivo. *Gut* 2016; 65: 1642–64.
59. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV Jr, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory

- bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36.
60. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P; ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017; 11(1): 3-25.
61. Kawasaki H, Kretsinger RH. Structural and functional diversity of EF-hand proteins: Evolutionary perspectives. *Protein Sci* 2017; 26(10): 1898-920.
62. Kretsinger R. H., Nockolds C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *The Journal of Biological Chemistry* 1973; 248 (9): 3313–26.
63. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 Proteins. *Current molecular medicine* 2013; 13(1): 24-57.
64. Moore B. W., McGregor D. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1965; 240: 1647–53.
65. Isobe T, Okuyama T. The amino acid sequence of the S100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium binding proteins. *Eur J Biochem* 1978; 89: 379–88.
66. Isobe T, Okuyama T. The amino acid sequence of the α -subunit in bovine brain S100a protein. *Eur J Biochem* 1981; 116: 79–86.
67. Deloulme JC, Mbele GO, Baudier J. S100 proteins. From purification to functions. *Methods in Molecular Biology* 2002; 172: 185–98.

68. Fritz G, Heizmann CW, Kroneck PM. Probing the structure of the human Ca²⁺- and Zn²⁺-binding protein S100A3: spectroscopic investigations of its transition metal ion complexes, and three-dimensional structural model. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1448(2): 264-76.
69. Tarabykina S, Scott DJ, Herzyk P, Hill TJ, Tame JR, Kriaievska M, Lafitte D, Derrick PJ, Dodson GG, Maitland NJ, Lukanidin EM, Bronstein IB. The dimerization interface of the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1): in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem* 2001; 276(26): 24212-22.
70. Inman KG, Tang R, Rustandi RR, Miller KE, Baldisseri DM, Weber DJ. Solution NMR structure of S100B bound to the high affinity target peptide TRTK-12. *J Mol Biol* 2002; 324: 1003–14.
71. Zhang H, Wang G, Ding Y, Wang Z, Barraclough R, Rudland PS, Fernig DG, Rao Z. The crystal structure at 2Å resolution of the Ca²⁺ -binding protein S100P. *J Mol Biol* 2003; 325(4): 785-94.
72. Kizawa K, Jinbo Y, Inoue T, Takahara H, Unno M, Heizmann CW, Izumi Y. Human S100A3 tetramerization propagates Ca(2+)/Zn(2+) binding states. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(7): 1712-19.
73. Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Simmen B, Michel BA, Pavelka K, Gay RE, Gay S, Neidhart M. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(12): 1645-48.
74. Moroz OV, Dodson GG, Wilson KS, Lukanidin E, Bronstein IB. Multiple structural states of S100A12: A key to its functional diversity. *Microsc Res Tech* 2003; 60(6): 581-92.
75. Gilston BA, Skaar EP, Chazin WJ. Binding of transition metals to S100 proteins. *Sci China Life Sci* 2016; 59(8): 792-801.

76. Rustandi RR, Baldisseri DM, Inman KG, Nizner P, Hamilton SM, Landar A, Landar A, Zimmer DB, Weber DJ. Three-dimensional solution structure of the calcium-signaling protein apo-S100A1 as determined by NMR. *Biochemistry* 2002; 41(3): 788-96.
77. Roulin K, Hagens G, Hotz R, Saurat JH, Veerkamp JH, Siegenthaler G. The fatty acid-binding heterocomplex FA-p34 formed by S100A8 and S100A9 is the major fatty acid carrier in neutrophils and translocates from the cytosol to the membrane upon stimulation. *Exp Cell Res* 1999; 247(2): 410-21.
78. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal* 2006; 396(Pt 2): 201-14.
79. Barraclough R, Dawson KJ, Rudland PS. Control of protein synthesis in cuboidal rat mammary epithelial cells in culture. Changes in gene expression accompany the formation of elongated cells. *Eur J Biochem* 1982; 129(2): 335-41.
80. Barraclough R, Savin J, Dube SK, Rudland PS. Molecular cloning and sequence of the gene for p9Ka. A cultured myoepithelial cell protein with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J Mol Biol* 1987; 198(1): 13-20.
81. Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev* 1989; 3(7): 1086-93.
82. Fei F, Qu J, Li C, Wang X, Li Y, Zhang S. Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiology. *Cell Biosci* 2017; 7: 64.
83. Fei F, Qu J, Zhang M, Li Y, Zhang S. S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget* 2017; 8(42): 73219-39.
84. Boye K, Jacob H, Frikstad KA, Nesland JM, Maeldansmo GM, Dahl O, Nesbakken A, Flatmark K. Prognostic significance of S100A4 expression in stage II and

- III colorectal cancer: results from a population-based series and a randomized phase III study on adjuvant chemotherapy. *Cancer Med* 2016; 5(8): 1840-49.
- 85.** Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, Schlag PM, Shoemaker RH. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 2006; 131(5): 1486-500.
- 86.** Kriajevska M, Bronstein IB, Scott DJ, Tarabykina S, Fischer-Larsen M, Issinger O, Lukanidin E. Metastasis-associated protein Mts1 (S100A4) inhibits CK2-mediated phosphorylation and self-assembly of the heavy chain of nonmuscle myosin. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498(2-3): 252-63.
- 87.** Cerezo LA, Remáková M, Tomčík M, Gay S, Neidhart M, Lukanidin E, Pavelka K, Grigorian M, Vencovský J, Šenolt L. The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(8): 1520-26.
- 88.** Cunningham MF, Docherty NG, Burke JP, O'Connell PR. S100A4 expression is increased in stricture fibroblasts from patients with fibrostenosing Crohn's disease and promotes intestinal fibroblast migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299(2): G457-66.
- 89.** Donato R, Sorci G, Giambanco I. S100A6 protein: functional roles. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(15): 2749-60.
- 90.** Hirschhorn RR, Aller P, Yuan ZA, Gibson CW, Baserga R. Cell-cycle-specific cDNAs from mammalian cells temperature sensitive for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(19): 6004-8.
- 91.** Kuźnicki J, Filipek A. Purification and properties of a novel Ca²⁺-binding protein (10.5 kDa) from Ehrlich-ascites-tumour cells. *Biochem J* 1987; 247(3): 663-67.

92. Filipek A, Kuźnicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin. *J Neurochem* 1998; 70(5): 1793-98.
93. Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 2005; 46(3): 256-69.
94. Stulík J, Osterreicher J, Koupilová K, Knízek J, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Schäfer BW, Heizmann CW. Differential expression of the Ca²⁺ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa. *Eur J Cancer* 2000; 36(8): 1050-59.
95. Duan L, Wu R, Zou Z, Wang H, Ye L, Li H, Yuan S, Li X, Zha H, Sun H, Zhang Y, Chen X, Zhou L. S100A6 stimulates proliferation and migration of colorectal carcinoma cells through activation of the MAPK pathways. *Int J Oncol* 2014; 44(3): 781-90.
96. Kilańczyk E, Graczyk A, Ostrowska H, Kasacka I, Leśniak W, Filipek A. S100A6 is transcriptionally regulated by β -catenin and interacts with a novel target, lamin A/C, in colorectal cancer cells. *Cell Calcium* 2012; 51(6): 470-77.
97. Feng S, Zhou Q, Yang B, Li Q, Liu A, Zhao Y, Qiu C, Ge J, Zhai H. The effect of S100A6 on nuclear translocation of CacyBP/SIP in colon cancer cells. *PLoS One* 2018; 13(3): e0192208.
98. Zhai H, Shi Y, Chen X, Wang J, Lu Y, Zhang F, Liu Z, Lei T, Fan D. CacyBP/SIP promotes the proliferation of colon cancer cells. *PLoS One* 2017; 12(2): e0169959.
99. Lagasse E, Clerc RG. Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2402-10.

- 100.** Ghavami S., Kerkhoff C., Chazin W. J., et al. S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research* 2008; 1783(2): 297–311.
- 101.** Leukert N, Vogl T, Strupat K, Reichelt R, Sorg C, Roth J. Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *J Mol Biol* 2006; 359(4): 961-72.
- 102.** Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 2008; 319: 962–65.
- 103.** Damo SM, Kehl-Fie TE, Sugitani N, Holt ME, Rathi S, Murphy WJ, Zhang Y, Betz C, Hench L, Fritz G, Skaar EP, Chazin WJ. Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 3841–46.
- 104.** Pruenster M, Vogl T, Roth J, Sperandio M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther* 2016; 167: 120-31.
- 105.** Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 99-126.
- 106.** Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 3658–65.
- 107.** Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, Most P, Weichenhan D, Greten J, Nawroth PP, Katus HA, Remppis A. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9

after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 6.

- 108.** Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3): 557-66.
- 109.** Okada K, Arai S, Nakase H, Kohno H, Nakamura F, Takeda M, Toda Y, Itoh H, Adachi S, Ikemoto M. Autocrine pathways involving S100A8 and/or S100A9 that are postulated to regulate the immunological functions of macrophages in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 456(1): 415-20.
- 110.** Okada K, Itoh H, Kamikubo Y, Adachi S, Ikemoto M. Establishment of S100A8 Transgenic Rats to Understand Innate Property of S100A8 and Its Immunological Role. *Inflammation* 2018; 41(1): 59-72.
- 111.** Stulík J, Osterreicher J, Koupilová K, Knízek, Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. *Electrophoresis* 1999; 20(4-5): 1047-54.
- 112.** Stulík J, Koupilova K, Osterreicher J, Knízek J, Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma. *Electrophoresis* 1999; 20(18): 3638-46.
- 113.** Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, Chen X, Zuo G, Zhang Y, Weng Y, Luo J, Tang M, Shi Q, He T, Zhou L. S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS One* 2013; 8(4): e62092.

114. Başsorgun Cİ, Unal B, Erin N, Ozlük A, Uzun OC, Elpek GÖ. S100A8 and S100A9 Positive Cells in Colorectal Carcinoma: Clinicopathological Analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2014; 2014: 943175.
115. Ang CW, Nedjadi T, Sheikh AA, Tweedle EM, Tonack S, Honap S, Jenkins RE, Park BK, Schwarte-Waldhoff I, Khattak I, Azadeh B, Dodson A, Kalirai H, Neoptolemos JP, Rooney PS, Costello E. Smad4 loss is associated with fewer S100A8-positive monocytes in colorectal tumors and attenuated response to S100A8 in colorectal and pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2010; 31(9): 1541-51.
116. Ghavami S., Kerkhoff C., Los M., Hashemi M., Sorg C., Karami-Tehrani F. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 76(1): 169–75.
117. Ghavami S., Rashedi I., Dattilo B. M., et al. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 83(6): 1484–92.
118. Ichikawa M., Williams R., Wang L., Vogl T., Srikrishna G. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Molecular Cancer Research* 2011; 9(2): 133–48.
119. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; 31(6): 220-27.
120. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, Nguyen M, Olsson A, Nawroth PP, Bierhaus A, Varki N, Kronenberg M, Freeze HH, Srikrishna G. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2008; 29(10): 2035–43.
121. DeVries G, McDonald JR, Walsh MP. Calmodulin-like Ca(2+)-binding proteins of smooth muscle. *Cell Calcium Metabolism* 1989; 427–37.

122. Inada H, Naka M, Tanaka T, Davey GE, Heizmann CW. Human S100A11 exhibits differential steady-state RNA levels in various tissues and a distinct subcellular localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 263(1): 135–38.
123. Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonogawa H, Kashiwagi M, Ohba M, Kuroki T, Namba M, Huh NH. PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *Journal of Cell Biology* 2004; 164(7): 979–84.
124. Sakaguchi M, Sonogawa H, Murata H, Kitazoe M, Futami J, Kataoka K, Yamada H, Huh NH. S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19(1): 78–85.
125. He H, Li J, Weng S, Li M, Yu Y. S100A11: diverse function and pathology corresponding to different target proteins. *Cell Biochem Biophys* 2009; 55(3): 117-26.
126. Lauritzen SP, Boye TL, Nylandsted J. Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 45: 32-38.
127. Tanaka M, Adzuma K, Iwami M, Yoshimoto K, Monden Y, Itakura M. Human calgizzarin; one colorectal cancer-related gene selected by a large scale random cDNA sequencing and northern blot analysis. *Cancer Lett* 1995; 89(2): 195-200.
128. Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Mothes H, Kaufmann R, Settmacher U, Von Eggeling F. Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28(1): 195-200.
129. Niu Y, Shao Z, Wang H, Yang J, Zhang F, Luo Y, Xu L, Ding Y, Zhao L. LASP1-S100A11 axis promotes colorectal cancer aggressiveness by modulating TGF β /Smad signaling. *Sci Rep* 2016; 6: 26112.
130. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; 95(1): 333-39.

131. Becker T, Gerke V, Kube E, Weber K. S100P, a novel Ca²⁺-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca²⁺ binding properties. *Eur J Biochem* 1992; 207(2): 541-47.
132. Emoto Y, Kobayashi R, Akatsuka H, Hidaka H. Purification and characterization of a new member of the S-100 protein family from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182(3): 1246-53.
133. Schäfer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 1995; 25(3): 638-43.
134. Shang X, Cheng H, Zhu R. Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family. *Genet Sel Evol* 2008; 40(4): 449–64.
135. Moravkova P, Kohoutova D, Drahosova M, Bures J. Serum concentration of S100P protein with colorectal cancer. *Gastroent Hepatol* 2017; 71(4): 293-98.
136. Jin G, Wang S, Hu X, Jing Z, Chen J, Ying K, Xie Y, Mao Y. Characterization of the tissue-specific expression of the s100P gene which encodes an EF-hand Ca²⁺-binding protein. *Mol Biol Rep* 2003; 30(4): 243-48.
137. Fuentes MK, Nigavekar SS, Arumugam T, Logsdon CD, Schmidt AM, Park JC, Huang EH. RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(8): 1230-40.
138. Arumugam T, Simeone DM, Schmidt AM, Logsdon CD. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 2004; 279(7): 5059-65.

- 139.** Mercado-Pimentel ME, Onyeagucha BC, Li Q, Pimentel AC, Jandova J, Nelson MA. The S100P/RAGE signaling pathway regulates expression of microRNA-21 in colon cancer cells. *FEBS letters* 2015; 589(18): 2388-93.
- 140.** Prica F, Radon T, Cheng Y, Crnogorac-Jurcevic T. The life and works of S100P - from conception to cancer. *Am J Cancer Res* 2016; 6(2): 562–76.
- 141.** Koltzsch M, Neumann C, König S, Gerke V. Ca²⁺-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P. *Mol Biol Cell* 2003; 14(6): 2372-84.
- 142.** Austermann J, Nazmi AR, Müller-Tidow C, Gerke V. Characterization of the Ca²⁺-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration. *J Biol Chem* 2008; 283(43): 29331–40.
- 143.** Leiphrakpam PD, Rajput A, Mathiesen M, Agarwal E, Lazenby AJ, Are Ch, Brattain MG, Chowdhury S. Ezrin expression and cell survival regulation in colorectal cancer. *Cell Signal* 2014; 26(5): 868–79.
- 144.** Parkkila S, Pan P, Ward A, Gibadulinova A, Oveckova I, Pastorekova S, Pastorek J, Martinez AR, Helin HO, Isola J. The calcium-binding protein S100P in normal and malignant human tissues. *BMC Clin Pathol* 2008; 8: 2.
- 145.** Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005; 54(3): 374-84.
- 146.** Li JN, Zhao L, Wu J, Wu B, Yang H, Zhang HH, Qian JM. Differences in gene expression profiles and carcinogenesis pathways between colon and rectal cancer. *J Dig Dis* 2012; 13(1): 24-32.
- 147.** Weidle UH, Birzele F, Krüger A. Molecular targets and pathways involved in liver metastasis of colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 2015; 32(6): 623-35.

- 148.** Chiang JM, Tan R, Wang JY, Chen JS, Lee YS, Hsieh PS, Changchien CR, Chen JR. S100P, a calcium-binding protein, is preferentially associated with the growth of polypoid tumors in colorectal cancer. *Int J Mol Med* 2015; 35(3): 675-83.
- 149.** Royse KE, Chen L, Berger DH, Ittmann MM, El-Serag HB, Balentine CJ, Graham DY, Richardson PA, Rumbaut RE, Shen X, White DL, Jiao L. Expression of pattern recognition receptor genes and mortality in patients with colorectal adenocarcinoma. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2017; 8(2): 8-18.
- 150.** Lin F, Zhang P, Zuo Z, Wang F, Bi R, Shang W, Wu A, Ye J, Li S, Sun X, Wu J, Jiang L. Thioredoxin-1 Promotes Colorectal Cancer Invasion and Metastasis through Crosstalk with S100P. *Cancer Letters* 2017; 401: 1-10.
- 151.** Zuo Z, Zhang P, Lin F, Shang W, Bi R, Lu F, Wu J, Jiang L. Interplay between Trx-1 and S100P promotes colorectal cancer cell epithelial-mesenchymal transition by up-regulating S100A4 through AKT activation. *J Cell Mol Med* 2018; 22(4): 2430-41.
- 152.** Wang Q, Zhang YN, Lin GL, Qiu HZ, Wu B, Wu HY, Zhao Y, Chen YJ, Lu ChM. S100P, a potential novel prognostic marker in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2012; 28(1): 303–10.
- 153.** Dong L, Wang F, Yin X, Chen L, Li G, Lin F, Ni W, Wu J, Jin R, Jiang L. Overexpression of S100P promotes colorectal cancer metastasis and decreases chemosensitivity to 5-FU in vitro. *Mol Cell Biochem* 2014; 389(1-2): 257-64.
- 154.** Shen ZY, Fang Y, Zhen L, Zhu XJ, Chen H, Liu H, Jiang B, Li GX, Deng HJ. Analysis of the predictive efficiency of S100P on adverse prognosis and the pathogenesis of S100P-mediated invasion and metastasis of colon adenocarcinoma. *Cancer Genet* 2016; 209(4): 143-53.
- 155.** Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 1982; 35(8): 830-41.

- 156.** Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E. Metastasis-inducing S100A4 protein: implication in non-malignant human pathologies. *Curr Mol Med* 2008; 8(6): 492–96.
- 157.** Zhang J, Jiao Y, Hou S, Tian T, Yuan Q, Hao H, Wu Z, Bao X. S100A4 contributes to colitis development by increasing the adherence of *Citrobacter rodentium* in intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 2017; 7: 12099.
- 158.** Higgins LM, Frankel G, Douce G, Dougan G, MacDonald TT. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 1999; 67(6): 3031-39.
- 159.** Zhang J, Hou S, Gu J, Tian T, Yuan Q, Jia J, Qin Z, Chen Z. S100A4 promotes colon inflammation and colitis-associated colon tumorigenesis. *Oncoimmunology* 2018; 11; 7(8): e1461301.
- 160.** Li ZH, Dulyaninova NG, House RP, Almo SC, Bresnick AR. S100A4 regulates macrophage chemotaxis. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 2598–610.
- 161.** Dulyaninova NG, Ruiz PD, Gamble MJ, Backer JM, Bresnick AR. S100A4 regulates macrophage invasion by distinct myosin-dependent and myosin-independent mechanisms. *Mol Biol Cell* 2018; 29(5): 632-42.
- 162.** Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130(2): 393-405.
- 163.** Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 2008; 88(2): 112-23.
- 164.** Yan LB, Zhang QB, Zhu X, He M, Tang H. Serum S100 calcium binding protein A4 improves the diagnostic accuracy of transient elastography for assessing liver fibrosis in hepatitis B. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2018; 42(1): 64-71.

- 165.** Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, Vencovsky J, Pavelka K, Klingelhöfer J, Gay S, Neidhart M, Brabcová H, Suchy D, Senolt L. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(12): 1590-94.
- 166.** Zhang J, Zhang K, Jiang X, Zhang J. S100A6 as a potential serum prognostic biomarker and therapeutic target in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2014; 59(9): 2136-44.
- 167.** Nishi M, Matsumoto K, Kobayashi M, Yanagita K, Matsumoto T, Nagashio R, Ishii D, Fujita T, Sato Y, Iwamura M. Serum expression of S100A6 is a potential detection marker in patients with urothelial carcinoma in the urinary bladder. *Biomed Res* 2014; 35(6): 351-56.
- 168.** Wei BR, Hoover SB, Ross MM, Zhou W, Meani F, Edwards JB, Spehalski EI, Risinger JI, Alvord WG, Quiñones OA, Belluco C, Martella L, Campagnutta E, Ravaggi A, Dai RM, Goldsmith PK, Woolard KD, Pecorelli S, Liotta LA, Petricoin EF, Simpson RM. Serum S100A6 concentration predicts peritoneal tumor burden in mice with epithelial ovarian cancer and is associated with advanced stage in patients. *PLoS One* 2009; 4(10): e7670.
- 169.** Wang T, Liang Y, Thakur A, Zhang S, Yang T, Chen T, Gao L, Chen M, Ren H. Diagnostic significance of S100A2 and S100A6 levels in sera of patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(2): 2299-304.
- 170.** Loosen SH, Benz F, Niedeggen J, Schmeding M, Schüller F, Koch A, Vucur M, Tacke F, Trautwein C, Roderburg C, Neumann UP, Luedde T. Serum levels of S100A6 are unaltered in patients with resectable cholangiocarcinoma. *Clin Transl Med* 2016; 5(1): 39.
- 171.** Onsurathum S, Haonon O, Pinlaor P, Pairojkul C, Khuntikeo N, Thanan R, Roytrakul S, Pinlaor S. Proteomics detection of S100A6 in tumor tissue interstitial fluid and

- evaluation of its potential as a biomarker of cholangiocarcinoma. *Tumour Biol* 2018; 40(4): 1010428318767195.
- 172.** Murzik U, Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Ulbricht T, Bussen W, Hentschel J, von Eggeling F, Melle C. Rad54B targeting to DNA double-strand break repair sites requires complex formation with S100A11. *Mol Biol Cell* 2008; 19(7): 2926-35.
- 173.** Foertsch F, Szambowska A, Weise A, Zielinski A, Schlott B, Kraft F, Mrasek K, Borgmann K, Pospiech H, Grosse F, Melle C . S100A11 plays a role in homologous recombination and genome maintenance by influencing the persistence of RAD51 in DNA repair foci. *Cell Cycle* 2016; 15(20): 2766-79.
- 174.** Kristinsson J, Røseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjøsby H, Børner OP, Raknerud N, Nygaard K. Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1998; 41(3): 316-21.
- 175.** Kristinsson J, Armbruster CH, Ugstad M, Kriwanek S, Nygaard K, Tøn H, Fuglerud P. Fecal excretion of calprotectin in colorectal cancer: relationship to tumor characteristics. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(2): 202-7.
- 176.** Lehmann FS, Trapani F, Fueglistaler I, Terracciano LM, von Flüe M, Cathomas G, Zetl A, Benkert P, Oertli D, Beglinger C. Clinical and histopathological correlations of fecal calprotectin release in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20(17): 4994-99.
- 177.** Pezzilli R, Barassi A, Morselli Labate AM, Finazzi S, Fantini L, Gizzi G, Lotzniker M, Villani V, Melzi d'Eril G, Corinaldesi R. Fecal calprotectin levels in patients with colonic polyposis. *Dig Dis Sci* 2008; 53(1): 47-51.
- 178.** Peng F, Huang Y, Li MY, Li GQ, Huang HC, Guan R, Chen ZC, Liang SP, Chen YH. Dissecting characteristics and dynamics of differentially expressed proteins during

multistage carcinogenesis of human colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(18): 4515-28.

- 179.** Kim K, Kim KH, Roh K, Yoo BC, Ku JL, Shin YK, Cho JY, Kim M, Kwon MH, Goh SH, Chang HJ, Oh JH. Antitumor effects of calgranulin B internalized in human colon cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(15): 20368-80.
- 180.** Jiang L, Lai Y-K, Zhang J, Wang H, Lin MC, He ML, Kung HF. Targeting S100P inhibits colon cancer growth and metastasis by Lentivirus-mediated RNA interference and proteomic analysis. *Mol Med* 2011; 17: 709–16.
- 181.** Shen Z, Deng H, Fang Y, Zhu X, Ye GT, Yan L, Liu H, Li G. Identification of the interplay between SOX9 and S100P in the metastasis and invasion of colon carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6(24): 20672-84.
- 182.** Kita H, Hikichi Y, Hikami K, Tsuneyama K, Cui ZG, Osawa H, Ohnishi H, Mutoh H, Hoshino H, Bowlus CL, Yamamoto H, Sugano K. Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis. *J Gastroenterol* 2006; 41(11): 1053-63.
- 183.** Lam FF, Jankova L, Dent OF, Molloy MP, Kwun SY, Clarke C, Chapuis P, Robertson G, Beale P, Clarke S, Bokey EL, Chan C. Identification of distinctive protein expression patterns in colorectal adenoma. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4(1): 60-70.

9. Přílohy

Příloha 1: Informovaný souhlas pacienta se studií

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové,
II. interní gastroenterologická klinika
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, tel: +420 495 834 240, fax: +420 495 834 785

Název studie:

Stanovení anti-porinových protilátek, S100 proteinů v periferní žilní krvi; vyšetření apoptózy a zastoupení bakterií v bioticky odebraných vzorcích z tlustého střeva

Koordinátor výzkumu: MUDr. Darina Kohoutová

Cíl studie

Stanovit anti-porinové protilátky a S100 proteiny v periferní krvi (odběr 10 ml krve), vyšetřit apoptózu a zastoupení bakterií v tlustém střevě (ze vzorků odebraných při koloskopii)

Informovaný souhlas nemocného

Jméno a příjmení:

Rodné číslo:

1. Souhlasím, aby moje osobní údaje byly trvale zapracovány do dokumentace II. interní gastroenterologické kliniky FNHK pro účely vědecké a výzkumné. Údaje poskytnu dobrovolně a jsem si vědom toho, že svůj souhlas se zpracováním osobních údajů mohu kdykoliv odvolat.
2. Souhlasím s jednorázovým odběrem krve (množství 10 ml, bude provedeno při zavádění periferního žilního katetru)
3. Souhlasím s bezbolestným odběrem biotických vzorků z tlustého střeva v rámci rutinní koloskopie

Doplňk k informaci pro pacienta (pacientku)

Při zařazení do studie budou Vaše osobní data uchována s plnou ochranou důvěrnosti. Do Vaší dokumentace budou moci na základě Vámi uděleného souhlasu nahlédnout za účelem ověření získaných údajů zástupci nezávislých etických komisí a zahraničních nebo místních kompetentních úřadů. Pro tyto případy je zaručena ochrana důvěrnosti Vašich osobních dat. Při vlastním provádění studie mohou být osobní údaje poskytnuty jiným než výše uvedeným subjektům pouze bez identifikačních údajů, to je anonymní data pod číselným kódem. Rovněž pro výzkumné a vědecké účely mohou být Vaše osobní údaje poskytnuty pouze bez identifikačních údajů (anonymní data) nebo s Vaším výslovným souhlasem.

(s odvoláním na Metodický návod Ministerstva zdravotnictví ČR k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnictví ČR k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírky o péči o zdraví lidu v platném znění).

.....

Datum

.....

Podpis nemocného

.....

Podpis lékaře