

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Patologie

Studium metastatických procesů a odpovědi na léčebnou terapii u primokultur izolovaných z kolorektálního karcinomu a metastáz do lymfatických uzlin

Study of Metastatic Processes and Response to Chemotherapy in Primary Cultures Obtained from Colorectal Carcinoma and Lymph Node Metastases

MUDr. Lukáš Krbal

Školitel: prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.

Školitel konzultant: prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl 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

podpis autora

1 Obsah

1	Obsah.....	3
2	Seznam zkratek.....	7
3	Teoretická část.....	9
3.1	Definice kolorektálního karcinomu.....	9
3.2	Epidemiologie kolorektálního karcinomu.....	9
3.3	Rizikové faktory pro vznik kolorektálního karcinomu.....	12
3.4	Prevence vzniku kolorektálního karcinomu.....	13
3.4.1	Preventivní programy diagnostiky a léčby kolorektálního karcinomu	13
3.5	Symptomy a klinický obraz karcinomu kolorekta.....	14
3.6	Molekulární patogeneze kolorektálního karcinomu.....	14
3.6.1	Genetické dráhy vzniku kolorektálního karcinomu.....	14
3.6.2	MikroRNA.....	16
3.6.2.1	Regulace klíčových signálních drah prostřednictvím miRNA..	17
3.6.2.2	Analýza miRNA v séru, plazmě a stolici.....	19
3.7	Mnohastupňová kancerogeneze se zaměřením na kolorektální karcinom	20
3.7.1	Nezávislost na růstových signálech.....	21
3.7.2	Ztráta schopnosti regulace buněk inhibičními signály.....	21
3.7.3	Blok apoptózy.....	21
3.7.4	Neomezený replikační potenciál a nestabilita genomu.....	22
3.7.5	Angiogeneze.....	22
3.7.6	Schopnost invaze a metastazování.....	22
3.7.6.1	Invaze do extracelulární matrix (ECM).....	24
3.7.6.2	Homing fenomén.....	25
3.7.6.3	Exosomy - jejich vliv na nádorové mikroprostředí a role při vzniku premetastatických nik.....	26
3.8	Makroskopický obraz kolorektálního karcinomu.....	27
3.9	Mikroskopický obraz kolorektálního karcinomu.....	27
3.10	Prekurzorové léze kolorektálního karcinomu.....	28
3.10.1	Polypy.....	28
3.10.1.1	Fokusy aberantních krypt.....	28
3.10.1.2	Adenomy.....	28

3.10.1.3	Pilovité léze	29
3.10.1.4	Juvenilní polyp	29
3.10.1.5	Peutz-Jeghersův polyp.....	29
3.10.2	Polypózy.....	30
3.10.2.1	Familiární adenomatózní polypóza (FAP)	30
3.10.2.2	MUTYH polypóza.....	31
3.10.2.3	Syndrom hyperplastické polypózy (SHP).....	31
3.10.2.4	Peutz-Jeghersův syndrom.....	31
3.10.2.5	Juvenilní polypóza.....	32
3.10.2.6	Syndrom Cowdenové	32
3.10.2.7	Cronkhite-Canada syndrom.....	33
3.10.3	Lynchův syndrom	33
3.10.4	Nádory kolorekta u idiopatických střevních zánětů.....	34
3.11	Grading a staging kolorektálního karcinomu	34
3.12	Diagnostika a léčba kolorektálního karcinomu	35
3.12.1	Farmakoterapie kolorektálního karcinomu	38
3.12.1.1	Chemoterapeutické režimy.....	38
3.12.1.2	Biologická léčba v terapii kolorektálního karcinomu	38
3.12.1.3	Nová generace chemoterapeutik	40
3.12.2	Léková rezistence v terapii kolorektálního karcinomu	40
3.12.2.1	Buněčné mechanismy založené na efluxním přenosu.....	41
3.12.2.2	EMT, epigenetika a chemorezistence.....	43
3.13	Experimentální modely kolorektálního karcinomu in vitro	44
3.13.1	Buněčné linie.....	44
3.13.2	Primokultury	45
3.13.3	Charakterizace buněčných linií	47
4	Cíle práce.....	50
5	Metodika.....	51
5.1	Materiál pro buněčné kultury	51
5.2	Pasážování buněk	55
5.3	Detekce mykoplazmové infekce u buněčných kultur pomocí PCR analýzy	56
5.4	Zamrazování a rozmrazování buněk	58
5.5	Testování životnosti buněk	58

5.6	Testování migrace buněk	59
5.7	Imunohistochemická analýza buněk	59
5.8	KRAS, NRAS, BRAF, PTEN, TP53 a PIK3CA – analýza mutací	60
5.9	Příprava vzorků na extrakci RNA z buněčných kultur	60
5.10	RNA izolace z buněčných kultur pomocí kolonek	61
5.11	Měření integrity RNA – stanovení RIN čísla u vzorků RNA izolovaných buněčných kultur	61
5.12	Příprava cDNA a RT-PCR identifikace	63
5.13	Reverzní transkripce miRNA	64
5.14	Příprava vzorku na Western blot - buněčný lyzát	64
5.15	BCA stanovení bílkoviny	66
5.16	Elektroforéza	68
5.17	Imunobloting (po elektroforéze).....	68
5.18	Detekce proteinů.....	70
5.18.1	Chemiluminiscenční detekce proteinů	71
5.19	Statistická analýza	71
6	Výsledky.....	72
6.1	Histologická charakterizace kolorektálního karcinomu a její vztah k úspěšnosti izolace buněčných kultur z primárního tumoru a lymfogenní metastázy	72
6.2	Vztah mutací v genomu buněk kolorektálního karcinomu na úspěšnost izolace buněčných kultur.....	75
6.3	Imunohistochemická/imunocytochemická analýza	76
6.4	Charakterizace tkáňových vzorků, od kterých byla získána buněčná linie z primárního tumoru i metastázy.....	78
6.4.1	Charakteristika primokultur z hlediska schopnosti migrace	78
6.4.2	Porovnání markerů zapojených do adheze a migrace	79
6.4.3	Stanovení relativního množství mikroRNA v izolovaných buněčných liniích.....	84
6.4.4	Účinek chemoterapeutik a biologické terapie na životnost izolovaných buněk	85
6.4.5	Imunohistochemická analýza sledovaných markerů nádorové progresu	89
6.4.6	Stanovení exprese markerů podílejících se na lékové rezistenci	93
6.4.7	Vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatiny na migrační potenciál izolovaných buněčných linií	94

6.4.8	Stanovení markerů nádorové progresse na úrovni mikroRNA a mRNA	95
6.4.9	Vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na expresi molekul zapojených do nádorové progresse	96
7	Diskuze	100
8	Závěr	110
9	Použitá literatura	112
10	Seznam popisů tabulek a obrazové dokumentace	118
10.1	Tabulky	118
10.2	Obrázky	119
11	Poděkování	125

2 Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
ABC	„ATP-binding cassette“
AFAP	atenuovaná forma familiární adenomatózní polypózy
AGF	růstový faktor příbuzný angiopoietinu
ASR-W	„age-standardized rate – world“, statistický ukazatel
ATP	adenosintrifosfát
BCA	„Bicinchoninic acid assay“
BCRP	„breast cancer resistance protein“
CEA	karcinoembryonální antigen
CDK	cyklindependentní kináza
CIMP	„CpG island methylator phenotype“
CT	počítačová tomografie
CTC	cirkulující nádorové buňky
cDNA	komplementární DNA
cfDNA	volná buněčná DNA
ctDNA	cirkulující nádorová DNA
CK	cytoketin
CpG	dinukleotid cytosin-fosfát-guanosin
DALM	„dysplasia-associated lesion or mass“
DEPT	dietyl pyrokarbonát
DMSO	dimethylsufoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
ERK	extracelulární signál regulující kináza
FAP	familiální adenomatózní polypóza
FBS	fetální bovinní sérum
FFPE	formalínem fixované parafinové bločky
FGFR	receptor pro fibroblastický růstový faktor
H&E	hematoxylin-eosin
HIF α	hypoxií indukovatelný faktor α

HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
hTERT	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
IC50	koncentrace způsobující 50 % inhibici parametru
IT	irinotekan
ITC	izolované nádorové buňky
MAP	polypóza způsobená mutací genu <i>MUTYH</i>
MEK	mitogen-aktivující proteinová kináza
MET	mezenchymálně-epiteliální tranzice
miRNA	mikroRNA
MMP	matrixová metaloproteináza
MMR	„mismatch repair“
MRP	„multidrug resistance protein“
NGS	masivní paralelní sekvenování
n.d.	nedekovatelné
OTP	oxaliplatina
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIK3CA	katalytická subjednotka α fosfatidylinositol 4,5-fosfát 3-kinázy
PDGFR- β	receptor pro destičkový růstový faktor β
PTEN	homolog fosfatázy a tenzinu
PVDF	polyvinylfluorid
RIN	číslo RNA integrity
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI	„Roswell park memorial institute“
SHP	syndrom hyperplastické polypózy
SLC transporter	„solute carrier transporter“
STR	„short tandem repeats“
TBE	tris-borát-EDTA
TGF α	transformující růstový faktor α
TGF β	transformující růstový faktor β
TME	totální mezorektální excize
TRI/TIP	trifluridin s tipiracilem
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

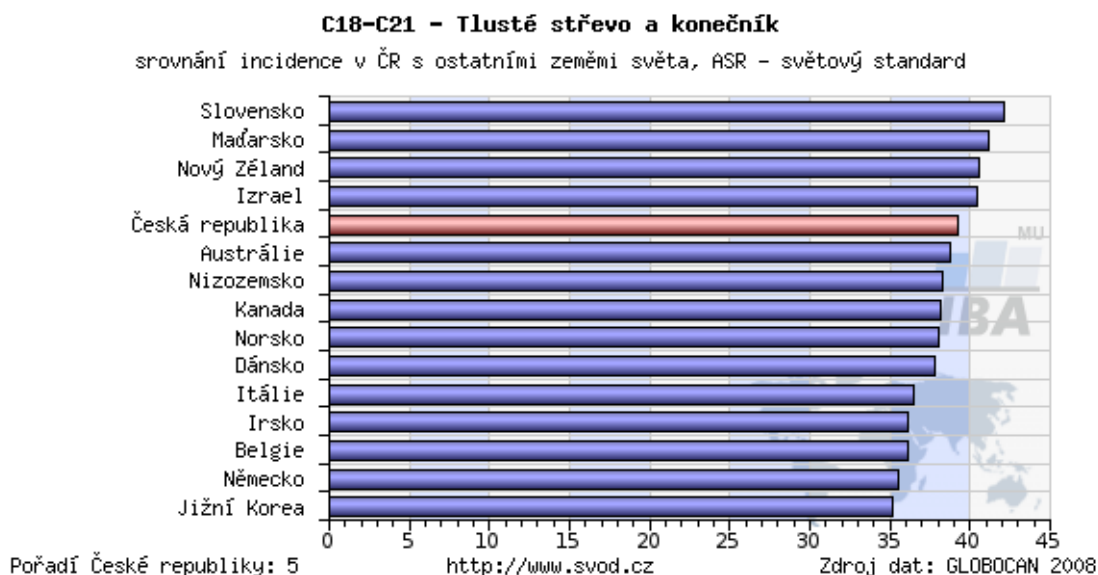
3 Teoretická část

3.1 Definice kolorektálního karcinomu

Adenokarcinom tlustého střeva a konečníku je maligní onemocnění vycházející ze žlázek sliznice tlustého střeva. Aby byl adenokarcinom označen za invazivní, musí maligní nádorové žlázy infiltrovat skrz lamina muscularis mucosae minimálně do submukózy. Typicky adenokarcinom kolorekta vzniká z premaligních slizničních lézí jako jsou adenomy, sesilní pilovité léze a výjimečně i hamartomatózní polypy. Méně často mohou v této oblasti vznikat i jiné typy karcinomů, například karcinomy neuroendokrinní [1].

3.2 Epidemiologie kolorektálního karcinomu

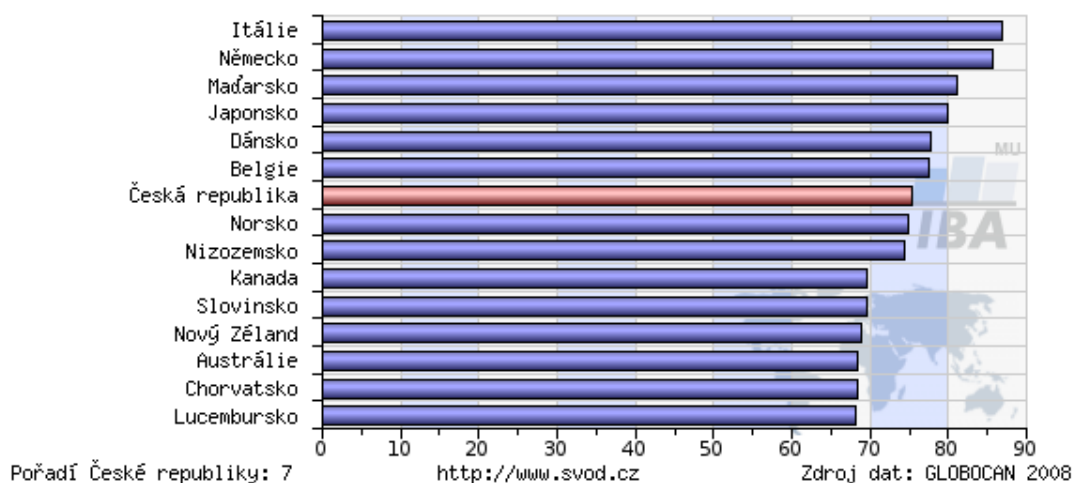
Česká republika dlouhodobě zaujímá přední místa v incidenci i mortalitě kolorektálního karcinomu v porovnání s ostatními zeměmi světa. Podle dat z roku 2008 je v incidenci na 5. místě (podle ASR-W standardu), resp. 7. místě (podle přepočtu na 100 000 obyvatel). V mortalitě kolorektálního karcinomu je Česká republika v obou těchto nejsledovanějších statistických ukazatelích na třetím místě [2].



Obr. č. 1: Srovnání incidence kolorektálního karcinomu v ČR s ostatními zeměmi světa podle ASR-W.

C18-C21 - Tlusté střevo a konečník

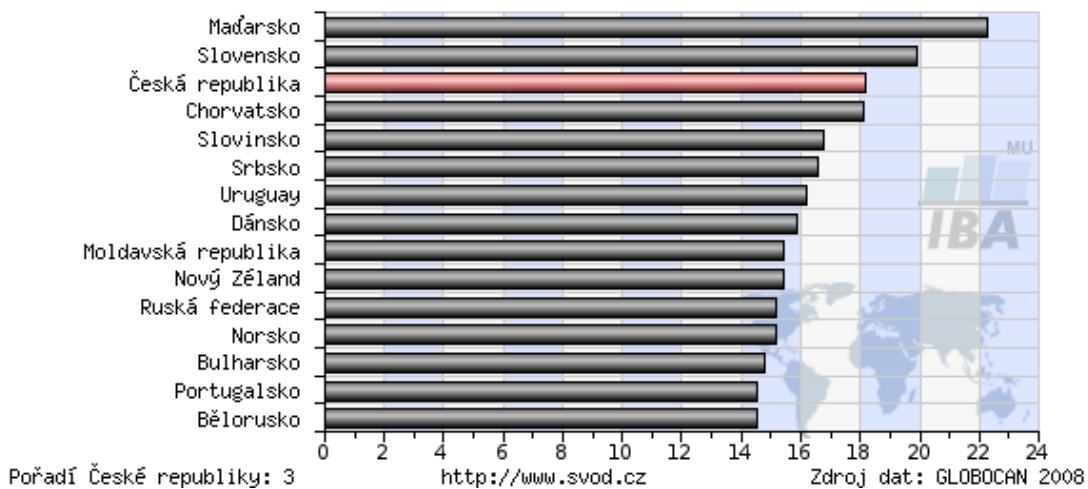
srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa, přepočten na 100 000 osob



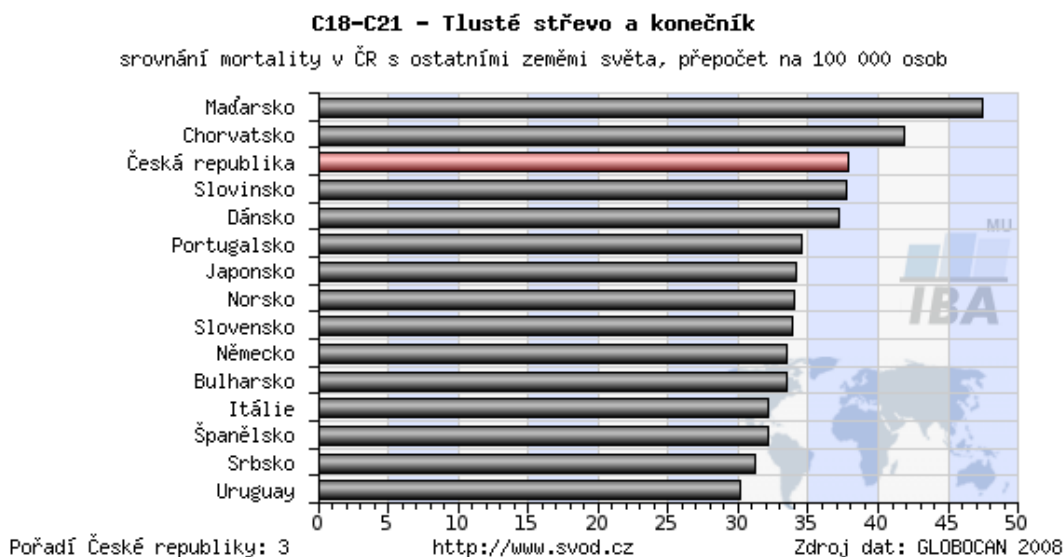
Obr. č. 2: Srovnání incidence kolorektálního karcinomu v ČR s ostatními zeměmi světa; přepočteno na 100 000 obyvatel.

C18-C21 - Tlusté střevo a konečník

srovnání mortality v ČR s ostatními zeměmi světa, ASR - světový standard

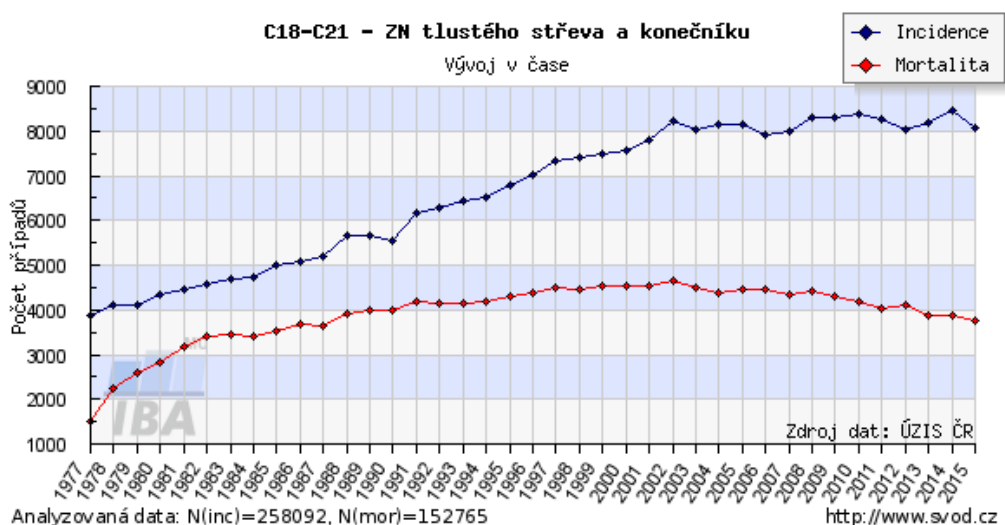


Obr. č. 3: Srovnání mortality kolorektálního karcinomu mezi ČR a ostatními zeměmi světa podle ASR-W.

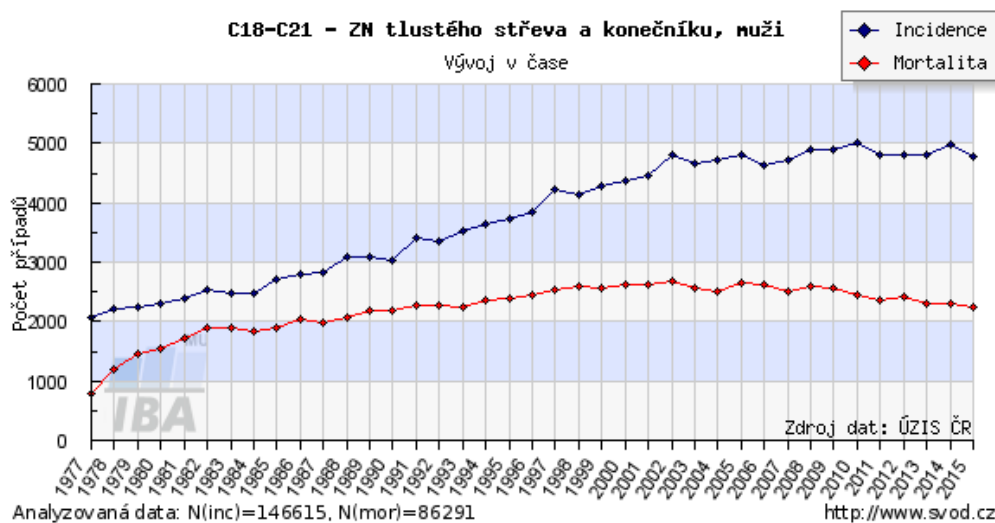


Obr. č. 4: Srovnání mortality kolorektálního karcinomu mezi ČR a ostatními zeměmi světa; přepočteno na 100 000 obyvatel.

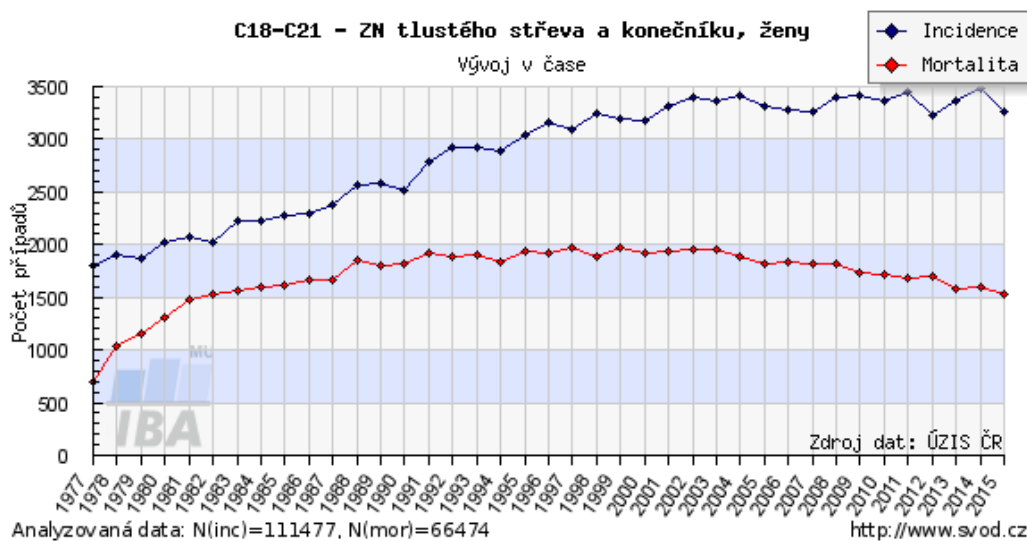
Od roku 1977 je v České republice (dříve v Československu) sledována incidence a mortalita maligních onemocnění. Dnes tyto statistiky zajišťuje Ústav zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) ČR. V posledních deseti letech se stabilizoval trend incidence kolorektálního karcinomu na cca 8 000 nových případů v ČR ročně. Mortalita (úmrtí) pozvolna klesá z cca 4 200 v roce 2005 na cca 3 800 v roce 2015. Incidence i mortalita kolorektálního karcinomu je v ČR vyšší u mužů než u žen. Každý rok je v ČR nově diagnostikován u cca 5 000 mužů a cca 3 000 žen a zemře na něj okolo 2 200 mužů a 1 500 žen [2].



Obr. č. 5: Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR; vývoj v čase; konkrétní počty případů.



Obr. č. 6: Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR u mužů; vývoj v čase; konkrétní počty případů.



Obr. č. 7: Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR u žen; vývoj v čase; konkrétní počty případů.

3.3 Rizikové faktory pro vznik kolorektálního karcinomu

Incidence kolorektálního karcinomu roste s věkem pacienta. Kolorektální karcinom může vzniknout i u mladších jedinců, obvykle na podkladě genetických abnormalit nebo v důsledku chronických zánětů ve střevě, hlavně u autoimunitních procesů (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida). Typickým příkladem geneticky podmíněného kolorektálního karcinomu je familiární adenomatózní polypóza, klinicky

se projevující stovkami polypů a vznikající na podkladě mutace *APC* genu, nebo Lynchův syndrom s poruchou tzv. mismatch repair genů, který se klinicky projevuje nejenom kolorektálním karcinomem, ale i karcinomy např. ženského pohlavního ústrojí. Jinými rizikovými faktory jsou dieta bohatá na tuky a alkohol, rodinná anamnéza, přítomnost prekancerózních lézí v kolorektu, předchozí radioterapie obvykle z důvodu jiné malignity v dutině břišní a dieta chudá na vlákninu. Častější je výskyt kolorektálního karcinomu u obézních pacientů, u kuřáků a u diabetiků [1, 3].

3.4 Prevence vzniku kolorektálního karcinomu

Prevenici vzniku sporadického kolorektálního karcinomu můžeme rozdělit do dvou úzce souvisejících kategorií. První spočívá v aktivním způsobu života, v pravidelné fyzické aktivitě, se kterou bývá spojená i dobrá fyzická kondice. Tito pacienti mají nižší „body mass index“ a menší zásoby tukové tkáně. V patogenezi kolorektálního karcinomu se u obézních pacientů uplatňuje mitogenní potenciál inzulinu, přičemž jejich buňky jsou často relativně rezistentní na inzulin, a z toho důvodu vzniká u těchto pacientů hyperinzulinémie, která se spolupodílí na rozvoji kolorektálního karcinomu. Obdobný princip rozvoje a vyšší incidence karcinomu kolorekta se uvádí i u diabetiků [4].

Do druhé kategorie patří dietní opatření. Jako riziková jsou uváděna jídla z „červeného“ masa (hovězí, zvěřina), ve kterém jsou více zastoupeny heterocyklické aminy ze svalového kreatininu, které při dlouhodobém působení mohou zapříčinit vznik kolorektálního karcinomu. Naopak jako preventivně nejúčinnější látky zamezující vzniku kolorektálního karcinomu se uplatňují antioxidanty a stopové prvky jako jsou vitamín A (i betakaroten jako provitamín), vitamín C, vitamín E a selen. Tyto látky jsou především v ovoci a zelenině, v nich je i větší množství vlákniny, o které se mluví jako o látce, která na sebe ve střevě dokáže navázat celou řadu škodlivých látek, které díky tomu nepůsobí na sliznici tlustého střeva nebo neprojdou do organismu. V poslední době se vyzdvihuje i obdobná role vápníku, který má za vzniku nerozpustných mýdel vychytávat toxické sekundární žlučové kyseliny, které se váží na mastné kyseliny z potravy a podílí se na patogenezi vzniku kolorektálního karcinomu [4].

3.4.1 Preventivní programy diagnostiky a léčby kolorektálního karcinomu

Přestože v současné době existuje několik preventivních programů (především test na okultní krvácení ve stolici a preventivní kolonoskopie), jež usilují o snížení

incidence a mortality kolorektálního karcinomu, nejeví tyto parametry dosud výrazněji klesající tendenci. Příčin je několik, za hlavní považujeme tyto čtyři (první má vliv na incidenci, ostatní na mortalitu): a) nedostatečná compliance občanů s programy primární a sekundární prevence, včetně rizikových skupin; b) diagnóza onemocnění v pokročilém stadiu, kdy pouze u 43 % pacientů je karcinom zjištěn v I. nebo II. klinickém stadiu; c) neschopnost současné klasifikace, která postrádá robustní molekulární prediktory biologického chování nádorů, přesněji stanovit riziko relapsu; d) nedostatečná individualizace terapie spojená s neuspokojivou odpovědí na protinádorovou léčbu [5].

Z těchto důvodů došlo v poslední době k významnému nárůstu studií usilujících o nalezení nových biomarkerů, které by umožnily časnou diagnózu bezpříznakového onemocnění a to nejlépe neinvazivní formou přijatelnou pro většinu občanů a které by mnohem přesněji predikovaly vývoj onemocnění a jeho odpověď na protinádorovou léčbu [5]. K tomuto účelu se jako velmi zajímavé jeví studium onkogenní miRNA.

3.5 Symptomy a klinický obraz karcinomu kolorekta

V časných stadiích onemocnění je kolorektální karcinom bezpříznakový. Později se přidávají celkové nespecifické příznaky jako zvýšená teplota, hubnutí a únava. V pokročilejších stadiích se u pacientů objevují bolesti břicha a střevní dyskomfort spojený například se zvýšenou plynatostí. Zejména pro pravostranné karcinomy kolorekta je typická mikrocytární anémie v důsledku dlouhodobého okultního krvácení. Pro levostranné adenokarcinomy tlustého střeva jsou typické křečovitě bolesti břicha (tenesmy), střídání zácpy a průjmu, neprůchodnost střev (ileus) a viditelná krev ve stolici [1, 3].

3.6 Molekulární patogeneze kolorektálního karcinomu

3.6.1 Genetické dráhy vzniku kolorektálního karcinomu

Podle aktuálních průzkumů existují tři genetické dráhy vzniku kolorektálního karcinomu; jsou to dráha chromozomální nestability, dráha mikrosatelitové nestability a dráha sesilních pilovitých lézí, někdy označovaná jako CIMP (CpG island methylator phenotype pathway) [6].

Dráha chromozomální nestability je známá nejdéle a spočívá v klasickém modelu, při kterém z adenomu vznikne adenokarcinom. V první fázi této dráhy dochází k mutaci, a tím ztrátě některého z tumorsupresorových genů (typicky se jedná o

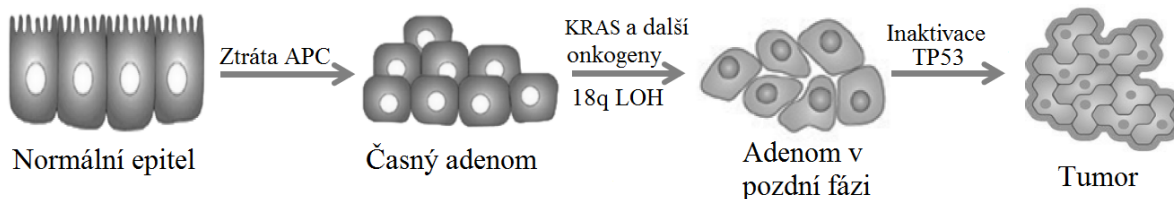
APC gen, obvykle jedné alely). To vede ke vzniku adenomu. V další fázi dochází k aktivaci protoonkogenů na onkogeny (*KRAS*,...), ke ztrátě dlouhého raménka 18. chromozomu a k delecí na krátkém raménku chromozomu 17, tím dojde k inaktivaci tumorsupresorových genů *APC*, *SMAD4* a především strážce genomu *TP53*. Vyřazení *APC* genu vede k aktivaci Wnt/ β -catenin signalizace, při které se β -catenin přesouvá do jádra a prostřednictvím fosforylace se podílí na proliferačních pochodech v buňce [6].

Další signální dráha podílející se na buněčné proliferaci je regulována protoonkogeny *KRAS* a *NRAS*. Ty hrají zásadní roli při buněčných pochodech spojených s dělením, diferenciací a apoptózou. Jednou z nejdůležitějších drah, kterou *RAS* reguluje, je dráha BRAF proteinové kinázy a dále MEK (mitogen-aktivující protein kináza) a ERK (extracelulární signál regulující kináza) kinázy. Je-li *RAS* mutován a to je u 40-50 % kolorektálních karcinomů, je zablokována GTPázová aktivita a tím dochází k permanentní aktivaci signálních drah do buněk, což vede k jejich proliferaci. Na tumorigenezi se dále podílí i dráhy, jejichž nejdůležitější součástí jsou TGF β (transformující růstový faktor β) a PIK3CA/PTEN (katalytická subjednotka α fosfatidylinositol 4,5-fosfát 3-kinázy, homolog fosfatázy a tenzinu) [4, 6].

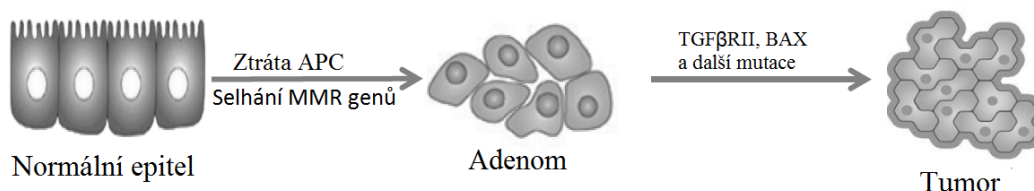
U dráhy mikrosatelitové nestability, která se uplatňuje při vzniku kolorektálního karcinomu, jsou inaktivovány geny tzv. mismatch repair (MMR) systému (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* a *hPMS2*). Tyto geny kontrolují, která z dvojice bazí je po replikaci DNA chybně zařazena a opraví ji. Funkce MMR systému je vyřazena buď germinální mutací (u Lynchova syndromu) nebo může vzniknout sporadicky hypermetylací promotoru. V dalších krocích dochází k deregulaci proteinů, které jsou zodpovědné za apoptózu (např. rodina BAX proteinů) [4, 6, 7].

Genová nestabilita u sesilných pilovitých lézí je podmíněna mutací (obvykle V600E) genu nebo hypermetylací promotoru BRAF proteinové kinázy. Ta vede k nadměrné aktivaci MAPK/ERK signální dráhy, která poté vede k nekontrolované proliferaci buněk. MAP kináza se podílí i na neoangiogenezi tím, že aktivuje HIF α (hypoxií indukovatelný faktor α) a VEGF. U adenokarcinomů ze sesilných pilovitých lézí bývá hypermetylací promotoru inaktivován i inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A (neboli protein p16) a gen *TP53* [4, 6].

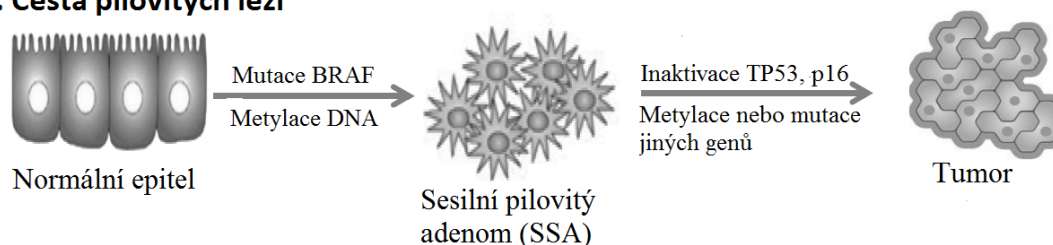
A. Cesta chromozomální nestability (CIN)



B. Cesta mikrosatelitové nestability (MSI)



C. Cesta pilovitých lézí



Obr. č. 8 : Genetické dráhy vzniku kolorektálního karcinomu (převzato a upraveno [6]).

3.6.2 MikroRNA

Jedním z nejmodernějších přístupů současné molekulární charakterizace solidních nádorů, včetně kolorektálního karcinomu, je analýza mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou významné regulátory genové exprese, které kontrolují, jak fyziologické, tak patologické procesy v organismu, např. embryonální vývoj nebo maligní transformaci. Výzkum během deseti let vedl k identifikaci hlavních faktorů podílejících se na biogenezi miRNA a popsal základní principy jejich fungování. Je evidentní, že miRNA, ačkoliv jsou samy regulátory, podléhají sofistikovanému systému regulace, která probíhá jak na úrovni jejich metabolismu, tak realizace jejich vlastní regulační funkce. Poruchy těchto regulací jsou významnou událostí v patogenezi nádorových onemocnění [8].

Díky početným studiím bylo identifikováno několik desítek těchto molekul s potenciálem ovlivňovat translaci nádorových supresorů či onkogenů. Mechanistické studie takto nalezených miRNA jsou pak zásadní pro správné porozumění jejich

zapojení do patogeneze kolorektálního karcinomu a mohou přispět k nalezení potenciálních léčebných cílů. Navíc bylo prokázáno, že miRNA je možné detekovat i v séru pacientů s kolorektálním karcinomem. Cílem je identifikovat miRNA rozdílně exprimované v nádorové tkáni a zdravé střevní sliznici, jež by mohly být v budoucnu využity jako nové prediktivní a prognostické markery [5].

MiR-21 je jednou z nejčastěji uváděných miRNA v souvislosti s kolorektálním karcinomem a významně se podílí na patogenezi tohoto onemocnění. Opakovaně byly prokázány zvýšené hladiny této miRNA u kolorektálního karcinomu, a lze proto tvrdit, že má aktivitu onkogenu [8].

3.6.2.1 Regulace klíčových signálních drah prostřednictvím miRNA

Wnt/ β -cateninová dráha hraje důležitou roli ve vývoji kolorektálního karcinomu, jak je uvedeno výše. Nedávné studie prokázaly schopnost miR-135a a miR-135b regulovat expresi *APC* genu. Tyto miRNA snižují expresi *APC* genu, což vede k poklesu hladiny mRNA APC proteinu a zvýšené koncentraci volného β -catenin. Několik studií zároveň potvrdilo zvýšenou expresi obou miRNA v kolorektálním karcinomem. Mezi další regulátory *APC* patří miR-141 a miR-142-3p, jejich zvýšené hladiny byly detekovány u linií odvozených od kolorektálního karcinomu. Při nesprávné funkci E-cadherinu dochází k ovlivnění hladiny volného β -catenin. Pokud se exprese E-cadherinu sníží, dochází ke zvýšené invazivitě buněk a zároveň ke zvýšení transkripce genů zodpovědných za progresi onemocnění [5].

Receptor pro EGFR se podílí nejen na časném vzniku kolorektálního karcinomu, ale svou roli hraje také při progresi tohoto onemocnění, neboť je spouštěčem významných signálních drah zodpovědných za proliferaci, diferenciaci, apoptózu, angiogenezi, migraci a buněčnou adhezi. MikroRNA, jež jsou součástí této dráhy, by proto mohly být v budoucnu využity jako cíle protinádorové léčby [5].

Nejvýznamnějšími signálními molekulami asociovanými s dráhou EGFR jsou onkoproteiny RAS (KRAS a NRAS), které stojí na počátku MAP kinázové kaskády a podílejí se na regulaci velkého množství transkripčních faktorů. U pacientů s kolorektálním karcinomem nesoucím mutaci genu *RAS* dochází k nekontrolovatelné expresi genů zodpovědných za vývoj a progresi onemocnění. Tito pacienti neodpovídají na biologickou léčbu založenou na podávání monoklonálních protilátek (cetuximab, panitumumab) proti EGFR. MiR-143, miR-145 a let-7 fungují jako nádorové supresory, jejich hladiny v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu bývají významně sniženy, což

vede ke zvýšené proliferaci buněk. Mezi další molekuly signální dráhy MAP kinázové kaskády patří ERK1/ERK2. V neposlední řadě jsou cílem miRNA i transkripční faktory aktivované před EGFR jako např. FOS, YES, FLI, MYC, jež se mohou vázat k miR-145, čímž dochází k inhibici jejich funkce [5, 9].

U 90 % pacientů s kolorektálním karcinomem dochází k úmrtí z důvodu generalizace nádoru. Nezbytnou podmínkou pro metastatickou diseminaci je narušení mezibuněčného spojení, čímž dochází k migraci nádorových buněk přes extracelulární matrix a následně i bazální membránu. Hlavním rysem metastatického procesu je epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Přeměna E-cadherinu na N-cadherin usnadňuje vazbu nádorových buněk k okolnímu stromatu. Zásadní roli v regulaci celého procesu však hrají transkripční faktory SNAIL, ZEB1/ZEB2 a TWIST, které potlačují expresi E-cadherinu. ZEB1/ZEB2 zároveň tlumí expresi některých miRNA z rodiny miR-200, jež potencují tvorbu E-cadherinu, epiteliální diferenciaci a současně inhibují pomocí negativní zpětné vazby též ZEB1/ZEB2. Tato regulace je velmi důležitá nejen při procesu EMT, ale i v procesu opačném, kdy se z buněk s mezenchymálním fenotypem stávají buňky s fenotypem epiteliálním, čímž může dojít k vytvoření sekundárního ložiska. V důsledku nadměrné aktivace matrixových metaloproteináz dochází ke zvýšené migraci buněk, proteolytické degradaci extracelulární matrix (ECM) a vstupu nádorových buněk do krevního řečiště. V souvislosti s tímto procesem je zmiňována miR-21, jejíž zvýšená exprese přispívá ke zvýšené aktivitě degradačních enzymů. Zvýšená exprese této miRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem bývá spojena s rozvojem vzdálených metastáz. Rovněž byla prokázána přímá souvislost mezi sníženou expresí miR-29 a zvýšenou funkcí MMP-2 [5, 10].

Klíčovou roli v patogenezi kolorektálního karcinomu zaujímá angiogeneze. Celý proces je regulován řadou molekul, přičemž zásadní roli hrají angiogenní faktory, důležitým faktorem v tomto procesu je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), který může být produkován především vlastními nádorovými buňkami a fibroblasty po aktivaci MAP-kinázové kaskády. Snížené hladiny miR-125 v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu ukazují možnost regulace tohoto růstového faktoru. Nejdůležitějším antiangiogenním faktorem je trombospondin, jehož exprese je pod přímou kontrolou genu *TP53*. Snížená exprese trombospondinu v nádorové tkáni má přímou souvislost se zvýšenou hladinou clusteru miR-17-92, který má výrazné onkogenní vlastnosti [5, 11].

3.6.2.2 *Analýza miRNA v séru, plazmě a stolici*

Časný záchyt kolorektálního karcinomu je jednou z hlavních podmínek úspěšné léčby. Proto je nezbytné najít biomarkery, které by bylo možné stanovit méně invazivními metodami a které by zároveň umožnily zlepšit detekci kolorektálního karcinomu a najít markery související s horší prognózou pacientů. Takovými biomarkery jsou různé typy miRNA, jako například miR-221, jejíž zvýšené hladiny v séru korelují s expresí proteinu p53 a také horší prognózou. MiR-141 je další miRNA, jejíž zvýšená hladina byla prokázána v plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem. Zároveň bylo zjištěno, že exprese této miRNA přímo koreluje s klinickým stadiem onemocnění a předoperační koncentrací markeru CEA [12]. V poslední době se začaly objevovat i studie analyzující miRNA ze stolice pacientů s kolorektálním karcinomem. U pacientů s adenomem či karcinomem byla prokázána zvýšená hladina miR-21 a miR-106a nebo zvýšené hladiny clusterů miR-17-92 [13]. Všechny tyto miRNA patří mezi nejčastěji zmiňované v souvislosti s kolorektálním karcinomem. S narůstajícím počtem studií zabývajících se expresním profilováním se ukazuje, že miRNA jsou slibnými markery pro určení prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem. Například zvýšená hladina miR-200c nebo miR-21 vede ke kratšímu přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem. Horší prognóza byla zjištěna také u pacientů se sníženou hladinou miR-126, miR-152, miR-143. Zvýšené hladiny miR-137 a miR-129 představují riziko pro metastazování do lymfatických uzlin, zatímco nadměrná hladina miR-126, miR-206 a miR-185 jsou spojovány s vyšší pravděpodobností rozvoje vzdálených metastáz [5, 14].

Velkou výzvou do budoucna je vyhledání takové miRNA, která by byla schopná predikovat léčebnou odpověď u pacientů s kolorektálním karcinomem. Například pacienti se sníženou expresí miR-181b nebo zvýšenou expresí miR-143 vykazují lepší léčebnou odpověď na 5-fluorouracil (5-FU). Dále bylo zjištěno, že u pacientů léčených 5-FU došlo ke zvýšení hladiny miR-21, jejíž exprese byla vyšší již před terapií. Ukázalo se také, že pacienti se zvýšenými hladinami miR-10b jsou chemorezistentní na léčbu 5-FU. Klinická studie léčby metastatického kolorektálního karcinomu s využitím oxaliplatinu prokázala, že vysoká hladina miR-625-3p, miR-181b a miR-27b je spojena se špatnou léčebnou odpovědí. U irinotekanu neexistuje dostatečné množství klinických studií [15].

U pacientů se zvýšenou hladinou miR-143 a miR-145 a sníženou expresí miR-21 byla popsána lepší odpověď na neoadjuvantní chemoterapii. Navzdory těmto výsledkům

bude nezbytné provést další studie, jež přispějí k přesnějšímu popisu souvislostí mezi expresí miRNA a odpovědí na chemoterapeutickou léčbu [5].

3.7 Mnohastupňová kancerogeneze se zaměřením na kolorektální karcinom

Většina nádorů včetně kolorektálního karcinomu vzniká následkem akumulace mnohotných mutací.

Během evoluce se vytvořily různé mechanismy schopné zastavit a potlačit vznik buněk s potenciálem transformace do maligního klonu. V buňkách s funkčními kontrolními body buněčného cyklu nevede onkogenní signalizace k nádorové transformaci, ale k buněčnému stárnutí (senescenci) a apoptóze. Z toho vyplývá, že vznik maligních nádorů je podmíněn ztrátou funkce mnoha genů, včetně genů regulujících kontrolu a průchod buňky buněčným cyklem a genů regulujících apoptózu a senescenci [7].

Přibližně 85 % karcinomů tlustého střeva vzniká sérií morfologicky definovaných změn – hyperplazií epitelových buněk sliznice tlustého střeva, vznikem adenomů s progresivně se vyvíjejícími intraepitelovými neoplastickými změnami a nakonec přechodem adenomu v invazivně rostoucí adenokarcinom [7].

Ve vztahu k vlastnímu rozvoji kolorektálního karcinomu je mutována malá podmnožina genů označovaná jako řídící geny („*driver genes*“), jejichž mutace má zásadní vliv na rozvoj nádorového onemocnění (jde o mutace protoonkogenů a tumorsupresorových genů). V nádorových buňkách nacházíme ale i řadu mutací v genech, které nemají zásadní vliv na nádorovou proliferaci, v tzv. pasažérských genech („*passenger genes*“) [16]. Jejich mutace se významným způsobem spolupodílí na selekci nových buněčných klonů v nádoru, které získávají vlastnosti, díky nimž je nádorová buňka schopna metastazovat do vzdálených orgánů, ať již mechanismem pozitivní klonální selekce nebo cestou imunoeditace. Na selekci nových nádorových klonů se podílí i epigenetické procesy (např. metylace DNA nebo modifikace histonů) [17].

Změny určující vznik a růst nádoru:

1) nezávislost na růstových signálech
2) ztráta schopnosti regulace buněk inhibičními signály
3) blok apoptózy
4) neomezený replikační potenciál (překonání buněčného stárnutí)
5) defektní DNA reparace se vznikem genomické nestability
6) rozvoj angiogeneze
7) schopnost invaze a metastazování

3.7.1 Nezávislost na růstových signálech

Onkogeny vzniklé z protoonkogenů mají schopnost stimulovat dělení buněk i v nepřítomnosti normálních mitogenních signálů. Aktivita genů kódujících receptory pro růstové faktory bývá často posílena prostřednictvím overexprese (např. EGFR). 40-50 % adenokarcinomů tlustého střeva má mutaci genů *RAS* (*KRAS*, *NRAS*), u kterých zablokování receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) nevede ke snížení proliferace [7].

3.7.2 Ztráta schopnosti regulace buněk inhibičními signály

Vzniká mutací tumorsupresorových genů (např. *TP53*), které za normálních okolností tlumí proliferaci [7]. Gen *TP53* se podílí na brzdných mechanismech nádorové transformace třemi vzájemně souvisejícími cestami:

a) Aktivací dočasné zástavy buněčného cyklu a převodem buňky do klidového stadia (<i>quiescence</i>)
b) Indukcí trvalého bloku buněčného cyklu a buněčného stárnutí (<i>senescence</i>)
c) Spuštěním programované buněčné smrti (<i>apoptóza</i>)

Dráhu proteinu p53 mohou spustit různorodé vlivy: hypoxie, nedostatek glukózy, zkrácení chromozomálních telomer, nepřiměřená onkogenní exprese proteinů, inaktivace jiných supresorových genů nebo poškození integrity DNA. Homozygotní ztráta genu *TP53* byla prokázána u mnoha malignit, vč. karcinomu tlustého střeva a konečníku [7].

3.7.3 Blok apoptózy

K nárůstu počtu nádorových buněk může dojít i na podkladě deregulace genů zodpovědných za programovanou buněčnou smrt. Protein p53 je důležitým

proapoptotickým regulátorem indukujícím apoptózu v buňkách, které nejsou schopny opravit poškozenou DNA.

Apoptózu aktivují dva buněčné programy. Extrinsický, který se aktivuje přes tzv. receptory smrti a intrinsický, který se spustí při nevratném poškození DNA. Nádorové buňky vyvíjejí řadu mechanismů, které brání rozvoji apoptózy indukované přes receptory smrti. U kolorektálního karcinomu jsou často mutovány geny kódující kaspázy (např. gen pro kaspázu 8) [7].

3.7.4 Neomezený replikační potenciál a nestabilita genomu

U většiny buněk je replikační potenciál omezen na 60-70 dělení, poté buňky schopnost dělení ztrácejí; tento jev se označuje jako buněčné stárnutí (senescence). Buněčné stárnutí je vysvětlováno fyziologicky chybějící aktivitou telomeráz v somatických buňkách. To ale neplatí u buněk nádorových, které dokáží reaktivovat telomerázu. V období genomické nestability, které předchází aktivaci telomerázy, se akumulují mutace, které přispívají k maligní transformaci [7, 18].

Časný postreplikační kontrolní mechanismus představují tzv. geny mismatch repair systému (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS2*), které kontrolují správnost řazení dvojic bazí při replikaci DNA. Chybně zařazené baze opraví, při neopravitelnosti vedou buňku k apoptóze. Mutace mismatch repair genů jsou typické pro hereditární Lynchův syndrom, ale mohou vznikat v nádorech i spontánně na podkladě hypermetylace promotoru genu *hMLH1*, což vede k mikrosatelitové nestabilitě a k hypermutačnímu stavu [7].

3.7.5 Angiogeneze

Neovaskularizace působí na růst nádorů ve dvou směrech; průtok krve dodává nádorovým buňkám kyslík a živiny a zároveň umožňuje nádoru přístup do cévního řečiště pro jeho případný metastatický rozsev. Na angiogenezi v nádorech se podílejí molekuly regulující vývoj cév v embryonálním stadiu organismu, např. vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) [7].

3.7.6 Schopnost invaze a metastazování

Schopnost invaze a metastazování je založena na zvyšující se heterogenitě nádorové populace a vzniku subklonů, které nabývají schopnosti invadovat a metastazovat. Metastatický potenciál se může vytvořit i ve velice časných stádiích

primárního nádoru. Nádorové buňky se dostávají do cirkulace běžně, ale v metastatická ložiska vyústí jen ve zlomcích promile, valná většina cirkulujících nádorových buněk je zlikvidována imunitním systémem [7].

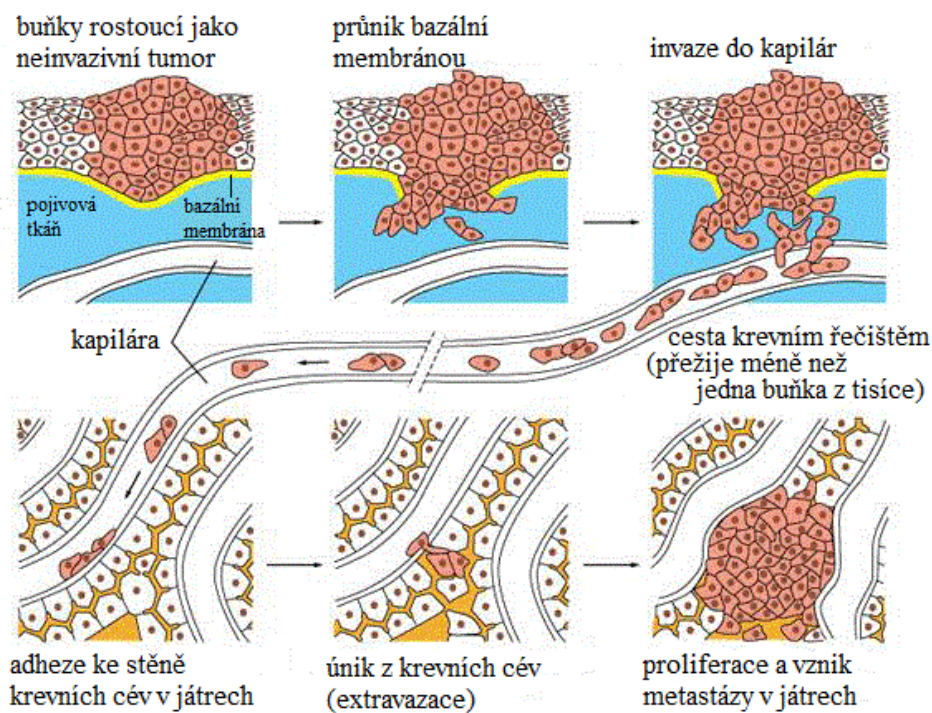
<u>Stupně v procesu metastazování [7]:</u>
1) <i>iniciace</i> (kroky, které vedou k rozvoji maligního nádorového klonu; změny způsobující nepřetržitý růst, přežití a genomickou nestabilitu)
2) <i>metastatická iniciace</i> (změny genů a jejich produktů, které v buňkách navodí schopnost metastazovat; invaze, angiogeneze, dochází k epiteliálně-mezenchymální tranzici)
3) <i>metastatická progrese</i> (aktivace vaskulární remodelace, extravazace nádorových buněk v metastatickém místě a únik imunitnímu dozoru)
4) <i>metastatická virulence</i> (urychluje růst nádoru v místě dceřiných ložisek)

Invaze nádoru vyžaduje zásadní změny v buněčném chování a ve fenotypických vlastnostech buněk. U karcinomů vč. kolorekta, které vycházejí z epitelových buněk, jsou vyžadovány změny v buněčných vztazích spojené s degradací extracelulární matrix a se změnou motility buněk. Strukturální a regulační proteiny, které kontrolují adhezi a migraci buněk, jsou pod kontrolou protoonkogenů a supresorových genů a jsou v procesu invaze a metastazování deregulovány. Během invaze buněk karcinomů dochází k mnoha změnám, které se účastní děje nazývaného epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Na buněčné úrovni je spojen se ztrátou mezibuněčných spojů a také se změnami organizace a složení cytoskeletálních vláken [7].

V průběhu EMT dochází k celé řadě změn – ztráta polaritity buněk, změna tvaru buňky ve vřetenovitý, ztráta mezibuněčných spojů a závislosti na nich, zvýšená produkce složek extracelulární matrix, ztráta závislosti na bazální membráně, zvýšená schopnost motility a zvýšená odolnost vůči apoptóze. V tomto procesu dochází ke změně E-cadherinu na N-cadherin, tzv. cadherinového switchi. Pokud zůstává komplex E-cadherin v buněčné membráně, je potlačena buněčná proliferace a buňky si zachovávají epiteliální fenotyp. Naopak, pokud E-cadherin je z buněčné membrány uvolněn, je uvolněn do cytoplazmy také β -catenin, jenž se následně přesouvá do jádra. Tam pak působí jako transkripční faktor. S tímto přesunem koreluje i změna fenotypu z epiteliálního na mezenchymální. Akumulace β -catenin v jádru spojená se ztrátou E-cadherinu koreluje se vznikem invazivního fenotypu a vstupem buňky do programu EMT. Buňky, jež ztrácejí E-cadherin ze svého buněčného povrchu, se tak stávají citlivějšími na impulzy růstových faktorů vedoucí ke spuštění EMT [19, 20].

Význam ztráty E-cadherinu je dobře ilustrován několika transkripčními faktory vyvolávajícími EMT, které usnadňují akvizici mezenchymálního fenotypu, jako je Snail a Slug, ZEB1, SIP1 a E12 (také známý jako E47-E2A). Tyto transkripční faktory jsou indukovány TGF- β a jednou exprimované potlačují expresi E-cadherinu. Ztráta E-cadherinu podporuje Wnt signalizaci a je spojena s vysokou úrovní Snail v jádru. Dokončení procesu EMT je signalizováno degradací bazální membrány a vytvořením buňky, která je schopna vycestovat z buněčné vrstvy, ve které vznikla [20].

Metastatickou kaskádu lze rozdělit do dvou etap:
1) invaze do extracelulární matrix (a do cév s vaskulárním rozsevem)
2) kolonizace nádorových buněk v místech vzdálených od primárního nádoru



Obr. č. 9: Metastatická kaskáda nádorových buněk (převzato a upraveno [18]).

3.7.6.1 Invaze do extracelulární matrix (ECM)

Tkáně jsou organizovány do kompartmentů oddělených od sebe dvěma typy ECM – bazálními membránami a intersticiální pojivovou tkání. Epitelové buňky se váží k lamininu bazálních membrán a ke kolagenům polarizovaným k bazálním povrchům buněk, a to prostřednictvím transmembránových molekul (integrinů). Integriny, které zprostředkovávají adhezi a klidový diferencovaný stav buněk, jsou u nádorových buněk potlačeny a jsou exprimovány integriny podporující proliferaci a migraci.

V průběhu invaze musí nádorové buňky nejprve rozrušit bazální membránu, pak pronikají intersticiem, rozruší bazální membrány cév a průnikem přes endotel se dostávají do cirkulace. Tento cyklus se opakuje v obráceném pořadí po zachycení nádorových buněk v cévní síti v místě počátečního metastatického rozsevu. Uvolnění nádorových buněk ze vzájemných vazeb je způsobeno potlačením funkce proteinů mezibuněčných spojů (typicky E-cadherin) [7].

K degradaci bazální membrány a intersticiální pojivové tkáně dochází nádorovými buňkami, které produkují proteolytické enzymy buď samy, nebo mohou indukovat jejich tvorbu ve stromálních buňkách (ve fibroblastech) a v buňkách zánětlivé infiltrace, konkrétně jde o metaloproteinázy, katepsin-B, katepsin-D, urokinázu, kolagenázu. Proteolýza matrix je v přirozených podmínkách regulována inhibičními mechanismy, při nádorové invazi je fyziologická rovnováha mezi proteinázovou aktivitou a její inhibicí posunuta směrem k degradaci ECM [7].

Migrace buněk je spojena s koordinovanou polymerizací a depolymerizací aktinových vláken cytoskeletu. Nádorové buňky tvoří cytoplazmatické výběžky (invadopodie), které zabezpečují průchod buněk ECM. Povrchové membrány invadopodií jsou vybaveny adhezivními molekulami a proteinázami [7].

Nádorové buňky mohou do ECM invadovat třemi základními způsoby:

a) individuálně převzetím podoby mezenchymových buněk (vyžaduje proteolýzu a změny adheze buněk k ECM pomocí integrinů)
b) pseudopodiemi (améboidní migrace, podobně jako leukocyty přes cévní stěnu při zánětu) - u buněk, které nemají proteolytické vlastnosti a je u nich zvýšená aktivita aktinového cytoskeletu
c) ve svazech (při zachované schopnosti udržet intercelulární spoje prostupují nádorové buňky ECM ve svazech) - např. v tubulárních formacích u tubulárních adenokarcinomů

3.7.6.2 *Homing fenomén*

Empirické pozorování chování různých nádorů napovídá, že samotná invaze do ECM není sama o sobě pro další krok metastatické kaskády dostačující (např. kožní bazaliom se chová invazivně a destruktivně v místě svého vzniku, ale metastazuje zcela výjimečně).

Intravazace (přestup nádorových buněk do cév) je aktivní proces vyžadující proteolytické pochody, podobné jako při přestupu přes bazální membránu epitelu. Snáze

pronikají buňky do cév vytvořených v primárním nádoru *de novo*, protože tyto cévy mají nedokonale vytvořené endoteliální spoje; podobně je tomu u lymfatických cév.

U zhoubných nádorů se do krevního oběhu uvolňuje velké množství nádorové DNA - tzv. cirkulující nádorové DNA (ctDNA), která se uvolňuje z několika zdrojů – zanikajících nádorových buněk jak v primárním ložisku, tak v metastázách a ze zanikajících cirkulujících nádorových buněk (CTC). Cirkulující nádorová DNA je podmnožinou cirkulující nebuněčné – tzv. volné DNA (cfDNA), která může být jak nádorového, tak nenádorového původu (z rozpadajících se zánětlivých elementů, přirozeně se obnovujících buněk somatických tkání, apod). Nádorová cfDNA, tedy ctDNA, může vznikat pasivním procesem (např. při nekróze nebo apoptóze nádorové buňky) nebo aktivně prostřednictvím nanovesikul (např. jako součást exosomů), které nádorová buňka cíleně vytváří. Tohoto fenoménu se zatím s neúplně přesvědčivými výsledky snaží využívat tzv. tekutá biopsie. Při ní je snahou detekovat ctDNA a získané genetické informace využít především k cílené protinádorové léčbě [21]. Přežití cirkulujících nádorových buněk závisí mimo jiné na tom, zda se pohybují řečištěm samotně nebo jako mikroemboly. Ty mohou být tvořeny pouze nádorovými buňkami nebo nádorovými buňkami s leukocyty, destičkami a fibrinem - pro imunitní systém jsou obtížněji detekovatelné [7].

3.7.6.3 *Exosomy - jejich vliv na nádorové mikroprostředí a role při vzniku premetastatických nik*

Exosomy jsou kulovité nanovesikuly průměru 40 – 100 nm, které jsou vylučovány buňkami organismu za fyziologických i patologických podmínek. Jejich role je komunikační a transportní. Uplatňují se např. v imunitních reakcích na mikrobiální infekce, při kterých může být pomocí exosomů z postižených buněk vyvolaná imunitní odpověď. V patologických procesech je popsána jejich role při tvorbě nádorového mikroprostředí. Exosomy nádorových buněk jsou schopny indukovat přeměnu nenádorových fibroblastů na (myo)fibroblasty sdružené s nádorem (*cancer associated (myo)fibroblasts*), které spoluvytvářejí nádorové desmoplastické stroma. V rámci metastatického procesu mohou exosomy transportovat především proteiny ovlivňující průběh nádorového procesu, např. cestou mezenchymo-epiteliální tranzice [22]. Existuje hypotéza, podle které metastatické šíření nádoru není zcela náhodné, ale podléhá jistým regulačním mechanismům, v důsledku kterých je metastáza vytvořena pouze v určitém orgánu. Tzv. premetastatická nika má být charakterizována

mikroprostředím příznivým pro kolonizaci nádorovými buňkami. Ovlivnění mikroprostředí se děje právě cestou exosomů secernovaných z nádorových buněk, které modifikují chování stromálních buněk cílového orgánu produkujících extracelulární matrix. Spouštěcím mechanismem pro vznik premetastatických nik může být například hypoxie nádoru při jeho expanzivním růstu [23].

3.8 Makroskopický obraz kolorektálního karcinomu

Adenokarcinom tlustého střeva může růst buď exofyticky (vyplňovat střevní lumen), nebo endofyticky (infiltrovat střevní stěnu, kterou ztlušťuje a způsobuje její stenózu). Méně často karcinomy kolorekta rostou difúzně ve stěně střeva nebo vyrůstají ze stopkatých adenomů, u kterých skrz stopku infiltrují do střevní stěny. Adenokarcinomy vznikající od pravého tračníku až po lienální ohbí rostou exofyticky. Naopak adenokarcinomy sestupného tračníku, sigmatu a rekta typicky rostou endofyticky.

Na řezu povětšinou najdeme bělavý homogenní tumor infiltrující nezdělaná subserózní tuk, výjimku tvoří mucinózní adenokarcinom, který má na řezu gelovitou konzistenci [1].

3.9 Mikroskopický obraz kolorektálního karcinomu

Více než 90 % karcinomů kolorekta jsou adenokarcinomy. Aby mohl být adenokarcinom označen jako invazivní, musí prorůst skrz lamina muscularis mucosae minimálně do submukózy. Za adenokarcinom in situ (intraepiteliální) je označován adenokarcinom, které neprorazil bazální membránu epitelu. Adenokarcinom, který postihuje pouze lamina propria musocae, je označován jako intramukozální [1].

U většiny adenokarcinomů kolorekta je pozitivní CK20 a CDX2 a negativní CK7. CK20 negativní adenokarcinomy bývají častěji spojeny s mismatch-repair nestabilitou [1].

Adenokarcinomy tlustého střeva mohou vytvářet méně obvyklé varianty. Karcinomy vznikající na podkladě defektu MMR genů jsou častěji mucinózní a prstenčité. Obě varianty se chovají agresivněji než „konvenční“ adenokarcinom, ale prognózu mají lepší, protože lépe reagují na chemoterapii (nedokáží opravovat poruchy DNA vyvolané chemoterapií) a indukují intenzivní protinádorovou imunitní odpověď.

Medulární karcinom je vzácná varianta karcinomu kolorekta, která je histologicky tvořena z objemných eozinofilních buněk s vezikulárními jádry s jádérky

rostoucí v drobných plachtách ve výrazném lymfoplazmocelulárním stromatu. Tato varianta má lepší prognózu, je asociována s mismatch-repair nestabilitu, popř. i mutací genu *BRAF*. Obdobné genetické abnormality může mít i adenokarcinom vznikající ze sesilných pilovitých lézí. Mikropapilární karcinom je v oblasti kolorekta vzácný, jeho časným projevem je postižení regionálních lymfatických uzlin v důsledku masivní lymfangioinvaze. Tato varianta karcinomu má horší prognózu [1].

Jiné typy karcinomů jsou uvedeny v tabulce níže. Obecně jde o vzácné léze, s výjimkou neuroendokrinních karcinomů.

Adenokarcinomy tlustého střeva metastazují nejprve do regionálních lymfatických uzlin, až v pozdních stádiích vytvářejí vzdálené metastázy. Nejčastější lokalizací metastáz jsou játra, ale výskyt metastázy je teoreticky možný téměř ve všech orgánech.

Tab. č. 1: Varianty adenokarcinomu a jiné typy karcinomů kolorekta [1].

<u>Varianty adenokarcinomu kolorekta</u>	<u>Jiné typy karcinomů kolorekta</u>
Medulární karcinom	Adenoskvamózní karcinom
Mikropapilární karcinom	Dlaždicobuněčný karcinom
Mucinózní adenokarcinom	Sarkomatoidní karcinom
Adenokarcinom z prstenčitých buněk	Neuroendokrinní karcinom
Adenokarcinom ze sesilní pilovité léze	Dediferencovaný karcinom

3.10 Prekurzorové léze kolorektálního karcinomu

3.10.1 Polypy

3.10.1.1 Fokusy aberantních krypt

Jde o akumulaci abnormálních buněk ve vrcholu slizničních krypt. Z nich může vzniknout hyperplastický polyp bez dysplazie nebo mikroadenom s dysplazií; typicky u pacientů se zárodečnou mutací *APC* genu při familiární adenomatózní polypóze [1].

3.10.1.2 Adenomy

Adenomy jsou charakteristické přítomností dysplazie ve slizničním epitelu. Histologicky jsou jádra zvětšená a hyperchromní, pseudostratifikovaná a ztrácí polaritu. Podle stupně architektonické komplexnosti změn, jaderné pseudostratifikace, velikosti jader a jadérek se v adenomech rozlišuje low grade a high grade dysplazie. Makroskopicky obvykle promínají do lumen, některé mohou být přisedlé, jiné na stopce; spíše výjimečně jsou ploché. Většina adenomů do velikosti 1 cm má

mikroskopicky tubulární úpravu. Adenomy větší než 1 cm mají obvykle vilózní úpravu, u nich jsou krypty uspořádány prstovitě, popř. lístkovitě. Pokud jsou v adenomu přítomny obě složky (mezi 25-75 %) lze adenom nazvat tubulovilózním. Pravděpodobnost high grade dysplazie narůstá podílem vilózní složky [1].

3.10.1.3 Pilovité léze

Lze je rozdělit do tří skupin - na běžné hyperplastické polypy (HP) bez dysplastického potenciálu, na sesilní pilovité adenomy (SSA), které jsou typicky v pravém tračníku a mohou mít dysplazii a na tradiční pilovité adenomy (TSA) lokalizované obvykle v oblasti rektosigmoidea s dysplaziemi.

U všech lézí histologicky zastihujeme zoubkovité až hvězdicovité slizniční krypty tvořené objemnějšími buňkami s eozinofilní cytoplazmou. Hyperplastický polyp je drobný s kryptami směrem k lamina muscularis mucosae ve tvaru písmene „V“. Sesilní pilovitý adenom má krypty směrem k lamina muscularis mucosae kyjovitě rozšířené, někdy označované jako „sloní nohy“. Tradiční pilovitý adenom je v levém tračníku (výhradně v rektu), je větší velikosti a krypty mohou být obojího výše popsaného tvaru. SSA a TSA jsou potenciální prekurzorové léze kolorektálního karcinomu, u kterých může být mutace v genu *BRAF* [1]. SSA a TSA mohou vykazovat dva typy dysplazií; konvenční a pilovitou. Konvenční dysplazie má stejné histologické znaky jako dysplazie v adenomech. Pilovitá dysplazie je charakteristická objemnými eozinofilními buňkami s posunutým nukleocytoplazmovým poměrem s vezikulárním jádrem a často s prominujícím jadérkem [24].

3.10.1.4 Juvenilní polyp

Sporadické juvenilní polypy jsou hamartomatózního charakteru a vyskytují se nejčastěji u dětí. Histologicky je polyp tvořen bohatým edematózním stromatem se zánětem popř. i granulační tkání. Ve stromatu jsou až cysticky dilatované žlázy s větším množstvím hlenu. Ve žlázkách mohou být reaktivní změny. Juvenilní polyp může být součástí syndromu juvenilní polypózy (viz níže) [1].

3.10.1.5 Peutz-Jeghersův polyp

Jedná se o hamartomatózní polyp nejčastěji se nacházející v oblasti tenkého střeva, ale vyskytující se i v tlustém střevě a žaludku. Histologicky jde o objemné polypy typicky bez dysplastických změn s pruhy hladké svaloviny zasahujícími až do

sliznice. Výjimečně může být sporadický, ve valné většině případů je součástí Peutz-Jeghersova syndromu (viz níže) [1].

3.10.2 Polypózy

V 70 % případů se kolorektální karcinom vyskytuje bez pozitivní rodinné anamnézy (tzv. sporadická forma), dalších 25 % nemocných udává výskyt kolorektálního karcinomu v příbuzenstvu (tzv. familiární forma). Asi 5 % případů (tzv. hereditární forma) vzniká v rámci preexistujících genetických chorob, ke kterým patří polypózní syndromy a hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom) [25]. Termín polypóza se používá pro různé typy vícečetných lézí ve střevě; histologicky jde o pilovité léze, adenomy nebo hamartomy. Adenomy malignizují relativně častěji, hamartomy a pilovité léze spíše vzácně [25].

3.10.2.1 Familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Jde o autozomálně dominantní onemocnění způsobené vrozenou mutací tumorsupresového *APC* genu (adenomatous polyposis coli) na dlouhém raménku 5. chromozomu (5q21). Jeho produkt fyziologicky degraduje transkripční faktor β -catenin, který stimuluje buněčnou proliferaci. Geneticky je nefunkční jedna alela *APC* genu, stačí tedy poškození druhé alely, aby byl APC protein zcela vyřazen z funkce, což má za následek výskyt stovek adenomů v celém tlustém střevě. V pozdější fázi onemocnění může být postižen i žaludek, duodenum a tenké střevo, ve kterých se také vytvářejí adenomy. Mutace N-terminální části *APC* genu mohou způsobit atenuovanou formu FAP (tzv. AFAP) s opožděným nástupem vzniku menšího množství polypů (méně než 100) s převahou výskytu v pravé části tračnicku. Asi třetina pacientů s klinickou diagnózou AFAP má intaktní *APC* gen a má mutovaný *MUTYH* gen.

Prevalence FAP v populaci se odhaduje na 1:10 000 a je zodpovědná za 1 % kolorektálních karcinomů v populaci. Uvádí se u ní 100 % riziko vzniku maligního zvratu některého z adenomů během života, obvykle po 40. roce, ale vznik o dekádu dříve není vzácností. V případě atenuované formy je vznik adenomů i malignizace zpožděn o 10-20 let.

Variantou FAP je Gardnerův syndrom, u kterého jsou kromě mnohočetných polypů střeva přítomny i osteomy lebečních kostí, anomálie zubů, epidermoidní cysty a fibromy kůže. Vysoce specifická je kongenitální hypertrofie povrchového epitelu sítnice, která se vyskytuje až u 80 % pacientů. Asi třetina pacientů trpí hlubokými

fibromatózami (desmoidy). Turcottův syndrom je kombinace polypózy a mozkových nádorů (obvykle meduloblastomu).

Léčba spočívá v preventivní kolektomii před 30. rokem života. Ovšem i po ní má pacient zvýšené riziko maligních onemocnění. Druhá nejčastější příčina smrti je adenokarcinom duodena a třetí hluboká fibromatóza u Gardnerovy varianty FAP. Z dalších nádorů je popisován výskyt tumorů jater (hepatoblastom), štítné žlázy, příštítných tělísek, pankreatu a nadledvin [1, 25].

3.10.2.2 *MUTYH* polypóza

MUTYH polypóza (MAP) je známá od roku 2002 jako střevní polypóza s autozomálně recesivním typem dědičnosti, která je způsobená germinální mutací obou alel pro *MUTYH* gen, který kóduje mutY DNA glykosylázu a patří mezi tzv. mutátorové geny společně s geny mismatch repair systému. Mutace *MUTYH* genu bývají zjištěny u třetiny pacientů s nálezem 15-100 adenomů a u 8 % pacientů s více než 100 adenomy bez nálezu mutace *APC* genu. Klinický obraz je obdobný jako u atenuované formy FAP, vzácněji jako u „klasické“ formy FAP. Možnost diagnózy MAP by měla být zvažována při nálezů menšího množství adenomů (3-100), rodinné anamnéze bez dominantního vzoru dědičnosti a při vyloučené mutaci *APC* genu. U pacientů s *MUTYH* polypózou je doporučována obdobná léčba jako u FAP [1, 25].

3.10.2.3 *Syndrom hyperplastické polypózy (SHP)*

Je charakterizován mnohočetným výskytem pilovitých lézí v tlustém střevě, konkrétně sesilních pilovitých adenomů a hyperplastických polypů. WHO kritéria pro tento syndrom jsou splněna, pokud platí nejméně jedna z následujících tří podmínek. Nález alespoň pěti pilovitých lézí proximálně od sigmoidea, z nichž nejméně dvě jsou větší než 1 cm. Případně jakýkoliv počet pilovitých lézí proximálně od sigmoidea u pacienta, který má příbuzného prvního stupně s hyperplastickou polypózou. Nebo více než 30 pilovitých lézí jakékoliv velikosti kdekoliv v tlustém střevě [26]. Pacienti se SHP mají nevýrazně vyšší riziko vzniku kolorektálního karcinomu (téměř 2 % v pětiletém období sledování), což je méně než se dříve předpokládalo [27].

3.10.2.4 *Peutz-Jeghersův syndrom*

Jde o autozomálně dominantní onemocnění způsobené mutací tumor supresorového genu *STK11/LKB1*. Onemocnění je desetkrát méně časté než FAP.

Syndrom je charakterizovaný kombinací mukokutánních melaninových pigmentací a gastrointestinální hamartomatózní polypózy.

Četné pigmentové skvrny (lentigines) jsou přítomny u 95 % pacientů a bývají v typických lokalizacích - bukální sliznice, červeň rtů, v okolí úst, na nosních křídlech, očních víčkách, dlaních, ploskách a anogenitální oblasti. Kožní skvrny mohou v období puberty vymizet, ale skvrny na bukální sliznici přetrvávají do dospělosti.

Hamartomatózní polypy u Peutz-Jeghersova syndromu se mohou vyskytovat v celé délce trávicí trubice (především v tenkém a tlustém střevě) a vzácněji i v jiných orgánech (nosní dutiny, bronchiální strom, močový měchýř, žlučník). Častými komplikacemi jsou neprůchodnost střeva, intususcepce, enteroragie a chronická anemizace.

Malignizace hamartomatózních polypů je vzácná, pacienti s tímto syndromem však mají zvýšené riziko malignity v jiných orgánech (jícen, žaludek, pankreas, prs, vaječník, děloha, varle, plíce, štítná žláza a kůže). Pravděpodobnost maligního onemocnění v průběhu života je 90 %.

Léčba je svízelná, z důvodu postižení různých orgánů. U pacientů je důležitá dlouhodobá dispenzarizace [1, 25].

3.10.2.5 *Juvenilní polypóza*

Jedná se o autozomálně dominantně děděný hamartomatózní syndrom, který je charakterizován tvorbou tzv. juvenilních polypů. Ve většině případů jsou polypy solitární, obvykle v rektosigmoideu, vzácněji v tenkém střevě nebo žaludku. Jde-li o tzv. generalizovanou formu juvenilní polypózy, u které musí být přítomno minimálně 5 juvenilních polypů, nacházíme je v celé trávicí trubici. V průběhu života je výrazně zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu a adenokarcinomu žaludku [1, 25].

3.10.2.6 *Syndrom Cowdenové*

Jedná se o syndrom mnohočetných hamartomů, který se dědí autozomálně dominantně a vzniká na podkladě mutace tumor supresorového genu *PTEN* (phosphatase and tensin homolog). Asi 75 % případů je charakterizováno vznikem hamartomatózních polypů, které mohou být v celé trávicí trubici, především v tenkém a tlustém střevě.

Kromě hamartomatózních polypů střeva bývají u tohoto syndromu zjištěny kožní a slizniční abnormality (obličejové trichilemomy, mnohočetné drobné fibromy

dutiny ústní, adenomy a cysty štítné žlázy, fibrocystické změny prsu, ovariální cysty, leiomyomy v děloze, makrocefalie a neurologické poruchy).

Maligní potenciál hamartomatózních polypů je minimální. U pacientů se syndromem Cowdenové nejčastěji vznikají karcinomy prsu (až ve třetině případů), štítné žlázy a endometria.

Z terapeutického hlediska je nutné na syndrom myslet při přítomnosti kožních afekcí na obličeji a slizničních v dutině ústní. V některých studiích je doporučována preventivní oboustranná mastektomie [1, 25].

3.10.2.7 Cronkhite-Canada syndrom

Jde o vzácný syndrom, u kterého nebyla dosud zjištěna genetická abnormalita, a proto je uvažováno o autoimunitní etiologii. Pacienti jsou obvykle starší 50 let a většina případů je z Japonska. Klinicky jde o hyperplastickou polypózu žaludku, tenkého a tlustého střeva. Může být provázená epizodickými bolestmi břicha, malabsorpcí, progresivní kachexií a vnitřním rozvratem prostředí jedince s letálním koncem.

Jsou popisovány i kožní projevy (alopecie, dystrofie nehtů, hyperpigmentace kůže) a neurologické projevy (bolesti hlavy).

Léčba je úspěšná a spočívá v systémové kortikoterapii nebo imunosupresivní terapii (azathioprin) [25].

U tohoto syndromu je popisováno zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu a vzácně též adenokarcinomu žaludku [28, 29].

3.10.3 Lynchův syndrom

Lynchův syndrom neboli hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) nepatří mezi polypózy, nicméně hraje významnou roli v patogenezi kolorektálního karcinomu. Uvádí se, že až 15 % kolorektálních karcinomů v populaci vzniká v důsledku HNPCC. Tento syndrom je spojen s vrozenou nefunkčností mismatch repair genů (*hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS2*), které se podílejí na opravě DNA - obnovují chybné párování nukleotidů a tím představují časný postreplicační kontrolní mechanismus. Mutace v mismatch repair genech vede ke zvýšení mutagenity následných generací buněk a později ke vzniku maligního nádoru [18].

Jedinec mužského pohlaví s Lynchovým syndromem má celoživotní riziko vzniku kolorektálního karcinomu v rozmezí 28-75 %, u žen je riziko o něco nižší (24-52 %). S Lynchovým syndromem jsou však spojeny i malignity jiných orgánů.

Typické jsou karcinomy endometria a ovaria. Méně často se mohou u HNPCC vyvinout karcinomy žaludku, urogenitálního traktu, hepatobiliárního systému, tenkého střeva a nádory mozku (typicky glioblastom do 20 let věku). U pacientů s HNPCC mohou být přítomny spolu s jinou malignitou i kožní sebaceózní adenomy nebo karcinomy. Tento klinický obraz se označuje jako syndrom Muir-Torreové [30].

3.10.4 Nádory kolorekta u idiopatických střevních zánětů

Riziko kolorektálního karcinomu se zvyšuje po 8-10 letech od diagnózy ulcerózní kolitidy nebo Crohnovy choroby, a to spíše u pacientů s časným začátkem onemocnění a jeho závažným klinickým průběhem. U obou onemocnění může být kolorektální karcinom víceložiskový, obvykle plochý, ve sliznici obtížně identifikovatelný. V těchto případech se provádí kolektomie, nezářídka pankolektomie, se zaměřením na extenzivní vyšetření lymfatických uzlin. V dnešní době se přistupuje konzervativněji k tzv. DALM lézím (dysplasia-associated lesion or mass) u idiopatických střevních zánětů. Pokud je endoskopista schopen identifikovat lézi a kompletně ji odstranit, neprovádí se kolektomie jako tomu bylo dříve. Další problém je, že i u idiopatických střevních zánětů mohou vznikat sporadické adenomy, které za DALM léze označit nelze. U kolorektálního karcinomu vzniklého v terénu ulcerózní kolitidy je často mutován *APC* gen a gen *TP53*; u kolorektálního karcinomu vzniklého u Crohnovy choroby jsou mutovány geny pro mismatch-repair systém [1].

3.11 Grading a staging kolorektálního karcinomu

U každého resektátu s adenokarcinomem tlustého střeva je stanoven histologický stupeň diferenciaci, tzv. grading [31].

Tab. č. 2: Histologický stupeň diferenciaci = Grading tumoru (G), adaptace na karcinom kolorekta [1].

G1	Dobře diferencovaný adenokarcinom (>95 % žlázových struktur)
G2	Středně diferencovaný adenokarcinom (50-95 % žlázových struktur)
G3	Nízce diferencovaný adenokarcinom (<50 % žlázových struktur)
G4	Dediferencovaný adenokarcinom (např. sarkomatoidní, mucinózní,...)

Obdobně jako grading je i u každého resektátu adenokarcinomu tlustého střeva stanoven patologický staging, podle TNM klasifikace [31].

Tab. č. 3: pTNM klasifikace; pokročilost primárního tumoru (T), adaptace na karcinom kolorekta.

pTis	Adenokarcinom in situ (intraepiteliální – nepřesahující bazální membránu; intramukozální - invaze do lamina propria mucosae bez šíření přes lamina muscularis mucosae)
pT1	Adenokarcinom postihuje submukózu
pT2	Adenokarcinom postihuje vlastní svalovinu (tunica muscularis propria)
pT3	Adenokarcinom postihuje subserózu nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně
pT4a	Adenokarcinom prorůstá na viscerální peritoneum
pT4b	Adenokarcinom přímo postihuje jiné orgány či struktury

Tab. č. 4: pTNM klasifikace; postižení lymfatických uzlin (N), adaptace na karcinom kolorekta.

pN0	Regionální lymfatické uzliny bez metastatického postižení
pN1a	Metastáza v jedné regionální lymfatické uzlině
pN1b	Metastáza ve 2-3 regionálních lymfatických uzlinách
pN1c	Nádorová satelitní ložiska v subserózním tuku bez postižení regionálních lymfatických uzlin
pN2a	Metastáza ve 4-6 regionálních lymfatických uzlinách
pN2b	Metastáza ve více než 7 regionálních lymfatických uzlinách

Tab. č. 5: pTNM klasifikace; přítomnost vzdálených metastáz (M), adaptace na karcinom kolorekta.

pM0	Bez vzdálených metastáz
pM1a	Metastázy omezené na jeden orgán (játra, plíce, vaječník, ne-regionální lymfatická uzlina)
pM1b	Metastázy ve více než jednom orgánu nebo na parietálním peritoneu

3.12 Diagnostika a léčba kolorektálního karcinomu

Diagnostika a terapie kolorektálního karcinomu se zakládá na spolupráci několika klinických oborů. Primární screening v podobě testu na okultní krvácení ve stolici provádí praktický lékař popř. gynekolog u pacientů, kteří dosáhli 50 let věku a nepatří do vysokorizikových skupin pro kolorektální karcinom. Při negativním výsledku je test opakován ve dvouletých intervalech. Při pozitivitě testu na okultní krvácení ve stolici je pacient odeslán k provedení kolonoskopie na gastroenterologii. Alternativou primárního

screeningu u pacientů na 55 let věku je primární screeningová kolonoskopie. Při negativním nálezu, ve smyslu prekancerózních lézí sliznice tlustého střeva, je opakována za 10 let [32].

Endoskopie hraje nejvýznamnější roli v sekundární prevenci kolorektálního karcinomu, především ve snášení prekancerózních lézí metodou endoskopické polypektomie, u přisedlých lézí je možné využít endoskopickou slizniční resekci nebo při rozsáhlejších výkonech i endoskopickou submukózní disekci. Obě zmiňované metody je možno užít i k odstranění časných kolorektálních neoplázií; submukózní disekce má výhodu v možném posouzení hloubky invaze a vyšetření resekční linie [33]. Při nekurativních výkonech je endoskopicky odebrán vzorek tumoru, který je zpracován na patologii, kde je na základě histologického obrazu diagnostikován kolorektální karcinom.

Před případným chirurgickým řešením je pacientovi stanoven tzv. klinický staging, v rámci něhož jsou mu provedena vyšetření, která mají zhodnotit pokročilost onemocnění. Zlatým standardem je provedení CT břicha a pánve, RTG plic a biochemické vyšetření (např. měření hladiny karcinoembryonálního antigenu, čehož se využívá např. k monitoraci úspěšnosti léčby).

Chirurgický výkon může být u kolorektálního karcinomu indikován ve všech klinických stádiích. Podle lokalizace nádoru a cévního zásobení tlustého střeva je provedena laparoskopicky popř. klasicky pravostranná nebo levostranná hemikolektomie. Je-li tumor lokalizován v oblasti rekta, je přistoupeno k Hartmannově operaci, při které se slepě zašije pahýl rekta, vyvede se dočasná sigmoideostomie a v druhé době se provede rekonstrukce trávicí trubice; popř. k Millesově operaci, při které dojde k odstranění rekta i se svěrači a pacient po ní má permanentní sigmoideostomii. U tumorů rekta je kromě střeva s nádorem odstraněna i perirektální tuková tkáň s lymfatickými uzlinami a případnými satelitními ložisky tumoru, jedná se o tzv. totální mezorektální excizi (TME). Kvalita provedení TME je určujícím faktorem pro případnou lokální recidivu tumoru [34]. Jiný je chirurgický přístup z důvodu metastáz karcinomu kolorekta do jater, jsou-li ve vhodné lokalizaci, může být provedena typická nebo atypická resekce jater [35].

Resekát tlustého střeva je zpracován na patologii, kde je určen patologický TNM staging. Pokud je v perikolickém tuku nalezeno a vyšetřeno méně než 12 lymfatických uzlin, je lymfadenektomie považována za inkompletní. Resekáty rekta jsou zpracovány

dle standardizovaného protokolu a navíc je hodnocena kvalita TME (intaktnost fascia recti, distální a radiální (cirkumferenční) resekční okraj) [34]. Podle patologického stagingu je určeno stadium onemocnění a je přistoupeno k další léčbě, kterou řídí klinický onkolog či radiační onkolog.

Tab. č. 6: Zjednodušené rozdělení do klinických a terapeutických stadií.

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

Ve stadiu 0 (Tis, N0, M0) hrají stále významnější roli endoskopické metody (hlavně endoskopická submukózní disekce), která musí být provedena tzv. do zdravé tkáně, aby byla kurativní. U endoskopicky neřešitelných velkých polypovitých nebo přisedlých lézí se provádí chirurgický výkon obvykle menšího rozsahu než hemikolektomie. Adjuvantní chemoterapie není indikována [36].

Ve stadiu I (T1-2, N0, M0) je terapeutickým výkonem chirurgická resekce. Adjuvantní chemoterapie rovněž není indikována [36].

Stadium II (T3-4, N0, M0) je děleno do dvou skupin; v první skupině pT3 N0 M0 bez rizikových faktorů není indikována adjuvantní chemoterapie a pacient je dlouhodobě dispenzarizován. U druhé skupiny pT4 N0 M0 nebo pT3 N0 M0 s high risk faktory (pozitivní nebo neznámé resekční okraje, obstrukce nebo perforace střeva nádorem, Grade 3-4, předoperačně zvýšená hladina CEA, mucinózní komponenta tumoru, nedostatečný počet vyšetřených lymfatických uzlin; lymfatická, vaskulární nebo perineurální invaze) je indikována pooperační adjuvantní chemoterapie [36].

Stadium III (jakékoli T, N1-2, M0) je vždy indikováno k pooperační adjuvantní chemoterapii. Ta se podává obvykle po dobu 6 měsíců jedním z mnoha schémat (viz níže).

Ve stadiu IV (jakékoli T, jakékoli N, M1) je indikována paliativní chemoterapie obvykle v kombinaci s biologickou léčbou (bevacizumab, cetuximab, panitumumab,...). V některých případech může být indikována paliativní radioterapie, která se užívá jen u tohoto stadia, protože radikální dávka radioterapie převyšuje toleranční dávky tenkého střeva a parenchymatózních orgánů břicha [36, 37].

3.12.1 Farmakoterapie kolorektálního karcinomu

3.12.1.1 *Chemoterapeutické režimy*

Režimy používané na principu kombinace 5-fluorouracilu (5-FU) a leukovorinu jsou DeGramontův režim, Machover a AIO režimy [36, 37]. 5-FU patří mezi antagonisty pyrimidinů, byl objeven jako první chemoterapeutikum účinné proti kolorektálnímu karcinomu, který byl do té doby považován za farmakorezistentní. 5-FU je v buňkách aktivován fosforylací na 5-fluorouridin monofosfát, který se inkorporuje do RNA a inhibuje její funkci. Dalším produktem aktivace je 5-fluorodeoxyuridin monofosfát, který se kovalentně váže na thymidylátsyntetázu a inhibuje syntézu DNA. Kombinace s leukovorinem zvyšuje účinnost 5-FU na principu tzv. biochemické modulace, při které je vzniklý meziproduct v nádorové buňce stabilnější a hůře degradovatelný. Leukovorin je podáván před dávkou 5-FU [38].

V režimech FOLFOX a FLOX je k 5-FU a leukovorinu přidávána oxaliplatina. FOLFOX je jeden z nejčastěji užívaných režimů u stadia III a společně s DeGramontovým režimem i pro stadia II s high risk faktory. Oxaliplatina obsahuje anorganický metalický komplex, který ničí buňky ve všech stádiích buněčného cyklu a působí neselektivně na rychle se dělící buňky. Oxaliplatina představuje třetí generaci mezi sloučeninami platiny. Nemá nefrotoxické ani výraznější emetogenní účinky, její myelosupresivní účinek je mírný, jejím hlavním nežádoucím účinkem je neurotoxicita [38].

V režimu FOLFIRI je užívána kombinace 5-FU a leukovorinu společně s irinotekanem, který patří mezi inhibitory topoizomerázy I a tlumí syntézu DNA. Toxicita irinotekanu se projevuje zejména průjmy a alopecii [38].

Kombinací výše zmíněných je režim FOLFOXIRI, který obsahuje 5-FU, leukovorin, oxaliplatinu a irinotekan. Je využíván např. i v kombinaci s bevacizumabem v rámci terapie metastatického kolorektálního karcinomu.

Další poměrně široce užívané chemoterapeutikum je kapecitabin (Xeloda), který je prekurzorem 5-FU a může být použit buď v monoterapii (u stadia III, ale i paliativně u stadia IV) nebo v režimech Xelox (společně s oxaliplatinou) nebo Xeliri (společně s irinotekanem) [36].

3.12.1.2 *Biologická léčba v terapii kolorektálního karcinomu*

K léčbě kolorektálního karcinomu jsou využívány terapeutické monoklonální protilátky, které blokují signální dráhy důležité pro růst kolorektálního karcinomu na

principu blokování EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) nebo působí antiangiogenně a ovlivňují novotvorbu cév blokováním VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor). Tyto látky jsou podávány u primárně pokročilých adenokarcinomů (pM1) nebo u adenokarcinomů, u kterých byla po předchozí chemoterapii zjištěna progresse onemocnění [37].

Cetuximab je chimérická monoklonální protilátka zaměřená na inhibici EGFR receptoru. Nadprodukce EGFR receptoru je popisována u více než 85 % kolorektálních karcinomů. Podmínkou pro podání látky je nemutovaný (tzv. wild type) gen *RAS* (*KRAS*, *NRAS*). Podává se v kombinaci s režimy FOLFOX a FOLFIRI [36, 39].

Panitumumab se váže na EGFR receptor, blokuje vazbu AGF (růstový faktor příbuzný angiopietinu) na $TGF\alpha$ (transformující růstový faktor alfa) a inhibuje proces fosforylace. Podmínkou pro podání látky je nemutovaný (tzv. wild type) gen *RAS* (*KRAS*, *NRAS*). Podává se v kombinaci s režimy FOLFOX a FOLFIRI [36, 39].

Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti všem typům vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který hraje významnou úlohu především při regulaci angiogeneze. Podává se buď samostatně nebo v kombinaci s jinými chemoterapeutickými režimy (nejvíce s FOLFOX) [36, 39].

Aflibercept je rekombinantní fúzní protein, který působí jako falešný receptor a váže ligandy s vyšší afinitou než přirozený receptor. Vazbou ligandů blokuje aktivaci receptorů vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGFR) a následnou proliferaci buněk a novotvorbu cév. Aflibercept je indikován ve druhé a třetí linii léčby metastatického kolorektálního karcinomu rezistentního k oxaliplatině, v kombinaci s chemoterapií FOLFIRI [40].

Regorafenib rozšiřuje možnosti léčby metastatického kolorektálního karcinomu. Jedná se o perorální multikinázový inhibitor, který selektivně ovlivňuje onkogenezi, angiogenezi a nádorové mikroprostředí. Regorafenib inhibuje signální proteiny zahrnuté do onkogeneze, jako je *BRAF* a tyrosinkinázy zahrnuté do angiogeneze (VEGF 1,2,3) a klíčový regulátor angiogeneze – tyrosinkináza s homologní doménou 2 pro imunoglobulinový a epidermální růstový faktor (TIE-2). Regorafenib dále inhibuje stromální kinázy ovlivňující nádorové mikroprostředí, kam řadíme receptor pro destičkový růstový faktor PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor) a receptor pro fibroblastový růstový faktor FGFR (fibroblast growth factor receptor) [36, 41].

3.12.1.3 Nová generace chemoterapeutik

Trifluridin v kombinaci s tipiracilem (TAS-102) je novou možností léčby pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří již byli léčeni fluoropyrimidiny, oxaliplatinou, irinotekanem, bevacizumabem a u pacientů bez mutace genu *RAS* protilátkami proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Jedná se o perorální analog thymidinu v kombinaci s inhibítozem thymidinfosforylázy tipiracil hydrochloridem. Aktivní cytotoxicky působící látkou je trifluridin, který se inkorporuje do DNA, což vede k protinádorovému účinku. Tipiracil působí inhibicí thymidinfosforylázy, čímž brání rychlé degradaci trifluridinu a zajišťuje jeho dostatečnou plazmatickou koncentraci. V preklinických studiích prokázal trifluridin s tipiracilem (TRI/TIP) protinádorovou aktivitu proti buněčným liniím kolorektálního karcinomu rezistentními vůči 5-fluorouracilu [36, 42].

3.12.2 Léková rezistence v terapii kolorektálního karcinomu

Rezistence nádorových buněk je hlavním problémem v managementu metastatického kolorektálního karcinomu. Na chemorezistenci se podílí několik mechanismů, mezi které patří:

- 1) inter- a intranádorová heterogenita a klonální selekce s ohledem na různorodost buněčné populace s různým stupněm diferenciaci [43];
- 2) mutace a epigenetické změny v reparačních mechanismech DNA [44];
- 3) získaná rezistence k apoptóze nebo senescenci přes změnu exprese signálních drah [45, 46];
- 4) zvýšená autofagie [47].

Dále existuje několik mechanismů lékově podmíněných:

- 1) zvýšená exprese ATP-binding cassette (ABC) transportérů jako například P-glykoprotein, transportéry organických kationtů 1,2,3; P-tytu ATPáz - ATP7A a ATP7B; dále pak protein spojený s multilékovou rezistencí (multidrug resistance protein; MRP), který aktivně přenáší chemoterapeutika ven z buněk [48, 49];

2) změny v intracelulárních a extracelulárních metabolických drahách vedoucí ke zvýšení lékové inaktivace [50];

3) změna cílových léčebných struktur.

Léková rezistence se objevuje u pacientů s kolorektálním karcinomem, snižuje účinnost terapie a nakonec je i zodpovědná za selhání léčby. Léková rezistence způsobuje snížení účinnosti léčiv např. antibiotik, antivirotik a chemoterapeutik [51].

3.12.2.1 Buněčné mechanismy založené na efluxním přenosu

Do efluxu léčiv z nádorových buněk je zapojeno několik membránových transportérů, které napomáhají snížit intracelulární akumulaci léčiva uvnitř buněk. Membránové transportéry jsou skupina membránově asociovaných proteinů, které kontrolují přenos substrátů dovnitř a ven z buňky. V lidském genomu bylo zjištěno více než 400 membránových transportérů, které můžeme rozdělit do dvou hlavních nadrodin: ABC (ATP binding cassette) a SLC (solute carrier) transportéry. Zástupcem ABC transportérů je např. P-glykoprotein, BCRP (breast cancer resistance protein) a protein spojený s multilékovou resistencí (MRP). Do SLC nadrodiny patří transportéry typu organických aniontů, organických kationtů a organických aniontů transportujících polypeptidy [52, 53].

ABC transportéry

Důležitou roli při transportu protinádorových léčiv ven z buněk hrají P-glykoprotein, podrodiny ABCB, MRP1, podrodiny ABCC, a BCRP z podrodiny ABCG, které se zároveň podílejí na rozvoji lékové rezistence.

P-glykoprotein (protein velikosti 170 kDa) je jedním z nejlépe popsáných ABC transportérů. P-glykoprotein přednostně transportuje relativně velké lipofilní a pozitivně nabitě molekuly [53]. Přibližně 50 % lidských nádorů exprimuje P-glykoprotein v hladině, která ovlivňuje lékovou rezistenci. Kolorektální karcinom patří mezi nádory, které jsou necitlivé k většině chemoterapeutik již na začátku terapie díky expresi P-glykoproteinu. Jeho vysoká hladina je velmi často pozorována již při stanovení diagnózy a je spojena s rezistencí k protinádorovým léčivům odvozeným z přírodních látek [54-56].

Substráty MRP1 (protein velikosti 190 kDa) jsou nekonjugované a konjugované organické anionty. Konjugací léčiv s glutationem, glukuronátem, fosfátem nebo sulfátem ve druhé fázi metabolizace léčiv dojde ke vzniku vhodnějšího substrátu pro MRP1 [53]. Zvýšená exprese MRP1 je také spojena s časnou kancerogenezí u kolorektálního karcinomu.

BCRP (protein velikosti 72 kDa) transportuje široké spektrum endogenních a exogenních substrátů přes plazmatickou buněčnou membránu. Indukce BCRP byla často pozorována během získané rezistence k protinádorovým léčivům. Některá protinádorová léčiva jako např. 5-FU, oxaliplatin a irinotekan jsou často používána pro léčbu pokročilých kolorektálních karcinomů. Eflux těchto léčiv pomocí ABC transportérů snižuje jejich účinnost a tím komplikuje léčbu tohoto onemocnění [51].

Fyziologicky jsou ABC transportéry exprimovány v důležitých biologických bariérách v lidském těle, jako je např. tenké střevo, játra, ledviny, hematoencefalická bariéra, varlata nebo placenta. Tyto transportéry fungují jako pumpa pro substráty, které jsou přenášeny ven z buněk a chrání tak lidské tělo před endogenními toxiny a xenobiotiky. ABC transportéry hrají důležitou roli v absorpci, distribuci a exkreci protinádorových léčiv, čímž ovlivňují jejich účinnost [51].

Mechanismy nezávislé na transportu léčiv

Tyto mechanismy lékové rezistence jsou často spojovány se změnou aktivit specifických enzymů a změnami v procesech buněčné smrti. Například zvýšená exprese glutation-S-transferázy může usnadnit odstranění protinádorových léčiv z buněk a tím snížit jejich terapeutický efekt. Snížená aktivita topoizomeráz, enzymů, které regulují procesy DNA replikace, může také způsobit rezistenci nádorových buněk k léčivům (např. doxorubicinu nebo etoposidu) [57].

Další z možných mechanismů je léková rezistence založená na změnách programované buněčné smrti, apoptózy. Tento typ lékové rezistence vychází ze zvýšené exprese proteinů, které inhibují buněčnou smrt a/nebo z důvodu ztráty proteinů odpovídajících za buněčnou smrt. Většina běžně používaných léčiv jako je doxorubicin, cisplatin, oxaliplatin a cyklofosfamid patří mezi induktory apoptózy, nicméně defekt v apoptotické signální dráze může chránit nádorové buňky před tímto typem programované buněčné smrti a tím vést k lékové rezistenci [58].

3.12.2.2 EMT, epigenetika a chemorezistence

V poslední době byla již několikrát popsána spojitost mezi epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT) a nádorovými kmenovými buňkami, a souvislost procesu EMT s terapeutickou rezistencí u kolorektálního karcinomu [43]. Během EMT dochází k řadě změn souvisejících se změnou epiteliálního charakteru buněk na mezenchymální fenotyp, zodpovědný za zvýšenou migraci a později i invazivitu a metastazování. Klíčová událost EMT je ztráta exprese E-cadherinu z prostoru buněčné membrány, může být ovlivněna několika genetickými a stejně tak i epigenetickými mechanismy. Mezi ně patří mutace somatických a zárodečných buněk genu pro *CDH-1* nebo hypermetylace CpG ostrůvku promotoru genu pro *CDH-1*. CpG ostrůvky jsou oblasti DNA větší než 200 párů bazí s vysokou frekvencí (více než 50 %) CpG dinukleotidů (cytosin-fosfát-guanosin). Někteří členové rodiny miR-200 (např. miR-141 a miR-200c) podporují produkci E-cadherinu a tím i epiteliální diferenciaci [10, 59, 60].

Pro nádorové buňky v EMT je charakteristická snížená exprese jejich epiteliálních markerů a zvýšená exprese mezenchymálních markerů jako jsou N-cadherin a vimentin, které se podílejí na zvýšení schopnosti migrace a invazivity [61]. Jedním z důležitých regulátorů tohoto procesu je miR-21, která inhibuje nádorové supresory např. *PDCD4*, *RECK* a *PTEN*, čímž se podílí na vyšší aktivitě degradačních enzymů [62-64]. Snížená exprese E-cadherinu se ukázala jako negativní prognostický faktor v několika studiích zabývajících se kolorektálním karcinomem [65-67]. Zároveň byl popsán vztah mezi expresí E-cadherinu a kolorektálním karcinomem. Nízká hladina E-cadherinu a vysoká hladina N-cadherinu v nádorové tkáni významně koreluje s pokročilostí onemocnění, angioinvazí, stupněm diferenciací a hladinou Ca19-9 [68]. Navíc je zvýšená exprese N-cadherinu spojována s vyšším stadiem onemocnění, invazí do lymfatických uzlin a tvorbou vzdálených metastáz u pacientů s kolorektálním karcinomem. Několik klinických studií prokázalo souvislost mezi procesem EMT a chemorezistencí. Bylo zjištěno, že léčba kolorektálního karcinomu pomocí chemoterapeutik vykazuje u buněk v procesu EMT znaky rezistence a to zejména ve spojitosti se zvýšenou hladinou TGF- β [69, 70].

3.13 Experimentální modely kolorektálního karcinomu *in vitro*

3.13.1 Buněčné linie

Pěstování buněčných kultur patří mezi základní techniky, které se používají jak v základním, tak aplikovaném výzkumu, ale i ve výrobě. Ve výzkumu slouží především jako zdroj materiálu (tj. buněk nebo buněčných součástí) pro pokusy. Zcela nezastupitelné postavení mají hybridomové kultury při výrobě monoklonálních protilátek [71].

Kultivované buňky jsou dnes již nenahraditelným modelem používaným ve výzkumu. Buněčné kultury v experimentální práci mají ve srovnání s jinými typy biologických modelů, např. v porovnání s použitím laboratorního zvířete nebo izolovaného orgánu či tkáně, zásadní výhody. Velkou předností je to, že pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi. Mnoho buněčných linií je možné snadno kultivovat a během krátké doby je možné získat poměrně velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu, což při použití jiných biologických modelů není možné. Zároveň provádění experimentů na buněčných kulturách, při nichž dochází k jejich zničení, s sebou nese etické problémy, jako by tomu bylo při použití zvířecího pokusného modelu.

Na druhou stranu je potřeba počítat i s nevýhodami, které použití buněčných kultur limitují. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstují se v umělém kultivačním mediu, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu, a také v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů, s nimiž by *in vivo* komunikovaly a vyměňovaly si nejrůznější látky, chybí ale i součásti extracelulární matrix, jejichž přítomnost či nepřítomnost má na vlastnosti buněk zcela zásadní vliv. V důsledku toho dochází ke změně fenotypu kultivovaných buněk, takže jejich vlastnosti nemusejí přesně odpovídat vlastnostem stejných buněk v organismu – kultivované buňky mění svou morfolonii, mění se exprese genů, citlivost na různé podněty atd. Stručně shrnuto: při experimentech s kultivovanými buňkami musíme mít na paměti, že pracujeme s modelem *in vitro*, který může a nemusí dobře odrážet poměry za podmínek *in vivo*. Práce s kultivovanými buňkami je pro výzkum velmi přínosná a rozšiřuje možnosti, které nám poskytují jiné pokusné modely, nemůže však beze zbytku nahradit pokusy

prováděné na tkáních, orgánech a laboratorních zvířatech nebo lidských dobrovolnících [71].

3.13.2 Primokultury

Zdrojem buněk pro založení kultury je laboratorní zvíře nebo člověk (méně často se používají rostlinné buněčné kultury). První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Nejprve se buňky namnoží, poté nařadí a následně se přenesou do nových kultivačních nádob – tento postup obvykle označujeme jako pasáž a vzniká jím tzv. sekundární kultura čili subkultura. Buňky v sekundární kultuře se pěstují tak dlouho, dokud nezískáme dostatečné množství materiálu pro pokus [71].

Pokud jde o zakládání primokultury, můžeme rozlišit buňky pocházející z normální a nádorové tkáně. Nádorové buňky se svými vlastnostmi pochopitelně liší od normálních buněk – zpravidla se lépe množí a obecně se snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změní svoje vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají. Odlišně se také chovají buňky izolované z dospělého jedince a z embrya. Embryonální buňky se snáze pěstují a kultury, které z nich vycházejí, mají zpravidla výrazně delší životnost. Na druhou stranu bývají náchylnější ke změnám fenotypu [71].

Použití primárních buněčných linií se ukazuje jako nepostradatelný nástroj pro studium protinádorové léčby a cílené terapie. V posledních dvou dekadách se jejich použití ukázalo jako nedocenitelné z důvodu lepšího porozumění vývoje nádoru, progresu metastáz a interakcí s nádorovým stromatem [72].

První experimentální použití buněk izolovaných z živého organismu a převedený do in vitro podmínek je datován již na přelom 19. a 20. století (1898 Ljuggren – kůže v ascitu; 1907 Harrison – žabí embrya). S cílem najít vhodný modelový organismus pro izolaci kontinuální buněčné linie došlo k rozvoji laboratorních technik a byly stanoveny nové postupy. Ve druhé polovině 20. století byl výzkum zaměřen především na izolaci nádorových buněk. V roce 1951 Gey ve své laboratoři vyizoloval vůbec první lidskou buněčnou linii, byla jí nádorová linie získaná z karcinomu děložního čípku Henrietty Lacks. Tato linie nese název HeLa a je používána dodnes. Buňky této mladé ženy se jako první dokázaly množit v laboratorních podmínkách a bez omezení - do nekonečna, a tak vznikla první kontinuální linie [73]. Použití buněčných linií se tak stalo nedílnou

součástí studia molekulárně-biologických technik, charakterizace genetických a epigenetických procesů a také studia prognostických a prediktivních markerů pro možnou individualizaci terapie.

Prvním krokem izolace buněčných linií je chirurgická resekce nádoru. Pro izolaci by měla být vybrána část nádoru, která není nekrotická, ani bakteriálně kontaminovaná. Poté následuje samotná disociace buněk nádoru, přičemž existuje několik metod izolace. Všechny mají své výhody i nevýhody, avšak žádná negarantuje 100% úspěch a reproducibilitu [72, 74]. V literatuře byly popsány čtyři základní typy izolace buněk z nádorové tkáně, od jednoduchých až po sofistikovanější metody, které se snaží zachovat původní vlastnosti nádorové tkáně. První je mechanická izolace za pomoci skalpelu, nůžek a pinzety. Tato technika je jednoduchá a rychlá, ale izolovaným buňkám způsobuje mechanický stres, který může vést k buněčné smrti. Tato metoda zároveň zachovává různé typy buněk z původní tkáně (fibroblasty, endotelie,...), díky čemuž získaná kultura více připomíná původní nádorovou tkáň [74, 75].

Druhou metodou izolace je použití enzymatické disociace. Pro tento typ izolace jsou vhodné enzymy jako např. trypsin, kolagenáza, hyaluronidáza nebo elastáza. Pro nejlepší výsledek je dobré kombinovat mechanickou disociaci s disociací enzymatickou [76, 77].

Třetím možným způsobem izolace je použití magnetických nanočástic. Tyto částice jsou potaženy různými typy adhezních molekul (např. EpCam, E-cadherin) nebo protilátkami specifickými pro danou buněčnou populaci, a umožňují tak získat přesně specifickou buněčnou kulturu o definovaných parametrech [78].

Čtvrtou metodou je kultivace malých kousků tkáně, která zastupuje tzv. 3D kultivace buněk. U této metody je zachována přirozená architektura a mezibuněčná signalizace a umožňuje tedy lepší porozumění nádorovým procesům uvnitř buněčné populace. Tato metoda však není vhodná pro dlouhodobou kultivaci [72]. Uvedenými postupy, s výjimkou použití specifických protilátek, zpravidla získáme směs, která kromě požadovaných buněk obsahuje i příměs dalších buněčných typů. Existuje několik postupů, kterými můžeme získat čistou kulturu buněk, avšak získání a kultivace směsi několika buněčných typů lépe odráží vlastnosti původní tkáně. Když se nasazené buňky začnou množit a založená kultura se rozrůstá, je třeba ověřit její čistotu a popřípadě určit podíl kontaminujících buněk. Prvním, i když samostatně zcela nepostačujícím krokem, je mikroskopické zhodnocení morfologie a růstových vlastností kultury. Bohužel pouhým mikroskopickým pozorováním nelze

většinu buněčných typů od sebe odlišit. Velkým přínosem jsou imunocytochemické metody – pomocí protilátek značených fluorescenčně nebo enzymaticky se testuje přítomnost povrchových antigenů charakteristických pro kultivované buňky i pro očekávané kontaminující buněčné populace. Podobně je možné stanovit aktivitu vhodných enzymů, popřípadě zastoupení některých izoenzymů v buňce, neboť enzymatická výbava buněk se mezi jednotlivými populacemi rovněž významně liší [71].

V průběhu přípravy je velmi důležité zachovat původní vlastnosti a chování primárních nádorových buněk. Špatně provedená metodika, mikrobiální kontaminace nebo nevhodné kultivační podmínky mohou způsobit změnu ve fenotypu buněk, genetický drift, nebo významné změny chování buněk *in vitro* v porovnání s původní tkání *in vivo* [72, 74].

Příprava buněk z kolorektálního karcinomu je obtížná z důvodu možné bakteriální a mykotické kontaminace. Pokud je odběr prováděn z lumen střeva, je vysoká pravděpodobnost kontaminace. Pokud je však prováděn ze serózní strany a nedojde k poškození střevní sliznice, je riziko kontaminace mnohonásobně nižší. Mikrobiální kontaminace je největším omezením při kultivaci nádorových buněk kolorektálního karcinomu, lze jí však předejít použitím vysokých dávek antibiotik a antimykotik. Tato léčba však může interferovat s testovanými látkami a zároveň vede k selekci rezistentních klonů buněčné populace [79].

3.13.3 Charakterizace buněčných linií

Pasážováním primární kultury dojde k vytvoření buněčné linie. Rozlišujeme buněčné linie kontinuální, které nejsou omezeny v růstu, a buněčné linie konečné, charakterizované senescencí po omezeném počtu buněčných dělení. Kontinuální buněčné linie jsou transformované, jejich telomerázová aktivita je v mnoha případech neomezená, čímž se buňky stávají nesmrtelnými. Existuje několik metod, pomocí kterých se buňka stane nesmrtelnou, např. pomocí virionu při použití hTERT transfekce. Tyto metody mohou být aplikované i na nenádorové buňky.

Buněčné linie mohou existovat jako adherentní kultury, které rostou na podkladech jako je plast nebo sklo, nebo jako suspenzní kultury, které rostou volně v mediu. Pro některé typy buněk se kultivační plasty, nebo skla potahují extracelulární matrix nebo různými typy kolagenů, což může zvýšit adhezivitu buněk, ale zároveň také změnit fenotyp buněk v kultuře [80].

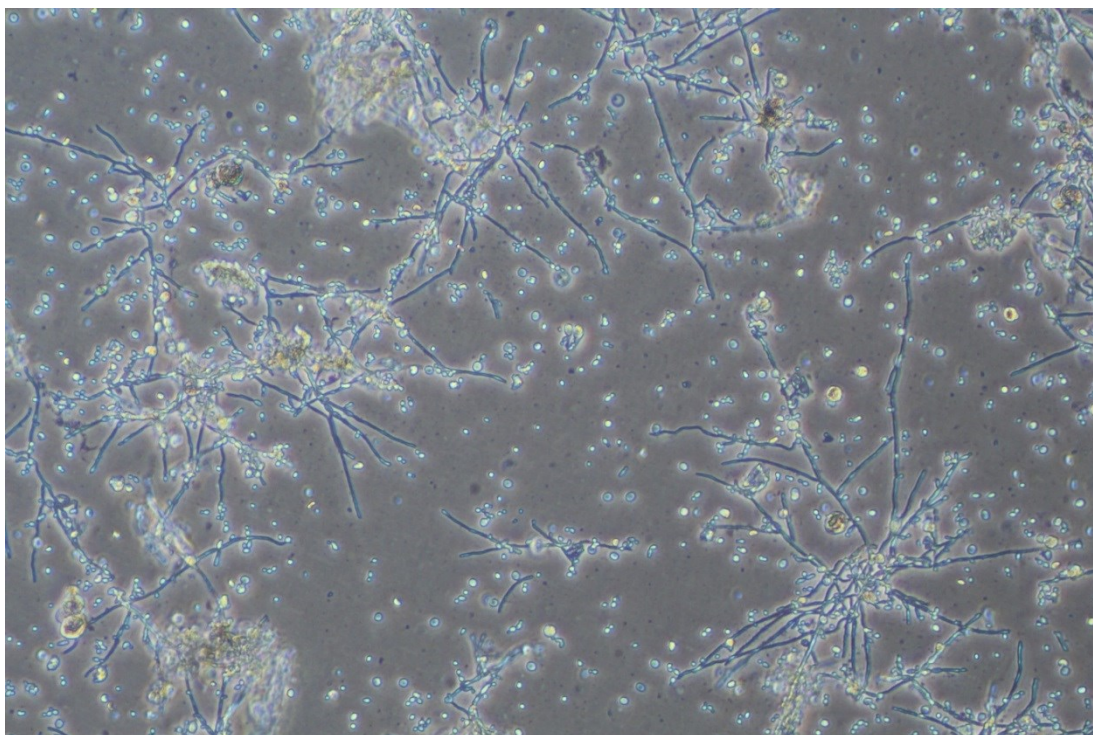
Použití nejvhodnější metodiky pro kultivaci buněk je základem konzistentních a reprodukovatelných výsledků. Výstupy z měření ovlivňuje mnoho faktorů, zahrnující změny ve funkčnosti, morfologii, množení buněk, počet pasáží a změny charakteru buněk. Tyto změny mohou znamenat genotypický drift z důvodu vysokého počtu pasáží, mikrobiální kontaminaci nebo kontaminaci jinou buněčnou linií. Autentizace buněčných linií je proto jednou z prerekvizit pro úspěšnou vědeckou práci [81].

Buněčné linie jsou náchylné k tzv. genotypovému a fenotypovému driftu, jako důsledku kontinuální kultivace. Může dojít ke vzniku rychle rostoucích klonů uvnitř populace, které často vykazují změny v karyotypu, v expresi hormonálních receptorů a v celkovém fenotypu. V poslední době se například ukazuje, že rezistence vůči léčivům není dána jen vlastními nádorovými buňkami, ale také jejich mikroprostředím, jejich interakcí s buňkami kostní dřeně nebo s buňkami okolních tkání. Dalším omezením pro užívání buněčných kultur je dvojrozměrnost (2D) daného systému [82].

Změny charakteru buněk často souvisí s mikrobiální kontaminací. Mikrobiální kontaminace (bakterie, plísně, mykoplasmata a viry) buněčných kultur je u většiny případů viditelná pouhým okem (zakalením kultury). Nízkou hladinu kontaminace lze odhalit pomocí molekulárně-genetických metod. Například mykoplasmatická infekce má vliv na mnoho buněčných funkcí. Způsobuje cytopatický efekt, má vliv na i na metabolismus buněk a proliferaci. Existuje několik validovaných metod pro detekci mykoplasmat v buněčné kultuře, patří mezi ně buněčná kultivace, fluorescenční stanovení (Hoechst, DAPI), DNA hybridizace a PCR.

Přítomnost virové infekce v buněčných kulturách je nejobtížněji detekovatelná, ale ne vždy má výrazný cytopatický efekt, což neznamená, že je virus v kultuře nutně latentní. Metody, kterými lze viry detekovat, jsou PCR, nepřímá imunofluorescence a enzymatické imunoassay [81].

Ke kontaminaci může dojít také jinou buněčnou kulturou. Jednou z nejčastějších linií kontaminujících jiné buněčné kultury je výše zmiňovaná linie HeLa. HeLa buňky samotné vykazují velké množství odlišností. Rozdíly mezi jednotlivými klony HeLa buněk jsou přičítány různým podmínkám kultivace, nebo počtu pasáží. Tyto rozdíly lze detekovat pomocí STR (short tandem repeats) profilování. Jedná se o techniku, která využívá detekci polymorfismů STR lokusů fluorescenční a multiplexní metodu založenou na PCR. Nesprávná identifikace buněčných kultur a zkřížená kontaminace jsou považovány za rozsáhlý problém ve výzkumu [83].



Obr. č. 10: Mykotická kontaminace primokultury kolorektálního karcinomu.

4 Cíle práce

Náplní mé disertační práce bylo vybrat vhodný postup pro izolaci buněčných kultur z kolorektálního karcinomu a jeho metastázy do regionální lymfatické uzliny, provést základní charakterizaci odebraných buněčných linií se zaměřením na analýzu markerů nádorové progresse.

Díličními cíli projektu bylo:

- 1) Optimalizovat postup pro přípravu primokultur odvozených z kolorektálního karcinomu a přilehlých lymfatických uzlin.
- 2) Stanovit citlivost těchto primokultur k běžně používaným chemoterapeutikům (oxaliplatin, irinotekan), a/nebo monoklonálním protilátkám (bevacizumab, cetuximab, panitumumab).
- 3) Stanovit markery podílející se na kancerogenezi a metastazování u kolorektálního karcinomu na úrovni mikroRNA, mRNA a proteinů.
- 4) Objasnit roli epiteliálně mesenchymální tranzice v buňkách metastatického kolorektálního karcinomu.

5 Metodika

5.1 Materiál pro buněčné kultury

Všechny resekáty tlustého střeva pro tuto práci byly operovány na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Výzkumný záměr byl povolen etickou komisí FNHK (Referenční číslo: 201206 S52P a 201604S O3P) a každý pacient podepsal informovaný souhlas s účastí v projektu.

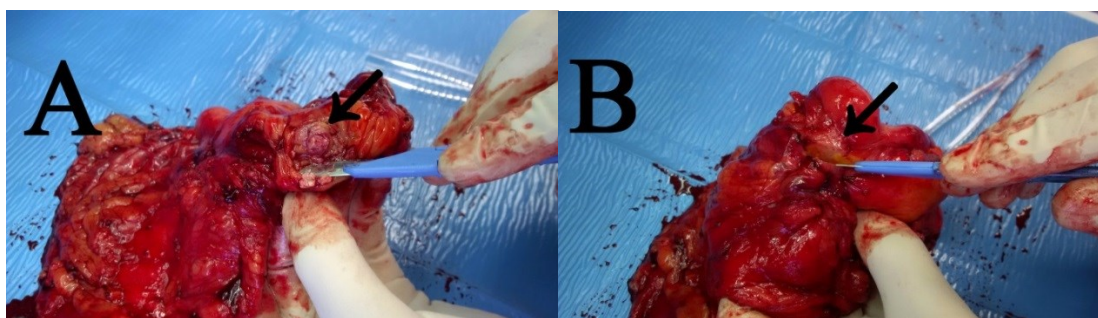
Pro tuto práci byly získány adenokarcinomy volného tlustého střeva; karcinomy rekta byly zpracovány podle speciálního protokolu a pro náš výzkumný projekt použity nebyly.

Resekáty tlustého střeva (téměř výhradně pravostranná nebo levostranná hemikolektomie) byly chirurgem odeslány jako nefixovaný materiál, tj. bez zalití do formolu, na Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN HK. Zde byl nejprve zkontrolován informovaný souhlas pacienta, a poté následovalo další zpracování. Na přikrajovací prkénko byla položena sterilní rouška, na kterou byl resekát položen. Lékař, který prováděl odběr, použil obličejovou roušku a sterilní rukavice. Nejprve byl vyhmátán primární tumor, obvykle jako ztluštělá stěna střeva, popř. byla na povrchu vtažená seróza. V jeho okolí jsme se pokusili najít zvětšenou lymfatickou uzlinu a polovinu této uzliny jsme odebrali do zkumavky s transportním médiem označené jako písmeno A. Místo odebrání bylo označeno barevným špendlíkem pro snazší identifikaci při následném histologickém zpracování. V dalším kroku byl do zkumavky s transportním médiem, označené písmenem B, odebrán vzorek z primárního tumoru střeva, při kterém byl kladen důraz na to, aby tento odběr nebyl z nejhlubšího místa invaze (což by mohlo komplikovat zhodnocení hloubky invaze a tím ohrozit či znemožnit histologický staging tumoru), dále aby nedošlo ke kontaminaci vzorku ze střevního lumen a aby odběr nebyl z místa s rozsáhlou nekrózou tumoru. V posledním kroku byla odebrána nepostižená sliznice střeva, obvykle v blízkosti resekčního okraje, a tento vzorek dán do zkumavky s transportním médiem označené písmenem C.



Obr. č. 11: Pomůcky pro odběr materiálu z nefixovaného resektátu tlustého střeva – sterilní rouška (modrá), rukavice, skalpel, pinzeta, obličejová rouška, označené zkumavky s transportním médiem.

Transportní medium - složení (15 ml/jeden vzorek)	
Penicillin/Streptomycin (100 U/mL, Gibco, Invitrogen)	Aqua pro injectione
Amphotericin B (Sigma-Aldrich)	PBS 10x



Obr. č. 12: Odběr materiálu z nefixovaného resektátu tlustého střeva - z lymfatické uzliny (A) z perikolického tuku a tumoru ze serózní strany tlustého střeva (B).

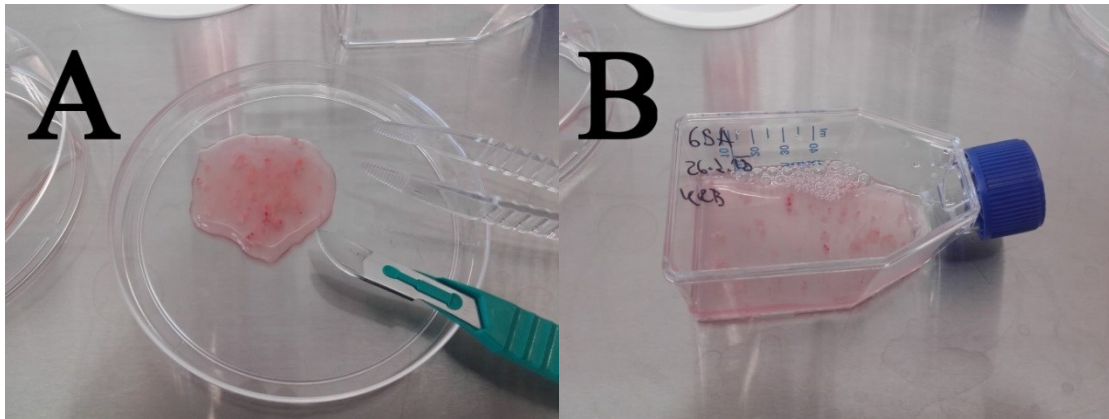
Resektát střeva byl po odběru standardně zalit formalínem a druhý den zpracován obvyklým způsobem podle příkrajovacího manuálu. Na průvodce bylo zaznamenáno, ve kterém bloku je odebraná uzlina, abychom mohli potvrdit její metastatické postižení. Histologicky byl stanoven grading a staging tumoru, angioinvaze, perineurální šíření, popř. mucinózní komponenta tumoru či jiné zvláštní histologické rysy.

U většiny odběrů byly části materiálu z uzliny (A), primární tumoru (B) a nenádorové sliznice tlustého střeva (C) po vyjmutí z transportního media vloženy do mikrozkušavek (objem 2 ml) s Trizolem (0,5 ml). Mikrozkušavky byly popsány, uloženy do krabičky do hlubokomrazícího boxu (-80°C) a jejich pozice zapsána do pracovního deníku.



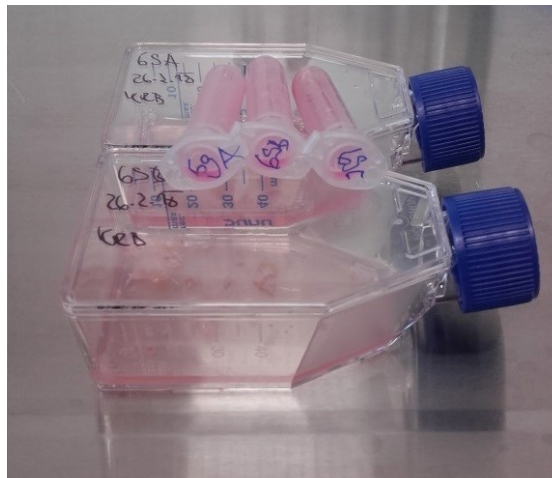
Obr. č. 13: Pomůcky pro zpracování kultury v laminárním boxu - materiál z tumoru, lymfatické uzliny a nenádorové sliznice střeva v transportním mediu (vlevo); sterilní pinzeta a skalpel; Petriho miska; kultivační lahve; kultivační medium; mikrozkušavky s Trizolem a plynový kahan.

Zbylá část materiálu z uzliny (A) a z primárního tumoru (B) byla v laminárním boxu zbavena přebytečné tkáně (svaloviny a tuku), vložena do Petriho misek (každá zvlášť) a již v kultivačním mediu rozmělněna pomocí skalpelu a pinzety, popř. injekční stříkačky s jehlou na co nejmenší fragmenty a za pomoci Pasterovy pipety byly tyto fragmenty přeneseny do označené kultivační lahve (objem 25 cm³). Ke vzorkům byly obvykle přidány ještě 3 ml kultivačního media. Takto připravené vzorky byly kultivovány při 37°C v 5% atmosféře CO₂.



Obr. č. 14: Rozmělnění materiálu z lymfatické uzliny v kultivačním mediu v Petriho misce (A). Materiál z lymfatické uzliny v kultivační lahvi (B).

<u>Kultivační medium – složení</u>	
RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich)	Insulin (100 IU/mL, Eli Lilly Czech)
15% fetální bovinní sérum (Gibco)	Transferrin (2 mg/mL, Sigma-Aldrich)
Penicillin/Streptomycin (100 U/mL, Gibco, Invitrogen)	



Obr. č. 15: Z většiny odběrů byly získány tři mikrozkuhavky, které byly uloženy do hlubokomrazícího boxu a dvě kultivační lahve, které byly umístěny do inkubátoru.

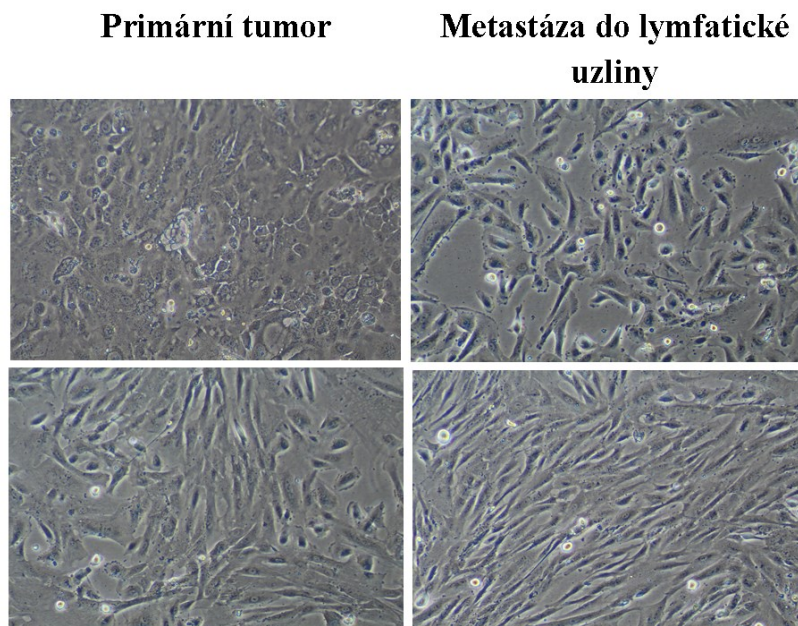
První den po odběru a kultivaci byla v invertovaném mikroskopu zkontrolována případná kontaminace vzorků. Totéž bylo učiněno i druhý den po odběru a navíc byly přidány do každé kultivační lahve 3 ml kultivačního media. Asi po týdně došlo k přilnutí buněk na dno lahve, bylo vyměněno kultivační medium a po vytvoření kompaktní buněčné vrstvy (tzv. monolayeru) bylo přistoupeno k rozpasáží buněk do dvou kultivačních lahví o objemu 25 cm². Při další pasáži byly buňky rozděleny do

dvou větších lahví o objemu 75 cm² z důvodu zajištění dostatečného množství buněk pro následné pokusy.

5.2 Pasážování buněk

Pokud byly buňky narostlé do kompaktní buněčné vrstvy (tzv. monolayeru), nejprve jsme odstranili kultivační medium, v dalším kroku jsme buňky několikrát opláchli roztokem trypsin/EDTA (1-2 ml na láhev) a asi na 10 minut jsme je vložili do inkubátoru (37°C v 5% atmosféře CO₂). Po této době při pozorování v mikroskopu se buňky staly oválnými a plavaly (dojde k přerušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů mezi buňkami a kultivační lahví). K zastavení účinku trypsin/EDTA jsme použili RPMI s 15% FBS. Pomocí tohoto media jsme nejprve dno kultivační lahve několikrát opláchli, a pak resuspendovali buněčnou peletu pomocí pipety. Poté jsme materiál zcentrifugovali (5 minut, 500 rpm). Původní medium se zbytky trypsin/EDTA jsme slili, doplnili 5 ml nového kultivačního media a několikrát promíchali. Vzniklou suspenzi jsme rozdělili do nových lahví a doplnili čerstvé kultivační medium. Poté jsme buňky vložili do inkubátoru na 37°C; 5% CO₂.

1 ml suspenze jsme zpracovali jako cytospinový preparát a obarvili dle May-Grunwald-Giemsy, ve kterém jsme hodnotili morfologické znaky buněk a dále jsme provedli imunohistochemické barvení pomocí protilátky proti pancytokeratinu (AE1-AE3), abychom potvrdili epitelový původ buněk. Část materiálu byla zpracována i jako cytoblok, u kterého byl nejprve materiál zcentrifugován a fixován formalínem, obarven hematoxylinem a zalit agarem a parafínem. Dále byl zpracován standardním postupem.



Obr. č. 16: Mikroskopie buněk izolovaných z primárního tumoru a jejich metastázy do lymfatické uzliny ve fázovém kontrastu (zvětšení 200x).

5.3 Detekce mykoplazmové infekce u buněčných kultur pomocí PCR analýzy

Při práci s buněčnými kulturami jsou častým problémem mykoplazmové infekce. Přítomnost mykoplazmat vede ke zpomalení proliferace buněk a má dalekosáhlý vliv na vlastnosti kultury. Buněčné kultury bývají rutinně testovány na přítomnost mykoplazmat. Buněčné linie izolované z primárních kolorektálních karcinomů, stejně tak z metastáz do lymfatické uzliny, jsme testovali na přítomnost mykoplazmat za pomoci klasické PCR detekce. Jako zdrojový materiál jsme použili medium, ve kterém byly buňky kultivovány alespoň 72 hodin, získané odběrem před pasážováním buněk. Pokud nebyla analýza provedena ihned po odběru, vzorky jsme uchovali v chladničce (4°C), maximálně však po dobu 48 hodin.

Odebrané medium jsme před analýzou ponechali zhruba hodinu při pokojové teplotě. Reakční směs pro PCR reakci jsme si připravili podle předpisu uvedeného v následující tabulce:

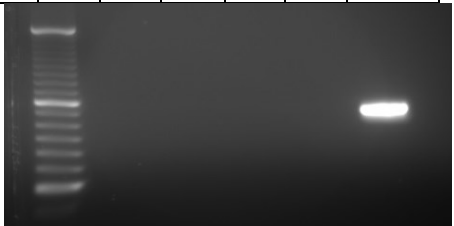
Reakční směs (pro jeden vzorek = 24 µl)	
DEPC voda	18,00 µl
10x reakční pufr Ex Taq Buffer (Takara)	2,50 µl
2,5 mM dNTP Mix (Takara)	2,00 µl
20 µM primeru FV-Myco-F (GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG)	
20 µM primeru FV-Myco-R (CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G) směs	1,25 µl
Ex Taq HS polymeráza (RR006, Takara)	0,25 µl

Směs jsme rozpipetovali po 24 µl do připravených 0,2 ml PCR mikrozkušavek. Ke směsi jsme přidali 1 µl odebraného kultivačního media. Jako pozitivní kontrolu jsme použili vzorek media Hep2 USA (p 405), jako negativní kontrolu jsme napipetovali 1 µl DEPC vody. Nakonec jsme vzorky promíchali. Amplifikace byla provedena na cyklieru PTC-200 (MJ Research), za reakčních podmínek uvedených v následující tabulce:

Opakování	Teplota	Čas	Poznámka
1x	95°C	3 min.	Aktivace polymerázy
30x	95°C	1 min.	Denaturace
	60°C	1 min.	Annealing
	72°C	1 min. 30 s.	Extenze
1x	72°C	10 min.	Závěrečná extenze
1x	4°C	∞	Ochlazení vzorků

Během amplifikace jsme si připravili 2% agarózový gel smícháním agarózy s TBE pufrém a zahřátím v mikrovlnné troubě. Poté jsme gel zchladili na teplotu cca 60°C a do gelu jsme připipetovali 4 µl fluorescenčního interkalačního barviva GelRed (Biotium). Obarvený gel jsme nalili do připraveného nástavce a nechali jsme ho ztuhnout při pokojové teplotě.

Po ukončení PCR analýzy jsme ke každému vzorku přidali 5 µl nanáškového pufru (Gel Loading Dye, Orange (6x), New England Biolabs) a po promíchání jsme nanесли 25 µl vzorku na připravený agarózový gel, vložený do elektroforetické vany a zalitý TBE pufrém. Do první jamky gelu jsme napipetovali DNA Ladder (100 bp, New England Biolabs) v koncentraci 0,5 µg/jamka. Vzorky byly rozděleny v elektrickém poli při napětí 100 V. Po ukončení elektroforézy jsme vzniklý produkt detekovali pomocí přístroje Gel Logic 2200, programem Carestream. U všech vzorků, použitých pro další testování (60 buněčných linií celkem) byl výsledek testu na přítomnost mykoplazmat negativní. Na obrázku č. 17 je uveden příklad testování mykoplazmat na buněčných liniích 1B, 4B, 4A, 20B a 20A. Pozitivní kontrola i kontrola bez templátu vyšly dle očekávání.

Název vzorku	Výsledek								
Buněčná linie 1B	Negativní								
Buněčná linie 4B	Negativní								
Buněčná linie 4A	Negativní								
Buněčná linie 20B	Negativní								
Buněčná linie 20A	Negativní								
Pozitivní kontrola*	Pozitivní								
Reakce bez templátu	Negativní								

Obr. č. 17: Výsledek detekce mykoplazmové infekce buněčných kultur izolovaných z primárního kolorektálního karcinomu a metastázy do lymfatické uzliny (1B, 4B, 4A, 20B a 20A).

5.4 Zamrazování a rozmrazování buněk

Technika zamrazování buněk je v prvních fázích stejná jako při pasážování buněk, ovšem po centrifugaci (5 minut, 500 rpm) jsme nejprve slili původní medium se zbytky trypsin/EDTA a poté jsme přidali směs 10% DMSO ve fetálním bovinním séru. Cílová koncentrace je $1-2 \times 10^6$ buněk na mililitr suspenze. Takto připravenou buněčnou suspenzi jsme rozdělili do 1,5 ml zamrazovacích zkumavek a vložili do tekutého dusíku (-180°C) k uchování pro budoucí analýzy.

V případě rozmrazování buněk jsme nejprve zamrazovací zkumavku ponořili do vodní lázně předehřáté na 37°C . Po rozmrazení jsme obsah ihned přepipetovali do sterilní 15 ml zkumavky s 5 ml studeného kultivačního media. V dalším kroku jsme buňky zcentrifugovali (5 minut/500 rpm), medium se zbytky zmrazovacího media jsme slili a přepipetovali 10 ml čerstvého media. Suspenzi jsme poté přenesli do kultivační lahve. Pokud je životnost rozmrazených buněk alespoň 80%, jsou případné testy cytotoxicity, vlastnosti buněk i imunohistochemické analýzy srovnatelné s testy před zamrazením [84].

5.5 Testování životnosti buněk

Irinotekan a oxaliplatina byly naředěny na cílové koncentrace (pro IT – 200; 100; 50; 25 a $10 \mu\text{g/ml}$ a pro OPT – 500; 250; 100; 50 a $25 \mu\text{g/ml}$) kultivačním médiem. Životnosti jednotlivých buněk byly měřeny pomocí testu WST-1, což je kolorimetrická assay založená na štěpení tetrazoliové soli na nerozpustný formazan mitochondriálními

dehydrogenázami živých buněk. Tento test kvantifikuje množství proliferujících buněk měřením aktivity mitochondriálních enzymů.

Izolované buňky byly nasazeny do 96-jamkové destičky a ovlivněny irinotekanem a oxaliplatinou ve výše popsanych koncentracích po dobu 30, resp. 48 hodin. Na konci každého intervalu byly buňky opláchnuty PBS a bylo k nim přidáno 100 μ l WST-1 roztoku (konečné ředění 1:10) a buňky byly dále kultivovány po dobu dvou hodin. Absorbance byla měřena při 450 nm s referenční vlnovou délkou při 650 nm za pomoci přístroje Tecan Infinite M200.

5.6 Testování migrace buněk

Měření buněčné migrace bylo provedeno za pomoci přístroje X-CELLigence, který měří průchod buněk přes semipermeabilní membránu v reálném čase. Všechny testované substance byly naředěny kultivačním médiem bez přidaného séra. Takto připravené roztoky byly napipetovány do horní komůrky CIM-plate 16. Do spodní komůrky bylo napipetováno kultivační medium s testovanými látkami a přidaným 10% FBS a 10 ng/ml EGF. Obě dvě komůrky byly spojeny v jednu a membrána byla preinkubována po dobu jedné hodiny v CO₂ inkubátoru při 37°C. Poté jsme změřili destičku s napipetovaným kultivačním médiem (pozadí). Do horní komůrky jsme napipetovali optimální množství buněk (20 tisíc buněk na jamku) resuspendovaných v bezsérovém mediu obsahujícím testované látky. Migrační potenciál byl detekován jako buněčný index, který odpovídá přímo úměrně nárůstu počtu buněk, které prošly přes semipermeabilní membránu. Data byla poté přepočítána na procenta neovlivněné kontroly.

5.7 Imunohistochemická analýza buněk

Z bioptických parafinových bločků byly zhotoveny 4 μ m řezy, které byly naneseny na podložní sklíčka. Pro některé vzorky byly použity tyto primární protilátky: pancytokeratin (Dako, klon AE1/AE3, ředění 1:100); p53 (Ventana, klon Bp53-11, RTU); vimentin (Dako, klon V9, ředění 1:400); E-cadherin (Dako, klon NCH-38, ředění 1:50); N-cadherin (Leica, klon IAR06, ředění 1:100); β -catenin (Dako, klon β -catenin-1, ředění 1:200); Ki67 (Ventana, klon 30-9, RTU); mutovaná forma BRAF (Ventana, klon V600E/VE1, RTU).

Většina vzorků (s výjimkou řezů barvených na β -catenin) byly vloženy do automatického barvicího systému BenchMark ULTRA (Ventana) a antigeny detekovány

pomocí kitu ultraView Universal DAB (Ventana). Pro řezy barvené na Ki67 a BRAF byl použit ještě OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana).

Vzorky na průkaz β -cateninu byly vloženy do vodní lázně o teplotě 97°C při pH 6 (pufr S1700, Dako) na dobu 20 minut. Endogenní peroxidázovaná aktivita byla inhibována pomocí 3% peroxidu vodíku. Po inkubaci s primární protilátkou byl antigen detekován systémem EnVision™ FLEX (Dako). Nakonec byla jádra dobarvena pomocí hematoxylinu.

5.8 KRAS, NRAS, BRAF, PTEN, TP53 a PIK3CA – analýza mutací

Izolace DNA z formalinem fixovaných parafinových bločků byla provedena pomocí komerční soupravy DNA Sample Preparation Kit (Roche) podle instrukcí výrobce. Mutační analýza byla provedena s využitím masivně paralelního sekvenování (NGS). K přípravě sekvenační knihovny byl použit KAPA Library Preparation Hyper Plus Kit (Roche). Cílové obohacení probíhalo metodou sequence capture -SeqCap EZ Choice Library (Roche NimbleGen). Koordináty cílových regionů byly navrženy v hg19 NCBI Build 37.1/GRCh37. Sekvence byla provedena na platformě MiSeq (Illumina) dle standardního protokolu výrobce. Filtrování a analýza sekvenačních dat provedena za pomoci softwaru NextGENe (Softgenetics), s nastavením minimální frekvence alternativní alely 5 %. Klasifikace nalezených variant probíhala za pomoci veřejně dostupných databází (ClinVar, dbSNP, ExAC), in silico predikce (Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster) a dostupné literatury.

5.9 Příprava vzorků na extrakci RNA z buněčných kultur

Buněčnou suspenzi v koncentraci 100tis./ml jsme nasadili do šestijamkové destičky (2 ml/jamka). Po 24 hodinách růstu v inkubátoru (37°C, 5% CO₂) jsme buňky 24 hodin ovlivňovali irinotekanem a oxaliplatinou (použitá koncentrace – hodnota IC50 zjištěná z testu metabolické aktivity - WST-1 analýza – specifická pro každou buněčnou linii a testovanou látku). Poté jsme odstranili medium a opláchli cca 2 ml ledového PBS a poté opět vše odsáli. K buňkám v destičce jsme přidali 200 μ l Trizolu, nechali jsme 1 - 2 minuty působit a poté seškrabali sterilní škrabkou. Buněčnou suspenzi v Trizolu jsme přenesli do sterilní 1,5 ml (PCR clean) zkumavky a uložili do -80°C do dalšího zpracování.

5.10 RNA izolace z buněčných kultur pomocí kolonek

Buněčnou suspenzi v Trizolu jsme nechali temperovat na laboratorní teplotu, přidali jsme k ní 200 µl ethanolu (95-100 %) a opatrně překlápěním promíchali (10x). Takto připravenou směs jsme přenesli do kolonky (Zymo-Spin IIC Column), kterou jsme vložili do sběrné zkumavky (Collection tube). Směs jsme zcentrifugovali (13 000 rpm, 30 vteřin, 4°C) a kolonky jsme přenesli do nových sběrných zkumavek. Ke směsi do kolonek jsme přidali 400 µl promývacího pufru (RNA Wash Buffer) a zcentrifugovali (13 000 rpm, 30 vteřin, 4°C). Ve sterilní mikrozkušavce jsme připravili směs DNAsy a pufru (DNA Digestion Buffer) a promíchali (na 1 reakci = 5 µl DNAsy a 75 µl DNA Digestion Buffer). Připravenou směs DNAsy jsme napipetovali na kolonku a nechali jsme stát při pokojové teplotě 15 minut.

Poté jsme přidali 400 µl promývacího pufru (Direct Zol RNA PreWash) a zkumavky jsme zcentrifugovali (13 000 rpm, 30 vteřin, 4°C). Tento krok jsme opakovali ještě jednou. Následně jsme do kolonek přidali 700 µl promývacího pufru (RNA Wash Buffer) a opět zcentrifugovali (13 000 rpm, 2 minuty, 4°C). Dále jsme kolonky přenesli do 1,5 ml sterilních mikrozkušavek a k vymytí RNA z kolonky jsme připipetovali 30-50 µl DEPC vody, podle množství buněk. Po závěrečné centrifugaci (13 000 rpm, 30 vteřin, 4°C) jsme koncentraci RNA změřili na NanoDropu 2000 (1,2 µl vzorku) a všechny vzorky jsme naředili na jednotnou koncentraci 1 µg/20 µl (1 reakce).

Dále jsme pomocí přístroje Bioanalyzer 2100, RNA Nanochipu měřili integritu RNA, tj. zda-li má potřebnou kvalitu vhodnou pro další analýzu (podrobnější postup viz „*Měření integrity RNA*“). Takto připravené vzorky byly skladovány při -80°C.

5.11 Měření integrity RNA – stanovení RIN čísla u vzorků RNA izolovaných buněčných kultur

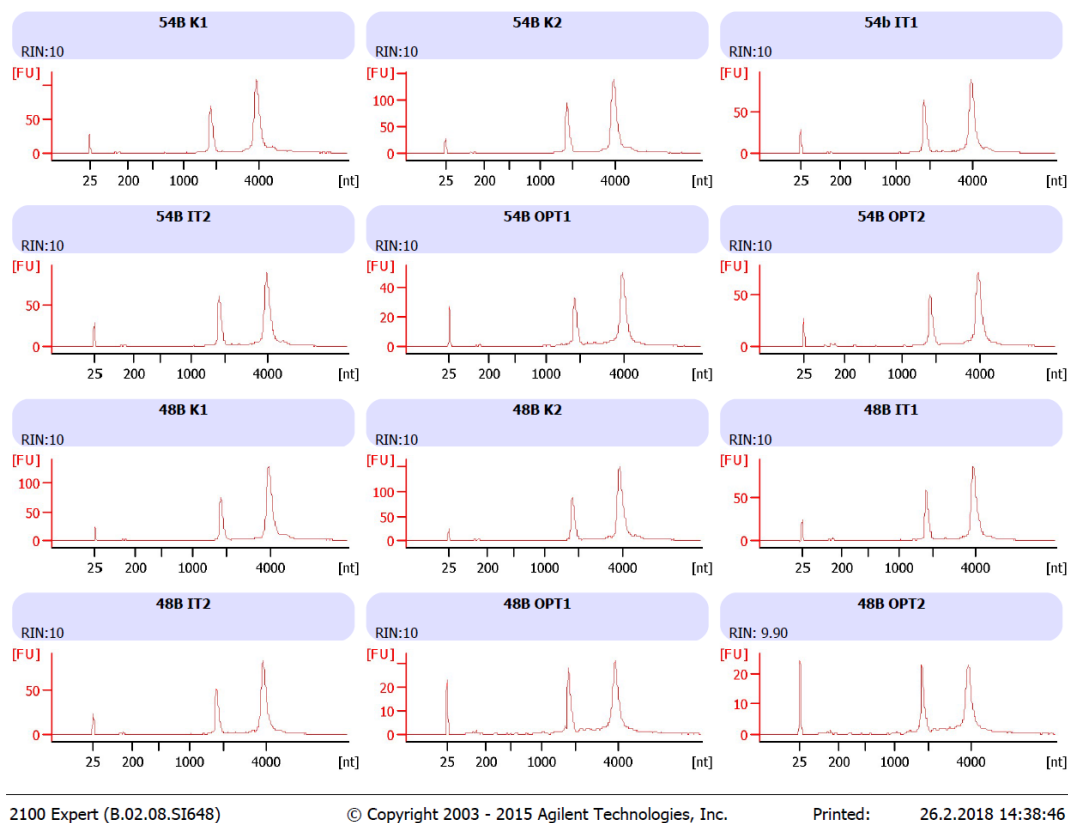
Použití neporušené RNA je důležitým předpokladem pro úspěšnou RT-PCR analýzu, proto jsme u vzorků RNA izolovaných z buněčných kultur provedli kvalitativní analýzu RNA měřením RIN čísla (RNA integrity number), jehož hodnoty dosahují 1-10 pomocí elektroforetického přístroje 2100 Bioanalyzer, který pracuje na principu kapilární elektroforézy. Pro RT-PCR analýzu jsou vhodné vzorky s RIN číslem větším než 7, avšak jako nejvhodnější se považuje použití vzorků s RIN číslem v rozmezí 9-10.

Nejprve jsme připravili gel. Na kolonku jsme nanесли 550 µl RNA gelové matrix a stočili jsme ji při pokojové teplotě (1 500 rpm, 10 min.). Prošlou matrix jsme

rozpipetovali do alikvotů po 65 μ l do 0,5 ml sterilních zkumavek a uložili do lednice. Poté jsme k 65 μ l připravené gelové matrix připipetovali 1 μ l RNA barviva, vytemperovaného na laboratorní teplotu. Gelovou směs jsme dobře promíchali a zcentrifugovali při laboratorní teplotě (13 000 rpm, 10 min.).

RNA čip jsme vložili do plnicí stanice a do označené jamky jsme napipetovali 9 μ l připravené obarvené gelové matrix. Píst plnicí stanice jsme umístili do pozice odpovídající 1 ml po dobu 30 sekund. Když byl čip naplněn gelovou matrix, pipetovali jsme do dalších dvou označených jamek 9 μ l obarvené gelové matrix (9 μ l do každé). Do všech jamek určených pro testované vzorky (celkem 12 jamek) a do jamky označené symbolem pro žebříček jsme napipetovali zelený RNA marker.

Do jamky označené symbolem pro žebříček jsme napipetovali 1 μ l směsi pro určení velikosti jednotlivých fragmentů RNA. Nakonec jsme do jamek určených pro vzorky napipetovali 1 μ l testovaného vzorku. Čip jsme poté umístili do vortexu a nechali jsme vzorky třepat po dobu 1 minuty při 2 400 rpm. Čip jsme nakonec vložili do přístroje (Agilent 2100 Bioanalyzer) a změřili jsme RNA integritu jednotlivých vzorků. Výsledky jsou shrnuty na následujícím obrázku (obr. č. 17).



2100 Expert (B.02.08.SI648)

© Copyright 2003 - 2015 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 26.2.2018 14:38:46

Obr. č. 18: Výsledky měření RIN čísla (RNA integrity number) u vybraných vzorků buněčných kultur (54B, 48B) kontrolních a ovlivněných irinotekanem, či oxaliplatinou

pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer. Nejvhodnější pro následnou RT-PCR analýzu jsou vzorky s RIN číslem v rozmezí 9 – 10. U většiny našich vzorků byla hodnota RIN čísla = 10.

5.12 Příprava cDNA a RT-PCR identifikace

Pro přípravu cDNA jsme si nejprve připravili směs A a B dle následujícího předpisu:

Směs A (pro jeden vzorek = 11 μl)		Směs B (pro jeden vzorek = 9 μl)	
Celková RNA	1 μ g	5x koncentrovaný reakční pufr	4 μ l
Random hexamer primer	1 μ l	10 mM dNTP mix	2 μ l
DEPC voda	9 μ l	RiboLock RNase inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
		M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/ μ l)	2 μ l

Směs A jsme opatrně promíchali pomocí pipety, krátce stočili v centrifuze, poté ji inkubovali v termobloku při 70°C 5 minut a nakonec ji zchladili v lednici. V dalším kroku jsme k 11 μ l směsi A přidali 9 μ l směsi B, opatrně pipetou promíchali a nakonec protřepali. Takto připravenou finální směs jsme inkubovali 5 minut při pokojové teplotě a následně pak 60 minut při 37°C (v termobloku). Reakci jsme zakončili zahřátím na 70°C po dobu 5 minut.

Pro amplifikaci připravené cDNA (směs A+B) jsme si vzorky naředili podle následujícího předpisu:

- 1:5 pro cílovou mRNA amplifikaci - smíchali jsme 80 μ l DEPC vody se vzorkem cDNA a důkladně promíchali.
- 1:20 pro housekeepingový gen *GAPDH*, pro kontrolu mRNA amplifikace - smíchali jsme 95 μ l DEPC vody s 5 μ l ředěného vzorku cDNA (vzniklé v předchozím kroku) a řádně jsme směs promíchali.

Pro PCR reakci jsme si připravili směs C dle následujícího předpisu:

Směs C (pro jeden vzorek - duplikát = 50 μl)	
SYBR Green	25 μ l
Forward primer pro cílovou mRNA (10 mM)	1 μ l
Reverse primer pro cílovou mRNA (10 mM)	1 μ l
DEPC voda	13 μ l

Do zkumavek jsme napipetovali 20 μ l směsi C v duplikátech pro každý vzorek. K nim jsme přidali 5 μ l naředěné cDNA (každý vzorek v duplikátech) a promíchali.

Takto připravené vzorky jsme vložili do Corbet Rotor Gene RT-PCR cykleru a zvolili jsme příslušný program.

5.13 Reverzní transkripce miRNA

5 μ l připravené RNA, naředěné na koncentraci 0,5 μ g, jsme smíchali s 2 μ l multiplex primeru (směs RT primerů v koncentraci 5 μ M pro stanovované miRNA). Vzniklou směs jsme nechali zahřát na 65°C po dobu 5 minut a poté jsme vzorek zchladili v lednici. Ke vzorku jsme přidali 13 μ l Master mixu (dle předpisu v tabulce níže) a zahřívali jej nejprve 30 minut na 16°C, poté 30 minut na 42°C a nakonec jsme zakončili reakci teplotou 95°C po dobu 5 minut. Po inkubaci jsme směs zchladili v lednici.

Master mix (pro 1 reakci = 13 μl)	
4 μ l Deoxyneukleotidtrifosfát	0,5 μ l inhibitor RNáz
4 μ l reakční pufr	0,5 μ l reverzní transkriptáza pro miRNA
2 μ l DTT	2 μ l DEPC voda

Takto připravenou cDNA jsme naředili pomocí 42,5 μ l DEPC vody na celkový objem 62,5 μ l - pro stanovení 5 mikroRNA). Naředěnou cDNA (5 μ l) jsme smíchali s připraveným Master mixem (20 μ l - viz tabulka níže) v duplikátech a poté byl již postup stejný jako při klasické PCR.

Master mix (pro 1 reakci = 15 μl)
2 μ l primer F (miR-200, miR-9, miR-21, miR-145, miR-29a)
3 μ l SYBR GREEN
8 μ l DEPC vody
2 μ l primer miR-U

5.14 Příprava vzorku na Western blot - buněčný lyzát

Buněčnou suspenzi v koncentraci 100tis./ml jsme nasadili do šestijamkové jamkové destičky (2 ml/jamka) a nechali jsme 24 hodin inkubovat (37°C, 5% CO₂). Poté jsme na buňky nechali 48 hodin působit irinotekan, oxaliplatinu a 5FU (použitá koncentrace – hodnota IC₅₀ zjištěná z testu WST-1-1 – různá pro každou buněčnou linii a testovanou látku). Po 48 hodinách expozice jsme odstranili medium, opláchli cca 2 ml ledového PBS a vše odsáli do sucha. Následně jsme přidali 50-100 μ l ledového

lyzačního pufru s inhibitory proteáz (záleží na konfluenci buněk = čím více buněk, tím více lyzačního pufru) a nechali jsme působit asi 2 minuty. Homogenát jsme poté seškrabali a opatrně jsme buňky přenesli do 1,5 ml mikrozkušavek postavených do ledu. Škrabku jsme mezi jednotlivými skupinami oplachovali v PBS a sušili papírovou utěrkou, aby nedošlo ke kontaminaci jinými vzorky.

<u>Lyzační pufr</u>		
<i><u>Složka (konečná koncentrace)</u></i>	<i><u>Koncentrace zásobního roztoku</u></i>	<i><u>Pipetované a vážené množství</u></i>
50 mM Tris/HCl pH 7,4	1 M	50 ml
150 mM NaCl	Prášek	8,766 g
10% glycerol	85 %	117,65 ml
1% Triton X-100	100 %	10 ml
2 mM EDTA	Prášek	0,58 g
2 mM EGTA	Prášek	0,76 g
40 mM β -glycerolfosfát	Prášek	8,52 g
50 mM fluorid sodný	Prášek	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	Prášek	4,46 g
2 mM dithiotreitol	Prášek	0,3085 g
200 μ l vanadičitan sodný	Prášek	0,03678 g
Redestilovaná voda		objem doplněn na 1 litr

Pozn.: Před použitím lyzačního pufru jsme přidali směs inhibitorů proteáz (ke 13 ml lyzačního pufru 130 μ l směsi inhibitorů).

<u>4xSDS vzorkový pufr</u>		
<i><u>Složka (konečná koncentrace)</u></i>	<i><u>Koncentrace zásobního roztoku</u></i>	<i><u>Pipetované a vážené množství</u></i>
200 mM Tris/HCl pH 6,8	1M	4 ml
40% glycerol	85 %	9,41 ml
6% SDS	Prášek	1,2 g
0,2 M DTT	Prášek	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	Prášek	Špetka
Redestilovaná voda		20 ml

Buňky v mikrozkušavkách jsme nejprve homogenizovali pomocí injekční stříkačky s jehlou (10x). Homogenát jsme nechali stát na ledu asi 20 minut, poté jsme vzorky zcentrifugovali (10 minut, 13 000 rpm, 4°C). Po centrifugaci jsme odebrali

supernatant a po stanovení koncentrace bílkoviny (viz *BCA stanovení bílkoviny*) jsme vypočítali naředění jednotlivých vzorků lyzačním pufrem a 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem (SDS) na jednotnou koncentraci 1,5 µg/µl. Tyto vzorky byly později nanášeny na gel připravený podle následujících předpisů.

Příprava gelu spočívala ve smíchání připravených roztoků uvedených v tabulce. Pro iniciaci polymerace jsme přidali roztoky APS a TEMEDu. Takto připravený spodní, neboli separační gel, byl nalit mezi skla a po dobu jeho tuhnutí (45 minut) byl převrstven isobutanolem.

<u>Separační gel (spodní)</u>	7,5% - 2 gely; 1,5 mm	10% - 2 gely; 1,5 mm
Redestilovaná voda	9,8 ml	8,1 ml
pufř 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml
roztok AA + bis AA	5,0 ml	6,7 ml
10% SDS	0,2 ml	0,2 ml
----- iniciace polymerace -----		
roztok 10% APS	200 µl	200 µl
TEMED	16 µl	16 µl

Po 45 minutách jsme připravili horní, neboli zaostřovací gel, kterým jsme převrstvili gel separační, vložili jsme hřebínek pro vytvoření jamek k nanášení vzorku a nechali jsme jej opět tuhnout po dobu cca 30 minut.

<u>Zaostřovací gel 4% (horní)</u>	<u>2 gely, 1,5 ml</u>
redestilovaná voda	6,1 ml
pufř 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
roztok AA + bis AA	1,3 ml
10% SDS	0,1 ml
----- iniciace polymerace -----	
roztok APS	200 µl
TEMED	16 µl

5.15 BCA stanovení bílkoviny

Pro stanovení koncentrace bílkoviny jsme použili metodu BCA (Bicinchoninic Acid Assay). Princip metody je založen na reakci proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď v ní přechází z Cu^{2+} na Cu^{1+} , čímž dochází k redukci BCA

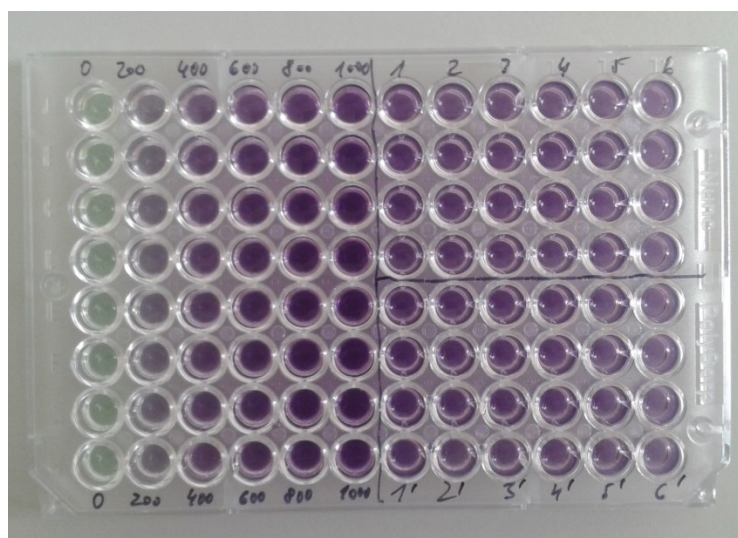
(bicinchoninic acid) za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny.

Nejprve jsme si připravili kalibrační křivku podle následující tabulky:

	Koncentrace	Roztok 1% BSA	Destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µl	500 µl
2	200 µg/ml	10 µl	490 µl
3	400 µg/ml	20 µl	480 µl
4	600 µg/ml	30 µl	470 µl
5	800 µg/ml	40 µl	460 µl
6	1000 µg/ml	50 µl	450 µl

Připravené vzorky jsme ředili 5x v poměru 40 µl destilované vody a 10 µl vzorku. 10 µl naředěného roztoku BSA podle kalibrační křivky a 10 µl naředěného vzorku jsme napipetovali do 96-jamkové destičky a k nim jsme přidali 200 µl pracovního roztoku C, který jsme připravili smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1. Nakonec jsme směs dobře promíchali a nechali inkubovat v termomixeru při 37°C, 30 minut, 300 rpm. Nakonec jsme změřili absorbanci při 562 nm proti destilované vodě.

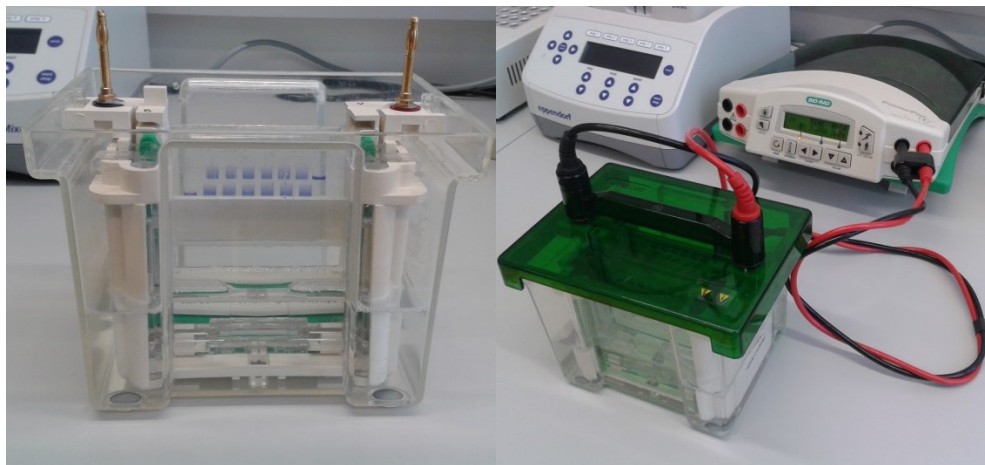
Roztok A obsahoval NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH, roztok B obsahoval 4 % CuSO₄ x 6H₂O.



Obr. č. 19: Mikrotitrační destička s kalibrační křivkou a testovanými vzorky pro stanovení množství proteinů metodou BCA.

5.16 Elektroforéza

Nejprve jsme naředěné vzorky nechali 5 minut denaturovat v termomixeru předehřátém na 95°C. Gely jsme vyndali ze stojánků a opláchli je pod tekoucí vodou. Takto připravené gely jsme vložili do stojánku a ten poté do elektroforetické vany. Do vnitřního elektrodového prostoru jsme nalili elektrodový pufr až po okraj, do vnějšího elektrodového prostoru jsme nalili elektrodový pufr do takové výšky, aby byla elektroda ponořena pod hladinou elektrodového pufru. Do každé jamky v gelu jsme nanášeli 20 μ l vzorku (30 μ g/jamku). Do jedné jamky jsme napipetovali molekulární standard (5 μ l). Do volných krajních jamek jsme nanесли 1x koncentrovaný SDS pufr. Elektroforetickou vanu jsme přiklopili víkem a připojili jsme ji ke zdroji, u kterého jsme nastavili konstantní napětí 120 V a spustili tak elektroforézu. Po doběhnutí vzorků ke spodnímu okraji gelu jsme gel na několik minut přemístili do blotovacího pufru a pokračovali metodou „*immunobloting*“.



Obr. č. 20: Sada na vertikální SDS-PAGE elektroforézu, elektroforetická vana (vlevo), zdroj (vpravo).

5.17 Imunobloting (po elektroforéze)

Blotovací pufr jsme vytvořili z chemikálií a roztoků uvedených v tabulce níže smícháním pomocí magnetické míchačky.

Pro stanovení proteinů v našich experimentech jsme použili polyvinylidínfluoridovou (PVDF) membránu. PVDF membránu jsme nejprve aktivovali ponořením do methanolu na dobu 5 minut, poté jsme ji vložili do blotovacího pufru k připravenému gelu. Dále jsme si připravili silný filtrační papír (2 ks pro jeden gel;

BioRad) a blotovací houbičky, které jsme také ponořili na cca 20 minut do blotovacího pufru.

Na zhotovení blotovacího pufru byly použity tyto chemikálie.

<u>Blotovací pufr</u>	
TRIS (25 mM)	6,06 g
Glycin (192 mM)	28,80 g
Methanol	400 ml
Redestilovaná voda	doplnit vodou do 2 000 ml

Do tzv. blotovacího sendviče jsme skládali jednotlivé součásti, a to v pořadí blotovací houbička, filtrační papír, gel z elektroforézy, PVDF membrána, druhý filtrační papír a navrch blotovací houbička. Při přípravě jsme věnovali pozornost tomu, aby se nám mezi jednotlivými vrstvami nevytvořily bubliny. Takto připravený blotovací sendvič jsme vložili do blotovacího nástavce a ten jsme poté umístili do blotovací vany s ledem. Blotovací vanu jsme zaklopili víkem a připojili ke zdroji, u kterého jsme nastavili konstantní napětí 100 V, dále pak 0,25 A a čas 1,5 hodiny, podle velikosti stanovovaných markerů a tloušťky gelu. Po přeblotování proteinů na membránu jsme membránu vyjmuli, opatrně opláchli destilovanou vodou a pokračovali podle postupu uvedeného v části „*Detekce proteinů*“.



Obr. č. 21: Blotovací sendvič sestavený z blotovací houbičky, filtračního papíru, gelu a PVDF membrány (nahore); blotovací sendvič vložený do blotovacího nástavce a blotovací vany s ledem (dole).

5.18 Detekce proteinů

PVDF membránu jsme přenesli do plastové misky s víčkem a na membránu nalili cca 15 ml 5% roztoku mléka v TBST pufru, krabičky jsme umístili na kývačku a nechali jsme inkubovat 1-2 hodiny. Během inkubace s mlékem jsme si naředili primární protilátku do TBST pufru s BSA, nebo mléka, podle instrukcí výrobce. Poté jsme mléko odstranili a opláchli. Následně jsme PVDF membránu inkubovali přes noc s připravenou primární protilátkou.

Druhý den jsme primární protilátku slili a následně membránu opláchli TBST pufrem (6x5 minut), aby došlo k odmytí nenavázané primární protilátky. Opět jsme si připravili sekundární protilátku ředěnou TBST pufrem s BSA, podle instrukcí výrobce. Poté jsme membránu inkubovali se sekundární protilátkou (1-2 hodiny) a znovu jsme membránu promývali TBST pufrem (6x5 minut), abychom se zbavili nenavázané sekundární protilátky.

<u>TBST pufr složení</u>	<u>10xTBS složení</u>
450 ml destilované vody	24,2 g Tris Base a 80 g NaCl rozpustit v 700 ml destil. vody
50 ml 10x TBS	Přidat 30 ml 4M HCl a doupravit pH na 7,6
250 µl Tween 20	Doplnit v odměrné baňce na 1000 ml

5.18.1 Chemiluminiscenční detekce proteinů

Pro detekci proteinů jsme použili Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent při použití sekundárních protilátek s navázanou křenovou peroxidázou. Během promývání TBST pufrem jsme smíchali roztok A (luminol solution) s roztokem B (peroxide solution) v poměru 1:1. Roztoky byly vytemperované na laboratorní teplotu.

Opláchnutou membránu jsme opatrně osušili a na její povrch napipetovali substrát (roztok A+B) tak, aby byla membrána celá pokrytá (cca 1,5 ml/1 membrána) a nechali jsme ji 5 minut inkubovat.

Poté jsme membránu vyndali ze substrátu, opatrně ji osušili a přenesli do přístroje Gel Logic, ve kterém probíhala detekce jednotlivých proteinů pomocí programu Carestream. Doba expozice se odvíjela podle typu protilátky. Jako kontrolní protein byl zvolen β -actin, pomocí kterého jsme prováděli relativní kvantifikaci jednotlivých proteinů.

5.19 **Statistická analýza**

Data ze všech měření byla vyjádřena jako hodnota \pm SD z průměru z alespoň dvou nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena pomocí two way ANOVA analýzy, Sidak test významnosti, kde $p < 0,05$. Analýza dat byla provedena programem GraphPad Prism 6.0. Koncentrace vybraných inhibitorů způsobující 50% pokles životnosti buněk (IC50) byla stanovena metodou nelineární regrese programem GraphPad Prism 6.0.

6 Výsledky

6.1 **Histologická charakterizace kolorektálního karcinomu a její vztah k úspěšnosti izolace buněčných kultur z primárního tumoru a lymfogenní metastázy**

Celkově byly získány resekáty od šedesáti pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva. Naším záměrem bylo odebrat z každého resekátu jeden vzorek z primárního tumoru a jeden vzorek z lymfatické uzliny. Z primárních tumorů bylo získáno 58 vzorků; ve dvou zbývajících případech byl tumor malého rozměru a případný odběr by mohl zkomplikovat hodnocení hloubky invaze tumoru a tím ohrozit či znemožnit histologický staging. 36 vzorků bylo získáno z regionálních lymfatických uzlin. Z primárních nádorů bylo získáno 26 primokultur s úspěšností 45 % (26/58); z odebraných lymfatických uzlin bylo získáno 17 primokultur s úspěšností 47 % (17/36). Téměř polovina (konkrétně 17) odebraných lymfatických uzlin však nebyla histologicky metastaticky postižena. Reálná úspěšnost izolace buněčných kultur z metastaticky postižených lymfatických uzlin byla vyšší; 74 % (14/19). U tří primokultur získaných z lymfatické uzliny byly histologicky zjištěny izolované nádorové buňky (ITC), což jsou ojedinělé nádorové buňky, popř. drobné shluky nádorových buněk, do velikosti 0,2 mm v největším rozměru v jednom histologickém řezu. Staging tumoru při nepřítomnosti metastázy v jiné lymfatické uzlině, byl stanoven jako pN0(i+). Izolace buněčných kultur z primárního tumoru a zároveň i z lymfogenní metastázy se podařila v deseti případech.

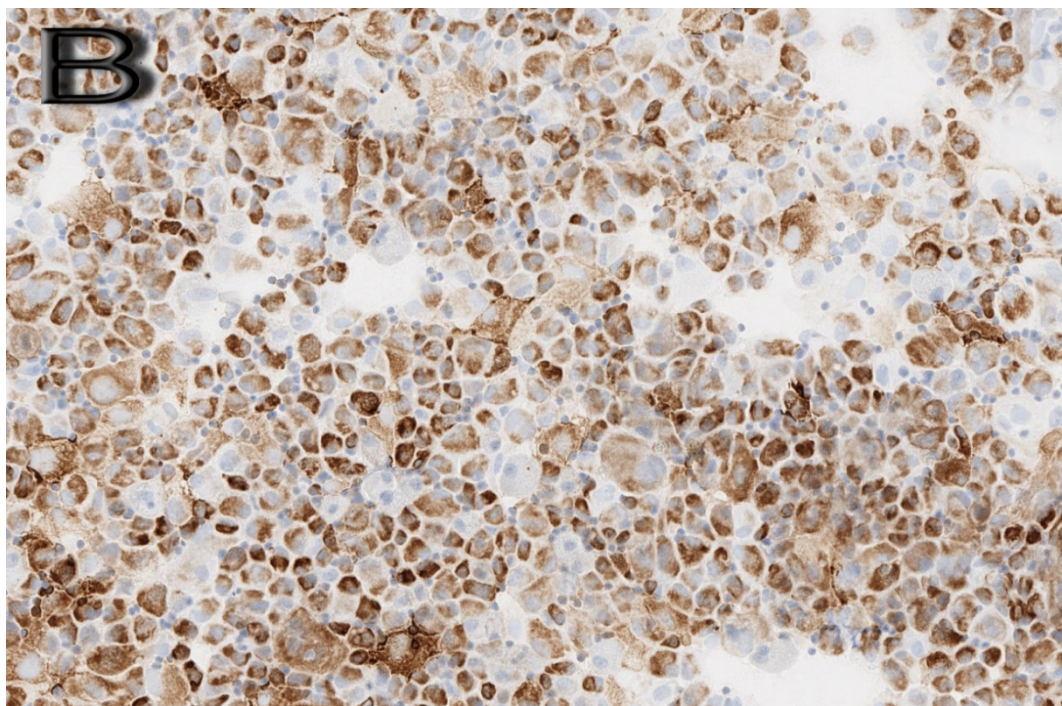
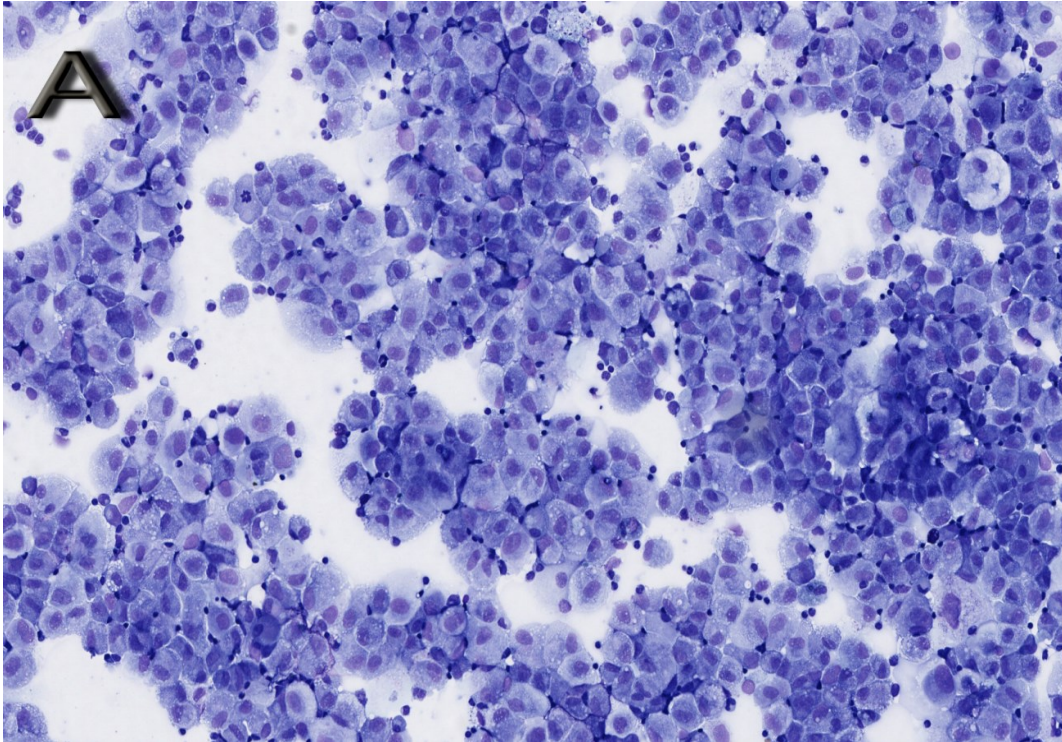
Výsledky úspěšnosti izolace v kombinaci s různými klinickopatologickými parametry jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 7. Nejefektivnější izolace nádorových buněk z primárního tumoru byla pozorována u níže diferencovaných tumorů (Grade 3) a u lokálně pokročilých tumorů (T3 a T4a,b). Tumory s histologicky zjištěným perineurálním šířením byly spojeny s vyšší úspěšností izolace buněčných kultur z primárního tumoru i z lymfogenních metastáz. Tumory s histologicky prokázanou lymfangioinvasí byly spojeny s vyšší úspěšností izolace primokultur z metastaticky postižené lymfatické uzliny. Nejúspěšnější izolace nádorových buněk z lymfogenních metastáz byla zaznamenána u vzorků s vyšší lokální pokročilostí tumoru (T3 a T4a,b) a u nádorů s postižením většího počtu lymfatických uzlin. Karcinomy s mucinózní komponentou se dařilo kultivovat obtížněji, pravděpodobně v důsledku snížené

schopnosti adheze buněk k povrchu lahve a nižšího počtu odebraných nádorových buněk.

Tab. č. 7: Úspěšnost izolace buněčných linií z primárního tumoru a z regionální lymfatické uzliny v závislosti na histologických parametrech kolorektálního karcinomu.

	Celkový počet (n=60)	% úspěšnost izolace z primárního tumoru (n=58)	% úspěšnost izolace z lymfatické uzliny (n=36)
Stage tumoru			
T1	1/60 (2 %)	0/0 (0 %)	1/1 (100 %)
T2	10/60 (17 %)	2/9 (22 %)	1/4 (25 %)
T3	38/60 (63 %)	17/38 (45 %)	10/24 (42 %)
T4a, b	11/60 (18 %)	7/11 (64 %)	5/7 (71 %)
Stage lymfatických uzlin			
N0 + N0(i+)	32/60 (53 %)	14/31 (45 %)	3/17 (18 %)
N1a, b, c	18/60 (30 %)	8/17 (47 %)	8/11 (73 %)
N2a, b	10/60 (17 %)	4/10 (40 %)	6/8 (75 %)
Lokalizace tumoru			
Pravý tračník	26/60 (43 %)	11/24 (46 %)	9/18 (50 %)
Levý tračník	34/60 (57 %)	15/34 (44 %)	8/18 (44 %)
Grade tumoru			
G1	8/60 (13 %)	2/7 (29 %)	1/3 (33 %)
G2	40/60 (67 %)	16/39 (41 %)	10/24 (42 %)
G3	12/60 (20 %)	8/12 (67 %)	6/9 (67 %)
Angioinvaze			
Prokázána	25/60 (42 %)	10/25 (40 %)	9/13 (69 %)
Neprokázána	35/60 (58 %)	16/33 (48 %)	8/23 (35 %)
Perineurální šíření			
Prokázáno	13/60 (22 %)	7/13 (54 %)	6/8 (75 %)
Neprokázáno	47/60 (78 %)	19/45 (42 %)	11/28 (39 %)
Mucinózní komponenta			
Přítomna	16/60 (27 %)	5/16 (31 %)	3/10 (30 %)
Nepřítomna	44/60 (73 %)	21/42 (50 %)	14/26 (54 %)

Morfologie buněk primokultur byla hodnocena v cytospinových preparátech. Epiteliální diferenciaci byla prokázána pomocí imunohistochemického průkazu koktejlu cytokeratinů AE1/AE3. Cytologické znaky malignity zahrnovaly anizocytózu, anizokaryózu, posun nukleocytoplasmatického poměru ve prospěch jádra, prominující jádérka a mitotickou aktivitu (obr. č. 21).



Obr. č. 22: Cytospinový preparát primokultury odvozené z lymfogenní metastázy (May-Grünwald-Giemsa, 200x, cytospin) (A). Imunocytochemický průkaz pancytokeratinu AE1/AE3 ukazuje cytoplazmatickou pozitivitu ve většině kultivovaných buněk. Ostatní elementy jsou fibroblasty, endotelie a lymfoidní elementy (200x, cytospin) (B).

6.2 Vztah mutací v genomu buněk kolorektálního karcinomu na úspěšnost izolace buněčných kultur

Součástí rutinní diagnostiky u pokročilých karcinomů kolorekta (pN1-3 a pM1) je testování mutace genů *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* pro případné rozhodování o optimální biologické léčbě. V naší kohortě pacientů s kolorektálním karcinomem byly nejprve stanoveny tyto mutace u 15 vzorků z primárního tumoru a na základě slibných výsledků byly stanoveny i u dalších 36 vzorků společně s dalšími geny (*PTEN*, *TP53*, *PIK3CA*), které hrají nepochybně významnou roli v patogenezi kolorektálního karcinomu. Ve všech případech byla DNA izolována z tkáňových parafinových bločků. U našich pacientů byla nejčastěji zjištěna mutace protoonkogenu *KRAS* v 51 % (26/51) vzorků a tumorsupresorového genu *TP53* u 61 % (22/36) případů (tab. č. 8).

Tab. č. 8: Stanovení genetických mutací *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *TP53* a *PIK3CA* na molekulární úrovni u pacientů s kolorektálním karcinomem.

	(n=51)
KRAS mutace	26 (51 %)
KRAS wild type	25 (49 %)
NRAS mutace	2 (4 %)
NRAS wild type	49 (96 %)
BRAF mutace	6 (12 %)
BRAF wild type	45(88 %)
PTEN mutace	5 (10 %)
PTEN wild type	46 (90 %)
	(n=36)
TP53 mutace	22 (61 %)
TP53 wild type	14 (39 %)
PIK3CA mutace	11 (31 %)
PIK3CA wild type	25 (69 %)

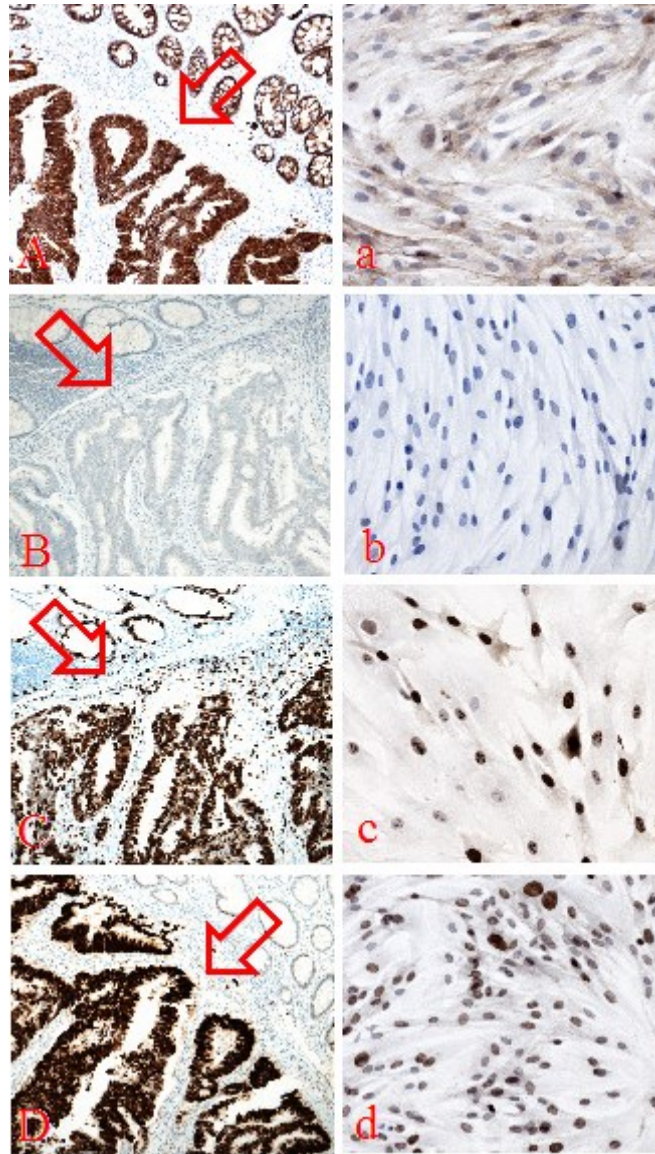
Výsledky získané z analýzy mutací (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *TP53* a *PIK3CA*) byly dále použity pro hodnocení úspěšnosti izolace primokultur z primárního tumoru a z regionální lymfatické uzliny (tab. č. 9). Vyšší úspěšnost izolací z primárního karcinomu byla zaznamenána u vzorků s *BRAF* a *PIK3CA* mutací, zatímco u linií z regionálních lymfatických uzlin byla zjištěna vyšší úspěšnost u vzorků s *KRAS* a *PTEN* mutací. Nicméně jde o velmi malá čísla, ze kterých není možné vyvozovat významnější závěry.

Tab. č. 9: Vliv mutace KRAS, NRAS, BRAF, PTEN, TP53 a PIK3CA na úspěšnost izolace primokultur z primárního tumoru a lymfogenní metastázy.

Genetická mutace	Počet případů s mutací	% úspěšnosti izolace primárního tumoru	% úspěšnosti izolace lymfatické uzliny
KRAS mutace	26	10/25 (40 %)	10/17 (59 %)
NRAS mutace	2	0/1 (0 %)	1/2 (50 %)
BRAF mutace	6	3/6 (50 %)	1/2 (50 %)
PTEN mutace	5	2/5 (40 %)	2/3 (75 %)
PT53 mutace	22	9/22 (41 %)	5/10 (50 %)
PIK3CA mutace	11	5/11 (45 %)	3/6 (50 %)

6.3 Imunohistochemická/imunocytochemická analýza

Imunohistochemické stanovení proteinové exprese bylo provedeno pomocí protilátek proti β -catenin, V600E mutované formě BRAF, p53 a Ki67. Analýza byla provedena z parafinových bločků fixovaných formalínem a odpovídající linie izolované z této tkáně (kultura č. 20B). Výsledky ukazují shodnou expresi mezi tumorem a jeho primární buněčnou linií: exprese Ki67 a p53 byla zvýšena v nádorových buňkách v porovnání s nenádorovou tkání (obr. č. 23 – C, D). V testovaném vzorku (kultura č. 20B) nebyla zjištěna mutace BRAF V600E. U β -catenin byla zachována normální membránová distribuce.



Obr. č. 23: Imunohistochemická analýza – histologické řezy rozhraní mezi normální střevní sliznicí a kolorektálním karcinomem (označeno šipkou) - levá strana (A,B,C,D). Imunocytochemická analýza (kultura č. 20B) – buňky primokultury izolované z kolorektálního karcinomu: pravá strana (a,b,c,d.). Imunohistochemické (popř. imunocytochemické) barvení: A,a – β -catenin (patrná membránová exprese); B,b – BRAF V600E (negativní exprese); C,c – Ki67 (zvýšená exprese v tumoru); D,d – p53 (zvýšená jaderná exprese v nádoru).

V neposlední řadě byla sledována průměrná doba mezi jednotlivými pasážemi. Průměrný čas od zpracování tkáně primárního tumoru po první pasáž buněčné kultury byl 18,5 dne (kultivační láhev o objemu 25 cm²), mezi první a druhou pasáží byla tato doba 6,5 dne (dvě kultivační lahve o objemu 25 cm²) a mezi druhou a třetí 6 dnů (dvě

kultivační lahve o objemu 75 cm²). U primokultur odvozených z metastaticky postižených lymfatických uzlin byl průměrný čas obdobný; od zpracování tkáně do první pasáže 19 dnů (kultivační láhev o objemu 25 cm²), mezi první a druhou pasáží 5,5 dne (dvě kultivační lahve o objemu 25 cm²) a mezi druhou a třetí pasáží taktéž 5,5 dne (dvě kultivační lahve o objemu 75 cm²).

6.4 Charakterizace tkáňových vzorků, od kterých byla získána buněčná linie z primárního tumoru i metastázy

Tab. č. 10: Základní histologická charakteristika vzorků určených pro izolaci buněčných kultur.

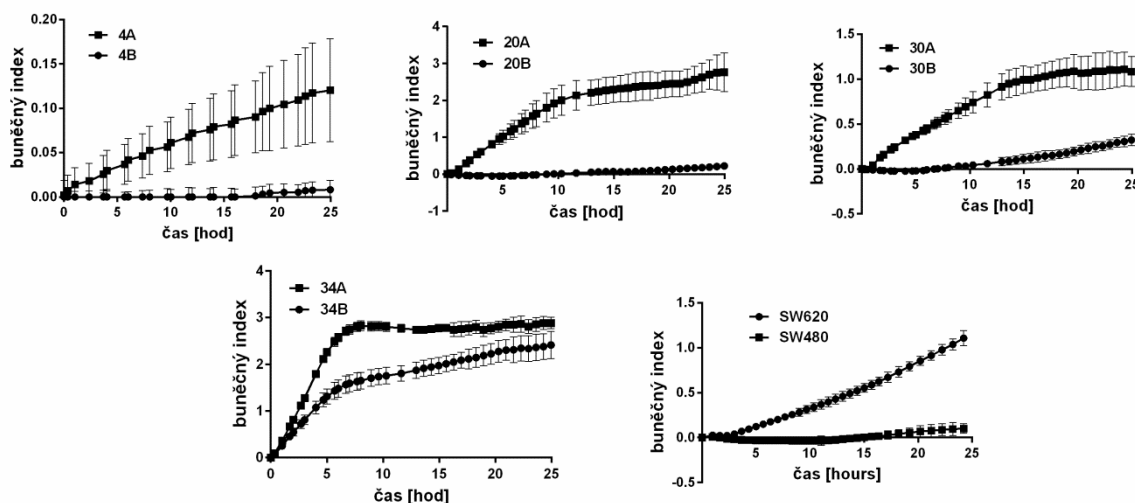
Číslo kultury	Stage tumoru	Stage uzlin	Grade tumoru	Angioinvaze	Perineurální šíření	Mucinózní komponenta	Lokalizace tumoru
4	T4b	T2b	G3	+	+	0	sigmoideum
20	T3	T1b	G2	-	-	0	cékum
30	T4a	T1a	G2	+	+	0	transversum
34	T3	T1a	G2	-	-	0	sigmoideum

Na základě patologických dat (staging tumoru, staging uzlin, grading tumoru, angioinvaze, perineurální šíření, mucinózní komponenta a lokalizace tumoru) byly vybrány pro prvotní experimenty čtyři vzorky, u nichž jsme získali jak buněčnou linii z primárního nádoru, tak z uzlinové metastázy. Vzorky se navíc lišily rozdílným stagingem uzlin (N1a, N1b, N2b) a gradingem tumoru (G2, G3), rozdílnou angioinvazí, perineurálním šířením a lokalizací tumoru.

6.4.1 Charakteristika primokultur z hlediska schopnosti migrace

Pro testování schopnosti migrace izolovaných primokultur byla použita metoda průchodu přes semipermeabilní membránu za pomoci přístroje xCELLigence. Schopnost migrace byla stanovena u 35 buněčných linií z celkových 43 úspěšně vyizolovaných. Pro ukázkou jsme zvolili čtyři linie získané z primárního tumoru (4B, 20B, 30B, 34B) a linie získané z metastáz do jejich lymfatických uzlin (4A, 20A, 30A, 34A) (obr. č. 24). Buňky získané z metastázy do lymfatických uzlin měly vyšší migrační potenciál, než buňky získané z primárního tumoru a to ve všech čtyřech případech. Pro porovnání našich kultur s immortalizovaným modelem byly použity buněčné linie korespondující s našimi kulturami a to linie SW480 a SW620.

Imortalizovaná buněčná linie SW480 je modelem kolorektálního karcinomu a buněčná linie SW620 je linie odebraná z metastázy do lymfatické uzliny od stejného pacienta. Získaná data ukázala, že buňky z lymfatické uzliny, SW620, migrovaly agresivněji než buňky SW480.



Obr. č. 24: Porovnání schopnosti migrace u čtyř různých linií izolovaných z primárního tumoru (4B, 20B, 30B, 34B) a linií z odpovídajících metastáz do lymfatických uzlin (4A, 20A, 30A, 34A). Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 a SW620, tedy model buněk kolorektálního karcinomu a buněk z metastáz do lymfatické uzliny odebrané od stejného pacienta. Data jsou vyjádřena jako průměr buněčného indexu \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. Buněčný index odpovídá nárůstu počtu buněk prošlých přes semipermeabilní membránu.

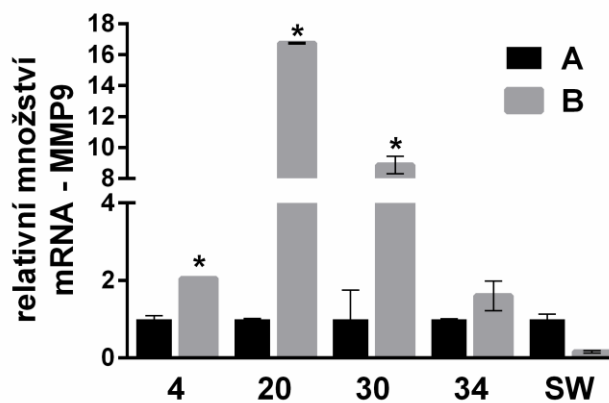
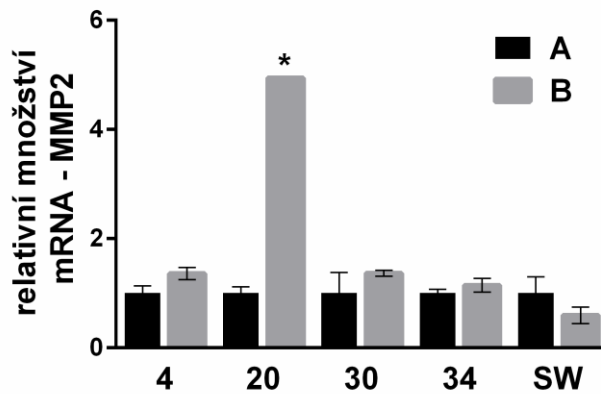
6.4.2 Porovnání markerů zapojených do adheze a migrace

Do metastatických procesů je zapojeno mnoho molekul podílejících se na adhezi, migraci nebo invazivitě. V našich experimentech jsme se zaměřili na několik markerů, a to jak na úrovni mRNA, tak i proteinu (obr. č. 26 a tab. č. 11). Bylo vybráno několik molekul, u kterých bylo stanoveno relativní množství mRNA a proteinů. Jednalo se o epiteliální adhezní molekulu (EpCAM), intercelulární adhezní molekulu (ICAM1), N-cadherin, E-cadherin a β -catenin. Matrixové metaloproteinázy MMP2 a MMP9, zapojené do degradace ECM, byly stanoveny na úrovni mRNA (obr. č. 25). Porovnání exprese bylo provedeno ve všech čtyřech izolovaných liniích z primárního tumoru a čtyřech liniích izolovaných z jejich metastatických lymfatických

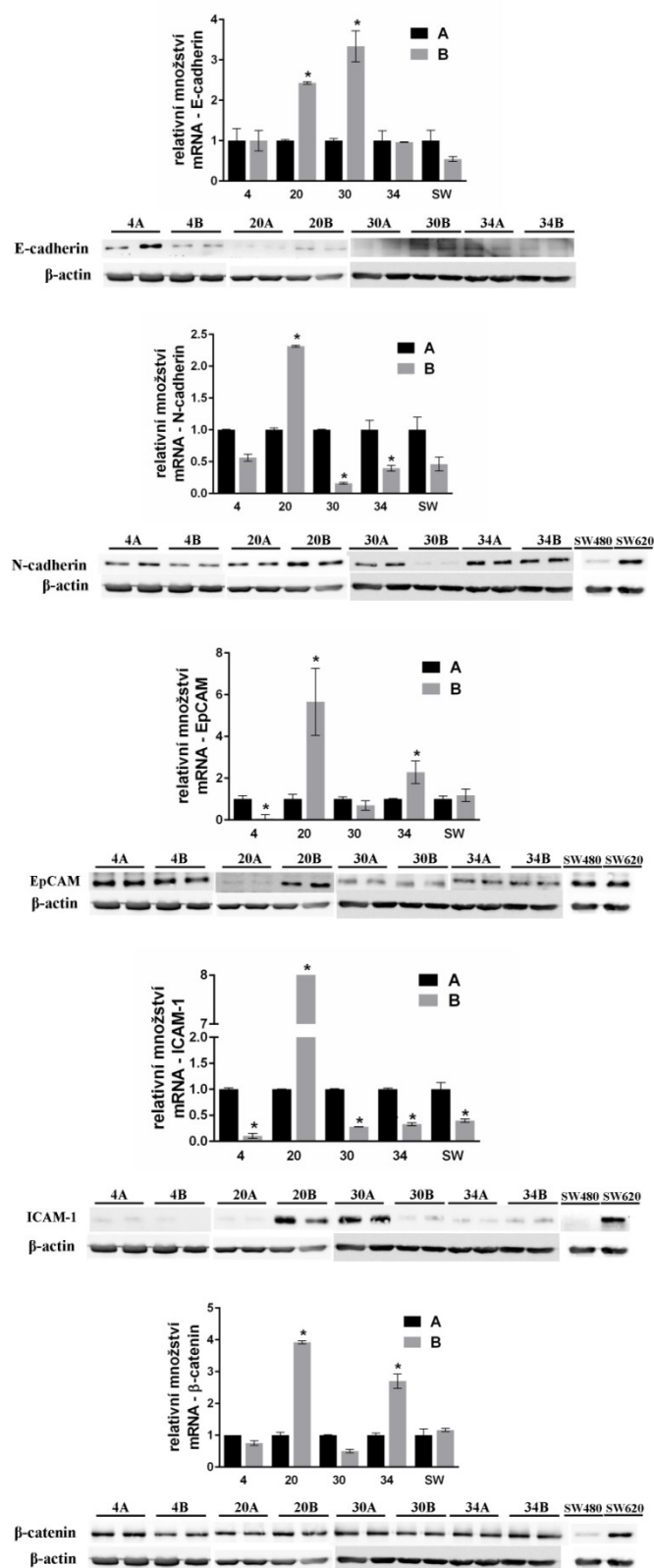
uzlin (vzorky č. 4, 20, 30, 34). Pro porovnání byly opět použity imortalizované linie SW480 a SW620.

V souvislosti se schopností migrace buněk byly nejprve stanoveny hladiny mRNA matrixových metaloproteináz (MMP). Vyšší hladiny MMP byly zjištěny u buněk izolovaných z primárního kolorektálního karcinomu, na rozdíl od imortalizovaných buněčných linií SW480 a SW620, ve kterých byl efekt opačný (obr. č. 25). Významně vyšší hladiny molekuly EpCAM na úrovni mRNA a proteinu byly nalezeny v metastatických buňkách v jednom případě, a to u pacienta č. 4. V ostatních vzorcích bylo stanoveno podobné množství proteinů v buňkách primárního tumoru i v buňkách získaných z metastáz. Co se týče hladiny mRNA, molekula ICAM1 a N-cadherin a stejně tak hladina proteinů byla zvýšena u buněk metastatických. Další důležitá molekula zapojená do metastatického procesu, E-cadherin, byla zvýšena na úrovni mRNA i proteinu u pacienta č. 20 a č. 30. Na druhou stranu, hladina β -cateninů byla zvýšena ve dvou případech (pacient č. 20 a č. 34) na úrovni mRNA, zatímco hladina proteinů se neměnila v žádném z testovaných vzorků. Výsledky jsou shrnuty na obrázku č. 26, jednotlivé hodnoty relativního množství jsou uvedeny v tabulce č. 11.

U imortalizovaných linií SW480 a SW620 byly získány podobné výsledky jako u primokultur. Hladina mRNA a proteinů molekul ICAM1 a N-cadherin byla významně vyšší u linie SW620, zatímco molekuly EpCAM a β -catenin vykazovaly stejné hodnoty v obou testovaných liniích. Proteinová hladina E-cadherinu nebyla pomocí western blotu detekována v žádné z těchto dvou linií.



Obr. č. 25: Expze MMP2 a MMP9 na úrovni mRNA v buňkách primárního kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B, 34B) a buňkách jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A) byla stanovena pomocí RT PCR. Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = buňky primárního kolorektálního karcinomu vs. buňky z jejich metastázy do lymfatické uzliny.



Obr. č. 26: Porovnání exprese molekul zapojených do buněčné adheze a progresu (N-cadherin, E-cadherin, EpCAM, ICAM-1 a β -catenin) na úrovni mRNA a proteinu u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastáz do lymfatické uzliny

u čtyř pacientů. Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Expres molekuly na úrovni mRNA byla stanovena pomocí RT-PCR a na úrovni proteinů western blot analýzou. Měření bylo provedeno v duplikátech a dvou nezávislých experimentech. * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny.

Tab. č. 11: Relativní množství mRNA vybraných molekul zapojených do buněčných adhezí a progresu (MMP2, MMP9, EpCAM, ICAM-1, N-cadherin, E-cadherin a β -catenin) u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B, 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A) u čtyř pacientů a u imortalizovaného modelu SW480 a SW620. Data byla stanovena pomocí RT-PCR. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr hodnot \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny; resp. SW480 vs. SW620.

<i>mRNA</i> <i>relativní</i> <i>množství</i>	MMP- 2	MMP- 9	EpCAM	ICAM- 1	N- cadherin	E- cadherin	β- catenin
SW620	1.00 \pm 0.30	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.20	1.00 \pm 0.26	1.00 \pm 0.20
SW480	0.59 \pm 0.15	0.16 \pm 0.03*	1.19 \pm 0.30	0.40 \pm 0.03*	0.46 \pm 0.11*	0.55 \pm 0.06	1.16 \pm 0.05
4A	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.17	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.30	1.00 \pm 0.04
4B	1.36 \pm 0.11*	2.05 \pm 0.02*	0.06 \pm 0.19*	0.11 \pm 0.05*	0.56 \pm 0.06	1.00 \pm 0.26	0.76 \pm 0.07
20A	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.23	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.09
20B	4.94 \pm 0.02*	16.74 \pm 0.06*	5.66 \pm 1.61*	11.96 \pm 0.28*	2.31 \pm 0.02*	2.43 \pm 0.03*	3.92 \pm 0.05*
30A	1.00 \pm 0.38	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.02
30B	1.36 \pm 0.06	8.88 \pm 0.56*	0.70 \pm 0.23	0.28 \pm 0.01*	0.16 \pm 0.02*	3.34 \pm 0.39*	0.51 \pm 0.06
34A	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.25
34B	1.14 \pm 0.13	1.60 \pm 0.39	2.29 \pm 0.54*	0.33 \pm 0.03*	0.40 \pm 0.05	2.70 \pm 0.23	0.97 \pm 0.01*

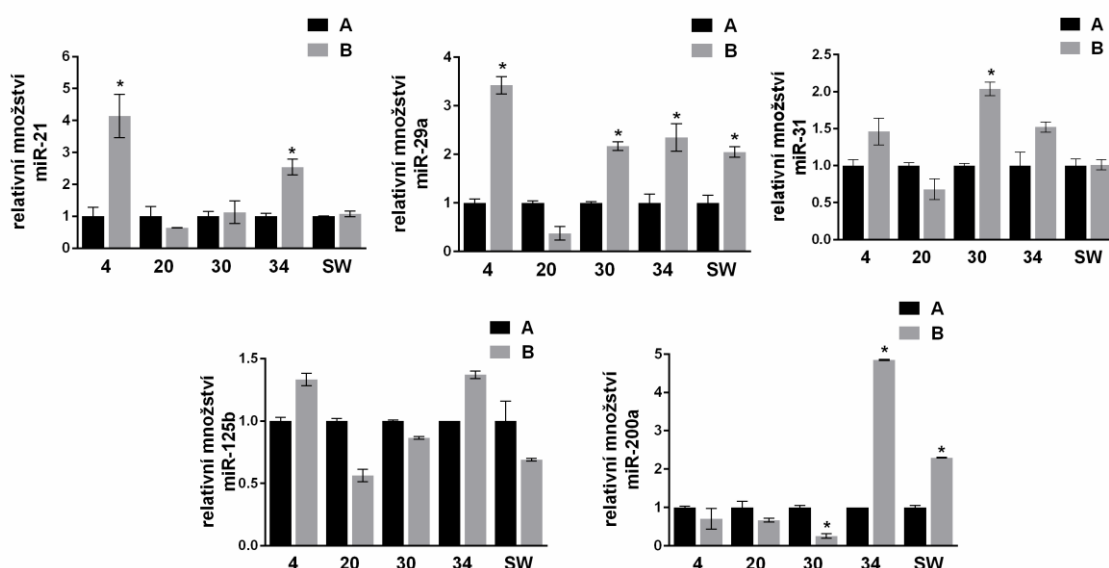
6.4.3 Stanovení relativního množství mikroRNA v izolovaných buněčných liniích

Expresse mikroRNA (miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b a miR-200a) související s procesy adheze a migrace byla měřena a porovnávána ve vybraných buněčných liniích izolovaných z primárního kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B a 34B) a jejich metastáz do lymfatických uzlin (4A, 20A, 30A, 34A), získaných od čtyř pacientů. Výsledky jsou shrnuty na obrázku č. 27 a v tabulce č. 12. Množství miR-21 bylo významně zvýšeno ve dvou případech (kultura č. 4 a č. 34) v liniích izolovaných z kolorektálního karcinomu. Stejně tak množství miR-29a bylo zvýšeno v kultuře č. 4, č. 34 a navíc také v kultuře č. 30, vždy u buněk kolorektálního karcinomu, v porovnání s liniemi izolovanými z metastáz. MiR-31 byla deregulována pouze v případě 30B. MiR-200a byla výrazně modifikována ve dvou případech, v linii 30B došlo ke snížení exprese a v linii 34B byla exprese naopak zvýšena.

Expresse výše zmíněných miRNA souvisejících s procesy adheze a migrace byla měřena a porovnávána také v imortalizovaných buněčných liniích SW480 a SW620. Data jsou uvedena na obrázku č. 27 a v tabulce č. 12. Hladiny miR-21, miR-31 a miR-125b se nijak významně nezměnily. Na druhou stranu hladina miR-29a a miR-200a byly významně zvýšeny u linie SW480 v porovnání s linií SW620.

Tab. č. 12: Relativní množství vybraných miRNA zapojených do buněčných adhezí a progresu (miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b, miR200a) u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B a 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A), získaných od čtyř pacientů a u imortalizovaného modelu SW480 a SW620. Expresse byla stanovena pomocí RT-PCR. Data jsou vyjádřena jako průměr hodnot \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny; resp. SW480 vs. SW620.

<i>miRNA</i> <i>relativní množství</i>	miR21	miR29a	miR31	miR125b	miR200a
SW620	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.05
SW480	1.07 \pm 0.09	2.05 \pm 0.11*	1.01 \pm 0.07	0.69 \pm 0.01	2.30 \pm 0.01*
4A	1.00 \pm 0.28	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.03
4B	4.14 \pm 0.68*	3.42 \pm 0.18*	1.46 \pm 0.18	1.33 \pm 0.05	0.70 \pm 0.27
20A	1.00 \pm 0.31	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.16
20B	0.64 \pm 0.01	0.37 \pm 0.14	0.68 \pm 0.14	0.56 \pm 0.05	0.67 \pm 0.05
30A	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.05
30B	1.28 \pm 0.35	2.17 \pm 0.09*	2.03 \pm 0.09*	0.87 \pm 0.01	0.25 \pm 0.06*
34A	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.18	1.00 \pm 0.18	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03
34B	2.54 \pm 0.25*	2.35 \pm 0.28*	1.52 \pm 0.07	1.37 \pm 0.03	4.85 \pm 0.2*



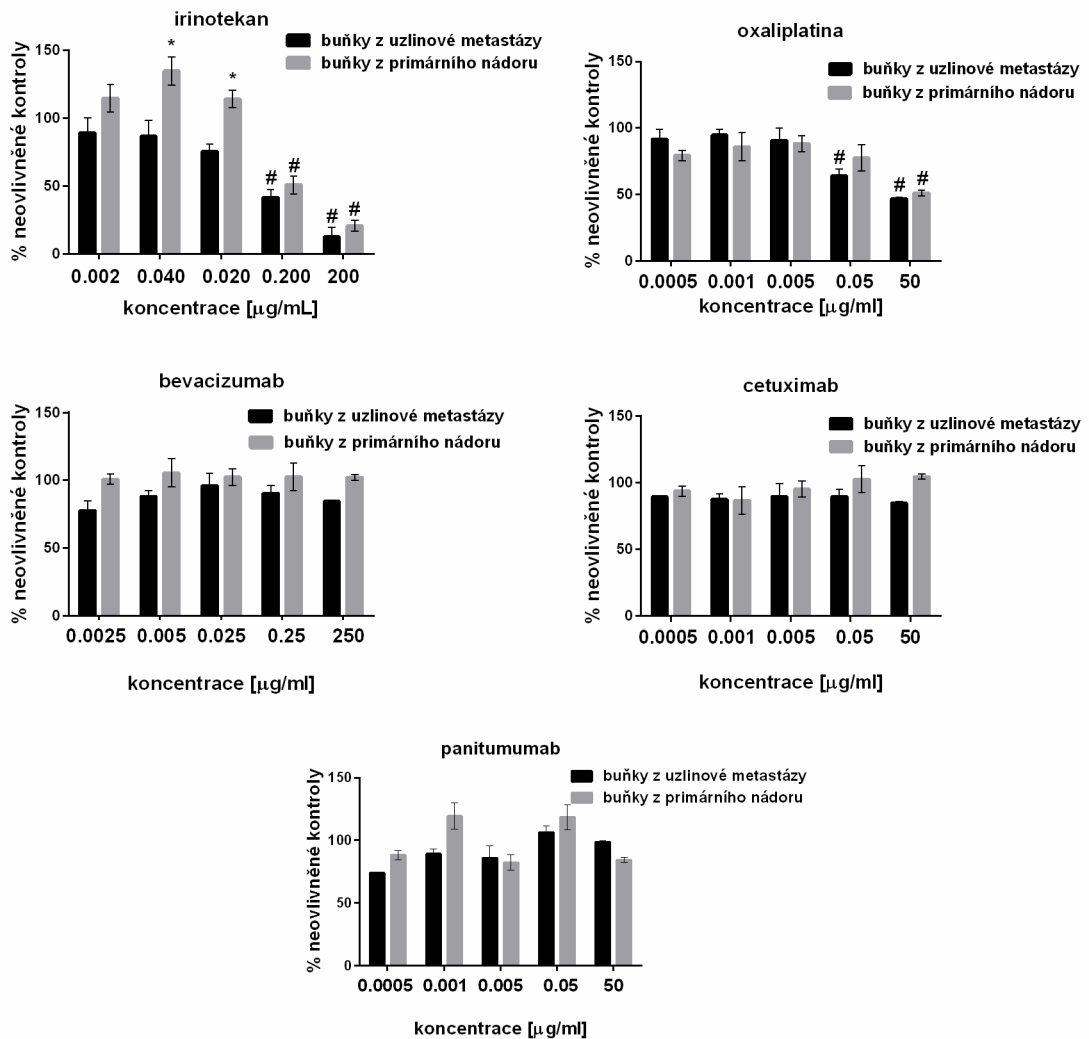
Obr. č. 27: Porovnání relativní exprese vybraných miRNA souvisejících s buněčnou adhezí a progresí (miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b a miR-200a) u buněčných linií izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B a 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A), získaných od čtyř pacientů. Pro srovnání byly použity immortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Data byla stanovena pomocí RT-PCR. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní množství \pm SD jako průměr z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny.

6.4.4 Účinek chemoterapeutik a biologické terapie na životnost izolovaných buněk

V další části studie jsme se zaměřili na stanovení životnosti buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastázy do lymfatické uzliny po ovlivnění chemoterapeutiky a biologickou léčbou (obr. č. 28). Chemoterapeutika irinotekan a oxaliplatinu reprezentují adjuvantní terapii kolorektálního karcinomu. Pro naše experimenty jsme zvolili testování základní cytotoxicity těchto léčiv na buňkách kolorektálního karcinomu (20B) a buňkách z jejich metastázy do lymfatické uzliny (20A). Irinotekan se ukázal jako více účinný v porovnání s oxaliplatinou, zejména u buněk izolovaných z metastázy. Porovnání hodnot IC_{50} je shrnuto v tabulce č. 13.

Stejně tak jako u adjuvantní terapie byl porovnáván účinek biologické terapie (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) na životnost izolovaných buněk. U

testovaných linií nebyly zjištěny žádné významné změny dokonce ani při použití vyšších koncentrací (bevacizumab 250 $\mu\text{g/ml}$; cetuximab a panitumumab 50 $\mu\text{g/ml}$).



Obr. č. 28: Porovnání životnosti buněk izolovaných z primárního nádoru a buněk z uzlinové metastázy po ovlivnění adjuvantní terapií (irinotekanem, oxaliplatinou) a biologickou léčbou (bevacizumabem, cetuximabem a panitumumabem) po dobu 30 hodin. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí WST analýzy. Data jsou vyjádřena jako procenta neovlivněné kontroly. * $p < 0,05$ = buňky izolované z kolorektálního karcinomu vs. buňky izolované z jejich metastázy do lymfatické uzliny; # $p < 0,05$ = buňky ovlivněné chemoterapií vs. neovlivněná kontrola.

Tab. č. 13: Hodnoty IC50 chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastázy do lymfatické uzliny po 30 hodinách inkubace.

IC50 [µg/ml]		
	buňky izolované z uzlinové metastázy	buňky izolované z primárního nádoru
irinotekan	0.11	0.22
oxaliplatina	48.23	52.23

Na základě předchozích výsledků byl pro další testování životnosti buněk vybrán irinotekan a oxaliplatina. Citlivost k těmto chemoterapeutikům byla testována na několika immortalizovaných buněčných liniích (HT29, CaCo2, SW480 a SW620) a nenádorových fibroblastech (CCD-112CoN) v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin. Dále byla citlivost testována na liniích izolovaných z primárních kolorektálních karcinomů, resp. jejich uzlinových metastáz, v časovém intervalu 48 hodin, který byl v předchozích experimentech určen jako optimální. Životnost byla hodnocena pomocí testu WST-1. Na základě testu cytotoxicity chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu byly stanoveny hodnoty IC50 (tab. č. 14). V testovaných buněčných liniích byly zřetelné rozdíly citlivosti na testovaná chemoterapeutika, avšak jako citlivější se projevíly linie izolované z metastáz do lymfatických uzlin.

Tab. č. 14: Hodnoty IC50 chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatiny u immortalizovaných buněčných linií HT29, CaCo2, SW480 a SW620, u nenádorové linie CCD-112CoN a u buněčných linií izolovaných od pacientů z primárního tumoru (B) a z metastaticky postižené lymfatické uzliny (A).

	IC50 OPT [$\mu\text{g/ml}$]			IC50 IT [$\mu\text{g/ml}$]		
	24hod	48hod	72hod	24hod	48hod	72hod
Immortalizované nádorové buněčné linie						
HT29	482.70	46.95	5.82	70.01	23.38	11.29
CaCo2	11.18	0.36	1.14	150.00	48.11	38.22
SW480	109.1	0.35	8.20	316.3	32.81	4.18
SW620	70.91	3.30	12.74	603.8	118.0	8.64
Nenádorová buněčná linie						
CCD	36.13	12.91	98.20	341.7	103.9	341.7
Primokultury						
36B		7.42			40.44	
39B		55.08			108.5	
42A		80.67			303.8	
42B		30.18			41.82	
43B		139.70			534.20	
44A		47.83			43.63	
44B		238.60			248.70	
46B		143.90			504.80	
47B		216.80			285.90	
48B		24.08			13.33	
54A		172.2			66.13	
54B		16.19			38.11	
55B		85.21			88.26	

Pro další testování byly vybrány pouze immortalizované linie SW480 a SW620, z linií izolovaných od pacientů byly vybrány vzorky číslo 42, 44 a 54, které vykazovaly výraznější rozdíly v citlivosti k testovaným chemoterapeutikům a byly získány z níže diferencovaných tumorů (G3) a s vyšší pokročilostí primárního tumoru (T3, resp. T4a) (tab. č. 15).

Tab. č. 15: Základní histologická charakteristika vzorků určených pro izolaci buněčných kultur.

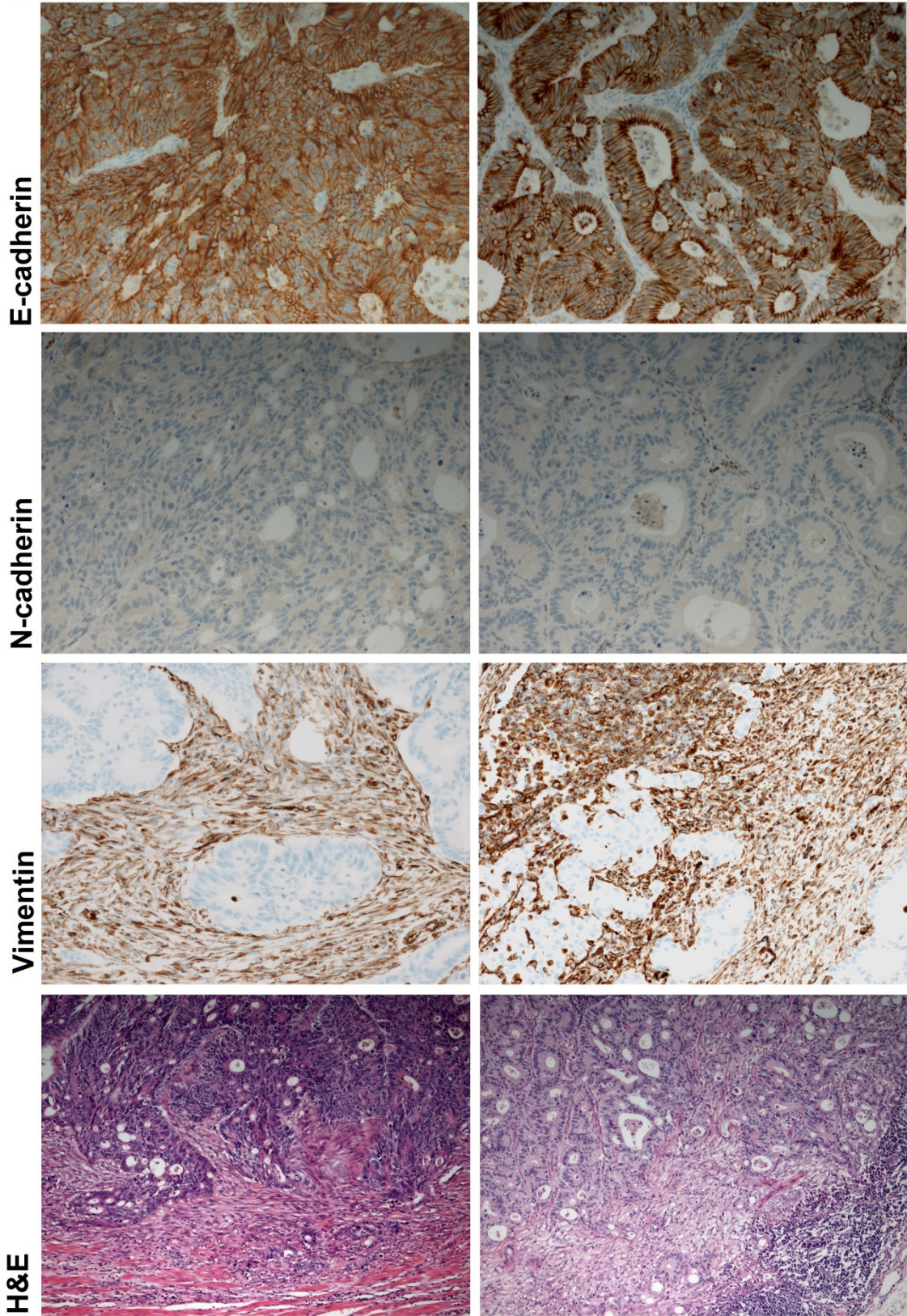
	Stage tumoru	Stage uzlin	Grade tumoru	Angio-invaze	Perineurální šíření	Mucinózní komponenta	Lokalizace tumoru
42	T4a	N2b	G3	+	+	+ (5 %)	Ascendens
44	T3	N1b	G3	+	+	+ (20 %)	Ascendens
54	T4a	N2a	G3	+	-	-	Ascendens

6.4.5 Imunohistochemická analýza sledovaných markerů nádorové progresse

Nejprve byla provedena imunohistochemická analýza vybraných vzorků (č. 42, 44, 54). Imunohistochemické stanovení exprese proteinů bylo provedeno použitím primárních protilátek specifických pro E-cadherin, N-cadherin a vimentin (obr. č. 29). K analýze bylo použito formalínem fixovaných parafinových bločků ze tří primárních kolorektálních karcinomů a tří metastaticky postižených lymfatických uzlin získaných od stejného pacienta. Výsledky ukázaly, že exprese E-cadherinu byla ve všech sledovaných vzorcích stejná, zatímco hladina N-cadherinu byla zvýšena pouze u vzorku č. 44 a to v lymfatické uzlině. U většiny vzorků se exprese vimentinu omezuje pouze na buňky stromatu a lymfocyty, zatímco v lymfatické uzlině u vzorku č. 54, se objevuje vimentin i na buňkách nádoru. Pro morfologické porovnání byl preparát obarven hematoxylinem a eozinem (H&E).

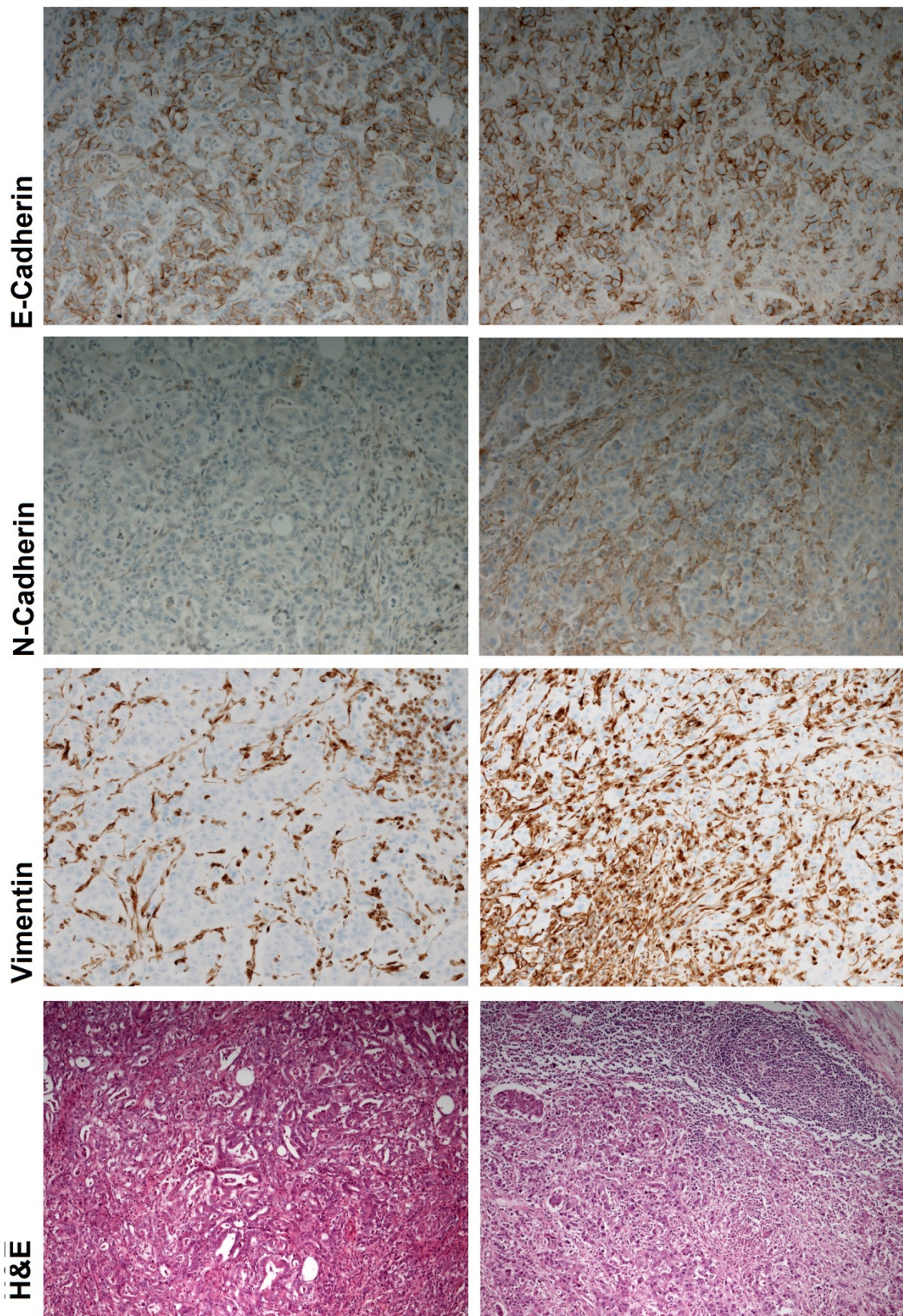
42. Primární nádor

Uzlinová metastáza



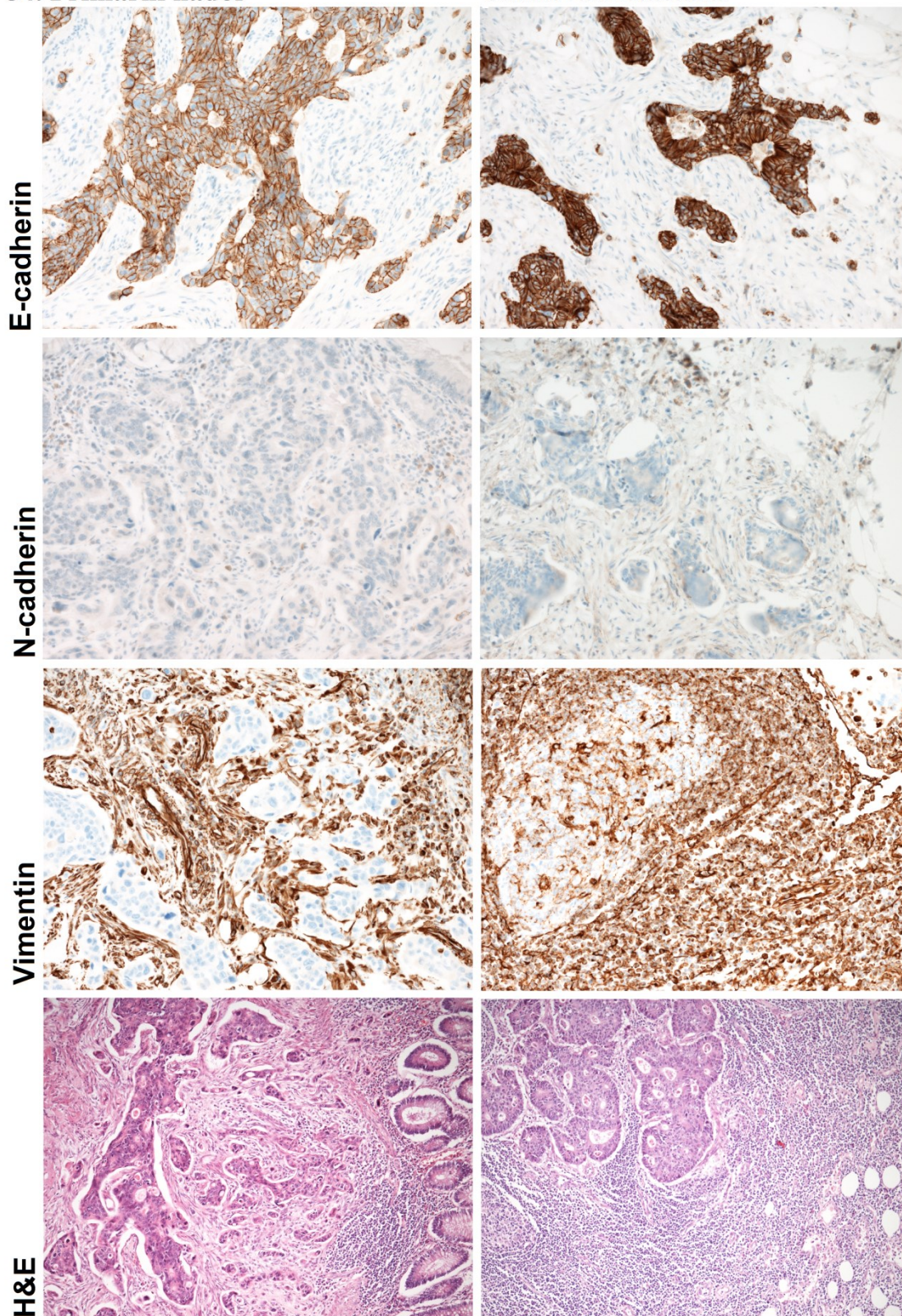
44. Primární nádor

Uzlinová metastáza



54. Primární nádor

Uzlinová metastáza

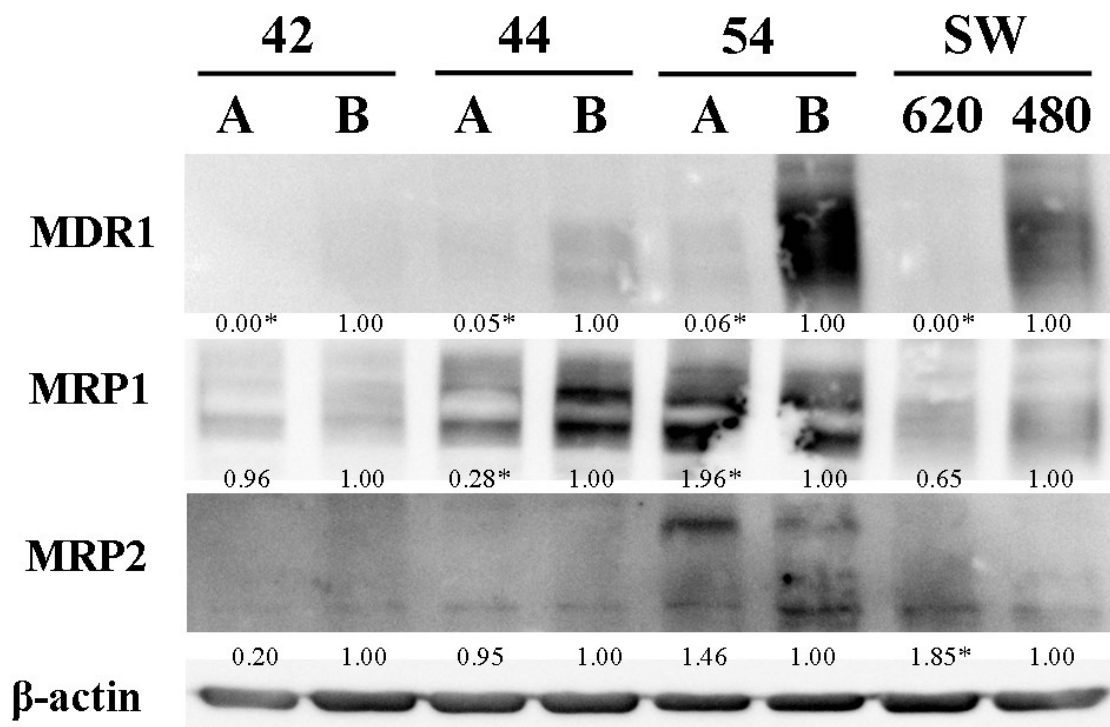


Obr. č. 29: Imunohistochemická analýza – stanovení exprese molekul podílejících se na nádorové progresi ve třech primárních kolorektálních karcinomech (vzorek č. 42, 44 a 54) a třech metastaticky postižených lymfatických uzlinách získaných od stejného

pacienta. Pro stanovení byly použity primární protilátky specifické pro E-cadherin, N-cadherin a vimentin. Zvětšení 200x.

6.4.6 Stanovení exprese markerů podílejících se na lékové rezistenci

Závažným problémem léčby chemoterapeutiky je léková rezistence. Rozdíly v citlivosti mezi jednotlivými buněčnými liniemi mohou souviset s interindividuálními rozdíly v expresi efluxních transportérů. Proto jsme se zaměřili na stanovení proteinů podílejících se na rezistenci k chemoterapeutikům irinotekanu a oxaliplatině, jako jsou MDR1, MRP1 a MRP2. V našich experimentech jsme porovnávali hladiny těchto proteinů zapojených do rezistence mezi buňkami izolovanými z primárního kolorektálního karcinomu (42B, 44B, 54B) a buněk izolovaných z metastázy (42A, 44A, 44B). Buňky izolované z primárních nádorů byly použity jako kontrola (hodnota denzity 1,0). U všech testovaných vzorků byla zjištěna vyšší exprese MDR1 v buňkách primárního nádoru (42B, 44B, 54B a SW480). Na druhou stranu, vyšší hladiny MRP1 a stejně tak i MRP2 byly nalezeny ve vzorku 54A. Vyšší hladina proteinu MRP2 byla nalezena i v linii SW620 v porovnání s linií SW480.

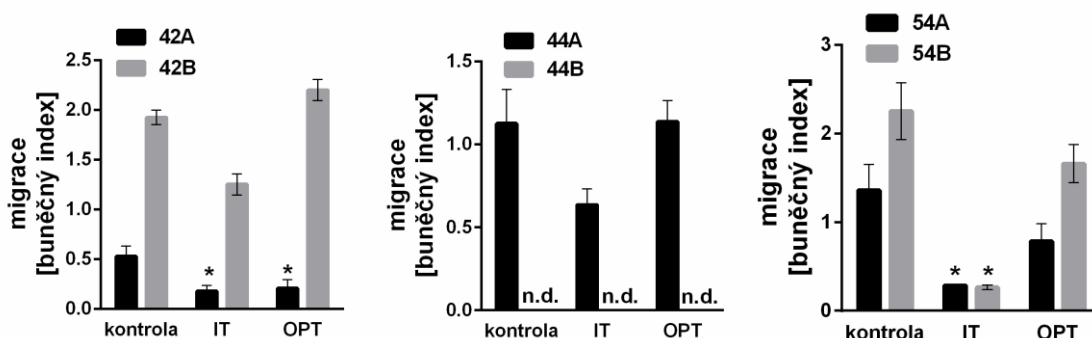


Obr. č. 30: Porovnání exprese MDR1, MRP1 a MRP2 v buňkách primárního kolorektálního karcinomu (42B, 44B, 54B) a buněk z jejich metastáz do lymfatické

uzliny (42A, 44A, 54A) izolovaných z nádorů od tří pacientů. Pro porovnání byly použity immortalizované buněčné linie SW480 a SW620. Hladiny proteinů MDR1, MRP1 a MRP2 byly stanoveny metodou western blot. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. * $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu.

6.4.7 Vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na migrační potenciál izolovaných buněčných linií

U vybraných izolovaných linií (vzorky 42, 44, 54 A i B) byla testována schopnost migrace a zároveň byl porovnáván vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na jejich migrační potenciál. Vyšší migrační potenciál byl pozorován u buněk primárního tumoru (42B a 54B), kromě vzorku číslo 44, kde buňky primárního tumoru nebyly schopny migrovat vůbec (n.d. = nedetekovatelné). Na druhou stranu, irinotekan a oxaliplatin působily na migraci účinněji v buňkách izolovaných z lymfatické uzliny.



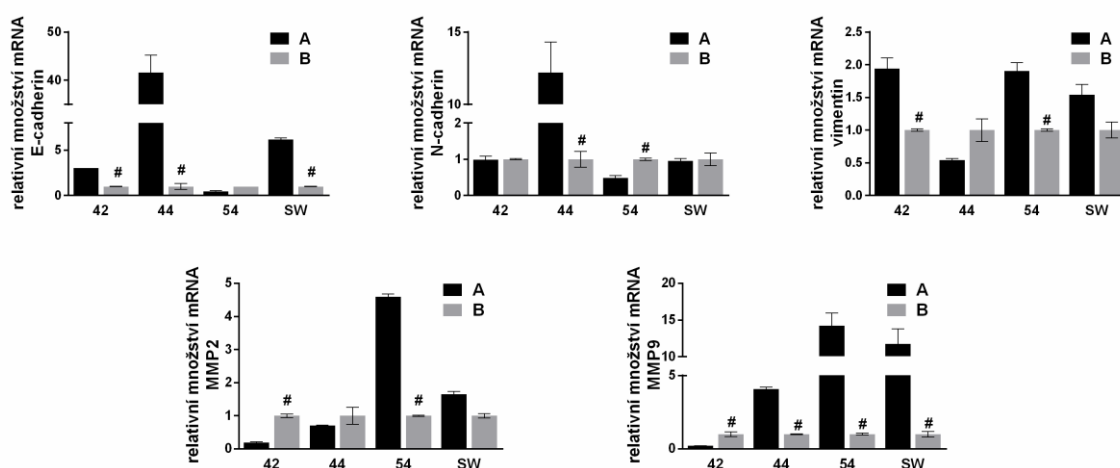
Obr. č. 31: Porovnání schopnosti migrace buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (B) a buněk izolovaných z jejich metastázy do lymfatické uzliny (A), získané z nádorové tkáně od tří pacientů (42, 44, 54), po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou (použitá koncentrace odpovídá hodnotě IC50). Migrační assay byla provedena pomocí analýzy v čase přístrojem x-CELLigence. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD z posledního bodu měření z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = irinotekan a oxaliplatin vs. neovlivněná kontrola; n.d. = nedetekovatelné.

6.4.8 Stanovení markerů nádorové progresy na úrovni mikroRNA a mRNA

Byly také měřeny hladiny markerů zapojených do nádorové progresy na úrovni mRNA (E-cadherin, N-cadherin, MMP2, MMP9 a vimentin) a také hladiny mikroRNA souvisejících s těmito procesy (miR-21, miR-29a a miR-200a) (viz obr. č. 32 a 33).

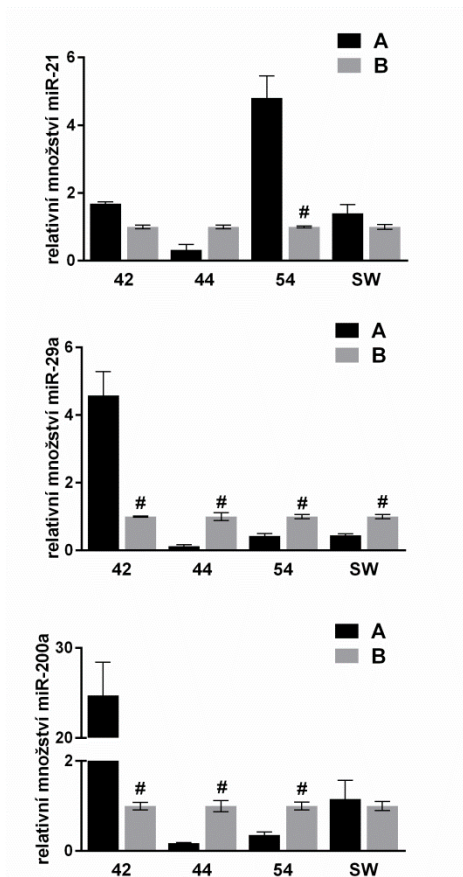
Vyšší exprese E-cadherinu byla zjištěna v buňkách z metastázy do lymfatické uzliny (A) ve vzorcích č. 42 a 44. Ve vzorku č. 54 byla vyšší exprese E-cadherinu nalezena v buňkách kolorektálního karcinomu. Výrazná exprese N-cadherinu byla zjištěna také ve vzorku 44A. Mezenchymální marker vimentin byl výrazně exprimován v buňkách z metastáz do lymfatické uzliny, kromě vzorku č. 44. MMP, které jsou zapojeny do nádorové progresy, byly významně vyšší v buňkách z metastaticky postižených lymfatických uzlin, zejména pak MMP-9. Jediná výjimka byl vzorek č. 42, ve kterém hladina mRNA obou MMP byla téměř nulová.

Co se týče exprese mikroRNA, vyšší hladina miR-21 byla stanovena v buňkách z metastaticky postižených lymfatických uzlin, vyjma vzorku č. 44. Nejvýraznější zvýšení miR-21 bylo zjištěno v metastatických buňkách 54A. Relativní množství miR-29a bylo naopak sníženo v metastatických buňkách (vzorek 44, 54, SW) v porovnání s liniemi odvozenými z primárního tumoru. Významný nárůst hladiny miR-29a byl detekován v linii 42A. Podobný trend jsme pozorovali i v expresi miR-200a, přičemž nejvyšší hladina byla stanovena právě v linii 42A.



Obr. č. 32: Porovnání rozdílu exprese mRNA vybraných molekul zapojených do nádorové progresy v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a buněk z jejich primárních tumorů (42B, 44B, 54B). mRNA exprese E-cadherinu,

N-cadherinu, MMP2, MMP9 a vimentinu byla stanovena pomocí RT PCR. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako relativní množství \pm SD. # $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu.

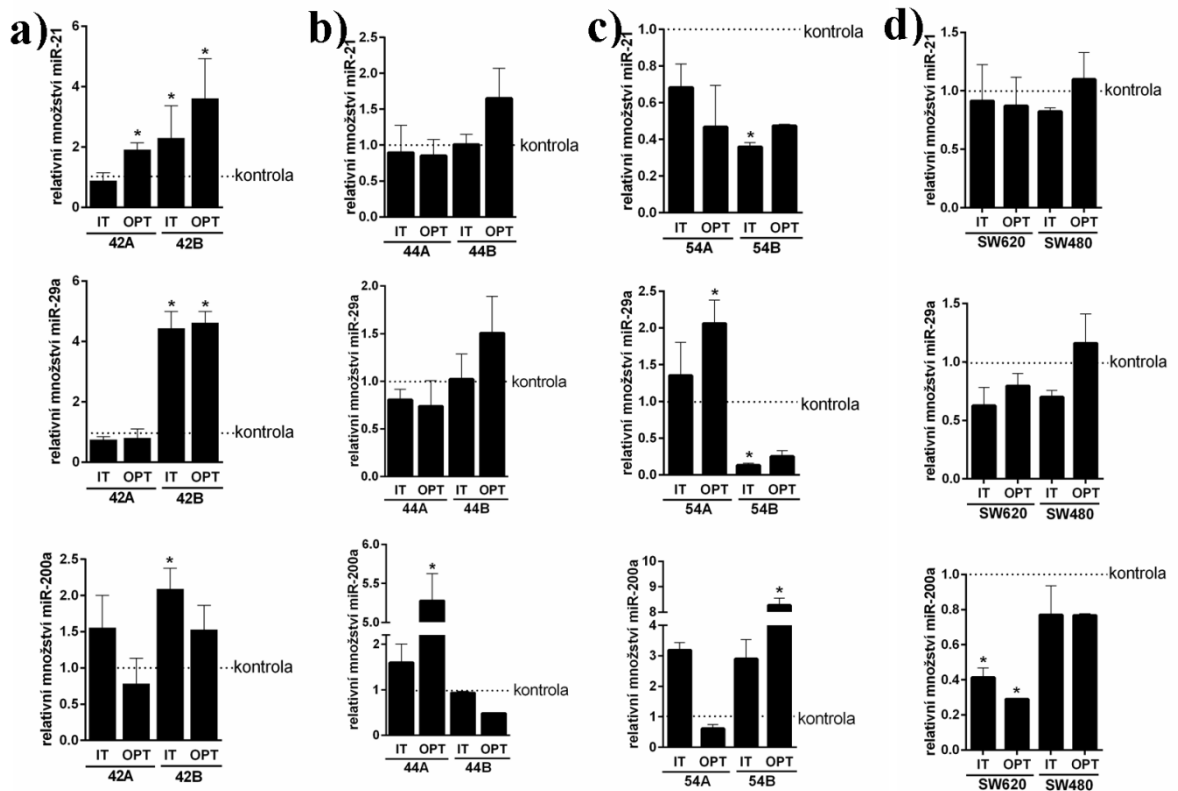


Obr. č. 33: Porovnání rozdílů hladin miRNA zapojených do nádorové progresy v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a buněk z jejich primárních tumorů (42B, 44B, 54B). Hladiny miR-21, miR-29a, miR-200a byly stanoveny pomocí RT PCR. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako relativní množství \pm SD. # $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu.

6.4.9 Vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na expresi molekul zapojených do nádorové progresy

Změny na úrovni miRNA byly nalezeny i po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou (obr. č. 34) ve všech testovaných liniích (42, 44, 54, SW – A i B). Nejvýraznější pokles byl pozorován u miR-21 po ovlivnění irinotekanem i oxaliplatinou

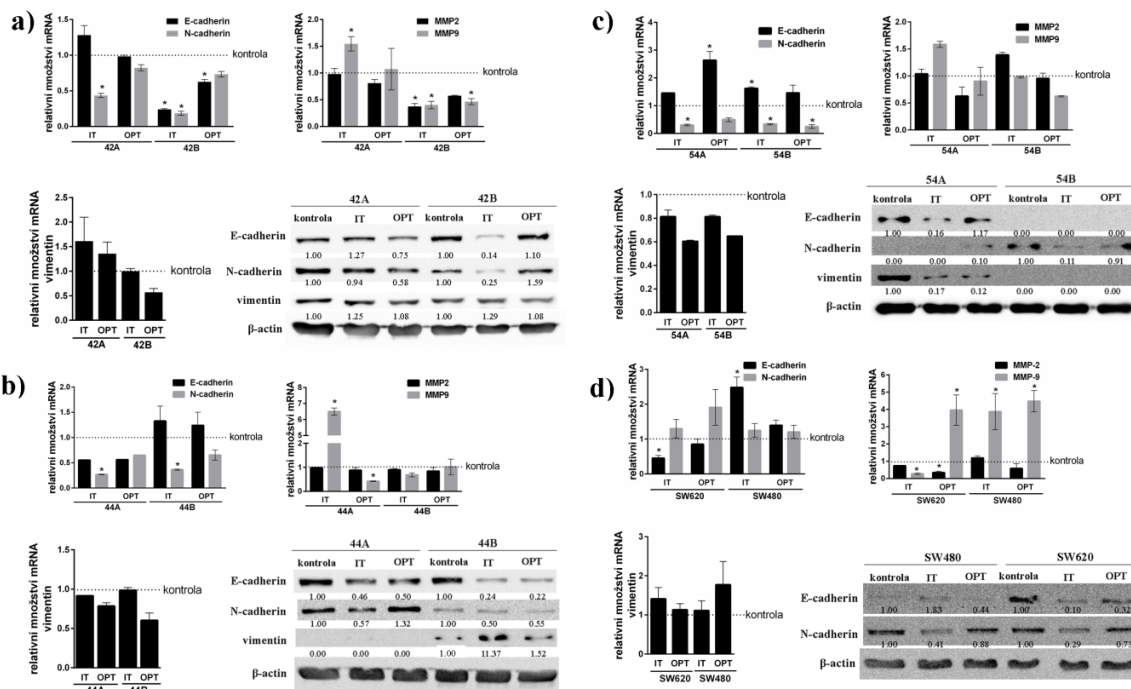
v buněčné linii 54B. Na druhou stranu, v buněčné linii 42A a 42B bylo nalezeno výrazné zvýšení hladiny miR-21, zejména po ovlivnění oxaliplatinou. Výrazné zvýšení hladiny miR-29a bylo pozorováno v buněčné linii 42B, po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou. Viditelný opačný efekt byl zjištěn v buněčné linii 54B, kde došlo ke snížení hladiny miR-29a. Hladina miR-200a byla zvýšena po ovlivnění irinotekanem v buněčné linii 42B, 54A a 54B; upregulace byla pozorována také po ovlivnění oxaliplatinou a to v buněčné linii 44A a 54B. Výrazný pokles miR-200a byl zjištěn pouze v linii SW620, po ovlivnění irinotekanem i oxaliplatinou.



Obr. č. 34: Porovnání relativního množství miRNA souvisejícího s nádorovou progresí (miR-21, miR-29a, miR-200a) po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou v metastatických nádorových buňkách z lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a v buňkách kolorektálního karcinomu (42B, 44B, 54B) izolovaných z tumorů od tří pacientů a v imortalizovaných buňkách SW620 a SW480. Expres byla stanovena pomocí RT-PCR analýzy. Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou experimentů. * $p < 0,05$ = metastatické nádorové buňky z lymfatické uzliny vs. buňky kolorektálního karcinomu.

Účinek irinotekanu a oxaliplatinu na expresi molekul souvisejících s nádorovou progresí byl porovnáván na úrovni mRNA a proteinu (obr. č. 35). Významné změny nastaly ve většině testovaných vzorků a to jak u buněk kolorektálního karcinomu, tak buněk odvozených z metastázy do lymfatické uzliny. Hladina N-cadherinu byla ve všech testovaných buněčných liniích získaných z klinických vzorků snížena exprimována (42, 44, 54 – A i B) po ovlivnění irinotekanem i oxaliplatinou. Často je pozorován jev, při němž hladina mRNA E-cadherinu koresponduje s hladinou N-cadherinu, např. ve vzorcích 42A, 42B nebo 44A. Na druhou stranu, ve vzorcích 54A a 54B je pozorována snížená exprese N-cadherinu společně se zvýšenou expresí E-cadherinu na úrovni mRNA. Podobný trend byl pozorován i na úrovni proteinu ve výše zmíněných případech.

Expresе MMP2 a MMP9 byla testována pouze na úrovni mRNA. Po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou byl sledován výrazný pokles obou testovaných metaloproteináz v linii 42B. MMP9 byla významně zvýšena po ovlivnění irinotekanem a to v liniích 42A, 44A a SW480. Po ovlivnění oxaliplatinou došlo také ke zvýšení MMP9 u linií SW620 a SW480.



Obr. č. 35: Porovnání změn v relativní expresi molekul souvisejících s nádorovou progresí (E-cadherin, N-cadherin, MMP2, MMP9 a vimentin) na úrovni mRNA a proteinů po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou v buňkách z metastázy do

lymfatické uzliny (A) a v buňkách kolorektálního karcinomu (B) izolovaných z tumorů od tří pacientů (vzorek č. 42- (a); č. 44 – (b); č. 54 – (c); a buněk imortalizovaných SW480 a SW620 (d). Expres byla stanovena pomocí RT-PCR (množství mRNA) a pomocí western blot analýzy (množství proteinu). Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou experimentů. * $p < 0,05$ = metastatické nádorové buňky z lymfatické uzliny vs. buňky kolorektálního karcinomu.

7 Diskuze

Pěstování buněčných kultur dnes patří mezi rutinní techniky používané v základním i aplikovaném výzkumu a ve výrobě. *In vitro* lze kultivovat řadu buněčných modelů, včetně modelu kolorektálního karcinomu. Pro založení takovéto kultury (primokultury) je potřeba laboratorní zvíře nebo člověk. Historicky kontinuální nádorová linie je důležitý validní model pro testování. Primární buněčné linie mají ten samý potenciál, avšak lépe odráží vlastnosti původní tkáně [73].

Odvození buněčných kultur z lidských nádorů je relativně rutinní procedura a k jejich získání existuje několik metod (mechanická a enzymatická disociace, separace za pomoci magnetických nanočástic a pomocí hustotního gradientu) [78, 85, 86]. Poslední dvě jmenované metody vedou k izolaci pouze určitého typu specifických buněk, avšak je čím dál více evidentní, že nádorové stroma hraje důležitou roli v invazivitě nádorů nebo se může podílet na lékové rezistenci v tumoru. Důležitým faktorem pro testování patologických procesů je tedy použití směsice buněk.

Námi použitá metoda mechanické disociace zachovává původní vlastnosti buněk, i když je vystavuje relativně velkému mechanickému stresu, který může vést k jejich smrti [72, 74]. Při použití této metody jsou přítomny buňky nádorové a zároveň zachovány podpůrné buňky nádorového stromatu (fibroblasty, endotelie,...). Dochází k relativnímu udržení původního mikroprostředí nádorových buněk, což podporuje jejich růst a proliferaci v porovnání s buněčnými liniemi izolovanými za pomoci jiných metod [80].

Izolace buněk z kontaminované tkáně, kterou je i střevo, je poměrně obtížná, ale nejedná se o nepřekonatelný problém. Již dříve byla popsána izolace buněk kolorektálního karcinomu pomocí enzymatické disociace [77, 87] za přítomnosti vysoké koncentrace antibiotik s úspěšností 80 - 90 % [79]. V našich experimentech byla zjištěna úspěšnost pouze 45 % (26/58), přičemž hlavním omezením izolace byla vysoká mikrobiální kontaminace buněčných kultur ze střevního obsahu. Vysoká dávka antibiotik nebo antimykotik by mohla tento problém vyřešit. Nicméně, léčba antibiotiky může interferovat s testováním některých léčiv a navíc vysoké dávky antibiotik vedou k selekci farmakorezistentních kmenů v buněčných kulturách [80].

Jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů kolorektálního karcinomu je postižení lymfatických uzlin. Experimentální i klinicko-patologická data ukazují, že výskyt lymfatických cév v blízkosti solidních nádorů bývá často spojován s uzlinovými metastázami [88, 89]. Lymfatické uzliny s potenciálním metastatickým postižením byly

vybrány podle velikosti a pohmatové tvrdosti. Úspěšnost izolace buněčných kultur z odebraných lymfatických uzlin byla 47 % (17/36). Téměř polovina odebraných lymfatických uzlin však nebyla metastaticky postižena. Reálná úspěšnost izolace buněčných kultur z metastaticky postižených lymfatických uzlin je mnohem vyšší – 74 % (14/19). U tří získaných primokultur z lymfatické uzliny byly histologicky zjištěny izolované nádorové buňky (ITC). Staging tumoru při nepřítomnosti metastázy v jiné lymfatické uzlině byl stanoven jako pN0(i+).

Data z našeho genetického testování ukazují obvyklou incidenci mutací *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN* a *PIK3CA* jak bylo popsáno v literatuře [90]. Mutace genu *KRAS* byla prokázána u 51 % námi testovaných vzorků; mutace genu *NRAS* u 4 % vzorků; mutace genu *PIK3CA* u 31 % vzorků; mutace genu *BRAF* u 12 % vzorků a mutace genu *PTEN* u 10 % vzorků.

V budoucnu by mohlo paralelní testování genetických mutací a testování citlivosti na chemoterapii nebo cílenou terapii být rutinní pro každého pacienta. V tomto směru je snaha o rozvoj technologií, které by generovaly velké množství nádorových buněk vhodných pro široké klinické testování [91]. V naší studii se časový interval mezi jednotlivými pasážemi zkracoval se zvyšující se proliferací buněk v kultuře. Celkově byl růst buněk odvozených z primárního tumoru obdobný v porovnání s buňkami izolovanými z metastázy.

Buňky z primárního ložiska kolorektálního karcinomu a buňky z uzlinové metastázy získané od identického pacienta tvoří unikátní model vhodný pro studium nádorové progresy a dalších metastatických vlastností. Pro naše experimenty jsme však ještě hledali model imortalizovaných buněk, díky kterým bychom mohli porovnat dosažené výsledky, chování jednotlivých buněk, morfologické a fenotypové rozdíly obou buněčných typů s izolovanými buňkami. Buněčné linie SW480 a SW620 přesně splňovaly naše požadavky. SW480 (buněčná linie primárního kolorektálního karcinomu) má epiteliální morfologii, zatímco SW620 (metastáza do lymfatické uzliny) má vřetenobuněčnou morfologii podobnou fibroblastu, stejně tak jako naše testované linie [92]. Co se týče proliferační schopnosti, vyšší proliferace byla zjištěna u buněk SW620, v porovnání s buňkami SW480 [92], zatímco proliferační index námi izolovaných buněk byl mnohonásobně zvýšen u buněk izolovaných z primárního nádoru v porovnání s buňkami izolovanými z lymfatické uzliny. Při porovnávání buněk izolovaných a buněk imortalizovaných bylo nalezeno velké množství rozdílů,

pravděpodobně také na základě selekce agresivních klonů během pasážování společně s důležitou rolí podpůrného stromatu v primární kultuře.

Mezibuněčné adheze nebo adheze mezi buňkami a ECM hrají důležitou roli v nádorové progresi a rozvoji metastáz, ale také v usídlení buněk v sekundárním ložisku. Adhezní molekuly, jako např. cadheriny, ale i jiné, se podílejí na migraci buněk z nádorové masy. Snížená exprese E-cadherinu bývá často spojována s nádorovou progresí a zvýšenou buněčnou invazivitou, jak bylo již dříve popsáno u několika typů nádorů, pocházejících z různých tkání [93]. Snížená exprese E-cadherinu společně s cateniny je spojována s dediferenciací, invazivitou a metastázami. Zároveň sníženou expresí E-cadherinu, ale i dalších molekul, mohou získat epiteliální buňky mezenchymální fenotyp, čímž se stávají více invazivními. Ztráta E-cadherinu a s tím související přechod na N-cadherin je základním předpokladem EMT v kolorektálním karcinomu. V tomto procesu N-cadherin interaguje s nejbližším okolím, čímž usnadňuje invazivitu a metastatický potenciál nádorových buněk. [61]. Při detekci markerů podílejících se na nádorové progresi jsme v našich modelových liniích našli dva případy buněk primárního kolorektálního karcinomu, které vykazovaly zvýšenou expresi E-cadherinu v porovnání s hladinou v buňkách z metastázy do lymfatické uzliny od téhož pacienta. U většiny testovaných vzorků byla pozorována zvýšená migrace zejména u buněk izolovaných z uzlinových metastáz, ve dvou případech byla však migrační aktivita vyšší u buněčných kultur z primárního nádoru. Buňky z metastázy ve většině případů migrovaly agresivněji než buňky izolované z primárního karcinomu, což koresponduje s výsledky exprese E- a N-cadherinu na úrovni mRNA i proteinu. N-cadherin byl zvýšeně exprimován zejména v buňkách izolovaných z uzlinové metastázy, zatímco zvýšené hladiny E-cadherinu byly prokázány u buněk z primárního karcinomu. I když předchozí studie prokázaly horší prognózu pro pacienty se sníženou expresí adhezních molekul, jako např. E-cadherinu a β -cateninu, v metastázách v porovnání s primárními tumory, tak popsáný rozdíl nebyl signifikantní a klinická významnost snížené exprese těchto adhezních molekul nebyla dosud prokázána. [61].

Důležitý krok v progresi kolorektálního karcinomu a metastazování souvisí s buněčnými adhezemi a to jak s odloučením nádorových buněk z primárního tumoru, tak i přichycením buněk ke vzdálené tkáni. Na orgánové selektivitě metastáz se podílí různá exprese adhezních molekul ve tkáních cílových pro metastázy, nebo přítomnost různých adhezních ligandů exprimovaných v buněčných liniích odvozených z kolorektálního karcinomu [94]. Ve studii, zahrnující 96 pacientů s kolorektálním

karcinomem, byla incidence metastáz do lymfatické uzliny nebo jater významně nižší u pacientů se sníženou expresí molekuly ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule) [95]. Tato molekula úzce souvisí se vznikem metastáz, ICAM-1 zprostředkovává adhezi nádorových buněk k extracelulární matrix [96]. Naproti tomu další studie ukázala zvýšenou expresi ICAM-1 u kolorektálních karcinomů, zároveň exprese molekuly ICAM-1 nebyla prokázána v normální střevní tkáni [97]. V našich experimentech buněčná linie SW480 vykazovala nižší expresi ICAM-1 v porovnání s linií SW620. Stejně tak ICAM-1 byla zvýšeně exprimována v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny v porovnání s buňkami z odpovídajícího primárního tumoru.

Dalšími důležitými molekulami, podílejícími se na nádorové progresi, jsou matrixové metaloproteinázy (MMP). Jedná se o proteolytické enzymy degradující kolagen v ECM a složky bazální membrány jako např. kolagen typu IV, proteoglykany, elastin, laminin a fibronectin. V maligních nádorech je zvýšená exprese MMP spojena se zvýšenou proteolýzou. Exprese MMP na povrchu invazivního tumoru může zprostředkovat interakci mezi buňkami tumoru a fibroblasty. Zvýšená hladina MMP-9 u kolorektálního karcinomu koreluje s agresivitou tumoru a přítomností metastáz v játrech. MMP-9 hraje důležitou roli v migraci nádorových buněk a metastatických procesech právě u kolorektálního karcinomu [98]. Hladina MMP-9 byla významně vyšší u metastatických SW620 v porovnání s buňkami SW480. Zatímco hladina další MMP, MMP-2, byla změněna minimálně. Zvýšená exprese MMP-2 a MMP-9 byla překvapivě zjištěna v buňkách primárního kolorektálního karcinomu, ve všech testovaných vzorcích. Rozdíly pravděpodobně reflektují změny mezi immortalizovanými buněčnými liniemi a buňkami izolovanými z nádorových tkání, které mohou být ovlivněny buňkami okolního stromatu [99].

Mezi významné regulátory genové exprese a to jak v procesech fyziologických, tak i v těch patologických, patří mikroRNA. Během posledních několika let je čím dál jasnější, že miRNA hrají klíčovou roli také v iniciaci a progresi kolorektálního karcinomu. Specifické miRNA mohou mít jak supresivní tak podpurný efekt závislý na buněčném prostředí, ve kterém miRNA vznikají [100]. Např. miR-21 je velmi dobře prostudovaná „onkomiRNA“, která slouží jako marker horší prognózy u různých typů karcinomů, včetně karcinomu prsu, jater, plic a také u kolorektálního karcinomu [101]. Kromě toho je zvýšená hladina miR-21 spojována s nižší chemosenzitivitou a špatnou odpovědí na chemoterapii u pacientů s kolorektálním a plicním karcinomem, zatímco

inhibice miR-21 může zlepšit odpověď na chemoterapii [102, 103]. MiR-21 je také schopna zvýšit buněčnou proliferaci nádorových buněk, vaskulární invazi, extravazaci a metastazování [104]. V našich experimentech byla miR-21 zvýšeně exprimována zejména ve vzorcích s vyšším migračním potenciálem. Exprese další miRNA, miR-31, která je schopná inhibovat lokální invazi, intravaskulární přežití a metastatické kolonizace, byla již dříve popsána v mnoha typech nádorů jako např. u karcinomu prsu, prostaty, ovarií, žaludku, močového měchýře, u kolorektálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu, karcinomu hlavy a krku nebo dlaždicového karcinomu jazyka [104, 28]. V našich experimentech byla miR-31 zvýšeně exprimována pouze v jednom testovaném vzorku, a to u buněk odvozených z primárního kolorektálního karcinomu. Velmi důležitým regulátorem genové exprese je rodina miR-200a, která působí na celou řadu procesů týkajících se buněčné migrace a invazivity. Genovou expresi markerů, podílejících se na těchto procesech, reguluje přes ZEB1/2 v různých typech nádorů. Inhibice miR-200a působí snížení hladiny E-cadherinu, zatímco dochází ke zvýšení hladiny vimentinu a zároveň je podpořena buněčná motilita [105]. Naše studie ukázala ve dvou případech korelaci mezi snížením hladiny miR-200a v buňkách primárního kolorektálního karcinomu a zvýšením hladiny E-cadherinu. U linie kolorektálního karcinomu, ve které byla zjištěna nejvyšší schopnost migrace buněk, byla hladina miR200a významně zvýšena. Dalším důležitým regulátorem u pacientů s kolorektálním karcinomem je miR-29a, jejíž zvýšená hladina byla v séru pacientů s kolorektálním karcinomem prokázána [105]. Stejně tak naše buňky, získané z primárního kolorektálního karcinomu, vykazovaly významně vyšší hladinu miR-29a u většiny testovaných vzorků. Množství miRNA u kolorektálního karcinomu je spojena s diagnózou, prognózou a terapeutickou odpovědí. Všechny námi testované mikroRNA vykazovaly výraznou variabilitu, která však korelovala s expresí markerů týkajících se invazivity a metastazování, jako např. vimentinem a E-cadherinem.

Pokroky v chemoterapii a radioterapii významně zlepšují přežití pacientů. Nicméně pokročilý nebo relabující kolorektální karcinom je stále pomocí konvenční systémové léčby obtížně léčitelný, proto je potřeba nastavit lepší terapeutické podmínky [106]. 5-FU a leukovorin s kombinací s oxaliplatinou se běžně používají pro adjuvantní a paliativní chemoterapii kolorektálního karcinomu [107, 108]. Pozitivní cytotoxický efekt irinotekanu a oxaliplatinu *in vitro* byl již několikrát testován na různých buněčných liniích, jejich citlivost se ale vždy liší [109, 110]. Pilotní data našich experimentů na izolovaných buněčných liniích ukázaly vyšší účinnost irinotekanu na

metastatické buňky v koncentracích srovnatelných s koncentracemi používanými u immortalizovaných buněčných linií. Oxaliplatina působila toxicky pouze ve vyšších koncentracích u metastatických buněk izolovaných z lymfatické uzliny resp. buněk z kolorektálního karcinomu ($IC_{50}=48,23$, resp. $52,23 \mu\text{g/ml}$). Do těchto výsledků se může promítnout celá řada faktorů, jako je např. různá exprese mikroRNA, markerů invazivity, mutace genů, či různá diferenciaci a lokalizace tumoru [111].

V posledních letech reprezentuje cílená terapie nový přístup k léčbě pacientů s kolorektálním karcinomem, ale také slibný prostor pro výzkum molekulárních mechanismů zodpovědných za nádorovou progresi. Inhibice růstu buněk kolorektálního karcinomu linií Caco2 a HT-29 byla pozorována po 48 hodinách expozice $40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentraci těchto léčiv, ale pouze v experimentech u kterých bylo léčivo přidáno k nasazované buněčné suspenzi. Podání cílené terapie za použití stejných podmínek jako pro konvenční chemoterapii na buněčnou proliferaci nemělo žádný efekt [112]. Nami izolované buněčné linie nereagovaly na použitou biologickou léčbu (bevacizumab, cetuximab, panitumumab). Efekt bevacizumabu na buněčnou linii, vzhledem k jeho působení na nádorovou angiogenezi, je pravděpodobně minimální. V primokulturách nepochybně jsou endoteliální buňky, které mohou uvolňovat některé působky, nicméně nezprostředkovávají zde nové cévní zásobení nebo přísun živin jako u tumoru *in vivo*. Absence cytotoxického působení cetuximabu a panitumumabu je lépe vysvětlitelná. Cetuximab a panitumumab je používán v podstatě výhradně v kombinaci s konvenční chemoterapií a na jejich terapeutickém efektu se jistě spolupodílí i nádorové stroma a protinádorová (zejména buněčná) imunita organismu.

V další části studie jsme se zaměřili na studium procesu EMT v našich buněčných liniích. EMT bývá popsána jako klíčový proces růstu maligních tumorů, zvýšené invazivity a tvorby metastáz. Není překvapením, že EMT se objevuje u mnoha solidních tumorů jako např. prsních [113], gastrointestinálních [43], ovariálních [114], plicních, prostatických [115] a mozkových. V případě kolorektálního karcinomu je fenomén EMT znám víc než 20 let. Na toto téma bylo napsáno mnoho prací týkajících se specifických vlastností a souvisejících molekulárních drah. Velmi často se setkáváme s heterogenitou vyskytující se v souvislosti s procesem EMT uvnitř tumorů. Existence různých spekter EMT fenotypů je důvodem, proč je čím dál složitější detekce EMT markerů a predikce vývoje a biologického chování tumoru.

Nádor může být produktem svého mikroprostředí, ve kterém buňky mikroprostředí asociované s nádorem mění proliferační a invazivní vlastnosti

nádorových buněk za pomoci mezibuněčných spojů a díky sekreci signálních molekul jako jsou např. růstové faktory a cytokiny [116]. Fibroblasty znamenají nejranější buněčný typ, který bývá spojen s nádorem uvnitř nádorového mikroprostředí [117]. Role nádorového mikroprostředí a EMT v tvorbě a rozvoji tumoru je zprostředkována dvěma důležitými mechanismy. První je ten, že fibroblasty usnadňují proliferaci buněk v okrajových částech tumoru a podporují EMT progresi za pomoci faktorů jako je IL-6 [118] nebo Tcf21 [119]. Druhým mechanismem je, že léčba pomocí chemoterapeutik mění nádorové mikroprostředí, které podporuje EMT proces a chemorezistenci nádorových buněk.

Na základě těchto faktů byla další část naší studie navržena tak, že byla nejprve charakterizována přítomnost EMT markerů a jejich role v buněčných liniích získaných z nádorové tkáně pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Po otestování širšího spektra buněčných kultur na citlivost k irinotekanu a oxaliplatině jsme se zaměřili na ty, které vykazovaly výrazně vyšší, či naopak výrazně nižší citlivosti k testovaným chemoterapeutikům, a byly získány ze vzorků z nízkce diferencovaných tumorů (G3) a s vyšší pokročilostí primárního tumoru (T3, resp. T4a). Dále jsme porovnávali vliv irinotekanu a oxaliplatinu na biologické chování a expresi EMT markerů v těchto buňkách. Naše získaná data jsou v souladu s akceptovaným konceptem EMT a její role v růstu a invazivitě kolorektálního karcinomu, nicméně vykazují určitou variabilitu. Imunohistochemická analýza ukazuje spíše konzistentní expresi E-cadherinu ve všech analyzovaných vzorcích, přítomnost N-cadherinu a vimentinu v metastatických maligních buňkách je patrná pouze v jednom z testovaných vzorků. Na druhou stranu pokud porovnáme buněčné linie s původní tkání, ze které byly izolovány, metastázy z regionálních uzlin vykazují zvýšenou expresi E-cadherinu, vimentinu a MMP (částečně MMP-9). Toto zvýšení však již není patrné u N-cadherinu a nebylo spojeno ani se zvýšenou motilitou buněk.

Mezi vnitřní faktory podílející se na plasticitě buněk patří nekódující RNA, miRNA. V kolorektálním karcinomu bylo popsáno několik miRNA, které jsou abnormálně exprimovány [120-123], mezi jinými miR-21, miR-135a a miR-135b, které mají protumorigenní efekt [120, 122]. V první části studie bylo otestováno několik mikroRNA zapojených do nádorové progresi u kolorektálního karcinomu. Pro naše další testování jsme se již zaměřili pouze na hladiny miR-21, miR-29a a miR-200a. Tyto miRNy byly v našich experimentech nalezeny v nízkých hladinách u metastatických buněk v porovnání s buňkami z primárního kolorektálního karcinomu,

což odpovídá jejich roli v EMT regulaci, přesněji přes změny v expresi E-cadherinu a/nebo expresi MMP-2. Navíc MMP-9, která je také zapojena do procesu EMT, negativně korelovala s miR-29a ve všech testovaných vzorcích. Další zajímavý trend byl znatelný v případě zvýšené hladiny miR-21, což korelovalo s vyšší expresí vimentinu na úrovni mRNA i proteinu. Celkově tato data potvrzují existenci EMT v buňkách získaných z metastázy do lymfatické uzliny. Rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou patrné a to nejen co se týče exprese EMT markerů, což odpovídá intra- a internádorové heterogenitě.

Již dříve byla popsána souvislost mezi EMT a lékovou rezistencí tumoru [124]. Častým jevem je, že rezistentní buňky jsou více invazivní a stávají se metastatickými v porovnání s buňkami původními, zejména v souvislosti s EMT po ovlivnění chemoterapeutiky [125]. Existuje několik mechanismů, které mohou potlačit signály vedoucí k buněčné smrti, nebo snížit expresi cílových struktur pro léky, a tím vést k chemoresistenci, mimo jiné díky přítomnosti efluxních transportérů v buněčné membráně nádorových buněk [126]. Kolorektální karcinom bývá chemorezistentní k většině chemoterapeutik již od počátku léčby, a tato rezistence koreluje s vysokou expresí P-glykoproteinu (P-gp) a MRP. Například do aktivního efluxu SN-38 a irinotekanu jsou zapojeny P-gp a MRP, což může být důvodem farmakologické modulace [127, 128]. Stejně tak léčba oxaliplatinou bývá spojována se zvýšenou rezistencí zprostředkovanou zvýšenou expresí P-gp v buňkách kolorektálního karcinomu. V našem experimentálním modelu se buňky primárního karcinomu ukázaly jako více citlivé k chemoterapii (irinotekan a oxaliplatina) v porovnání s buňkami metastatickými. Tato zjištění však nekorelují s hladinou P-gp, která byla naměřena významně vyšší ve všech buňkách získaných z primárního nádoru. Stejně tak proteiny MRP1 a MRP2 byly zvýšeně exprimovány pouze v jednom vzorku metastatických buněk. Tyto výsledky ukazují, že alespoň v našich vzorcích nejsou analyzované ABC transportéry pravděpodobně odpovědné za citlivost buněk kolorektálního karcinomu k chemoterapeutikům.

V další části naší studie jsme porovnávali účinek irinotekanu a oxaliplatinu na biologické chování a expresi EMT markerů v párových buněčných liniích kolorektálního karcinomu. Obě použítá chemoterapeutika snižovala motilitu a migrační aktivitu metastatických buněk, přičemž irinotekan působil na tyto buňky účinněji. Významné změny v expresi EMT markerů byly v ovlivněných buňkách znatelné. Zatímco zjištěný inhibiční efekt na expresi N-cadherinu byl konzistentní ve všech

testovaných liniích, a to zejména na úrovni proteinu, hladina E-cadherinu se mezi jednotlivými vzorky lišila. U některých vzorků došlo ke zvýšené expresi E-cadherinu na úrovni proteinu u buněk získaných z metastaticky postižené lymfatické uzliny, u některých byla patrna vyšší, nebo srovnatelná exprese s buňkami získanými z primárního tumoru. Hladina vimentinu nebyla dokonce změněna vůbec. Dynamické změny fenotypu nádorových buněk a exprese výše zmíněných markerů souvisí s probíhající EMT, respektive MET (mesenchymálně-epiteliální tranzicí), které umožňují trvalý růst nádoru a jeho šíření. Významný vliv má i podpůrné stroma, které se na těchto mechanismech podílí [129].

Zajímavým zjištěním je, že potlačení exprese N-cadherinu korelovalo se sníženou migrační aktivitou buněk po ovlivnění irinotekanem i oxaliplatinou. Tyto výsledky podporují naše předchozí zjištění, ve kterých vyšší migrační potenciál odpovídal vyšší hladině N-cadherinu. Změna E-cadherinu na N-cadherin bývá často pozorována u agresivních nádorů a exprese N-cadherinu je často spojována s migrací transformovaných epiteliálních buněk [130]. Naše experimenty ukázaly, že účinek irinotekanu a oxaliplatiny se může podílet na snížení migračního potenciálu buněk.

Účinek irinotekanu a oxaliplatiny na expresi sledovaných miRNA nezaznamenal výraznější změny. Jediná významná sledovaná změna se týkala zvýšené hladiny miR29a a s tím související potlačení exprese MMP-2 a MMP-9, které se podílí na degradaci extracelulární matrix a tím ovlivňují migraci a invazivitu nádorových buněk.

Celkem vzato, naše výsledky vykazují výraznou variabilitu nejen v citlivosti na použitá chemoterapeutika, ale také variabilitu v expresi EMT markerů ve všech našich studovaných vzorcích, stejně tak jejich změny v expresi po ovlivnění chemoterapeutiky. Tato variabilita je pravděpodobně výsledkem rozdílného stagingu, gradingu a interindividuální heterogenity vzorků, ale také rozdílem v dynamice EMT procesů. Zatímco buňky izolované z primárních tumorů získaly mezenchymální charakteristiky, tedy schopnost invadovat a metastazovat, metastatické buňky tyto charakteristiky ztrácely a vracely se ke svému původnímu fenotypu, nazývanému mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET). Jiným důvodem pozorované variability může být také intratumorální heterogenita a přítomnost fibroblastů asociovaných s tumorem a dalších typů buněk, které zůstaly zachovány z důvodu použití mechanické disociace nádorových vzorků. I když tento přístup přináší některé komplikace, na druhou stranu ale přispívá k pochopení procesů, které se podílí na nádorové progresi na

experimentální úrovni, protože zachovává původní složení nádorové tkáně, což lépe odráží situaci *in vivo*.

8 Závěr

V disertační práci jsem se zabýval studiem buněčných linií z kolorektálního karcinomu a jeho metastázy do regionální lymfatické uzliny, jejich charakterizací na úrovni mikroRNA, mRNA a proteinů a testováním jejich citlivosti k běžně používaným chemoterapeutikům. Dosažené výsledky lze shrnout do následujících závěrů.

- Pro izolaci buněčných kultur z kolorektálního karcinomu a jeho metastázy do regionální lymfatické uzliny byla zvolena jednoduchá, nenákladná metoda založená na mechanické disociaci. Celkově byly získány resekáty od šedesáti pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva. Naším záměrem bylo odebrat z každého resekátu jeden vzorek z primárního tumoru a jeden vzorek z lymfatické uzliny. Z primárních tumorů bylo získáno 58 vzorků. 36 vzorků bylo získáno z regionálních lymfatických uzlin. Z primárních nádorů bylo získáno 26 primokultur s úspěšností 45 % (26/58); z odebraných lymfatických uzlin bylo získáno 17 primokultur s úspěšností 47 % (17/36). Téměř polovina odebraných lymfatických uzlin však nebyla histologicky metastaticky postižena. Reálná úspěšnost izolace buněčných kultur z metastaticky postižených lymfatických uzlin byla vyšší; 74 % (14/19). Izolace buněčných kultur z primárního tumoru a zároveň i z lymfogenní metastázy se podařila v deseti případech. Nejefektivnější izolace nádorových buněk z primárního tumoru byla pozorována u níže diferencovaných tumorů (Grade 3) a u lokálně pokročilých tumorů (T3 a T4a,b). Tumory s histologicky zjištěnou angioinvasí a perineurálním šířením byly spojeny s vyšší úspěšností izolace, zejména u linií z lymfogenních metastáz. Nejúspěšnější izolace nádorových buněk z lymfogenních metastáz byla zaznamenána u vzorků s vyšší lokální pokročilostí tumoru (T3 a T4a,b) a u nádorů s postižením většího počtu lymfatických uzlin.

- Monoklonální protilátky se pro náš testovaný model ukázaly být neefektivní, proto jsme se zaměřili na testování oxaliplatinu a irinotekanu. Citlivost jednotlivých buněčných linií k oběma testovaným chemoterapeutikům se významně lišila. Tato variabilita je pravděpodobně výsledkem rozdílného stagingu, gradingu a interindividuální heterogenity vzorků. Dalším důvodem může být přítomnost fibroblastů asociovaných s tumorem a dalších typů buněk, které zůstaly zachovány z důvodu použití mechanické disociace nádorových vzorků.

- Porovnáním účinku irinotekanu a oxaliplatiny na biologické chování a expresi EMT markerů v párových buněčných liniích kolorektálního karcinomu bylo zjištěno, že obě použítá chemoterapeutika snižovala motilitu a migrační aktivitu metastatických buněk, přičemž irinotekan působil na tyto buňky účinněji.

- V testovaných buněčných liniích byly dále pozorovány významné korelace mezi hladinami mikroRNA, expresí EMT markerů a biologickým chováním testovaných buněčných linií, i když se mezi jednotlivými vzorky projevovala výrazná heterogenita. Nejen že se množství mikroRNA lišilo mezi buňkami metastatickými a buňkami získanými z primárního nádoru, u miR-21, miR-200a a miR-29a byly navíc zjištěny významné regulace exprese E-cadherinu, vimentinu a také změny v buněčné motilitě.

Dosažené výsledky doplňují a rozšiřují základní poznatky o vlastnostech a chování buněčných linií získaných z kolorektálního karcinomu a regionální lymfatické uzliny a popisují mechanismy, jimiž nádorové buňky překonávají buněčnou smrt. I když námi zvolený postup izolace přináší některé komplikace, přispívá k pochopení procesů, které se podílí na nádorové progresi na experimentální úrovni, protože zachovává původní složení nádorové tkáně, čímž lépe odráží situaci *in vivo*, což by mohlo v budoucnu zefektivnit léčebné strategie používané k léčbě kolorektálního karcinomu. Pro posouzení potenciálního přínosu však bude zapotřebí více experimentů na širším spektru vzorků.

9 Použitá literatura

1. Bosman FT, C.F., Hruban RH, Theise ND, et al., *WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th (edn)*. Lyon: IARC Press, 2010: p. 134-146.
2. *Epidemiologie kolorektálního karcinomu*, www.svod.cz (staženo 20.8.2017).
3. *Colon cancer - symptoms and causes*, <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/dxc-20188239> (Staženo, 28.8.2017).
4. Das, V., J. Kalita, and M. Pal, *Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges*. Biomed Pharmacother, 2017. **87**: p. 8-19.
5. Faltejsová, P., et al., *MikroRNA u kolorektálního karcinomu*, in *MikroRNA v onkologii*. 2012, Galén. p. 105-126.
6. Mundade, R., et al., *Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer*. Oncoscience, 2014. **1**(6): p. 400-6.
7. Povýšil, C. and I. Šteiner, *Obecná patologie*. Vol. 1. vydání. 2011: Galén. 290.
8. Slabý, O., *MikroRNA: historie, definice, biogeneze a funkce*, in *MikroRNA v onkologii*. 2012, Galén. p. 105-126.
9. Mlcochova, J., et al., *MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. Oncotarget, 2015. **6**(36): p. 38695-704.
10. Batlle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
11. Dews, M., et al., *The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 8233-46.
12. Cheng, H., et al., *Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17745.
13. Koga, Y., et al., *MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(11): p. 1435-42.
14. Vychytilova-Faltejsova, P., et al., *Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer*. Carcinogenesis, 2016. **37**(10): p. 941-950.
15. Andreoli, S.C.d.S., et al., *Use of microRNAs in directing therapy and evaluating treatment response in colorectal cancer*. Einstein, 2014. **12**(2): p. 256-258.
16. Minárik, M., *Molekulární profilování nádorů plic*. Onkologie, 2016. **10**(1): p. 7-10.
17. Chatterjee, A., E.J. Rodger, and M.R. Eccles, *Epigenetic drivers of tumorigenesis and cancer metastasis*. Semin Cancer Biol, 2018. **51**: p. 149-159.
18. HOFMANOVÁ, J., *Genotoxicita a karcinogeneze [online]*. 2013 [cit. 2018-01-11], Masarykova univerzita.
19. Gheldof, A. and G. Berx, *Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **116**: p. 317-36.
20. Matejka, V.M., J. Finek, and M. Kralickova, *[Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer]*. Klin Onkol. **30**(1): p. 20-27.
21. Gerber, B., et al., *Circulating tumor DNA as a liquid biopsy in plasma cell dyscrasias*. Haematologica, 2018. **103**(6): p. e245-e248.
22. Weidle, U.H., et al., *The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis*. Cancer Genomics Proteomics, 2017. **14**(1): p. 1-15.
23. Aguado, B.A., et al., *Engineering the pre-metastatic niche*. Nature Biomedical Engineering, 2017. **1**: p. 0077.
24. Liu, C., et al., *Sessile serrated adenomas with dysplasia: morphological patterns and correlations with MLH1 immunohistochemistry*. Mod Pathol, 2017. **30**(12): p. 1728-1738.

25. Falt, P., P. Fojtík, and K. Martin, *Gastrointestinální polypózní syndromy*. Interni medicina pro praxi, 2010. **11**(12): p. 558-560.
26. Rex, D.K., et al., *Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(9): p. 1315-29; quiz 1314, 1330.
27. Carballal, S., et al., *Colorectal cancer risk factors in patients with serrated polyposis syndrome: a large multicentre study*. Gut, 2016. **65**(11): p. 1829-1837.
28. Wang, J., et al., *Cronkhite-Canada syndrome associated with colon cancer metastatic to liver: A case report*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(38): p. e7466.
29. Zhu, X., et al., *A case of recurrent Cronkhite-Canada syndrome containing colon cancer*. Int Surg, 2015. **100**(3): p. 402-7.
30. Plevova, P., et al., [*Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*]. Klin Onkol, 2009. **22** Suppl: p. S12-5.
31. *TNM Klasifikace zhoubných novotvarů, 7. vydání*. 2011, ÚZIS ČR. p. 246.
32. Suchanek, S., et al., *Colorectal cancer prevention in the Czech Republic: time trends in performance indicators and current situation after 10 years of screening*. Eur J Cancer Prev, 2014. **23**(1): p. 18-26.
33. Ondřej, U., *Endoskopická léčba časných kolorektálních neoplazií*. Onkologie, 2013. **7**(4): p. 183-187.
34. Kala, Z., et al., *Moderní trendy v chirurgii kolorektálního karcinomu aneb co by měl onkolog vědět o práci chirurga*. Onkologie, 2017. **11**(2): p. 54-60.
35. Ryska, M. and D. Langer, *Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu*. Onkologie, 2013. **7**(4): p. 179-182.
36. *Modrá kniha České onkologické společnosti*. Vol. 23. aktualizace. 2017: Masarykův onkologický ústav.
37. *Protokol pro léčbu karcinomu tlustého střeva - Klinika onkologie a radioterapie FNHK*, Editor. verze 2013.
38. Dagmar Lincová, H.F., *ZÁKLADNÍ A APLIKOVANÁ FARMAKOLOGIE Druhé, doplněné a přepracované vydání*. Vol. 2. vydání. 2007: Galén. 672.
39. Kiss, I., J. Tomášek, and J. Halámková, *Biologická léčba kolorektálního karcinomu*. Remedia, 2008. **18**: p. 28-34.
40. Finek, J., *Aflibercept v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu*. Remedia, 2015. **25**(4): p. 280-282.
41. Obermannová, R.K., I. , et al., *Regorafenib v léčbě kolorektálního karcinomu, Studie CORRECT a vlastní zkušenosti s léčbou regorafenibem v Masarykově onkologickém ústavu*. Remedia, 2014. **24**: p. 419-424.
42. Dvořák, J., et al., *Trifluridin/tipiracil v léčbě pacientů s refrakterním metastatickým kolorektálním karcinomem - první klinické zkušenosti*. Onkologie, 2017. **11**(2): p. 88-91.
43. Findlay, V.J., et al., *SNAI2 modulates colorectal cancer 5-fluorouracil sensitivity through miR145 repression*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(11): p. 2713-26.
44. Arnold, C.N., A. Goel, and C.R. Boland, *Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines*. Int J Cancer, 2003. **106**(1): p. 66-73.
45. Shi, X., et al., *Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes*. Oncology, 2002. **62**(4): p. 354-62.
46. Violette, S., et al., *Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status*. Int J Cancer, 2002. **98**(4): p. 498-504.
47. Huang, Z., et al., *Stress management by autophagy: Implications for chemoresistance*. Int J Cancer, 2016. **139**(1): p. 23-32.

48. Crea, F., et al., *Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: an opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies*. Drug Resist Updat, 2011. **14**(6): p. 280-96.
49. Loe, D.W., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(6): p. 945-57.
50. Longley, D.B. and P.G. Johnston, *Molecular mechanisms of drug resistance*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 275-92.
51. Hu, T., et al., *Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies*. World Journal of Gastroenterology, 2016. **22**(30): p. 6876-6889.
52. Duan, H., et al., *Potent and Selective Inhibition of Plasma Membrane Monoamine Transporter by HIV Protease Inhibitors*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(11): p. 1773-80.
53. International Transporter, C., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
54. Fu, D. and I.M. Arias, *Intracellular trafficking of P-glycoprotein*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(3): p. 461-4.
55. Meschini, S., et al., *Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells*. Int J Cancer, 2000. **87**(5): p. 615-28.
56. Spoelstra, E.C., et al., *P-glycoprotein drug efflux pump involved in the mechanisms of intrinsic drug resistance in various colon cancer cell lines. Evidence for a saturation of active daunorubicin transport*. Biochem Pharmacol, 1991. **41**(3): p. 349-59.
57. Lewis, A.D., et al., *Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines*. Br J Cancer, 1989. **60**(3): p. 327-31.
58. Vacchelli, E., et al., *Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers*. Oncoimmunology, 2013. **2**(3): p. e23510.
59. Burk, U., et al., *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells*. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 582-9.
60. Schmalhofer, O., S. Brabletz, and T. Brabletz, *E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 151-66.
61. Tsanou, E., et al., *The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach*. Anticancer Res, 2008. **28**(6A): p. 3815-26.
62. Jackstadt, R. and H. Hermeking, *MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1849**(5): p. 544-53.
63. Jiang, H., et al., *Diverse roles of miR-29 in cancer (review)*. Oncol Rep, 2014. **31**(4): p. 1509-16.
64. Slaby, O., et al., *MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 102.
65. Ikeguchi, M., et al., *Reduced E-cadherin expression and enlargement of cancer nuclei strongly correlate with hematogenic metastasis in colorectal adenocarcinoma*. Scand J Gastroenterol, 2000. **35**(8): p. 839-46.
66. Lugli, A., et al., *Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis*. Histopathology, 2007. **50**(4): p. 453-64.
67. Roca, F., et al., *Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma*. J Surg Oncol, 2006. **93**(2): p. 151-60.
68. Ye, Z., et al., *Expression of lncRNA-CCAT1, E-cadherin and N-cadherin in colorectal cancer and its clinical significance*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(3): p. 3707-15.
69. Li, J., et al., *Chemoresistance to doxorubicin induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of transforming growth factor beta signaling in HCT116 colon cancer cells*. Mol Med Rep, 2015. **12**(1): p. 192-8.

70. Yang, A.D., et al., *Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4147-53.
71. Vejražka, M. *Buněčné kultury - Bioprojekty* <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf> (staženo 10.10.2017).
72. Mitra, A., L. Mishra, and S. Li, *Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy*. Trends in biotechnology, 2013. **31**(6): p. 347-354.
73. Freshney, R.I., *Primary Culture*, in *Culture of Animal Cells*. 2010, John Wiley & Sons, Inc. p. 163-186.
74. Ljung, B.M., et al., *Cell dissociation techniques in human breast cancer--variations in tumor cell viability and DNA ploidy*. Breast Cancer Res Treat, 1989. **13**(2): p. 153-9.
75. Mitaka, T., *The current status of primary hepatocyte culture*. Int J Exp Pathol, 1998. **79**(6): p. 393-409.
76. Burke, Z.D., et al., *Isolation and culture of embryonic pancreas and liver*. Methods Mol Biol, 2010. **633**: p. 91-9.
77. Li, W.C., K.L. Ralphs, and D. Tosh, *Isolation and culture of adult mouse hepatocytes*. Methods Mol Biol, 2010. **633**: p. 185-96.
78. Chougule, P., et al., *Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method*. Scand J Gastroenterol, 2012. **47**(11): p. 1334-43.
79. Cree, I.A., *Isolation and culture of colon cancer cells and cell lines*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* I.A. Cree, Editor. 2011. p. 135-140.
80. Glaysher, S. and I.A. Cree, *Principles of cancer cell culture*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* I.A. Cree, Editor. 2011. p. 13-26.
81. Reid, Y.A., *Characterization and authentication of cancer cell lines: An overview*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* I.A. Cree, Editor. 2011. p. 35-43.
82. Ševčíková, S. and J. Kohoutek, *Modelové systémy v molekulární medicíně*, in *Molekulární medicína*, O. Slabý, Editor. 2015, Galén. p. 157-178.
83. Huang, Y., et al., *Investigation of Cross-Contamination and Misidentification of 278 Widely Used Tumor Cell Lines*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170384.
84. Parker, K.A., *Storage of Cell Lines*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, I.A. Cree, Editor. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 27-34.
85. Loret, S., et al., *Preliminary characterization of jejunocyte and colonocyte cell lines isolated by enzymatic digestion from adult and young cattle*. Res Vet Sci, 2009. **87**(1): p. 123-32.
86. Rusu, D., et al., *Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures*. BMC Cell Biol, 2005. **6**: p. 42.
87. Cunningham, R.E., *Tissue disaggregation*. Methods Mol Biol, 2010. **588**: p. 327-30.
88. Achen, M.G. and S.A. Stacker, *Molecular control of lymphatic metastasis*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1131**: p. 225-34.
89. Royston, D. and D.G. Jackson, *Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma*. J Pathol, 2009. **217**(5): p. 608-19.
90. Medico, E., et al., *The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7002.
91. Ray, S., et al., *Establishment of human ultra-low passage colorectal cancer cell lines using spheroids from fresh surgical specimens suitable for in vitro and in vivo studies*. J Cancer, 2012. **3**: p. 196-206.
92. Hewitt, R.E., et al., *Validation of a model of colon cancer progression*. J Pathol, 2000. **192**(4): p. 446-54.
93. Nakajima, S., et al., *N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4125-33.

94. Paschos, K.A., D. Canovas, and N.C. Bird, *The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis*. Cell Signal, 2009. **21**(5): p. 665-74.
95. Maeda, K., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer*. Oncol Rep, 2002. **9**(3): p. 511-4.
96. Schellerer, V.S., et al., *Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes*. Oncol Rep, 2014. **31**(1): p. 255-61.
97. Kelly, C.P., et al., *Human colon cancer cells express ICAM-1 in vivo and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion in vitro*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 1): p. G864-70.
98. Zhang, Y.Y., B. Chen, and Y.Q. Ding, *Metastasis-associated factors facilitating the progression of colorectal cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(6): p. 2437-44.
99. Zucker, S. and J. Vacirca, *Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 101-17.
100. Schetter, A.J., H. Okayama, and C.C. Harris, *The role of microRNAs in colorectal cancer*. Cancer J, 2012. **18**(3): p. 244-52.
101. Chen, H., et al., *Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers*. J Cancer, 2016. **7**(5): p. 490-9.
102. Kheirelseid, E.A.H., et al., *Clinical applications of gene expression in colorectal cancer*. J Gastrointest Oncol, 2013. **4**(2): p. 144-57.
103. Slaby, O., et al., *MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application*. Molecular Cancer, 2009. **8**(1): p. 102.
104. Triulzi, T., et al., *microRNA: New Players in Metastatic Process*. Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic. 2013.
105. Chan, S.H. and L.H. Wang, *Regulation of cancer metastasis by microRNAs*. J Biomed Sci, 2015. **22**: p. 9.
106. Berrino, F., et al., *Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EURO CARE-4 study*. The Lancet Oncology, 2007. **8**(9): p. 773-783.
107. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803*. J Clin Oncol, 2007. **25**(23): p. 3456-61.
108. Van Cutsem, E., et al., *Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3*. J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3117-25.
109. Arnould, S., et al., *Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines*. Eur J Cancer, 2003. **39**(1): p. 112-9.
110. Ikehata, M., et al., *Different Effects of Epigenetic Modifiers on the Cytotoxicity Induced by 5-Fluorouracil, Irinotecan or Oxaliplatin in Colon Cancer Cells*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2014. **37**(1): p. 67-73.
111. O'Connell, M.J., *Oxaliplatin or irinotecan as adjuvant therapy for colon cancer: the results are in*. J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3082-4.
112. Luca, T., et al., *In vitro combined treatment with cetuximab and trastuzumab inhibits growth of colon cancer cells*. Cell Prolif, 2014. **47**(5): p. 435-47.
113. Mallini, P., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(3): p. 341-8.
114. Gupta, N., et al., *Notch3 induces epithelial-mesenchymal transition and attenuates carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells*. Gynecol Oncol, 2013. **130**(1): p. 200-6.
115. Zhao, J., et al., *Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer*. Int Braz J Urol, 2014. **40**(2): p. 179-89.

116. Liotta, L.A. and E.C. Kohn, *The microenvironment of the tumour-host interface*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 375-9.
117. Spano, D. and M. Zollo, *Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process*. Clin Exp Metastasis, 2012. **29**(4): p. 381-95.
118. Guan, J., et al., *Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells*. Cancer Lett, 2014. **345**(1): p. 132-9.
119. Acharya, A., et al., *The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors*. Development, 2012. **139**(12): p. 2139-49.
120. Bandres, E., et al., *Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 29.
121. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.
122. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(14): p. 5795-802.
123. Shi, B., et al., *Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32582-90.
124. Sui, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance: role, molecular mechanisms, and therapeutic strategies*. Oncol Res Treat, 2014. **37**(10): p. 584-9.
125. Thomson, S., et al., *Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9455-62.
126. Sui, H., Z.Z. Fan, and Q. Li, *Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells*. J Int Med Res, 2012. **40**(2): p. 426-35.
127. Chu, X.Y., et al., *Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(2): p. 735-41.
128. Xu, Y. and M.A. Villalona-Calero, *Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity*. Ann Oncol, 2002. **13**(12): p. 1841-51.
129. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
130. Shih, W. and S. Yamada, *N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 15): p. 3661-70.

10 Seznam popisů tabulek a obrazové dokumentace

10.1 Tabulky

Tab. č. 1: Varianty adenokarcinomu a jiné typy karcinomů kolorekta [1].

s. 28

Tab. č. 2: Histologický stupeň diferenciaci = Grading tumoru (G), adaptace na karcinom kolorekta [1].

s. 34

Tab. č. 3: pTNM klasifikace; pokročilost primárního tumoru (T), adaptace na karcinom kolorekta.

s. 35

Tab. č. 4: pTNM klasifikace; postižení lymfatických uzlin (N), adaptace na karcinom kolorekta.

s. 35

Tab. č. 5: pTNM klasifikace; přítomnost vzdálených metastáz (M), adaptace na karcinom kolorekta.

s. 35

Tab. č. 6: Zjednodušené rozdělení do klinických a terapeutických stadií.

s. 37

Tab. č. 7: Úspěšnost izolace buněčných linií z primárního tumoru a z regionální lymfatické uzliny v závislosti na histologických parametrech kolorektálního karcinomu.

s. 73

Tab. č. 8: Stanovení genetických mutací *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *TP53* a *PIK3CA* na molekulární úrovni u pacientů s kolorektálním karcinomem.

s. 75

Tab. č. 9: Vliv mutace *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *TP53* a *PIK3CA* na úspěšnost izolace primokultur z primárního tumoru a lymfogenní metastázy.

s. 76

Tab. č. 10: Základní histologická charakteristika vzorků určených pro izolaci buněčných kultur.

s. 78

Tab. č. 11: Relativní množství mRNA vybraných molekul zapojených do buněčných adhezí a progrese (MMP2, MMP9, EpCAM, ICAM-1, N-cadherin, E-cadherin a β -catenin) u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B, 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A) u čtyř pacientů a u immortalizovaného modelu SW480 a SW620. Data byla stanovena pomocí RT-PCR.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr hodnot \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny; resp. SW480 vs. SW620. **s. 83**

Tab. č. 12: Relativní množství vybraných miRNA zapojených do buněčných adhezí a progresu (miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b, miR200a) u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B a 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A), získaných od čtyř pacientů a u immortalizovaného modelu SW480 a SW620. Exprese byla stanovena pomocí RT-PCR. Data jsou vyjádřena jako průměr hodnot \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny; resp. SW480 vs. SW620. **s. 84**

Tab. č. 13: Hodnoty IC₅₀ chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastázy do lymfatické uzliny po 30 hodinách inkubace. **s. 87**

Tab. č. 14: Hodnoty IC₅₀ chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu u immortalizovaných buněčných linií HT29, CaCo2, SW480 a SW620, u nenádorové linie CCD-112CoN a u buněčných linií izolovaných od pacientů z primárního tumoru (B) a z metastaticky postižené lymfatické uzliny (A). **s. 88**

Tab. č. 15: Základní histologická charakteristika vzorků určených pro izolaci buněčných kultur. **s. 88**

10.2 Obrázky

Obr. č. 1: Srovnání incidence kolorektálního karcinomu v ČR s ostatními zeměmi světa podle ASR-W. **s. 9**

Obr. č. 2: Srovnání incidence kolorektálního karcinomu v ČR s ostatními zeměmi světa; přepočteno na 100 000 obyvatel. **s. 10**

Obr. č. 3: Srovnání mortality kolorektálního karcinomu mezi ČR a ostatními zeměmi světa podle ASR-W. **s. 10**

Obr. č. 4: Srovnání mortality kolorektálního karcinomu mezi ČR a ostatními zeměmi světa; přepočteno na 100 000 obyvatel. **s. 11**

Obr. č. 5: Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR; vývoj v čase; konkrétní počty případů. **s. 11**

Obr. č. 6: Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR u mužů; vývoj v čase; konkrétní počty případů. **s. 12**

Obr. č. 7: Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu v ČR u žen; vývoj v čase; konkrétní počty případů. **s. 12**

Obr. č. 8 : Genetické dráhy vzniku kolorektálního karcinomu (převzato a upraveno [6]).
s. 16

Obr. č. 9: Metastatická kaskáda nádorových buněk (převzato a upraveno [18]).
s. 24

Obr. č. 10: Mykotická kontaminace primokultury kolorektálního karcinomu.
s. 49

Obr. č. 11: Pomůcky pro odběr materiálu z nefixovaného resektátu tlustého střeva – sterilní rouška (modrá), rukavice, skalpel, pinzeta, obličejová rouška, označené zkumavky s transportním médiem. **s. 52**

Obr. č. 12: Odběr materiálu z nefixovaného resektátu tlustého střeva - z lymfatické uzliny (A) z perikolického tuku a tumoru ze serózní strany tlustého střeva (B).
s. 52

Obr. č. 13: Pomůcky pro zpracování kultury v laminárním boxu - materiál z tumoru, lymfatické uzliny a nenádorového sliznice střeva v transportním médiu (vlevo); sterilní pinzeta a skalpel; Petriho miska; kultivační lahve; kultivační médium; mikroskopické zkumavky s Trizolem a plynový kahan. **s. 53**

Obr. č. 14: Rozmělnění materiálu z lymfatické uzliny v kultivačním médiu v Petriho misce (A). Materiál z lymfatické uzliny v kultivační lahvi (B). **s. 54**

Obr. č. 15: Z většiny odběrů byly získány tři mikrozkuřavky, které byly uloženy do hlubokomrazicího boxu a dvě kultivační lahve, které byly umístěny do inkubátoru.

s. 54

Obr. č. 16: Mikroskopie buněk izolovaných z primárního tumoru a jejich metastázy do lymfatické uzliny ve fázovém kontrastu (zvětšení 200x). **s. 56**

Obr. č. 17: Výsledek detekce mykoplazmové infekce buněčných kultur izolovaných z primárního kolorektálního karcinomu a metastázy do lymfatické uzliny (1B, 4B, 4A, 20B a 20A). **s. 58**

Obr. č. 18: Výsledky měření RIN čísla (RNA integrity number) u vybraných vzorků buněčných kultur (54B, 48B) kontrolních a ovlivněných irinotekanem, či oxaliplatinou pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer. Nejvhodnější pro následnou RT-PCR analýzu jsou vzorky s RIN číslem v rozmezí 9 – 10. U většiny našich vzorků byla hodnota RIN čísla = 10. **s. 62**

Obr. č. 19: Mikrotitrační destička s kalibrační křivkou a testovanými vzorky pro stanovení množství proteinů metodou BCA. **s. 67**

Obr. č. 20: Sada na vertikální SDS-PAGE elektroforézu, elektroforetická vana (vlevo), zdroj (vpravo). **s. 68**

Obr. č. 21: Blotovací sendvič sestavený z blotovací houbičky, filtračního papíru, gelu a PVDF membrány (nahore); blotovací sendvič vložený do blotovacího nástavce a blotovací vany s ledem (dole). **s. 70**

Obr. č. 22: Cytospinový preparát primokultury odvozené z lymfogenní metastázy (May-Grünwald-Giemsa, 200x, cytospin) (A). Imunocytochemický průkaz koktejlu cytokeratinů AE1/AE3 ukazuje pozitivitu ve většině kultivovaných buněk. Ostatní elementy jsou fibroblasty, endotelie a lymfocyty (200x, cytospin) (B). **s. 74**

Obr. č. 23: Imunohistochemická analýza – histologické řezy rozhraní mezi normální střevní sliznicí a kolorektálním karcinomem (označeno šipkou) - levá strana (A,B,C,D). Imunocytochemická analýza (kultura č. 20B) – buňky primokultury izolované z kolorektálního karcinomu: pravá strana (a,b,c,d). Imunohistochemické (popř. imunocytochemické) barvení: A,a – β -catenin (patrná membránová exprese); B,b –

BRAF V600E (negativní exprese); C,c – Ki67 (zvýšená exprese v tumoru); D,d – p53 (zvýšená jaderná exprese v nádoru). **s. 77**

Obr. č. 24: Porovnání schopnosti migrace u čtyř různých linií izolovaných z primárního tumoru (4B, 20B, 30B, 34B) a linií z odpovídajících metastáz do lymfatických uzlin (4A, 20A, 30A, 34A). Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 a SW620, tedy model buněk kolorektálního karcinomu a buněk z metastáz do lymfatické uzliny odebrané od stejného pacienta. Data jsou vyjádřena jako průměr buněčného indexu \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. Buněčný index odpovídá nárůstu počtu buněk prošlých přes semipermeabilní membránu. **s. 79**

Obr. č. 25: Expresse MMP2 a MMP9 na úrovni mRNA v buňkách primárního kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B, 34B) a buňkách jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A) byla stanovena pomocí RT PCR. Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = buňky primárního kolorektálního karcinomu vs. buňky z jejich metastázy do lymfatické uzliny. **s. 81**

Obr. č. 26: Porovnání exprese molekul zapojených do buněčné adheze a progresu (N-cadherin, E-cadherin, EpCAM, ICAM-1 a β -catenin) na úrovni mRNA a proteinu u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastázy do lymfatické uzliny u čtyř pacientů. Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Expresse molekul na úrovni mRNA byla stanovena pomocí RT-PCR a na úrovni proteinů western blot analýzou. Měření bylo provedeno v duplikátech a dvou nezávislých experimentech. * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny.

s. 82

Obr. č. 27: Porovnání relativní exprese vybraných miRNA souvisejících s buněčnou adhezí a progresí (miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b a miR-200a) u buněčných linií izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B a 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A), získaných od čtyř pacientů. Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Data byla stanovena pomocí RT-PCR. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní

množství \pm SD jako průměr z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny.

s. 85

Obr. č. 28: Porovnání životnosti buněk izolovaných z primárního nádoru a buněk z uzlinové metastázy po ovlivnění adjuvantní terapií (irinotekanem, oxaliplatinou) a biologickou léčbou (bevacizumabem, cetuximabem a panitumumabem) po dobu 30 hodin. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí WST analýzy. Data jsou vyjádřena jako procenta neovlivněné kontroly. * $p < 0,05$ = buňky izolované z kolorektálního karcinomu vs. buňky izolované z jejich metastázy do lymfatické uzliny; # $p < 0,05$ = buňky ovlivněné chemoterapií vs. neovlivněná kontrola. **s. 86**

Obr. č. 29: Imunohistochemická analýza – stanovení exprese molekul podílejících se na nádorové progresi ve třech primárních kolorektálních karcinomech (vzorek č. 42, 44 a 54) a třech metastaticky postižených lymfatických uzlinách získaných od stejného pacienta. Pro stanovení byly použity primární protilátky specifické pro E-cadherin, N-cadherin a vimentin. Zvětšení 200x. **s. 92**

Obr. č. 30: Porovnání exprese MDR1, MRP1 a MRP2 v buňkách primárního kolorektálního karcinomu (42B, 44B, 54B) a buněk z jejich metastáz do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) izolovaných z nádorů od tří pacientů. Pro porovnání byly použity immortalizované buněčné linie SW480 a SW620. Hladiny proteinů MDR1, MRP1 a MRP2 byly stanoveny metodou western blot. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. * $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu. **s. 93**

Obr. č. 31: Porovnání schopnosti migrace buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (B) a buněk izolovaných z jejich metastázy do lymfatické uzliny (A), získané z nádorové tkáně od tří pacientů (42, 44, 54), po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou (použitá koncentrace odpovídá hodnotě IC₅₀). Migrační assay byla provedena pomocí analýzy v čase přístrojem x-CELLigence. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD z posledního bodu měření z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = irinotekan a oxaliplatin vs. neovlivněná kontrola; n.d. = nedetekovatelné. **s. 94**

Obr. č. 32: Porovnání rozdílu exprese mRNA vybraných molekul zapojených do nádorové progresie v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a buněk z jejich primárních tumorů (42B, 44B, 54B). mRNA exprese E-cadherinu, N-cadherinu, MMP2, MMP9 a vimentinu byla stanovena pomocí RT PCR. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako relativní množství \pm SD. # $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu. **s. 95**

Obr. č. 33: Porovnání rozdílu hladin miRNA zapojených do nádorové progresie v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a buněk z jejich primárních tumorů (42B, 44B, 54B). Hladiny miR-21, miR-29a, miR-200a byly stanoveny pomocí RT PCR. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako relativní množství \pm SD. # $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu.

s. 96

Obr. č. 34: Porovnání relativního množství miRNA souvisejícího s nádorovou progresí (miR-21, miR-29a, miR-200a) po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou v metastatických nádorových buňkách z lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a v buňkách kolorektálního karcinomu (42B, 44B, 54B) izolovaných z tumorů od tří pacientů a v imortalizovaných buňkách SW620 a SW480. Exprese byla stanovena pomocí RT-PCR analýzy. Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou experimentů. * $p < 0,05$ = metastatické nádorové buňky z lymfatické uzliny vs. buňky kolorektálního karcinomu. **s. 97**

Obr. č. 35: Porovnání změn v relativní expresi molekul souvisejících s nádorovou progresí (E-cadherin, N-cadherin, MMP2, MMP9 a vimentin) na úrovni mRNA a proteinů po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou v buňkách z metastázy do lymfatické uzliny (A) a v buňkách kolorektálního karcinomu (B) izolovaných z tumorů od tří pacientů (vzorek č. 42- (a); č. 44 – (b); č. 54 – (c)); a buněk imortalizovaných SW480 a SW620 (d). Exprese byla stanovena pomocí RT-PCR (množství mRNA) a pomocí western blot analýzy (množství proteinu). Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou experimentů. * $p < 0,05$ = metastatické nádorové buňky z lymfatické uzliny vs. buňky kolorektálního karcinomu. **s. 98**

11 Poděkování

Tato práce vznikla za podpory programů IGA MZ ČR (NT 14150-3/2013) a GAČR (17-10331S)

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Ivo Šteinerovi, CSc. a školiteli konzultantovi prof. MUDr. Aleši Ryškovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu a cenné připomínky k dokončení disertační práce.

Především bych rád poděkoval RNDr. Veronice Skarkové, Ph.D. z Ústavu lékařské biologie a genetiky LF HK UK za extrémní trpělivost, nápaditost při experimentech a nedocenitelnou pomoc při psaní práce. Velmi ji děkuji a cením si vlídných slov podpory a někdy i ostřejších slov, bez kterých by nedošlo k dokončení této práce.

Děkuji chirurgům z kolorektální skupiny Chirurgické kliniky FN HK za zasílání nativních preparátů a vyplňování informovaných souhlasů pacientů. Rád bych poděkoval i MUDr. Stanislavu Johnovi z Kliniky onkologie a radioterapie FN HK za chemoterapeutika pro experimenty.

Velké díky patří nejlepší laborantce FÚP Světlaně Kopecké za příkladnou starostlivost o buněčné kultury, obdobně bych chtěl poděkovat i laborantkám Ústavu lékařské biologie a genetiky LF HK UK.

Rád bych poděkoval i RNDr. Haně Vošmikové a RNDr. Kateřině Rozkošové z FÚP za genetickou analýzu vzorků. Za pomoc při měření hladin miRNA ve vzorcích patří dík doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. z FaF HK UK.

V neposlední řadě bych rád vyjádřil díky své přítelkyni za morální podporu a dále kolegovi a kamarádovi MUDr. Jiřímu Soukupovi za neustálý optimismus a pomoc při zpracování buněčných kultur.