

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
I. lékařská fakulta

MUDr. Jan Král

Patofyziologie kolorektálního karcinomu

*Efekt screeningu kolorektálního karcinomu a role microRNA
v patofyziologii kolorektálního karcinomu*

Pathophysiology of colorectal cancer

*Colorectal cancer screening effect and the role of microRNA
in pathophysiology of colorectal cancer*

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Julius Špičák, CSc.

Školitel konzultant: MUDr. Pavel Vodička, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31. 8. 2020

Jan Král

Podpis

Poděkování:

Tímto bych rád vyjádřil vřelé poděkování svému školiteli, panu prof. MUDr. Juliu Špičákovi, CSc., za odborné vedení, podněty v přípravě disertační práce, rady a připomínky.

Dále bych rád vyjádřil své poděkování doc. MUDr. Tomáši Huclovi, PhD. a MUDr. Soně Fraňkové, PhD. za podnětné návrhy, připomínky, opravy a přípravu publikací. Další poděkování patří všem pracovníkům Oddělení molekulární biologie nádorů Ústavu experimentální medicíny AV ČR, bez jejichž spolupráce by následující výsledky nevznikly. Především to jsou: MUDr. Pavel Vodička, CSc., MUDr. Ludmila Vodičková, CSc., Mgr. Jana Slyšková, PhD., a Mgr. Veronika Vymetálková, PhD.

Bezpochyby můj největší dík patří mé manželce Tereze Králové a mé malé dceři Lilian Králové, bez jejichž nepřeborné trpělivosti a shovívavosti by tato práce nevznikla. I ta nejmenší zaslouží můj dík – Mia Králová. Dále můj dík patří přátelům a kolegům za jejich podporu a pomoc.

V Praze, 31. 8. 2020

Jan Král

Podpis

Identifikační záznam:

KRÁL, Jan. Patofyziologie kolorektálního karcinomu: Screening kolorektálního karcinomu a role microRNA v patofyziologii kolorektálního karcinomu [*Pathophysiology of colorectal cancer: colorectal cancer screening effect and the role of microRNA in pathophysiology of colorectal cancer*] Praha, 2020. 103 s., přílohy 7. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika hepatogastroenterologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha. Vedoucí práce Špičák, Julius. Konzultant Vodička, Pavel.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	6
Seznam zkratk	8
1. Úvod do problematiky.....	12
1.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu	12
1.2. Rizikové faktory a prevence KRK	13
1.3. Screening KRK.....	14
1.3.1. Testování stolice.....	15
1.3.2. Vyšetření krve.....	15
1.3.3. Endoskopie	16
1.3.4. Radiodiagnostika	17
1.3.5. Screening ve světě.....	17
1.3.6. Screening KRK v ČR.....	19
1.4. Klinické projevy KRK	22
1.5. Levostranný KRK versus pravostranný KRK.....	23
1.5.1. Epidemiologie.....	24
1.5.2. Histologie.....	24
1.5.3. Genetika	24
1.6. Formy KRK	25
1.7. Patogeneze KRK.....	27
1.7.1. Chromozomální instabilita	28
1.7.2. Mikrosatelitní instabilita	28
1.7.3. Metylace CpG ostrůvků – CIMP (CpG Island Methylator Phenotype pathway)	28
1.7.4. Střevní mikrobiom a KRK.....	29
1.8. Genetické změny vedoucí ke KRK	30
1.8.1. Mutace v tumor-supresorových genech	30
1.8.2. Mutace v onkogenech	33
1.8.3. Ztráta heterozygosity	35
1.8.4. Geny opravy chybného párování (DNA Mismatch repair).....	38
1.8.5. Dlouhé, nekódující RNA (lncRNA)	39

1.8.6. MicroRNA	39
1.9 Terapie.....	41
1.10 Závěr	43
2. Hypotézy.....	44
3. Cíle práce	44
4. Klinicko-patologická charakteristika KRK diagnostikovaného screeningem vs. KRK zjištěný v důsledku symptomů	45
4.1. Metodika studie	45
4.2. Zpracování dat.....	45
4.3. Výsledky.....	46
4.4. Diskuse	50
5. MicroRNA expresní profil u rektální formy KRK se liší od expresního profilu nádoru tlustého střeva a nenádorové tkáně	53
5.1. Úvod do problematiky.....	53
5.2. Metody	54
5.2.1 Izolace a kontrola kvality RNA.....	54
5.2.2 Screening microRNA pomocí 3D-Gene microarray.....	55
5.2.3 Kvantitativní PCR vzorků	55
5.2.4 Buněčné kultury	56
5.2.5 Předběžné zpracování qPCR dat	57
5.2.6. Statistická analýza	57
5.3. Výsledky.....	57
5.3.1. Screening microRNA.....	57
5.3.2. Profil microRNA u rektální a kolonické formy KRK.....	60
5.3.3. Profil microRNA a odpověď na léčbu	61
5.3.4. Cluster miR-17/92 a odpověď na léčbu	62
5.3.5. microRNA 18 a 19 ovlivňují proliferaci a migraci buněk	65
5.4. Diskuse	66
6. Expres lokusů kvantitativního znaku u genů ABC transportérů a jejich vliv na přežívání pacientů s KRK léčených 5-FU	71
6.1. Úvod do problematiky.....	71
6.2. Metodika studie	71
6.2.1 Studovaný soubor	71

6.2.2 Follow-up pacientů.....	72
6.2.3 Výběr eQTL polymorfismů.....	72
6.2.4 Analýza SNP	73
6.2.5 Statistická analýza	73
6.3. Výsledky.....	74
6.3.1 Výběr SNP	74
6.3.2 Výběr kandidátních SNPs – eQTL analýza	75
6.3.3 Studie případů a kontrol.....	77
6.3.4 Studie přežívání	78
6.3.5 Přežívání a léčba	79
6.4. Diskuse	80
7. Souhrn výsledků	83
8. Budoucí perspektivy	84
9. Reference	86
10. Seznam obrázků a tabulek	96

Abstrakt

Kolorektální karcinom (KRK) je závažné zhoubné nádorové onemocnění tlustého střeva, kterým celosvětově onemocní téměř dva miliony pacientů za rok. V České republice (ČR) je diagnostikován ročně u okolo osmi tisíc pacientů a přes tři a půl tisíce pacientů ročně na toto onemocnění umírá. Velká část je stále diagnostikována v pokročilém stadiu onemocnění (stadium IV – 20,1 %; stadium III – 24,5 % v roce 2017), což znamená horší celkovou prognózu. Screeningový program si klade za cíl identifikovat pacienty v časném stadiu KRK (stadium 0, I a II), kteří mají celkově lepší prognózu než ti s již vyvinutými symptomy onemocnění. Současný výzkum je zaměřen na markery, které by sloužily jak k časně diagnóze tohoto onemocnění, tak k predikci účinnosti léčby či časně recidivy nádoru.

Prvním cílem naší práce bylo zhodnotit klinicko-patologickou charakteristiku pacientů s KRK diagnostikovaných screeningem v porovnání se symptomatickými pacienty a ověřit efektivitu screeningového programu v ČR. Provedli jsme multicentrickou prospektivní observační studii ve 12 centrech, která měla za cíl lépe charakterizovat jednotlivé parametry pacientů s KRK (lokalizace a stupeň diferenciacie tumoru, výskyt metastáz apod). Screening byl definován jako primární screeningová koloskopie, nebo koloskopie po pozitivním testu na okultní krvácení u běžné populace. Zařadili jsme celkem 265 pacientů (screening 73 pacientů, kontrola 192 pacientů). Výsledky studie potvrdily přínos screeningu jako takového, kdy ve screeningové skupině v porovnání s kontrolní skupinou převládala časná stadia (stadium 0, I a II; 63 % vs. 43,3 %, $p < 0,001$) oproti pokročilým stadiím onemocnění (stadium III a IV; 26,1 % vs. 44,3 %, $p < 0,001$). Rovněž výskyt lokálních (N1 a N2; 28,8 % vs. 45,3 %, $p < 0,001$) tak i vzdálených metastáz (M1; 0 % vs. 18,2 %, $p < 0,001$) v době diagnózy byl výrazně příznivější pro screeningovou skupinu oproti kontrole. V obou skupinách pacienti vykazovali dominantně postižení levého tračníku oproti ostatním částem tlustého střeva (screening 91,9 %; kontrola 74,9 %).

Druhým cílem naší práce bylo vyhodnotit expresní profil doposud známých microRNA (miRNA) u KRK, v porovnání se zdravou tkání, se zaměřením na rektální formu tumoru a následnou identifikaci možných markerů časného zachytu KRK a odpovědi na léčbu. Otestovali jsme 2 555 miRNA na 20 párech rektální formy KRK a zdravé tkáně pomocí 3D-Gene

Toray microarray. Následně jsme kandidátní miRNA validovali na nezávislé kohortě 100 párů KRK rekta, zdravé tkáně a plazmy pacientů s KRK; miRNA s nejvyšší expresí jsme dále testovali na buněčných kulturách. Podařilo se nám identifikovat specifické miRNA které korelovaly s odpovědí pacientů na adjuvantní chemoterapii (cluster miR-17/92). Zvýšená exprese miRNA 17, 18a, 18b, 19a, 19b, 20a, 20b a 106a byla spojena s vyšším rizikem relapsu onemocnění a stimulací růstu buněk v buněčných kulturách. Expese miRNA v plazmatických exosomech se lišila mezi nádorovou tkání a zdravou kontrolou a byla spojena s odpovědí na léčbu. Cluster miR-17/92 by se mohl stát neinvazivním biomarkerem predikujícím prognózu pacientů po léčbě s rektální formou KRK.

Třetím cílem naší práce bylo zhodnotit jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) u ABC transportéru fungující jako lokus kvantitativního znaku (QTL) v souvislosti s rizikem vzniku KRK a odpovědi na léčbu. V projektu jsme identifikovali 14 SNPs v 11 genech pro ABC transportér, tyto SNP byly vyšetřeny u celkem 1098 pacientů s KRK a 1442 kontrol. V projektu jsme neprokázali signifikantní spojitost mezi SNP a rizikem vzniku KRK. SNP rs3819720 v genu *ABCB3/TAP2* byl spojen s kratším celkovým přežíváním v dominantním a kodominantním modelu. Prokázali jsme, že rs3819720 reguluje expresi dalších 36 genů. Screening QTL polymorfismů v genech, jako například pro ABC transportéry, může vést k identifikaci genů spojených s odpovědí pacientů na léčbu.

Abstract

Colorectal cancer is a serious malignant disease with an incidence of over 1.8 million new cases per year worldwide. There are about 8 000 patients diagnosed with CRC in the Czech Republic each year, and about half of them present with an advanced disease. Screening program identifies patients in the early stages of CRC resulting in overall better prognosis and survival. There is also a lack of biomarkers of early CRC detection and of response to treatment.

The first aim of our project was to conduct a national multicentre prospective observational study to evaluate the impact of CRC screening within the framework of a Czech population screening programme. Between March 2013 and September 2015, a total of 265 patients were enrolled in 12 centres across the Czech Republic. Patients were divided into screening and control groups and compared for pathology status and clinical characteristics. Screening was defined as a primary screening colonoscopy or a colonoscopy after a positive FOBT in an average-risk population. The distribution of CRC stages was significantly favourable in the screening group compared with the control group (stages 0, I and II, 63% versus 43.3%; $p < 0.001$). The presence of distant (M1) and local metastases (N1 and N2) was significantly less prevalent in the screening group (0%, 28.8%) than in the control group (18.2%, 45.3%) ($p < 0.001$). In both groups, patients had tumour localized in left colon (screening – 91.9%; control – 74.9%). CRC diagnosed by screening disclosed less advanced clinical-pathological characteristics and results in patients with higher probability of radical surgery (R0) than diagnoses established based on symptoms, with subsequent management differing accordingly between groups. These results advocate the implementation of a suitable worldwide screening programme.

The second aim of our project was to evaluate microRNA (miRNA) as a promising source of cancer-related biomarkers since miRNA signatures are specific for each cancer type and subgroups of patients with diverse treatment sensitivity. Yet this miRNA potential has not been satisfactorily explored in rectal cancer (RC). The aim of the study was to identify the specific miRNA signature with clinical and therapeutical relevance for RC. Expression of 2 555 miRNAs were examined in 20 pairs of rectal tumours and matched non-malignant

tissues by 3D-Gene Toray microarray. Candidate miRNAs were validated in an independent cohort of 100 paired rectal tissues and in whole plasma and exosomes of 100 RC patients. To study the association of miRNA profile with therapeutic outcomes, plasma samples were taken repeatedly over time period of one year reflecting thus patients' treatment responses. Finally, the most prominent miRNAs were investigated *in vitro* for their involvement in cell growth. We identified RC specific miRNA signature that distinguishes responders from non-responders to adjuvant chemotherapy. A predominant part of identified miRNAs was represented by members of miR-17/92 cluster. Upregulation of miRNAs 17, 18a, 18b, 19a, 19b, 20a, 20b and 106a in the tumour was associated with higher risk of tumour relapse and their overexpression in RC cell lines stimulated cellular proliferation. Examination of these miRNAs in plasma exosomes showed that their levels differed between RC patients and healthy controls and correlated with patients' treatment response. MiR-17/92 cluster miRNAs represent a non-invasive biomarker to predict post-treatment prognosis in RC patients.

The third aim of our project was to evaluate expression of quantitative trait loci (eQTL) variants in ABC transporter and their possible role in CRC development or treatment response. We have identified 14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 11 ABC transporter genes acting as eQTL. We enrolled 1098 CRC patients and 1442 healthy controls. We did not find any significant association between SNPs and risk of CRC. The SNP rs3819720 was significantly associated with shorter overall survival. The allele rs3819720 affected the expression of 36 downstream genes. Screening for eQTL polymorphisms in genes, for example gen for ABC transporter, could help to elucidate the genetic background of individual response to treatment.

Seznam zkratek

ABC	ATP binding cassette
ASA	acetylsalicylová kyselina
aFAP	atenuovaná forma familiární adenomatózní polypózy
APC	adenomatous polyposis coli
ASR	age-standardized rates
BER	bázová excizní oprava DNA
BMI	body mass index
BRAF	B-Raf proto-oncogen
C4A	complement C4A
C/EBPσ	CCAAT/enhancer-binding protein- σ
CCAT1	colon cancer associated transcript 1
CCAT2	colon cancer associated transcript 2
CEU	kavkazská populace
CIMP	metylace v CpG ostrůvcích (CpG island methylator phenotype)
CIN	chromozomální instabilita
<i>c-myc</i>	MYC proto-oncogene, BHLH transkripční faktor
<i>c-jun</i>	Jun proto-oncogene
CRC	colorectal cancer
CRD-BP	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1
CT	počítačová tomografie
CTLA-4	T lymphocyte-associated antigen 4
CCND1	cyclin D1
DCC	deleted in colorectal carcinoma gen
DSH	phosphoprotein dishevelled
EGFR	epidermal growth factor receptor

EMT	epiteliální/mesenchymální transformace
ERK	extracellular signal-regulated kinase
eQTL	expression quantitative trait loci
<i>Exo 1</i>	exonuclease 1
FAP	familiární adenomatózní polypóza
<i>FBXW7</i>	F-box and WD repeat domain-containing 7
FRZ	frizzled family receptor
<i>G6PC2</i>	Glucose-6-Phosphatase catalytic subunit 2
GIT	gastrointestinální trakt
GSK-3β	glycogen synthase kinase 3
GWAS	genome wide association studies
HIF-1α	hypoxia inducible factor-1 α
<i>HLA-DMA</i>	major histocompatibility complex, class II, DM Alpha
<i>HLA-DOB</i>	major histocompatibility complex, class II, DO Beta
<i>HLA-DQA1</i>	major histocompatibility complex, class II, DQ Alpha 1
<i>HLA-DQA2</i>	major histocompatibility complex, class II, DQ Alpha 1
<i>HLA-DQB2</i>	major histocompatibility complex, class II, DQ Beta 2
HNPCC	hereditární nepolypózní forma kolorektálního karcinomu
IBD	idiopatický střevní zánět
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JPS	juvenilní polypózní syndrom
KLF5	Kruppel-like factor 5
<i>KRAS</i>	Kirsten ras oncogene homolog
KRK	kolorektální karcinom
LOH	ztráta heterozygoty
lncRNA	long non-coding RNA
LRP	lipoprotein receptor-related protein
MAF	minor allele frequency

MAPK	mitogen-activated protein kinase cascade
MEG3	maternally expressed 3
MEK	mitogen-activated protein kinase
miRNA	microRNA
MGMT	O ⁶ -metylguanin DNA metyltransferáza
MHC	major histocompatibility complex
MMR	oprava chybného párování v DNA (DNA mismatch repair)
MR	magnetická rezonance
MLH1	MutL Homolog 1
MLH3	MutL homolog 3
MSH2	MutS Homolog 2
MSH3	MutS Homolog 3
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	mikrosatelitová instabilita
MST	median survival time
MUTYH	MutY DNA Glycosylase
mTOR	serin/threoninová kináza (mammalian target of rapamycin)
NF1	neurofibromatosis type 1
NGS	next generation sequencing
NOSTRIN	nitric oxide synthase trafficking
NRF1	nuclear factor E2-related factor 1
PCAT1	prostate cancer associated transcript 1
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-1	programmed death protein 1
PD-L1	programmed death receptor ligand 1
PDCD4	programmed cell death 4
PFS	progression-free survival
PJS	Peutz-Jaeghersův syndrom

PI3K	fosfatidylinositol 4,5 bisfosfát
PIK3CA	fosfatidylinositol 4,5 bisfosfát 3-kináza, katalytická podjednotka alfa
PMS1	PMS1 Homolog 1
PMS2	PMS1 Homolog 2
PSMB9	proteasome 20S subunit beta 9
PTEN	fosfatáza a tensin homologní gen
QTL	quantitative trait locus
RC	rectal cancer, rektální karcinom
RhoA	Ras homolog family member A
SKIV2L	Ski2 like RNA helicase
SMAD2	SMAD family member 2
SMAD4	SMAD family member 4
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
SNP	single nucleotide polymorphism
SOS	son of sevenless
SREBP	transkripční faktor (sterol regulated element-binding proteins)
TAP1	transporter associated with antigen processing 1
TAP2	transporter associated with antigen processing 2
TGF-β	transforming growth factor-β
TGFβRII	transforming growth factor beta receptor II
TGFR	transforming growth factor receptor
TOKS	test na okultní krvácení ve stolici
TP53	tumor protein p53
UB	ubikvitin
UNC5H	netrin-1 receptor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

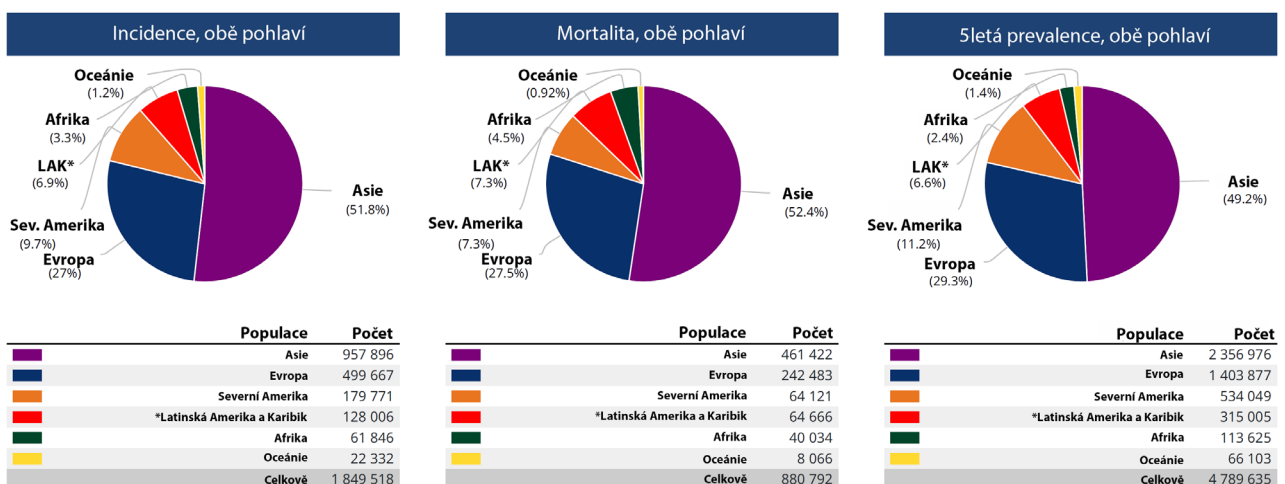
1. Úvod do problematiky

1.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (KRK) je závažné nádorové onemocnění tlustého střeva. Jedná se o třetí nejčastější nádorové onemocnění u mužů a druhé nejčastější u žen celosvětově (Bray et al. 2018). V roce 2018 bylo ve světě diagnostikováno více než 1,8 milionu nových případů KRK. Celkově KRK zaujímá čtvrté místo s incidencí 19,7 na 100 000 obyvatel (age-standardized rates/ASR). V pořadí před KRK jsou nádory prsu (incidence 46,3/100 000 obyvatel za rok), prostaty (incidence 29,3/100 000 obyvatel za rok) a plic (incidence 22,5/100 000 obyvatel za rok). Z hlediska mortality je KRK na třetím místě (8,9/100 000 obyvatel za rok), na prvním místě je karcinom plic (18,6/100 000 obyvatel za rok) (Bray et al. 2018).

Česká republika (ČR) zaujímala v roce 2012 páté místo ve výskytu KRK v Evropě, v současné době zaujímá místo patnácté s incidencí 32,7/100 000 obyvatel (ASR, 2018) (Bray et al. 2018). Na předních příčkách výskytu KRK se již mnoho let drží Maďarsko a Slovensko (Bray et al. 2018; Ferlay et al. 2013).

Každým rokem je v ČR KRK diagnostikován téměř 8 000 pacientům a okolo 3 600 nemocných na následky onemocnění umírá. V poslední době lze v ČR sledovat postupně klesající trend mortality (Dušek L et al. 2015). Je otázné, nakolik se na tomto výsledku podílel screeningový program (Aleksandrova et al. 2014).



Obr. 1. Incidence, mortalita a prevalence KRK ve světě, převzato z Globocan 2018 (Bray et al. 2018)

1.2. Rizikové faktory a prevence KRK

Na patogenezi KRK se významnou měrou podílí vlivy životního prostředí, mezi které patří kouření cigaret, vysoká konzumace červeného masa, živočišných tuků, snížená konzumace vlákniny, alkohol, nedostatek pohybu či stres. Dalším důležitým rizikovým faktorem je pozitivní rodinná anamnéza reflektující individuální genetickou výbavu (Kral et al. 2016; Murphy et al. 2019).

V roce 2009 byla provedena meta-analýza studií zabývajících se vlivem kouření na vznik KRK v letech 1950–2008, zahrnující 28 prospektivních kohortových studií s celkem 1 463 796 jedinci s mediánem sledování 13 let. Kuřáci ve srovnání s nekuřáky vykazovali vyšší riziko (relativní riziko 1,20), navíc riziko u mužů bylo vyšší než u žen (relativní riziko 1,38 vs. 1,06). Prokázalo se také, že zvýšené riziko výskytu vzniku nádoru tlustého střeva závisí na množství za den vykouřených cigaret a na počtu let aktivního kouření (Tsoi et al. 2009; Yang et al. 2016).

Meta-analýza prospektivních studií z roku 2011 zkoumala riziko zvýšené konzumace červeného masa a jeho vliv na vznik KRK během let 1966–2011. Zjistilo se, že konzumace 140 gramů červeného masa denně je spojena s vyšším rizikem vzniku KRK (relativní riziko, 1,22) (Chan et al. 2011).

Nižší příjem vlákniny v dietě současně se zvyšujícím se věkem je spojen s vyšším rizikem vzniku KRK, jak bylo prokázáno z meta-analýzy 13 prospektivních kohortových studií. Nicméně vyšší příjem vlákniny není spojen s nižším rizikem vzniku KRK (Park et al. 2005).

Z randomizovaných studií vyplývá, že riziko vzniku KRK snižuje užívání kyseliny acetylsalicylové (ASA) déle než 10 let při minimální dávce 300 mg ASA denně. Užívání ASA déle jak 20 let nevedlo k dalšímu snížení rizika. Nižší dávky ASA tento efekt nepotvrdily, data jsou však inkonzistentní (Flossmann and Rothwell 2007). Podobné výsledky zaznamenaly i studie s jinými nesteroidními antirevmatiky.

Chronická konzumace alkoholu je jedním z rizikových faktorů vzniku nádorů trávicí trubice (orofarynx, jícen) včetně nádorů tlustého střeva a zvýšené riziko je patrné i při jeho mírné konzumaci (maximálně dvakrát týdně 20–30 g alkoholu u muže a 10–20 g alkoholu u ženy) (Poschl and Seitz 2004). V roce 2011 byla provedena meta-analýza 34 studií, která

přinesla jasné důkazy o souvislosti mezi konzumací jednoho alkoholického nápoje denně a vyšším rizikem vzniku KRK (Fedirko et al. 2011; Hughes et al. 2017).

Problematikou rizika vzniku KRK u příbuzných pacientů s anamnézou KRK se zabývá řada studií. V meta-analýze Butterwortha a spol. z roku 2006 bylo vyhodnoceno celkem 59 studií, z nichž 47 přímo odhadovalo riziko vzniku KRK u pacientů s alespoň jedním postiženým rodinným příslušníkem, které bylo 2,24x vyšší oproti běžné populaci a v případě více jak dvou postižených rodinných příslušníků vzrostlo 3,97x (Butterworth et al. 2006). Srovnatelné riziko bylo popsáno v meta-analýze autorů Baglietta a spol. z roku 2006, porovnávající výsledky 20 studií. Při alespoň jednom postiženém rodinném příslušníkovi činilo riziko v porovnání s běžnou populací 2,26 (Baglietto et al. 2006). Nejnověji publikovaná meta-analýza Roose a spol. obsahující 20 kohortových a 42 kontrolovaných studií, prokázala, že riziko KRK je při postižení příbuzného 1. řádu 1,92, v případě postižení 2 a více příbuzných je 2,81 (Roos et al. 2019). Přestože doposud neexistují jednoznačné údaje o účinnosti screeningového programu u příbuzných pacientů s KRK ve smyslu vlivu na incidenci a mortalitu, předpokládá se zahájení časného screeningu u této skupiny (Král et al. 2017). V poslední době čelíme novému problému, a to zvyšující se incidenci KRK u mladé populace. Data z recentně publikované studie od Vuika a spol. u více jak 143 milionů Evropanů ve věku od 20 do 49 let analyzovala trend v incidenci a mortalitě KRK v evropské populaci. Výsledky studie ukázaly, že incidence KRK v období 2004–2016, vzrostla ve skupině 20–29 let o 7,9 % ročně, ve skupině 30–39 let o 4,9 % ročně a ve skupině 40–49 let o 1,6 % ročně, přičemž mortalita KRK od roku 1990 postupně klesá (Vuik et al. 2019).

1.3. Screening KRK

Screeningová vyšetření mají za cíl diagnostikovat pacienty s prekancerózními lézemi nebo KRK v časných stádiích (stadium 0, I a II), která mají lepší celkovou prognózu, oproti pokročilým stádiím (III a IV) (Pande et al. 2013). Jedná se o efektivní metodu, vedoucí ke snížení morbidity i mortality (Brenner et al. 2016; Kubisch et al. 2016; Pox et al. 2012).

Rozlišujeme několik typů screeningových metod, a to **testování stolice, vyšetření krve, endoskopické a radiodiagnostické vyšetření.**

1.3.1. Testování stolice

Polypy i KRK se mohou manifestovat mikroskopickým krvácením, které není okem patrné (tzv. okultní krvácení), nicméně které je možné detekovat laboratorně. Míra ztrát krve do stolice se odvíjí od mnoha faktorů, jako je tloušťka povrchové vrstvy epitelu polypu, barva polypu (cherry-red), histopatologická charakteristika polypu a velikost polypu (Foutch et al. 1988; Uno and Munakata 1995). Pro testování stolice na přítomnost krve využíváme tzv. testů na okultní krvácení (TOKS). V minulosti byl převážně využíván guajakový test (gTOKS), který je založen na peroxidázové reakci s hemoglobinem. Tento test je zatížen rizikem falešně negativních i pozitivních výsledků. Přesto dokázal přispět při svém jednoletém používání k redukci mortality na KRK o 33 % (Mandel et al. 1993). Imunochemické testy na okultní krvácení (iTOKS) fungují na principu vazby protilátky na globinovou složku hemoglobinu. Dělí se na iTOKS kvantitativní a kvalitativní. Cut-off hodnoty kvantitativních testů bývají nastaveny na hodnotu mezi 75–100 ng/ml (Nakama et al. 2001). Výhodou iTOKS oproti gTOKS je vyšší senzitivita při obdobné specificitě (J. K. Lee et al. 2014). V recentní meta-analýze celkem 31 studií od byla porovnána senzitivita a specificita iTOKS pro detekci KRK a pokročilých adenomů (velikost >10 mm, vilózní struktura, high-grade dysplázie). Senzitivita iTOKS k detekci KRK byla 91 % (95 % CI, 0,84 až 0,95), specificita 95 % (CI, 0,94 až 0,96). V případě pokročilého adenomu senzitivita byla 40 % a specificita 95 % (Imperiale et al. 2019). Novinkou v posledních letech jsou DNA testy, které detekují abnormální změny v buněčné DNA ve vzorku stolice (metylovaný vimentin, integrita lokusu 5p21 a *LOC91199*). Z počátku tyto testy vykazovaly nízkou senzitivitu, nicméně od zavedení stabilizačních pufrů došlo k jejímu zvýšení (Itzkowitz et al. 2008). V současné době jsou používány testy hodnotící genetické markery ve stolici v kombinaci s imunochemickým měřením hemoglobinu ve stolici. Dle studie od Malika a spol. byla senzitivita DNA testu 92,3 % v porovnání s iTOKS (73,8 %) a specificita 86,6 % (iTOKS 94,9 %) (Malik 2016).

1.3.2. Vyšetření krve

Do portfolia screeningových testů v posledních letech přibýlo molekulární vyšetření metylovaného genu *Septin 9* (mSEPT9) se uvolňuje z nádorových buněk KRK do krevního oběhu. A mSEPT9 pak lze detekovat z krve pomocí metody PCR. Septin 9 je zodpovědný za řízení cytokineze a remodelaci cytoskeletu. Dle recentní meta-analýzy 25 studií od Jiayun Niana a spol. se ukázalo, že senzitivita testu (Epi proColon® 2.0, 2/3 algoritmus) je 71 %

a specifická 92 %. Dle analýzy senzitivita testu roste s pokročilostí KRK a horší diferenciací nádoru. Meta-analýza ukázala, že mSEPT9 je spolehlivý krevní biomarker k detekci KRK, a to především pokročilých forem (Nian et al. 2017). Meta-analýza od Lele Songa a spol. porovnála efektivitu mSEPT9 s ostatními testy (iTOKS, DNA ze stolice) užívanými ke screeningu KRK. Výsledkem studie bylo, že mSEPT9 má větší senzitivitu než iTOKS u symptomatického pacienta, nikoliv však než iTOKS a DNA testy ze stolice u asymptomatického pacienta. Stejně jako předchází meta-analýza, i tato analýza ukázala vyšší senzitivitu mSEPT9 u pokročilejších stadií KRK (Song et al. 2017).

1.3.3. Endoskopie

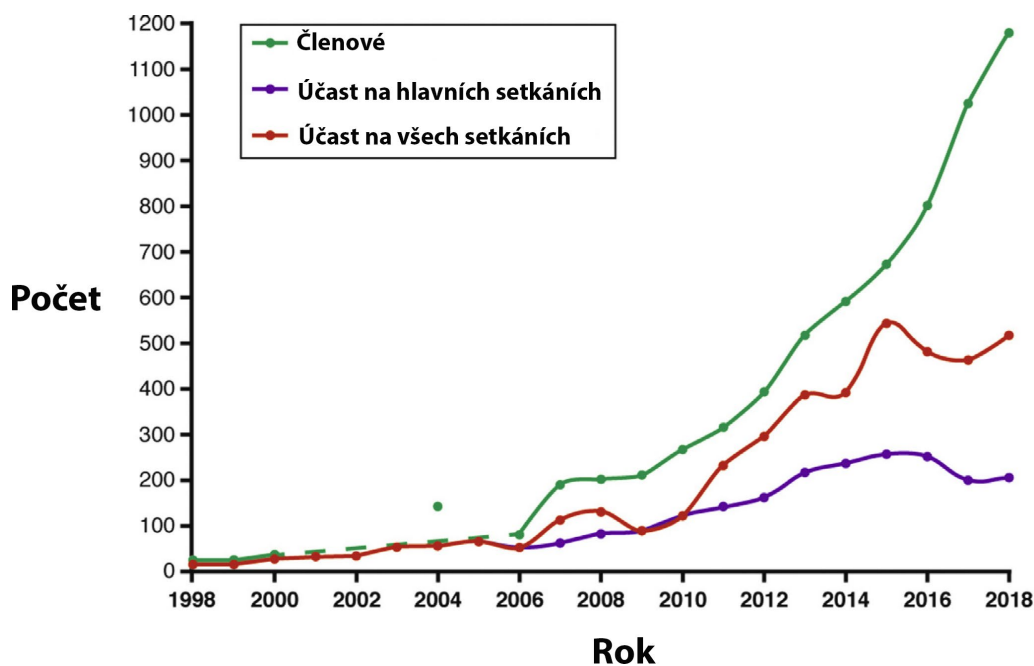
Mezi endoskopické vyšetřovací metody patří koloskopické vyšetření, sigmoideoskopie či kapslová endoskopie. Koloskopie je zlatým standardem v diagnostice KRK pro schopnost vizualizace celého tlustého střeva, přesnou lokalizaci, možnost provedení biopsie či kompletní odstranění potencionální prekancerózní léze během jednoho sezení. Zásadní roli v pohledu na prevenci KRK sehrála National Polyp Study, jejíž výsledky byly analyzovány Winawerem a spol. Ve studii bylo zařazeno 1418 pacientů, kteří podstoupili koloskopické vyšetření, jimž byl odstraněn jeden či více adenomů střeva. Kontrolní kolonoskopie po odstranění prekancerózních neoplázií následovala v průměrném intervalu 5,9 let. Výsledky studie prokázaly, že časná polypektomie vede ke snížení incidence KRK o 76–90 % (Winawer et al. 1993). Nevýhodou koloskopie je diskomfort, zpravidla nutnost podání analgosedace a riziko komplikací jako jsou perforace či krvácení. Sigmoideoskopie umožňuje vyšetření pouze levostranného tračníku. Výhodou oproti koloskopii je snížení pocitu diskomfortu, menší riziko komplikací a menší časová náročnost vyšetření bez nutnosti analgosedace. Randomizované studie potvrdily, že díky sigmoideoskopii došlo k poklesu incidence KRK o 31–33 % a mortality o 38–43 % (Atkin et al. 2010; Segnan et al. 2011). Někteří pacienti, i přes krátkou dobu vyšetření, sigmoideoskopii hůře tolerují a bez aplikace analgosedace je ochota k opakovanému vyšetření nízká (Rex et al. 2017). Kapslová endoskopie využívá technologii kapsle s dvěma optickými kamerami na obou koncích se zorným polem téměř 360°, která snímá střevo s variabilní frekvencí počtu fotek za minutu (adaptive frame rate). Senzitivita a specifická v detekci KRK dle irské studie dosahovala 89 % a 96 %, čímž došlo k poklesu nutnosti koloskopie o 71 % (Holleran et al. 2014).

1.3.4. Radiodiagnostika

Alternativní metodou screeningu KRK může být CT kolografie, která využívá počítačové tomografie a speciálního počítačového softwaru. Dle francouzské studie, kde CT kolografii a následně koloskopii podstoupilo 845 pacientů, byla senzitivita 69 % a specificita 91 % při detekci polypů větších 6 mm (Heresbach et al. 2011). MR kolografie je další metodou, kterou lze použít ke screeningu KRK. Dle evidence-based analýzy je senzitivita detekce KRK u MR srovnatelná s CT, v detekci velkých (>10 mm) a středně velkých polypů (5–10 mm). Výhodou MR kolografie je absence ionizujícího záření (Medical Advisory 2009). Společnou nevýhodou všech dosavadních zobrazovacích metod je nutnost přípravy vyprázdněním střeva projímadly.

1.3.5. Screening ve světě

Screening KRK ve světě prodělal celou řadu změn, od oportunistického screeningu až po populační screeningový model. Velkou zásluhou na rozšíření screeningového programu celosvětově měla Světová Endoskopická Organizace (World Endoscopy Organization – WEO, dříve Organisation Mondiale d'Endoscopie Digestive – OMED). Před 50 lety WHO vydala kritéria popisující principy a význam screeningu jako takového (J. M. G. Wilson et al. 1968). Zhruba o 20 let později byly publikovány první studie s testem na okultní krvácení (gTOKS), které prokázaly efektivitu ve screeningu a naznačily snížení mortality KRK. Následovaly studie s iTOKS s vyšší účinností, redukci incidence a mortality KRK také vykazalo screeningové koloskopické a sigmoideoskopické vyšetření. V roce 1997 skupina vedená Massimem Crespim a Glaciomarem Machadem navrhla vytvoření mezinárodní komise pro screening KRK, což bylo podpořeno organizací OMED. První meeting skupiny pro screening KRK vedené Paulem Rozenem se sešel ve Vídni v roce 1998 (Rozen 1999). Z původních 12 členů z 8 zemí světa (1998) se skupina rozrostla na 1180 členů ze 78 států světa (2018) (Obr. 2.); (Young et al. 2019).



Obr. 2. Nárůst počtu členů Komise pro screening KRK v průběhu let, převzato z WEO (Young et al. 2019)

V posledních 20 letech došlo k výraznému rozšíření screeningových programů celosvětově. K docílení proveditelnosti screeningového programu v lokálních podmínkách jednotlivých zemí byly standardizovány dvě kategorie screeningových programů:

- 1) strukturovaný oportunistický screeningový program;**
- 2) populační screeningový program.**

Oportunistický screeningový program spočívá v individuálním či skupinovém zvaní ke screeningovému vyšetření na bázi doporučených postupů, nicméně bez jednotné celopopulační metodiky, jednotného zpracování dat a institucionální národní garance. Prvně byl zaveden v roce 1999 ve Spojených státech a v Německu (zvaní jedinců k účasti na programu cestou odborníků - praktický lékař, gastroenterolog atd.) a následně v dalších zemích celého světa. V novém miléniu velká část zemí pak přešla na efektivnější populační screeningový program.

Populační screeningový program je charakterizován v rámci územních celků jednotnou metodikou, která spočívá v aktivním zvaní celé cílové skupiny k vyšetření, monitoringu, hodnocení kvality a transparentním vykazováním a zpracováváním výsledků. Významná je politická institucionální garance. Program byl poprvé zaveden v Itálii (pilotní studie) a v krátké

době jej přijaly i ostatní evropské země. K roku 2018 je tento typ programu evidován ve více jak 30 zemích světa a dalších 19 zemí je v pilotní fázi programu (Young et al. 2019). Většina těchto zemí provádí screening ve dvou krocích, kde prvním krokem je iTOKS, přičemž v případě positivity následuje koloskopické vyšetření. Pouze Itálie a Velká Británie užívá jako prvního vyšetření sigmoideoskopii, některé země pak místo prvního vyšetření TOKS volí koloskopii. Mezi nejúspěšnější populační screeningové programy v Evropě z hlediska účasti lze řadit Finsko, Švédsko, Holandsko a Velkou Británii (iTOKS a gTOKS) (Senore et al. 2019). Mezi úspěšné screeningové programy patří i Polský národní screeningový program (Wieszczy et al. 2020).

The National Colorectal Cancer Roundtable (<https://nccrt.org/>; NCCRT) je národní sdružení veřejných, soukromých a dobrovolných organizací, které mají za cíl snížit incidenci a mortalitu KRK. NCCRT stanovil jako cíl k dosažení požadované redukce incidence a mortality KRK 80% účast populace na screeningovém programu do konce roku 2018 (Issa and Nouredine 2017). Screening KRK začíná podle většiny doporučených postupů u osob bez signifikantně zvýšeného rizika (hereditární syndromy, rodinná anamnéza) od 50 let věku. Přes značný rozmach je účast v jednotlivých zemích stále značně variabilní a kolísá mezi 9–65 % (Schreuders et al. 2015). Důvodem rozdílů je věk, pohlaví, etnikum a s tím spojené vzdělání či socioekonomická situace. Data z roku 2016 ukazují nejvyšší účast pacientů na screeningovém programu v Nizozemsku (68,2 %) a Slovinsku (57,8 %), naopak nejnižší v Chorvatsku (19,9 %) (Navarro et al. 2017). V řadě zemí včetně ČR se zvažuje zahájení screeningů od 45 let věku (Americká společnost pro onkologii, The American Cancer Society) (Wolf et al. 2018). Recentně publikovaná modelová analýza od Ladabauma a spol. využívající Markovův model vykázala v případě zahájení screeningů ve 45 letech přínos i po stránce ekonomické (Ladabaum et al. 2019).

1.3.6. Screening KRK v ČR

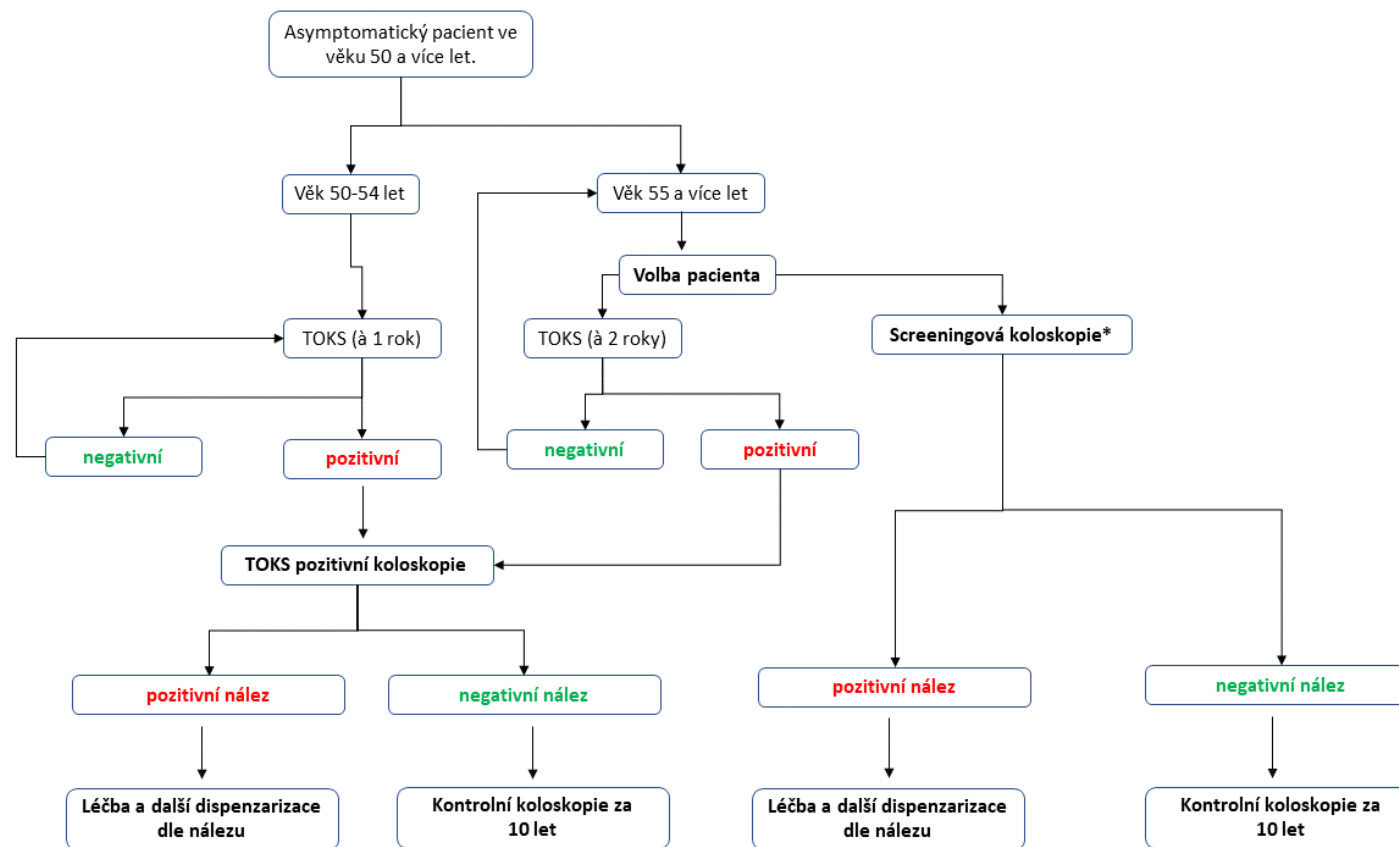
Screening využívající test na okultní krvácení (Haemoccult II – guajakový test) byl poprvé představen v ČR v roce 1979 v podobě šesti pilotních studií probíhajících do roku 1984. Především díky prof. Fričovi dále následovaly dvě prospektivní studie, Český screeningový program (1985–1991) a Pražský projekt (1997–1998), které potvrdily vysoký zájem a spolupráci cílové populace (více jak 80 % respondentů absolvovalo úvodní gTOKS); (Frič et al. 1994). Národní oportunistický screeningový program založený na vyšetření stolice

pomocí gTOKS byl v ČR zahájen v lednu 2000. V případě positivity testu navazovalo koloskopické vyšetření. Do programu byla zapojena část praktických lékařů a gynekologů. První data jednoznačně ukázala nárůst provedených vyšetření, kdy v roce 2000 bylo provedeno 13 716 gTOKS a 59 205 koloskopií a již o rok později 139 575 gTOKS a přes 68 000 koloskopií (M. Zavoral 2005).

Od roku 2006 byl založen Registr screeningové koloskopie pod správou Institutu biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně, který slouží k monitoraci kvality. Od ledna 2014 byl změněn oportunistický screeningový program na populační a bylo zahájeno adresné zvaní cílových skupin ze strany pojišťoven (Grega et al. 2016; Suchánek et al. 2013; Zavoral et al. 2009). Program prošel během let celou řadou změn a týká se kromě KRK také nádorů prsu a děložního hrdla. Screeningový program je koordinován Ministerstvem zdravotnictví ČR.

V roce 2011 byla účast české cílové populace na screeningovém programu KRK 25 %. V roce 2014, kdy bylo zahájeno adresné zvaní, dosáhlo pokrytí screeningem KRK celkem 30,8 % cílové populace v porovnání s 26,5 % v roce 2013 (Dušek L et al. 2015). V roce 2018 bylo provedeno celkem 21 468 koloskopických vyšetření po pozitivním TOKS s nálezem 9 689 adenomů (45,1 %), 4 415 pokročilých adenomů (20,6 %) a 720 karcinomů (3,4 %). Ve stejném roce bylo provedeno celkem 11 047 primárních screeningových koloskopií s nálezem 3 400 adenomů (30,8 %), 998 pokročilých adenomů (9,0 %) a 87 karcinomů (0,8 %). Průměrná čekací doba na koloskopické vyšetření se v posledních letech stabilizovala a činí okolo 1,6 měsíce (Ngo et al. 2019).

Program screeningu KRK je určený pro občany od 50 let věku. Zdravotní pojišťovny kromě primárního zvaní znovu oslovují ty, kteří na výzvu k vyšetření nezareagují. Provádí se TOKS v ročních intervalech a v případě positivity screeningová koloskopie (Obr. 3.). Od 55 let věku je TOKS prováděn jednou za dva roky nebo je nahrazen primárním koloskopickým vyšetřením. U příbuzných pacientů s KRK (rodiče, sourozenci, děti) je doporučeno zahájit screeningové vyšetření (TOKS) od 40 let věku a to jednorůčně, nebo 10 let před diagnózou u jejich příbuzného.



* Od července 2021 bude screeningová koloskopie možná od 50 let věku.

Dispenzarizace:

- 1 – 2 adenomy < 10 mm s LGD – koloskopie za 10 let
- 3 a více adenomů < 10 mm / adenom > 20 mm s HGD či vilózní - koloskopie za 3 roky
- > 4 velké hyperplastické polypy – koloskopie za 5 let

Obr. 3. Algoritmus screeningu v ČR, převzato a upraveno z www.kolorektum.cz (vytvořil Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, 23. 2. 2015)

1.4. Klinické projevy KRK

KRK se může projevovat variabilní symptomatologií a může zůstat asymptomatický až do pokročilých stádií. Nejčastějším symptomem je krvácení z rekta. K viditelnému krvácení dochází více u distální KRK, zatímco okultní krvácení, vedoucí často k anemii, u formy proximální. Díky užšímu průměru distální části tlustého střeva se zde více setkáváme s obstrukcí lumen oproti proximálnímu KRK. Pacienti s touto formou přicházejí s bolestmi břicha, distenzí střeva, střídáním zácpy a průjmů, až i s ileem. Dalšími příznaky jsou ztráta chuti k jídlu a kachektizace (Khalid et al. 2007). Rektální forma KRK může prorůstat do močového měchýře a vést k pneumaturii, obstrukci močového měchýře a perineálním bolestem. Pacienti s KRK tračnicku nejčastěji zakládají metastázy v játrech, kdy při těžkém postižení bývá prvním symptomem ikterus. Nejčastější lokalizací metastáz u rektální formy KRK jsou plíce, někdy s rozvojem hemoptýzy. Metastázy v centrálním nervovém systému mohou vést k fokálním neurologickým projevům, kostní metastázy k bolestem a symptomům spojeným s hyperkalcémií. Veškeré zmíněné příznaky KRK mají bohužel nízkou senzitivitu a specifitu ke stanovení diagnózy. Publikovaná meta-analýza 15 studií na téměř 20 000 pacientech s KRK od Forda a spol. ukázala nízkou senzitivitu a specifitu pro tzv. „alarm signs“ (krvácení z rekta, váhový úbytek, anemie, změna defekačního stereotypu; 5–64 %) (Ford et al. 2008; Podolsky et al. 2015). Stadium KRK v době diagnózy definuje prognózu pacienta (Tabulka 1).

Tabulka 1. Stadia KRK a TNM klasifikace, převzato z AJCC (Edge 2015)

Stadia a TNM klasifikace	
Stadium	Charakteristika
0	Karcinom in situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria (Tis N0 M0)
I	Nádor invaduje do submukózy (T1 N0 M0) Nádor invaduje do muskularis propria (T2 N0 M0)
II IIA (T3 N0 M0) IIB (T4a N0 M0) IIC (T4b N0 M0)	Nádor invaduje skrze muskularis propria do perikolické tkáně (T3 N0 M0) Nádor prorůstá skrze viscerální peritoneum (T4a N0 M0) Nádor invaduje nebo naléhá na okolní orgány (T4b N0 M0)
III IIIA (T1-T2 N1/N1c/N2a M0) IIIB (T3-T4a N1/N1c M0) / (T2-T3 N2a M0) / (T4b N1-N2 M0) IIIC (T4a N2a M0) / (T3-T4a N2a M0) / (T4b N1-N2 M0)	Jakékoliv prorůstání skrze stěnu střeva s mnohočetnými metastázemi N1: metastázy v 1-3 uzlinách N1a: metastázy v 1 regionální uzlině N1b: metastázy ve 2-3 regionálních uzlinách N1c: lokalizace nádoru v subseróze, mezenteriu, perirektální tkáni, bez regionálního postižení uzlin N2: metastázy ve více jak 4 uzlinách N2a: metastázy ve 4-6 uzlinách N2b: metastázy ve více jak 7 uzlinách Jakékoliv T N1 M0 Jakékoliv T N2 M0
IV IVA (T1-4 N1-2 M1a) IVB (T1-4 N1-2 M1b)	Jakákoliv invaze tumoru skrze stěnu střeva s přítomností nebo absencí regionálních metastáz, ale přítomností vzdálených metastáz Jakékoliv T jakékoliv N M1a: metastázy v jednom orgánu Jakékoliv T jakékoliv N M1b: metastázy ve více jak jednom orgánu či peritoneu

1.5. Levostranný KRK versus pravostranný KRK

KRK vzniká z epitelu jak pravé, tak i levé části tlustého střeva. Data ze studií ukazují odlišné chování KRK v jednotlivých částech tlustého střeva, odlišnou progresi KRK a celkové přežívání pacientů. Příčina těchto rozdílů je multifaktoriální (rozdílný embryonální původ, mikrobiom, expozice různým nutrientům a žlučovým kyselinám) (Baran et al. 2018).

1.5.1. Epidemiologie

U více jak 90 % pacientů je KRK je diagnostikován po 50. roce věku. V posledních letech se ukazuje, že incidence KRK narůstá i u mladší populace (Haggard and Boushey 2009). Řada studií včetně recentní meta-analýzy od Petrelliho a spol. prokázala, že prognóza pravostranné formy KRK je horší než prognóza levostranného KRK (Petrelli et al. 2017). Podle studie na více jak 77 000 pacientů s KRK od Meguida a spol. byl medián přežití s pravostrannou formou KRK 78 měsíců, zatímco u levostranné formy KRK 89 měsíců (Meguid et al. 2008). Výsledky studie u 17 000 pacientů s KRK od Benedixe a spol. ukázaly 5leté přežití 73 % u pravostranné formy a 74 % u levostranné formy KRK (Benedix et al. 2010).

1.5.2. Histologie

U pravostranné formy KRK nalézáme zpravidla sesilní serátní adenomy a mucinózní adenokarcinomy, zatímco u levostranné formy KRK převažují tubulární a vilózní adenokarcinomy. Pravostranné léze bývají spíše ploché oproti polypoidním lézím levého tračníku. Pravostranné KRK bývají větší a hůře diferencované (Gualco et al. 2006; Nawa et al. 2008). U metastatické formy pravostranného KRK nacházíme spíše peritoneální karcinomatózu, zatímco u metastatické formy levostranného KRK vidáme častěji přítomnost jaterních a plicních metastáz (Verwaal et al. 2008).

1.5.3. Genetika

Genetické mutace vedoucí ke vzniku pravostranné a levostranné formy KRK jsou odlišné. U pravostranné formy nacházíme více mutací v mikrosatelitové instabilitě (MSI; MSI-High) zatímco levostranné tumory vykazují více chromozomálních instabilit. Histologicky u MSI-High tumorů se vyskytuje vyšší přítomnosti T-lymfocytů, což je spojeno s lepší prognózou a nižším výskytem metastáz (Glebov et al. 2003; Haug et al. 2011).

Tabulka 2. Souhrn rozdílů mezi pravostrannou a levostrannou formou KRK

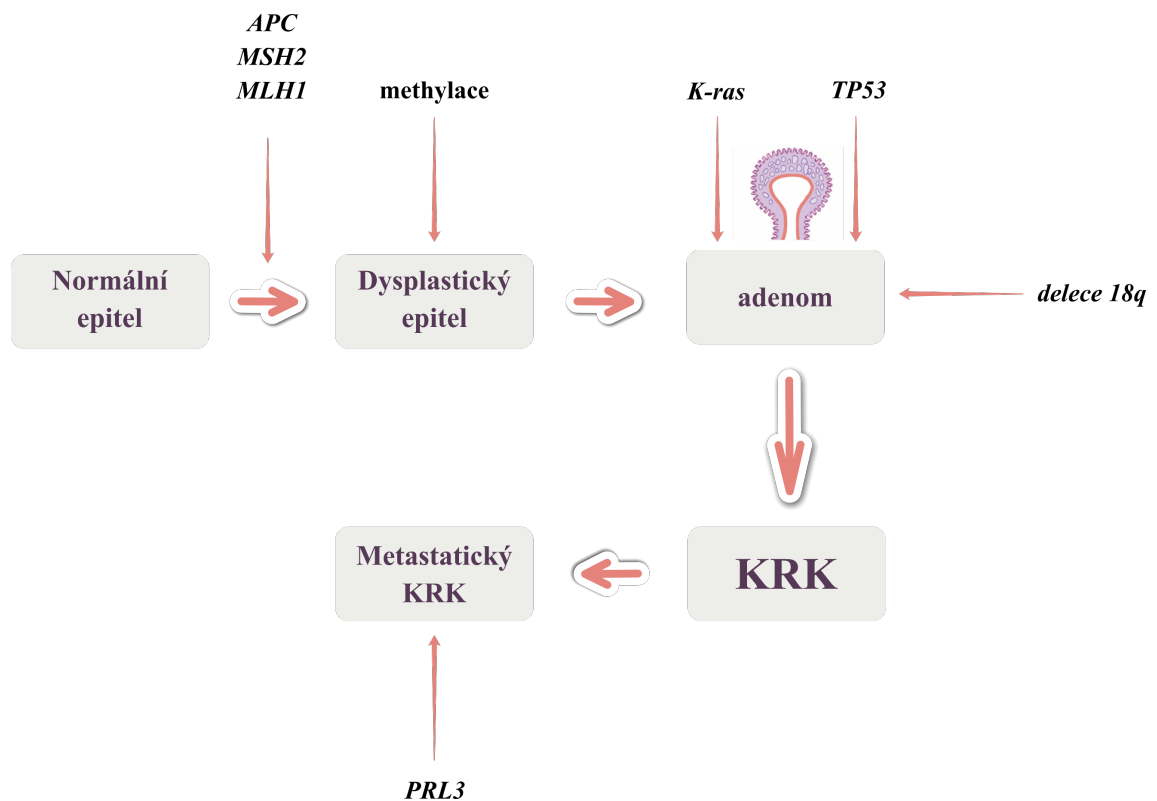
Pravostranná forma KRK	Levostranná forma KRK
Mucinózní adenokarcinom, sesilní serátní adenom	Tubulární, vilózní adenokarcinom
Ploché léze	Polypoidní léze
MSI-High	CIN-high
Vysoká infiltrace T-lymfocyty	Nízká infiltrace T-lymfocyty
Karcinomatóza peritonea	Metastázy jater a plic
Ve vyšším věku	V mladším věku
Predominantně u žen	Predominantně u mužů
Lepší prognóza v časných stádiích (stadium I a II)	Lepší prognóza v pozdějších stádiích (stadium III a IV)
Dobrá odpověď na imunoterapii	Dobrá odpověď na adjuvantní konvenční terapii a cílenou terapii

1.6. Formy KRK

KRK se dělí na **sporadický** (90–95 % KRK) a **hereditární** (5–10 % KRK).

Sporadický KRK vzniká v důsledku postupné akumulace mutací. Střevní epitel podléhá stálé obnově z kmenových buněk bazí krypt přibližně během pěti dnů včetně fáze množení a diferenciaci. Během cyklů může docházet k akumulaci chyb v DNA buněk v důsledku například chronického zánětu, infekce, expozici mutagenům atd. (Podolsky et al. 2015). Proces, kdy dochází postupně k progresi z normálního střevního epitelu do dysplastického epitelu a následně do karcinomu trvá zpravidla 10–15 let (tzv. **sekvence adenom-karcinom**; obr. 4.). Základem této sekvence jsou mutace v genech *APC*, *KRAS* a *TP53*. Sekvence byla prvně popsána Fearonem a Vogelsteinem v roce 1990 (Fearon and Vogelstein 1990; Vogelstein et al. 2013) (Obr. 4). Udává se, že se jedná o nejčastější cestu vzniku KRK, i když se objevují důkazy, že patogeneze KRK je spíše otázkou kombinace více sekvencí zároveň (současný výskyt mutací *APC*, *KRAS* a *TP53* je pouze v 7 %) (Jass 2004; Smith et al. 2002). Další sekvence, které mohou vést ke vzniku sporadického nádoru, jsou tzv. **de novo**, kde dochází ke vzniku nádoru

na podkladě nově vzniklé mutace zpravidla genu *TP53* bez předchozí mutace v *APC* genu. Kromě této cesty vzniká také KRK v **zánětlivě změněné střevní sliznici**, například u pacientů s idiopatickým střevním zánětem (IBD), kde se zvyšuje riziko vzniku mutace vedoucí ke KRK nebo serátnímu (pilovitému) adenomu (serrated adenoma). KRK u serátních adenomů vzniká nejčastěji časnou mutací v *KRAS* a *BRAF* genech (Bettington et al. 2013; Gala et al. 2014).



Obr. 4. Adenom-karcinom sekvence, upraveno podle (Feldman et al. 2016)

Hereditární formy vznikají na podkladě zděděné mutace (Bogaert and Prenen 2014). Zahrnují familiární adenomatózní polypózu (FAP), atenuovanou formu FAP (aFAP), hereditární nepolypózní formu kolorektálního karcinomu (HNPCC), MYH asociovanou polypózu a polypózní syndromy (Rustgi 2007).

FAP je autosomálně dominantní onemocnění, které je charakteristické vrozenou mutací v *APC* genu, které vede k narušení Wnt/ β -kateninové signální dráhy (viz. dále). U 5–30 % pacientů s FAP není mutace v *APC* genu identifikována, ale byla u nich zjištěna mutace v *MUTYH* genu (Kartheuser et al. 1995; Pezzi et al. 2009; Varesco 2004). FAP zaujímá celkem 1 % ze všech KRK a je charakteristická výskytem velkého počtu polypů (stovky až tisíce) v druhé dekádě života s prakticky 100% rizikem malignizace. Z tohoto důvodu se u těchto

pacientů doporučuje časná kolektomie. Součástí syndromu jsou také extraintestinální projevy jako kožní léze, osteomy a extraintestinální nádorová onemocnění. Atenuovaná forma FAP je typická menším počtem polypů, pozdějším začátkem onemocnění, a nižší frekvencí extraintestinálních příznaků.

U hereditární nepolypózní formy KRK (HNPCC, Lynchův syndrom) identifikujeme vrozenou mutaci v tzv. genech opravy chybně spárovaných bazí (DNA mismatch repair genes – MMR) (Chew et al. 2015). Mutací v MMR dochází k hromadění replikačních chyb, které nejsou opraveny, a tím dochází k větší pravděpodobnosti vzniku KRK. HNPCC je nejčastější formou hereditárního KRK (2–3 %). Pacienti s HNPCC jsou zpravidla nižšího věku s vyšším rizikem vzniku synchronních a extraintestinálních nádorů (ovaria, ledviny, endometrium, žaludek, pankreas, atd.) (Vaja et al. 2010).

MYH-asociovaná polypóza je autosomálně recesivní onemocnění zapříčiněné mutací v *MUTYH* genu, inaktivujících glykosylázu bázové excizní reparace, zodpovědné za opravy oxidativního poškození DNA (bázové excizní reparace – BER). Mutace v *MUTYH* vede dominantně k transverzi CG–AT. U pacientů nacházíme zpravidla desítky polypů se zhruba 65% pravděpodobností vzniku karcinomu (Al-Sohaily et al. 2012; Ma et al. 2018).

Hamartogenní polypózní syndromy zahrnují Peutz-Jaeghersův syndrom (PJS), juvenilní polypózní syndrom (JPS) a Cowdenův syndrom. PJS je syndrom autosomálně dominantní onemocnění s výskytem polypů v gastrointestinálním traktu (GIT) a mukokutánní pigmentací. JPS je rovněž autosomálně dominantní syndrom s výskytem četných juvenilních polypů, které jsou spojené s vyšším rizikem nádorů pankreatu. Hlavním znakem Cowdenova syndromu, který s sebou nese i vyšší riziko vzniku nádoru prsu, štítné žlázy a endometria, je výskyt hamartogenních polypů v GIT.

1.7. Patogeneze KRK

KRK vzniká postupnou akumulací genetických mutací a epigenetických změn, které vedou k přeměně zdravé sliznice tlustého střeva v nádorovou tkáň. Nejčastější molekulární a genetické změny vedoucí ke vzniku nádoru jsou strukturální a numerické změny chromozomů označované jako **chromozomální instabilita** (CIN), dále pak zvyšování počtu kopií opakujících se sekvencí DNA (tzv. mikrosatelity) způsobené defektní opravou špatně

párovaných bází, označované jako **mikrosatelitní instabilita** (MSI) a nakonec aberantní hypermethylace **promotorových oblastí genů, CpG island methylator phenotype** (CIMP) (Al-Sohaily et al. 2012; Armaghany et al. 2012; Nguyen et al. 2020; Strimpakos et al. 2009). Přítomnost chromozomální instability vylučuje přítomnost MSI a vice versa, nicméně některé studie poukazují, že oba fenomény se mohou prolínat (Trautmann et al. 2006). Nesmíme také opomenout potencionální roli mikrobiomu na vzniku KRK (Zhu et al. 2013).

1.7.1. Chromozomální instabilita

CIN je charakterizována nestabilitou chromozomů, při níž dochází ke zmnožení počtu (copy number variation) či ztrátě celých chromozomů, nebo jejich oblastí. Důsledkem je aneuploidie (chybný počet chromozomů), chromozomální amplifikace (zmnožení DNA) nebo ztráta heterozygoty chromozomů (loss of heterozygosity, LOH). CIN se spojuje se vznikem KRK v 65–70 % případů. Příznačně jsou takto postiženy oblasti onkogenů a tumor-supresorových genů *APC*, *KRAS* či *TP53* (Al-Sohaily et al. 2012; Markowitz and Bertagnolli 2009).

1.7.2. Mikrosatelitní instabilita

Mikrosatelity jsou krátké sekvence opakujících se nukleotidů (nejčastěji A a C), které se nacházejí v celém genomu a jsou náchylné k chybám, ke kterým dochází během replikace. Chyby, které vzniknou v mikrosatelitech, jsou rozpoznány systémem MMR, který opravuje chyby v párování bází. MSI je odrazem nedostatečné funkce MMR systému. Na funkci MMR systému se podílí geny *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH3*, *PMS1* a *Exo 1*. MSI jako důsledek poruchy MMR systému je spojena jak s hereditární (HNPCC), tak i se sporadickou formou KRK (15 % nádorů). V patogenezi rozlišujeme KRK s MSI-High a MSI-Low (viz. kapitola 1.8.4.) (Al-Sohaily et al. 2012; Kuipers et al. 2015; Markowitz and Bertagnolli 2009).

1.7.3. Metylace CpG ostrůvků – CIMP (CpG Island Methylator Phenotype pathway)

CpG methylace je kromě modifikace histonů a nekódujících RNA další epigenetická změna, která nevede ke změně DNA sekvence, ale ovlivňuje promotorovou oblast genu a tím jeho expresi. Nejčastěji k metylaci DNA dochází v oblasti 5'-CG-3' dinukleotidu, respektive vzniká pevná kovalentní vazba -CH₃ skupiny na pozici 5' cytozinu v opakujícím se CG dinukleotidu. Geny, které jsou ovlivněny hypermethylací promotorové oblasti jsou především *APC*, *MCC*, *MLH1*, *MGMT* a další (Farkas et al. 2014). Tumory s CIMP mívají často přítomnou

mutaci v *BRAF* genu či jsou MSI-High nebo MSI-Low. CIMP je příčinou cca 15–20 % sporadického KRK. Vyskytuje se častěji u žen, starších pacientů a kuřáků (East et al. 2008; Noffsinger 2009).

Jedním z potenciálně významných reparačních genů, který je v patogenezi KRK metylován, je *MGMT* (*O*⁶-metylguanin DNA metyltransferáza). Ztráta funkce *MGMT* je téměř výhradně spojena s CpG metylací. Funkcí tohoto DNA reparačního enzymu je ochraňovat buňky před působením exogenních karcinogenů odstraňováním alkyl skupiny z pozice *O*⁶ guaninu. Metylaci promotorové oblasti *MGMT* můžeme nalézt až ve 40 % KRK, nejčastěji v serátních adenomech. Předpokládá se, že metylace *MGMT* je v onkogenezi jednou z prvních událostí. Pacienti s defektním *MGMT* mají vyšší procento mutací v *KRAS* genu a lépe reagují na chemoterapii.

1.7.4. Střevní mikrobiom a KRK

Studium střevního mikrobiomu je v posledních letech výrazně na vzestupu. V databázi PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) byla v roce 2002 pod heslem „gut microbioma“ publikována jediná práce, v roce 2018 bylo evidováno více jak 2320 a v roce 2019 dokonce 4219 záznamů.

V GIT člověka žije okolo 10^{13} – 10^{14} bakterií, které jsou důležité z hlediska zejména nutriční a imunity. Střevní mikrobiota se skládá z anaerobních bakterií zahrnující rody *Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* a další. Předpokládá se, že dlouhodobé působení metabolitů střevních bakterií na sliznici tlustého střeva by se mohla podílet na vzniku KRK (M. R. Wilson et al. 2019; Zhu et al. 2013). Analýza z hluboce zmražených resekátů střeva (KRK a zdravá tkáň) ukázala, že hlavními rody, které dominovaly ve skupině s KRK, byly *Fusobacterium* a *Campylobacter* (Leung et al. 2019). Podle práce od Zhanga a spol. dominovali u pacientů s KRK (vzorky odebrané během koloskopie a následně hluboce zaměřeny) rody *Eubacterium* a *Devosia* (H. Zhang et al. 2019). Hlavním nedostatkem obou studií je malý počet pacientů s KRK a kontrolních skupin.

Podle Wonga a spol. se ukazuje, že mikrobiom úzce ovlivňuje enterocyty, imunitní systém a metabolom GIT a hraje roli nejen ve vzniku KRK, ale také pravděpodobně v progresi a odpovědi na léčbu (Wong and Yu 2019).

1.8. Genetické změny vedoucí ke KRK

V současné době je známa celá řada genetických změn vedoucích ke vzniku KRK. Jedná se například o změny v tumor-supresorových genech (gen, jehož produkt chrání buňky před maligní transformací), onkogenech (gen, jehož porucha může způsobit vznik zhoubného bujení) či miRNA. Kromě těchto známých genetických změn (geny s vysokou penetrancí), a to jak v hereditární, tak sporadické formě KRK, byly díky tzv. celogenomovým asociačním studiím (Genome Wide Association Studies, GWAS) identifikovány varianty s nízkou penetrancí, které se také podílejí na patogenezi KRK. Tento fakt podtrhuje, že riziko vzniku KRK je vysoce polygenní a teprve další robustní studie ukážou pravý význam těchto vzácných variant na patogenezi KRK (Huyghe et al. 2019; Peters et al. 2015).

1.8.1. Mutace v tumor-supresorových genech

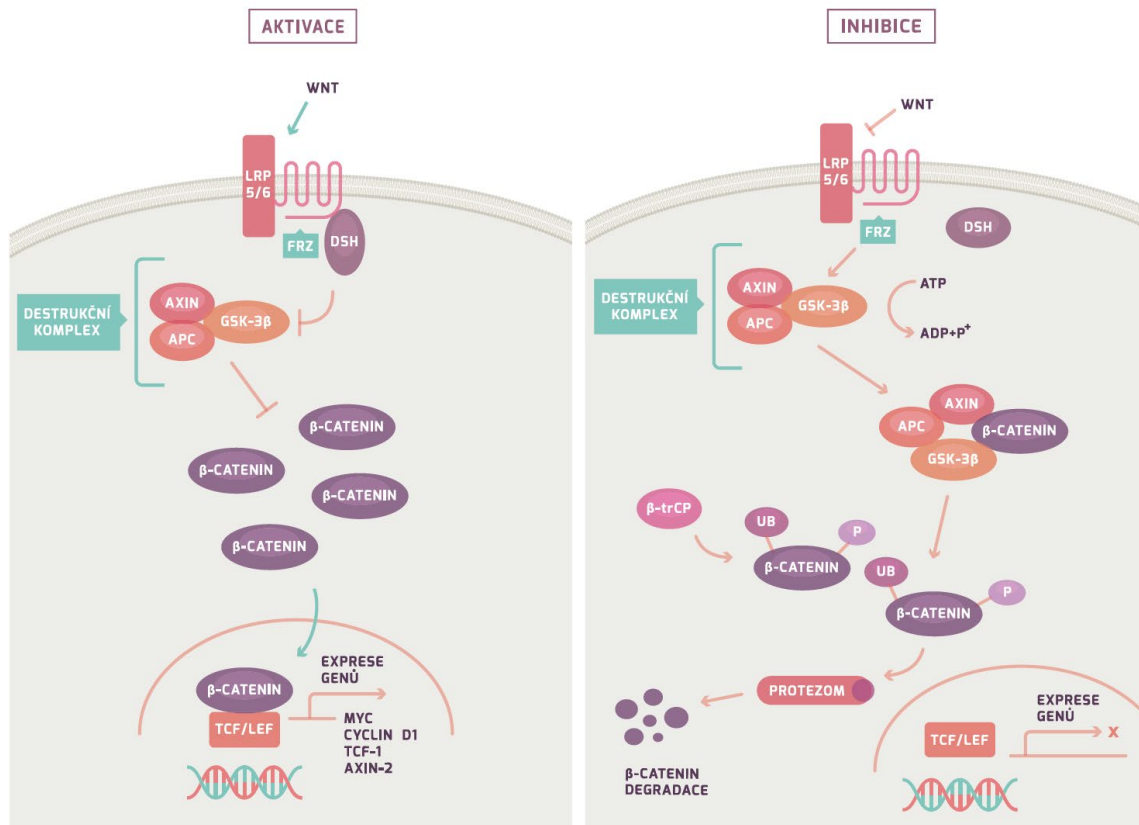
1.8.1.1. *Adenomatous Polyposis Coli gen (APC gen)*

APC gen je tumor-supresorový gen lokalizovaný na dlouhém raménku 5. chromozomu (5q21). Byl objeven v roce 1987 a poprvé naklonován v roce 1991 (Bodmer et al. 1987). Podílí se nejenom na vzniku sporadického KRK, ale rovněž hraje významnou roli v patogenezi hereditárních forem KRK, konkrétně při vzniku FAP, a také aFAP (Kwong and Dove 2009).

APC gen s 15 exony hraje důležitou roli v proliferaci, diferenciaci, migraci, apoptóze, a také v řízení buněčného cyklu včetně stabilizace mikrotubulů během mitózy. Mutace v *APC* se vyskytuje u časných stadií nádoru a zpravidla se jedná o bodové mutace či ztrátu heterozygoty. K manifestaci mutace *APC* je důležité, aby dle Knudsonovy two-hit hypotézy byly mutovány obě dvě alely tohoto genu, což vede ke ztrátě jeho tumor-supresivního účinku (Berger et al. 2011). Výsledkem je poté neúplný *APC* protein, který částečně ztrácí svou funkci.

APC řídí **Wnt/ β -kateninovou signální dráhu** (Obr. 5.). Za fyziologických podmínek *APC* tvoří protein, který společně s Axin/Axin2 a GSK-3 β vytváří tzv. „destruktivní komplex“, který iniciuje ubikvitaci (označení) β -kateninu (protein koordinující buněčnou adhezi a genovou transkripci) s jeho následnou degradací v proteazomu (proteinový komplex degradující nepotřebné či poškozené proteiny). Mutace v *APC* vede ke snížení degradace β -kateninu a následně k jeho hromadění. Nahromaděný β -katenin vstupuje do jádra, váže se na jaderné receptory a indukuje transkripci mnoha genů včetně *CCND1*, *c-myc* a *CRD-BP*. Důsledkem

je nejenom nekontrolovatelná proliferace a růst buňky, ale rovněž i indukce apoptózy. Poslední studie dokazují, že ztráta genu vedoucí k proliferaci a vyššímu přežívání buňky je závislá na původní diferenciaci buněk (Benchabane and Ahmed 2009; Fearnhead et al. 2002; Fodde et al. 2001; Kwong and Dove 2009; Walther et al. 2009).



Obr. 5. APC signální dráha, převzato z (Kral et al. 2016)

1.8.1.2. TP53

TP53 je tumor-supresorový gen, lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozomu (17p13.1). Základní funkcí *TP53* je regulace buněčného cyklu (zastavení cyklu a zahájení opravy DNA), apoptózy a buněčného metabolismu (Armaghany et al. 2012; Slyskova et al. 2012; Vogelstein et al. 2000). V případě poškození DNA *TP53* koordinuje opravu DNA, a pokud ji nelze opravit, tak navodí apoptózu buňky. *TP53* je nejčastěji postiženým genem v mutagenезi mnoha nádorových onemocnění – mutace bývají nalézány až u 50 % všech nádorů (Royds and Iacopetta 2006). Je známo celkem 2314 mutací *TP53*, které jsou buď aktivační (cca 71 %, protein se váže na mdm2 a dojde k jeho degradaci) nebo inaktivační (29 %, nemožnost regulace genové exprese) (Soussi et al. 2005). Stejně jako u *APC*, tak i u *TP53*, je k funkčnímu projevu nutná mutace obou alel.

Ke ztrátě alely zpravidla dochází na 17. chromozomu a zároveň k mutaci druhé alely na párovém chromozomu. Až 80 % představují missense mutace, vedoucí k expresi stabilního stejně dlouhého proteinu, který ale ztrácí možnost vazby na DNA a její následnou regulaci (Iacopetta et al. 2006). Mutace genu bývá přítomna v pozdější fázi vývoje KRK a zpravidla vede k přechodu adenomu do adenokarcinomu. Pokročilé formy KRK (T1-4N1-2M0-1) mají ve srovnání se stadii T1-4N0M0 vyšší frekvenci mutací obecně. Mutace v *TP53* bývá přítomna až v 60 % KRK a pro významnou heterogenitu mutantů *TP53* lze jen těžko odhadnout jejich prognostický význam. Recentní studie od Williamse a spol. ukazuje, že zvýšená exprese *TP53* je spojena s nižším efektem adjuvantní chemoterapie u pacientů ve stadiu III (D. S. Williams et al. 2020).

1.8.1.3. FBXW7

FBXW7, někdy označován jako hCdc4, je tumor-supresorový gen lokalizovaný dlouhém raménku 4. chromozomu (4q31.3). Tento gen je zodpovědný za tvorbu *FBXW7* proteinu, který reguluje ubikvitin-dependentní proteolýzu regulačních proteinů a člení se do rodiny F-box proteinů. *FBXW7* je regulován pomocí P53, C/EBP σ (CCAAT/enhancer-binding protein- σ), miR-223 a miR-27a. Proteiny regulované pomocí *FBXW7* jsou důležité pro determinaci, osud buňky, dělení, či zachování integrity genetické informace. Jedná se o cyklin E1, c-Myc, c-Jun, Notch, Aurora-A, Mcl-1, SREBP, mTOR, KLF5, c-Myb, NF1, NRF1, HIF-1 α a p100. *FBXW7* protein má tři izoformy (α , β a γ), které se liší N-terminálním koncem a mají konzervativní C-konec (C-konec je protažen o osmkrát se opakující WD40 jednotku, na kterou se váže fosforylovaný substrát). Isoformy se nacházejí jak v jádře a jadérku, tak i v cytoplasmě. *FBXW7* je součástí SCF komplexu (SKP1-CUL1-F-box protein). Stavba SCF komplexu je tvořena Skp1 proteinem, Rbx1 a Cullin1 proteinem, a nakonec *FBXW7* proteinem, na který se váže substrát, který je pak rozložen v 26S proteazomu. Bylo zjištěno, že mutace *FBXW7* je přítomen zhruba v 6 % tumorů (cholangiokarcinom 35 %, leukemie 31 %, tumor endometria 9 %, KRK 9 %, tumor žaludku 6 %). Převaha (94 %) mutací ve *FBXW7* genu jsou bodové mutace (delece, inserce). U mnoha typů tumorů byla nalezena pouze mutace v jedné alele, což naznačuje, že *FBXW7* je atypickým tumor-supresorovým genem, který nevyžaduje ke ztrátě své funkce mutaci v obou svých alelách. Mutace v *FBXW7* vede k deregulaci onkoproteinů, a tudíž k nekontrolované proliferaci a množení buňky (Akhoondi et al. 2007; Cheng and Li 2012; Tan et al. 2008; Wang et al. 2012).

1.8.2. Mutace v onkogenech

1.8.2.1. KRAS

KRAS gen patří do rodiny proto-onkogenů (*HRAS*, *NRAS*) a je mutován (nejčastěji v exonech 2 a 3) u 30-50 % pacientů se sporadickým KRK (Al-Sohaily et al. 2012; Pardini et al. 2012). S mutací *KRAS* u familiární formy se setkáváme jen zřídka. Z hlediska posloupnosti, jeho mutaci předchází mutace *APC*. Různé mutace *KRAS* (exon 2, exon 3) mohou mít odlišné prognostické a prediktivní důsledky, například odlišný účinek biologické terapie.

KRAS protein je 21 kDa velký membránový protein, který hraje roli v buněčné signalizaci ovlivňující buněčný růst, přežití, diferenciaci, proliferaci a řadu dalších buněčných dějů. Konkrétně *KRAS* a *BRAF* jsou součástí RAS/RAF/MAPK signální dráhy (Obr. 6.) (Lamy et al. 2011). Mutovaný protein si zachovává aktivní formu z důvodu nefunkční GTPázové aktivity, která mění GTP na GDP, a tím má stimulační efekt na proliferaci a růst buňky. *KRAS* je aktivován přes EGFR receptor, který je během mutagenese KRK častokrát více exprimován a po jeho stimulaci dochází k aktivaci *KRAS* navázáním TGF. Při aktivaci receptoru EGFR dochází také k stimulaci intracelulární kinázové domény. Ta poté aktivuje řada proteinů jako je SOS, dále GRB, následně *KRAS*, a ten poté stimuluje *BRAF*. Dále signální kaskáda pokračuje přes proteiny MEK, ERK, až dojde k ovlivnění genové exprese a proliferace buňky (Armaghany et al. 2012). Během aktivace EGFR receptoru dochází k stimulaci PI3K (fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát), který inhibuje apoptózu buňky. Tato dráha je poté regulována pomocí PTEN proteinu, který blokuje funkci PI3K (Karakas et al. 2006; Samuels and Waldman 2010).

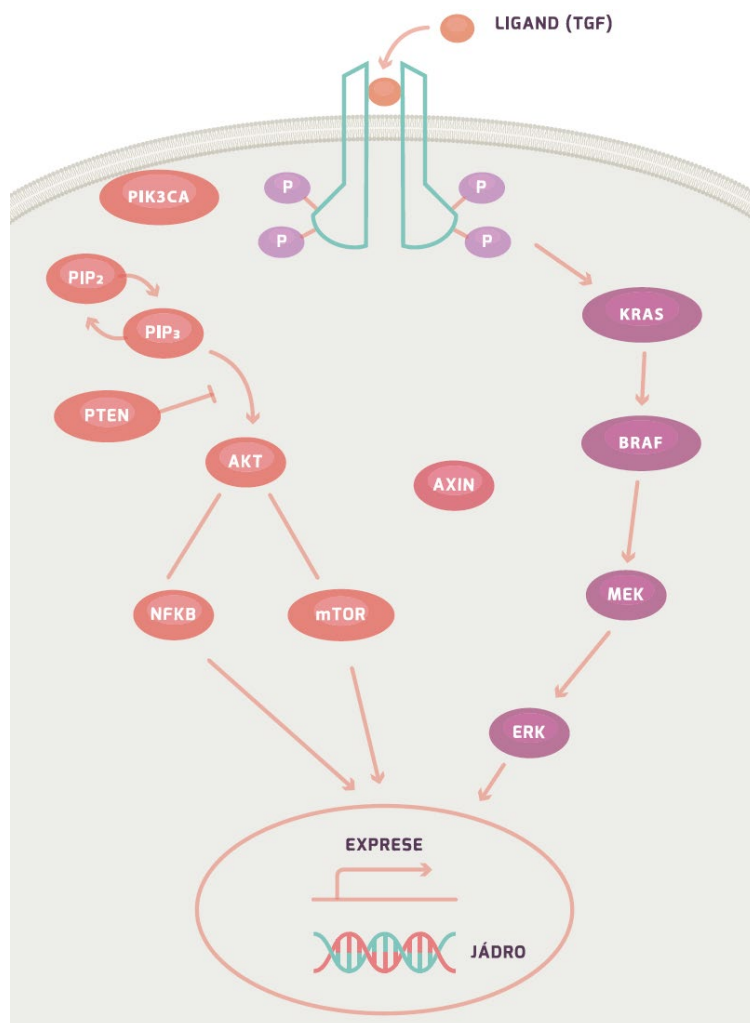
Informace, zda pacient má či nemá mutaci v *KRAS*, je důležitá z důvodu následné léčby pokročilé formy KRK monoklonálními protilátkami anti-EGFR. Geny mají aktivační konformaci a stále mohou stimulovat buněčnou proliferaci. Důsledkem je snížená odpověď na biologickou léčbu (Demes et al. 2013; Karapetis et al. 2008; Strimpakos et al. 2009).

BRAF gen, stejně jako *KRAS*, je proto-onkogen, který je součástí RAF rodiny serin/threonin kináz a reguluje růst buňky skrze RAF-MAP signální dráhu. V této signální dráze zajišťuje downregulaci *KRAS* a upregulaci MEK. U sporadické formy nádorů se tato mutace vyskytuje cca v 10 %. Jedná se převážně o hotspot mutaci ve V600E. Mutace v *BRAF* byly identifikovány u 4 % pacientů s MSI-Low a u 40 % s MSI-High. Stejně jako u *KRAS*, pacienti s *BRAF* mutací mají horší odpověď na léčbu monoklonálními protilátkami proti EGFR.

BRAF způsobuje sníženou expresi *KRAS* genu. Tento fakt je klinicky významný pouze tehdy, pokud *KRAS* mutace není přítomna (Armaghany et al. 2012; Davies et al. 2002; Rosty et al. 2013). Přítomnost *KRAS* mutace zpravidla vylučuje přítomnost *BRAF* mutace a vice versa, nicméně objevují se případy přítomnosti mutací obou genů (Midthun et al. 2019; Sahin et al. 2013).

I přes nepřítomnost mutace v *KRAS* či *BRAF* není léčba monoklonálními protilátkami stoprocentně úspěšná. Byla identifikována další signální dráha, která hraje roli v patogenezi KRK, a to PI3K dráha. *PIK3CA* gen je mutován u více jak 25 % pacientů s KRK. Při této mutaci dochází k aktivaci signální dráhy, která v konečném důsledku vede k inhibici apoptózy. Na druhou stranu protein PTEN vede ke snížené expresi PI3K, a tudíž vede k poklesu aktivity signální dráhy. Nicméně setkáváme se i s mutací v *PTEN* genu, která má za následek neschopnost regulace PI3K signální dráhy vedoucí k horší odpovědi na biologickou léčbu a horšímu celkovému přežití pacienta (Sartore-Bianchi et al. 2009; Strimpakos et al. 2009; Yin and Shen 2008).

Mutaci můžeme nalézt rovněž v receptoru pro transformující růstový faktor β (TGFR). Známý jsou celkem tři formy tohoto receptoru, ale nejčastěji se setkáváme s mutací u TGF β RII. Tato mutace je přítomna až u 90 % pacientů s MSI instabilitou. Mutace TGF β RII vede k aktivaci PI3K, která vyústí v inhibici apoptózy a rovněž povede k epiteliální/mezenchymální transformaci (proces, při kterém epitelové buňky ztrácí schopnost buněčné adheze, a tím získávají možnost migrovat, stávají se z nich mesenchymální zárodečné buňky s možností diferenciace do mnoha buněčných typů; proces lze identifikovat při hojení ran, fibróze a v procesu metastazování). Transformace má za následek progresi, invazi a metastazování KRK.



Obr. 6. KRAS signální dráha, převzato z (Kral et al. 2016)

1.8.3. Ztráta heterozygosity

Ztráta heterozygosity (LOH, loss of heterozygosity), popsána Knudsonem (Knudson 1985), je dalším mechanismem, který může vést ke vzniku KRK. Nejčastěji dochází ke ztrátě heterozygosity na 18q chromozomu. Další chromozomy postiženy mechanismem LOH jsou 1p, 5q, 17p. Na 5q se jedná o ztrátu alely *APC*, zatímco na 17p chromozomu se jedná o ztrátu alely pro *TP53* (Armaghany et al. 2012).

1.8.3.1. *DCC*

Jeden z genů, který může být postižen na 18. chromozomu, je *DCC* gen (Deleted in Colorectal Carcinoma). Ten je zodpovědný zejména za expresi *DCC* transmembránového proteinu, ale rovněž i za další produkty díky alternativnímu sestřihu (splicing) (Mehlen and Fearon 2004). Téměř 70 % KRK má přítomnou LOH genu *DCC* (exon 7) (Mehlen and Fearon 2004). Kromě LOH *DCC* se v patogenezi uplatňují i jiné somatické mutace, například bodová mutace či delece *DCC* (Arakawa 2004). *DCC* je tumor-supresorový gen, ačkoliv o jeho jasném

zařazení se vedou stále velké diskuse. Někdy je označován jako poslední obránce (Late Gatekeeper), který limituje progresi tumoru navozením apoptózy (Castets et al. 2012). Jeho funkcí je blokovat růst buňky v případě absence svého ligandu (netrin-1). Netrin patří do rodiny difuzibilních proteinů podobných lamininu, který hraje důležitou roli v určování směru růstu a migrace axonů. Netrin-1 byl popsán jako faktor buněčného přežití. Váže se na transmembránové receptory DCC a UNC5H (UNC5A, UNC5B, UNC5C) (Mazelin et al. 2004). Oba receptory jsou schopné indukovat buněčnou smrt v nepřítomnosti svého ligandu, a proto receptory hrají roli v patogenezi KRK.

Koncentrace netrinu-1 je nejvyšší v oblasti bazí krypt tlustého střeva a klesá apikálním směrem. V případě mutace *DCC* nebude přítomen transmembránový receptor pro netrin-1, a tudíž nebude navozena apoptóza a buňka bude nadále proliferovat. V nepřítomnosti netrinu-1 či při jeho nižší koncentraci (fyziologický děj) dochází k odštěpení intracelulární domény DCC proteinu kaspázou za vzniku ADD domény (addiction/dependent domain), která je schopná vazby na kaspázu 9, a tím aktivaci buněčné smrti (Duman-Scheel 2012; Mehlen and Fearon 2004). Mutace v tomto genu nalézáme zpravidla až u pokročilých forem KRK, nikoliv v úvodní fázi patogeneze. Otázkou je, jak je tomu u mutace transmembránového proteinu UNC5H. LOH na 18. chromozomu můžeme najít v patogenezi i jiných nádorových onemocnění, jako jsou tumory žaludku, prostaty, endometria, ovarií atd. Ze studií vyplývá, že nemocní s LOH *DCC* mají horší prognózu nežli pacienti bez ní, a to z důvodu vyšší agresivity tumorózního procesu.

Jak již bylo řečeno výše, netrin-1 se váže kromě DCC i na UNC5H receptory (A, B, C), které při nepřítomnosti netrinu-1 indukují apoptózu. Mechanismus indukce apoptózy je odlišný od DCC receptoru. Při absenci netrinu-1 dochází ke štěpení intracelulární části UNC5H receptoru pomocí neznámé proteázy či kaspasy-3, která odhalí doménu, která následně zahájí apoptózu. Mutace této intracelulární části UNC5H receptoru povede k inhibici apoptózy. Exprese UNC5H receptoru je fyziologicky řízena pomocí *TP53*. V případě poškození DNA dochází ke zvýšené expresi UNC5H receptoru a následnému odštěpení intracelulární domény a navození apoptózy. *TP53* řídí expresi netrinu-1, který společně s UNC5H zpětně downregulují expresi *TP53*, a díky vazbě netrin-1 a UNC5H inhibují *TP53* indukovanou apoptózu buňky (Arakawa 2004).

1.8.3.2. SMAD

Dalšími geny, které jsou lokalizovány na 18. chromozomu a mohou se podílet na patogenezi KRK jsou *SMAD2* a *SMAD4*. Hrají zásadní roli v TGF- β signální dráze. TGF- β rodina zahrnuje TGF- β a kostní morfogenetický protein (Bone morphogenetic protein, BMPs). Tyto proteiny se váží na TGF- β receptory (T β RI, T β RII) mající široké spektrum účinku, jako je řízení buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy, migrace a tvorbu extracelulární mezibuněčné hmoty (Ten Dijke et al. 2002). Po vazbě TGF- β na receptor dochází k aktivaci SMAD proteinu (Smad anchor for receptor activation), který zaktivuje intracelulární proteiny SMAD2 a SMAD3. Komplex SMAD2 a SMAD 3 se naváže na SMAD4 a tento komplex SMAD2,3,4 putuje do jádra, kde se váže přímo na DNA sekvenci či na DNA transkripční faktory. Výsledkem vazby je inhibice růstu buňky či navození apoptózy. Buněčný cyklus se po aktivaci TGF- β zastaví v G1 fázi. *SMAD* se chová jako tumor-supresorový gen.

Výsledkem exprese *SMAD* jsou SMAD proteiny různých funkcí. R-SMAD (receptorové SMAD proteiny: 1,2,3,5,8), Co-SMAD (mediátorové SMAD proteiny: 4 α , 4 β), I-SMAD (inhibitorové SMAD proteiny: 6, 7) regulují genovou expresi. TGF- β /SMAD signální dráha musí být pečlivě regulována, což mají za úkol SMAD6 a SMAD7. SMAD7 protein se váže na SMURF1,2 (E3 ubikvitin protein ligáza) a aktivuje degradaci SMAD4, čímž reguluje TGF- β /SMAD signální dráhu. Růstové faktory jako EGF (epidermal growth factor) a HGF (hepatocytes growth factor) dokáží inhibovat TGF- β /SMAD signální dráhu skrze aktivaci Ras, která bude indukovat degradaci SMAD4 v proteazomu. TGF- β v pozdější fázi nádorového procesu nemusí hrát pouze roli tumor-supresivní dráhy, ale může být promotorem nádorového bujení, a to skrze aktivaci RhoA kinázy. Kináza následně způsobí uvolnění buněčných spojů, snížení exprese E-cadherinu a zvýšení motility buňky. Následkem je epiteliální/mesenchymální transformace (EMT) a možnost šíření nádorových buněk a zakládání metastáz. Tento fakt dokládá možnost tvorby metastáz nezávisle na funkci TGF- β /SMAD signální dráhy.

TGF- β signální dráha dokáže aktivovat i jiné signální dráhy mimo RhoA či Ras. Příkladem mohou být ERK, PI3K, JNK. Tyto dráhy na rozdíl od SMAD signální dráhy mají proto-onkogení účinek. Mutace v *SMAD4* (Arakawa 2004) bývá přítomna u jedné třetiny KRK pacientů s LOH (Mehlen and Fearon 2004). Důsledkem této mutace je nefunkčnost TGF- β /SMAD signální dráhy, která povede k proliferaci buněk a růstu tumoru. Nemocní s KRK a vysokou expresí

SMAD4 mají signifikantně delší přežití než pacienti s nízkou expresí. Tento fakt však nemusí platit u jiných malignit, jako je nádorové onemocnění prsu, kde vysoká exprese *SMAD* naopak vede k tvorbě kostních metastáz (B. Zhang et al. 2010).

1.8.4. Geny opravy chybného párování (DNA Mismatch repair)

Jak již bylo řečeno v úvodu kapitoly 1.7.2., nádor tlustého střeva vzniká na podkladě chromozomálních nestabilit, CpG metylace či mutací v tzv. MMR genech, které vedou k MSI. DNA mismatch repair (MMR) je systémem, který opravuje chybné párování bazí při replikaci genetické informace, zjednodušeně opravuje chyby, které nejsou rozpoznány proof-reading aktivitou DNA polymerázy během replikace. Nejedná se pouze o tuto funkci, ale MMR systém má i další funkce jako regulace buněčného cyklu a TP53 dependentní apoptotickou odpověď na odlišná poškození DNA (Jacob and Praz 2002).

V patogenezi KRK dochází vlivem mutace v MMR genech nejčastěji ke vzniku MSI. K tomu, aby byl MMR gen vyřazen z funkce, je zapotřebí mutace v obou alelách genu. Proto se MMR geny chovají jako tumor-supresorové geny s výjimkou *Exo1*, u kterého je dostatečná mutace jedné alely. Mikrosatelity, neboli repetitivní nukleotidové sekvence, se v genomu vyskytují každých 30–60 kilobází (Armaghany et al. 2012). MMR systém má za úkol takové chyby opravovat a zabránit tak vzniku mikrosatelitové instability (Al-Sohaily et al. 2012). Mutace v MMR systému mohou být jak vrozené (germinální), tak i získané. Právě ty vrozené mutace v MMR systému jsou klíčem ke vzniku hereditární nepolypózní formy KRK (HNPCC), kde nacházíme mutaci v MMR genech u 50–70 % případů (Armaghany et al. 2012; Stigliano et al. 2008). Získané mutace (delece, inzerce atd.) či epigenetické změny (metylace) v MMR jsou zodpovědné za vznik cca 15 % sporadického KRK (Al-Sohaily et al. 2012; Armaghany et al. 2012; Sandouk et al. 2013). Jedná se o mutace či metylace v těchto genech: *MSH2* (2p16), *MLH1* (3p21), *MSH6* (2p16), *PMS2* (7p22), *MLH3* (14q24.3), *MSH3* (5q11-q12), *PMS1* (2q31-33) a *Exo1* (1q42-43) (Al-Sohaily et al. 2012; Armaghany et al. 2012; Jacob and Praz 2002; Papadopoulos and Lindblom 1997; Sandouk et al. 2013). Existují však i jedinci, kteří mají vysokou predispozici ke KRK a přitom jsou tzv. MSI stabilní, jinak řečeno u nich nenalzáme mutaci v MMR genech. Bylo zjištěno, že somatická mutace v genu *POLE* (Leu424Val varianta) a *POLD1* (Ser478Asn varianta) vede ke snížení proof-reading efektivity u DNA-polymerázy a tím zvýšené kumulaci mutací a riziku vzniku KRK (Palles et al. 2013).

Tumory s mikrosatelitovou instabilitou můžeme dělit na MSI-High tumory a MSI-Low tumory. MSI-High tumory jsou specifikovány instabilitou ve více jak dvou mikrosatelitech, zatímco MSI-Low tumory mají mutaci pouze v jednom sledovaném mikrosatelitu. Pacienti s KRK na podkladě MSI bývají mladšího věku a překvapivě mají lepší přežívání než ostatní formy KRK. Pacienti s MSI-High mutacemi jsou převážně ženy s pravostrannou lokalizací tumoru. Z patologického hlediska se většinou jedná o špatně diferencovaný, mucinózní karcinom se zvýšenou infiltrací lymfocyty. MSI-High tumory mívají méně *KRAS* a *TP53* mutací, zato *BRAF* mutace jsou častější. Pacienti rovněž s MSI-High mají horší terapeutickou odpověď na léčbu 5-fluorouracilem (5-FU) (Strimpakos et al. 2009). Navzdory těmto faktům pacienti s MSI-High mají lepší celkové přežívání nežli ostatní pacienti s KRK (Al-Sohaily et al. 2012; Armaghany et al. 2012; Devaud and Gallinger 2013). U sporadické formy KRK dochází nejčastěji k inaktivaci promotorové oblasti genu *MLH1* metylací s následkem zabránění exprese genu (Al-Sohaily et al. 2012). MMR a básová excizní oprava (BER) systémy cílí na úseky DNA poškozené 5-FU. Ve studii z poslední doby se ukázalo, že nejenom snížená aktivita MMR systému, ale také změny v BER systému vedou (zvýšení opravy v nádorové tkáni a současném snížení v okolní sliznici) k horší odpovědi pacienta na 5-FU a celkovému přežívání (Vodenkova et al. 2018).

1.8.5. Dlouhé, nekódující RNA (lncRNA)

Lidský genom je přepisován do mRNA či do nekódující RNA (ncRNA) v 5–10 %. Tyto ncRNA jsou pak děleny do dvou tříd: 1) malé ncRNA do velikosti 200 nukleotidů (microRNA, siRNA atd.) a 2) dlouhé ncRNA (>200 nukleotidů; lncRNA). Dnes je známo více jak 146 742 lncRNA. Dlouhé RNA hrají roli v mnoha fyziologických a patofyziologických procesech jako jsou růst buněk, apoptóza, regulace transkripce a posttranskripční úpravy, včetně regulace epigenetických změn (Xu et al. 2014). Bylo publikováno několik prací popisující vyšší (*CCAT1*, *CCAT2*, *PCAT1* atd.) či nižší expresi lncRNA (*MEG3* atd.) u KRK (Kam et al. 2014). Studie Svobody a spol. z roku 2014 provedla analýzu HOTAIR (Homeobox Transcript Antisense Intergenic RNA, gen na 12 chromozomu) dlouhých ncRNA, kde prokázala, že vyšší exprese HOTAIR v tkáni a krvi pacientů s KRK je spojeno s horší prognózou (Svoboda et al. 2014).

1.8.6. MicroRNA

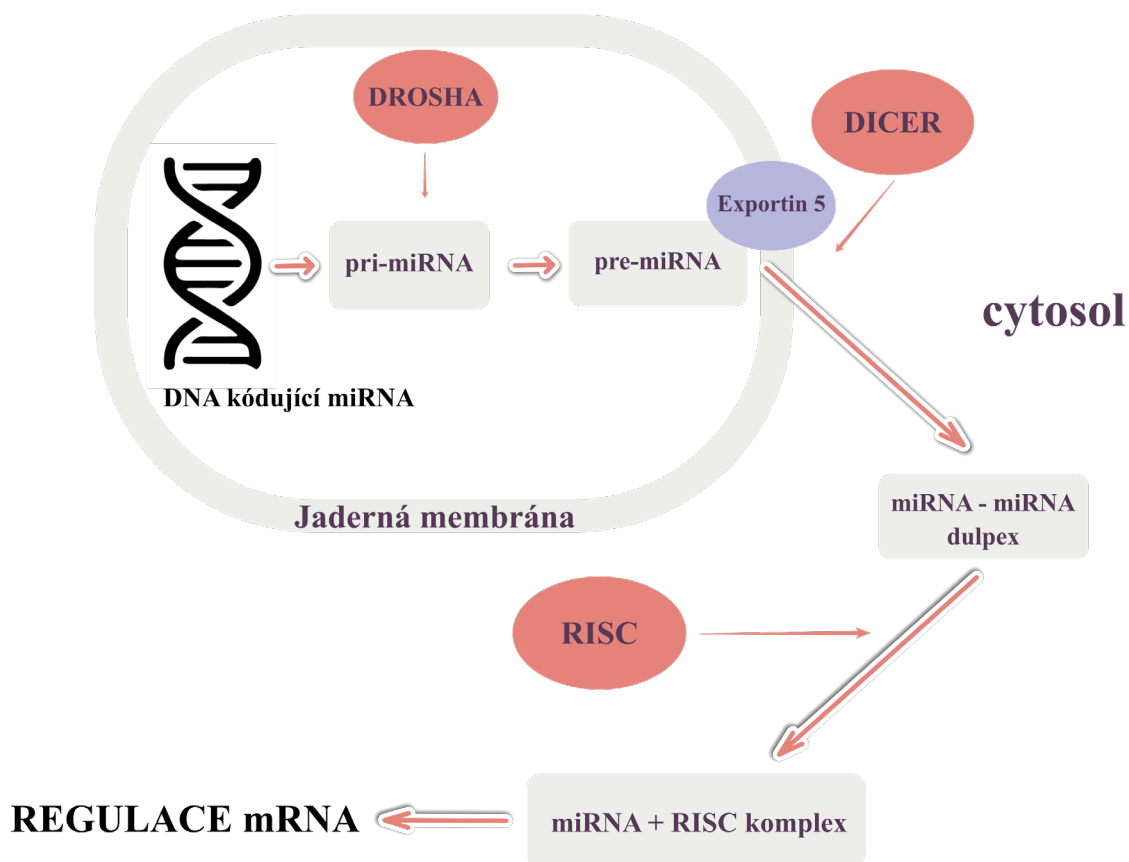
MicroRNA jsou krátké nekódující RNA o délce 22–23 nukleotidů, která jsou kódovány v DNA (Bonfrate et al. 2013; Chin and Slack 2008) strukturálními geny (70 %), ale také

intergenovou nekódující DNA (30 %), která není vázána na expresi genů jako takových. Po přepisu DNA kódující microRNA vznikne pri-microRNA, která je v jádře upravena na pre-microRNA, která je dále exportována z jádra do cytosolu. V cytosolu podléhá další úpravě za vzniku jednovláknové microRNA, jejíž funkcí je regulace genové exprese která probíhá několika způsoby (Obr. 7.) (Aslam et al. 2012; Wouters et al. 2011). Jedním ze způsobů je interakce s mRNA, kde dojde k navození degradace mRNA nebo inhibice translace (častější u živočišných buněk). Předpokládá se, že microRNA jsou zodpovědné za regulaci cca 30 % genů (některé zdroje uvádí 30–60 %) (Garzon et al. 2009). Je známo, že polovina genů kódujících microRNA je v oblasti genetické informace, která je lokalizována v místech častých amplifikací, ztráty heterozygoty, nebo mutací. MicroRNA v patogenezi KRK může hrát roli jak tumor-supresivní, tak i proto-onkogení. Role microRNA je dána typem tkáně a charakterem genu, který reguluje.

Dalšími diskutovanými mechanismy, kterými by microRNA mohla regulovat genovou expresi, je methylace promotorové oblasti genu či ovlivnění konformace histonů (methylace), a tím kondenzaci heterochromatinu (Garzon et al. 2009; Kusenda et al. 2006). Ke ztrátě funkce microRNA dochází několika způsoby: mutace genu pro microRNA, microRNA posttranskripční úprava a epigenetické změny. Vzhledem k tomu, že microRNA se podílí na řízení buněčného cyklu, metabolismu a vývoji buňky, jsou změnou exprese (zvýšení či snížení exprese microRNA) proto-onkogenní (progrese a růst nádoru) či tumor-supresivní (inhibice růstu a proliferace) důsledky (Bonfrate et al. 2013; Garzon et al. 2009; Chin and Slack 2008; Kusenda et al. 2006).

MicroRNA, která je výrazně exprimována v nádorových buňkách, pravděpodobně funguje jako inhibitor tumor-supresorových genů. Na druhou stranu microRNA, která má sníženou expresi v nádorových buňkách, může zapříčinit snížení exprese onkogenů v normální tkáni. V patogenezi KRK byla zjištěna změna exprese microRNA například miR-145, miR-143, let7 či zvýšená exprese miR-21, miR-135 atd. MiR-145 a miR-143 byly jedny z prvních microRNA identifikovaných u nádorového onemocnění tlustého střeva. MiR-143 se podílí na inhibici *KRAS* a miR-145 pravděpodobně funguje tumor-supresivně přímou inhibicí p70S6K1 (serin/threonin kináza, která snižuje aktivitu PI3 signální dráhy). MiR-21 je spojena s invazí a metastazováním KRK díky inhibici tumor-supresorového *PDCD4* (Raisch et al. 2013). Vzhledem k velké specificitě exprese jednotlivých microRNA a typem tumoru se zde nabízí možnost využití microRNA jako diagnostického či prognostického markeru (Hrasovec and

Glavac 2012). Další výhodou microRNA je její stabilita v biologické tkáni, ať už se jedná o plazmu, moč nebo stolici, ze kterých ji lze následně izolovat a analyzovat (Slaby et al. 2009; Svoboda et al. 2014).



Obr. 7. Vznik microRNA, převzato od (Aslam et al. 2012)

1.9 Terapie

Léčba KRK je komplexní proces vyžadující multidisciplinární přístup (gastroenterolog, chirurg, onkolog, radiolog, atd.) (van de Velde et al. 2014b). Chirurgická léčba (resekce tumoru) nadále zůstává jedinou kurativní metodou pro nemetastatickou formu KRK. Výsledek chirurgické léčby se odvíjí od předoperačního stagingu a kvality operace jako takové. Před operací je nezbytné zvážit mnoho faktorů, jako je věk pacienta, celková kondice, staging nádoru a typ operačního výkonu (van de Velde et al. 2014a). Chirurgická resekce KRK může být provedena jak klasickou otevřenou cestou, tak i laparoskopicky. Laparoskopický přístup se dle studií zdá být stejně bezpečný jako otevřený přístup (Veldkamp et al. 2005).

Systémová chemoterapie pro léčbu KRK zahrnuje primárně fluoropyrimidiny (5-fluorouracil (5-FU), perorální kapecitabin), irinotekan a oxaliplatinu. Fluorouracil funguje na podkladě inhibice thymidylát-syntetázy. Společně s leukovorinem dochází ke stabilizaci vazby

5-FU s enzymem a vyšší efektivitě terapie (Ohhara et al. 2016; Sobrero et al. 2000). U metastatické formy KRK vede 5-FU a leukovorin k prodloužení přežívání z 6 na 12 měsíců (Wolpin and Mayer 2008). Tato adjuvantní chemoterapie je nejvíce účinná u pokročilých forem KRK (stadium III a IV) a u tumorů, které mají nízkou frekvenci mutací s MSI (MSI-Low). Pro adjuvantní chemoterapii je proto častěji indikována levostranná forma KRK (Moertel et al. 1995). U metastatické formy KRK se kromě konvenční terapie užívá biologická terapie (bevacizumab, aflibercept, ramucirumab a regorafenib – cíl angiogeneze (anti-VEGFR); cetuximab a panitumumab – cíl EGFR signální dráhy) (Seeber and Gastl 2016). Studie od Venooka a spol. ukázala, že terapie bevacizumabem vedla k mediánu přežití 31,4 měsíců u pacientů s levostranným KRK, na rozdíl od 24,2 měsíců u pacientů s pravostrannou formou KRK. Meta-analýza klinických studií došla k závěru, že pacienti s levostrannou formou KRK a wild-type mutací KRAS mají významně vyšší benefit z terapie anti-EGFR v porovnání s anti-VEGFR s kombinací s konvenční terapií (Tejpar et al. 2017).

Pacienti s vysokou frekvencí mutací v MSI (MSI-High), s KRK převážně lokalizovaném v pravém tračníku, mají vysokou infiltraci T-lymfocyty (Kloor and von Knebel Doeberitz 2016). Lymfocyty migrují do oblasti tumoru díky rozpoznání specifických antigenů a díky vlivu kostimulačních signálů. Regulační faktory (PD-1, PD-L1, CTLA-4) inhibují aktivaci T-lymfocytů, a tím jsou také klíčové v regulaci imunitního systému proti nádorovému procesu. Studie ukazují, že inhibice regulačních faktorů (anti-CTLA-4 – ipilimumab, tremelimumab; anti-PD-1 – pembrolizumab, nivolumab) by mohla být slibnou cestou pro pacienty s vysokou frekvencí MSI mutací (MSI-High), kteří jsou rezistentní ke konvenční terapii (fluoropyrimidin, irinotekan, oxaliplatin), a pro pacienty s neresekabilním metastatickým KRK s MSI-High (Passardi et al. 2017).

1.10 Závěr

Přes dosažené úspěchy zůstává KRK jedním z nejčastějších a nejzávažnějších maligních onemocnění. Screening nepochybně vedl ke snížení incidence a mortality onemocnění a nové metody screeningu v podobě DNA testování stolice či mSEPT9 jistě povedou k dalšímu pokroku a zlepšení efektivity screeningu jako takového. Endoskopie rovněž v budoucnu nabídne novinky, které dále zefektivní screening či zvýší detekce prekancerózních lézí, jako je například nově dostupná umělá inteligence od Fujifilm REiLI, která v reálném čase detekuje léze během endoskopického vyšetření. Tyto systémy využívající umělou inteligenci k záchytu polypů dosahují detekce lézí ve více jak 90 % (Misawa et al. 2018). Nadále se vedou rozsáhlé diskuse, zda screening nezačít již před 50. rokem života, anebo dokonce i časněji. Jedná se prozatím o kontroverzní téma, jak z hlediska medicínského i ekonomického (Archambault et al. 2019). V budoucnu můžeme očekávat jak nové biomarkery časného záchytu KRK, tak i markery účinnosti a prognózy. Na základě předešlých informací je zřejmé, že vývoj na poli molekulární genetiky, endoskopie a edukace jak laické, tak odborné společnosti, se nadále vyvíjí a nabývá kvalitativně nové rozměry.

2. Hypotézy

1. KRK diagnostikovaný screeningem má příznivější klinicko-patologický profil oproti KRK diagnostikovaného v důsledku symptomů.
2. Expresní profil microRNA u rektální formy KRK se liší od expresního profilu nádoru ostatních částí tlustého střeva a nenádorové tkáně.
3. Exprese lokusu kvantitativního znaku ABC transportéru má vliv na odpověď na léčbu a přežívání u pacientů s KRK.

3. Cíle práce

1. Prospektivně zhodnotit klinicko-patologickou charakteristiku KRK diagnostikovaného pomocí screeningu a u symptomatických pacientů. Ověřit výhody screeningového programu v České republice.
2. Objasnit expresní profil doposud známých microRNA u rektální formy KRK v porovnání s nádorem v jiné části tlustého střeva a nenádorovou tkání. Porovnat expresní profil microRNA u různých lokalizací KRK. Zhodnotit možné využití microRNA jako markeru odpovědi na léčbu KRK.
3. Objasnit, zda polymorfismy v genech pro ABC transportéry ovlivňují individuální odpověď na léčbu a přežívání pacientů s KRK.

4. Klinicko-patologická charakteristika KRK diagnostikovaného screeningem vs. KRK zjištěný v důsledku symptomů

4.1. Metodika studie

Provedli jsme prospektivní multicentrickou observační studii ve 12 centrech v České republice v období od roku 2013 do roku 2015. Zařadili jsme celkově 276 pacientů s histologicky verifikovaným KRK. Pacienty jsme rozdělili do dvou skupin: 1. **screeningová skupina**; 2. **kontrolní skupina**. Kritériem vstupu do studie byl nově diagnostikovaný KRK. Studie byla schválena etickou komisí (Etická komise při Institutu klinické a experimentální medicíny a Thomayerově nemocnici s multicentrickou působností) a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií.

Pacienti ve screeningové skupině byli definováni jako asymptomatictí pacienti s nově diagnostikovaným a histologicky verifikovaným KRK, a to primární screeningovou koloskopií, nebo koloskopií po pozitivním TOKS, bez pozitivní rodinné anamnézy. Pacienti zařazení do kontrolní skupiny byli definováni jako pacienti s diagnostikovaným a histologicky verifikovaným KRK, kteří byli symptomatictí.

4.2. Zpracování dat

Údaje pacientů jsme prospektivně zaznamenávali pomocí online systému REDCap (Research Electronic Data Capture) (Harris et al. 2009). Jedná se o webovou aplikaci vytvořenou pro sběr studijních dat. Každé centrum, které se účastnilo studie, mělo přidělené své unikátní identifikační číslo (ID) pro správu výsledků. Každý pacient zařazený do studie byl vedený pod vlastním ID.

Ke statistické analýze jsme využili SAS software, verze 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Deskriptivní analýza dat zahrnovala absolutní a relativní četnosti, mediány. Interval spolehlivosti byl nastaven na 95 %. Ke kvantitativní analýze dat jsme použili χ -kvadrát test, Fisherův exaktní test a Mann-Whitneyův test. Výsledky byly nastaveny na hladinu významnosti

p = 0,05. Statistická analýza byla provedena biostatistikem v Mezinárodním centru klinického výzkumu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně (<https://www.fnusa-icrc.org/cz/>).

4.3. Výsledky

Do studie jsme prospektivně zařadili celkem **276 pacientů**, a následně jsme statisticky vyhodnotili **265 pacientů** (95,9 %) (Tabulka 3).

Tabulka 3. Základní charakteristika pacientů ve skupině screening a kontrola

	Screening (N = 73)		Kontroly (N = 192)	
	N	%	N	%
Muži	44	60,3 %	115	59,9 %
Ženy	29	39,7 %	77	40,1 %
Věk (roky, medián 95 % CI)	67,5 (66,0–73,0)		70,0 (68,0–71,0)	
Výška (cm, medián 95 % CI)	169,5 (166,0–173,0)		170,0 (168,0–172,0)	
Váha (kg, medián 95 % CI)	78,0 (75,0–90,0)		78,0 (74,0–80,0)	

Ze 73 pacientů screeningové skupiny jsme patnácti z nich diagnostikovali KRK pomocí primární screeningové koloskopie a zbylých 58 koloskopií bylo provedeno následně po pozitivním TOKS. V kontrolní skupině ze 192 pacientů bylo 171 vyšetřeno pro chronické obtíže, a 21 pro akutní symptomy (krvácení, perforace) (Tabulka 4).

Tabulka 4. Diagnostické metody ve skupině screening a kontrola

	Screening (N = 73)		Kontroly (N = 192)	
	N	%	N	%
Metoda				
Primární screeningová koloskopie	15	20,5 %	-	-
Koloskopie po pozitivním TOK	58	79,5 %	-	-
Diagnostická koloskopie	-	-	177	92,2 %
Další metody	-	-	15	7,8 %
Vyšetření pro akutní obtíže (N)	0		21	

Pokročilost KRK (stadium 0, I, II vs. III, IV) byla statisticky významně příznivější ve skupině KRK diagnostikovaným screeningem, kde převažovala stadia 0, I a II, než ve skupině kontrolní (p <0,001). Rovněž výskyt lokálních metastáz (N1, N2) v době diagnózy byl výrazně příznivější pro skupinu screening než pro kontrolní skupinu (p <0,001); (Tabulka 5). Pacienti

ve skupině screening neměli přítomny vzdálené metastázy (M1) na rozdíl od pacientů v kontrolní skupině (35 nemocných se vzdálenými metastázami, $p < 0,001$). Grading KRK v našem souboru nevykazoval mezi oběma skupinami rozdíly. V obou skupinách dominoval dobře diferencovaný KRK (72,6 % vs. 62,5 %) (Tabulka 5).

Tabulka 5. Stadia, metastázy, grading KRK

	Screening (N = 73)		Kontroly (N = 192)		P
	N	%	N	%	
Stadia					
0 (Tis N0 M0)	10	13,7 %	9	4,7 %	<0,05
I (T1-2 N0 M0)	21	28,8 %	32	16,7 %	<0,05
II (T3-4 N0 M0)	15	20,5 %	42	21,9 %	
III (T1-4 N1-2 M0)	18	24,7 %	51	26,6 %	
IV (T1-4 N1-2 M1)	1	1,4 %	34	17,7 %	<0,05
Chybějící data	8	10,9 %	24	12,4 %	
Metastázy					
MX	8	11,0 %	31	16,1 %	
M0	55	75,3 %	104	54,2 %	<0,05
M1	0	0,0 %	35	18,2 %	<0,05
Chybějící data	10	13,4 %	22	11,5 %	
Regionální postižení uzlin					
NX	3	4,1 %	13	6,8 %	
N0	41	56,2 %	71	37,0 %	
N1	18	24,7 %	48	25,0 %	<0,05
N2	3	4,1 %	39	20,3 %	
Grading					
GX (nelze hodnotit)	6	8,2 %	29	15,1 %	
G1 (dobře dif.)	11	15,1 %	24	12,5 %	
G2 (středně dif.)	42	57,5 %	96	50,0 %	
G3 (špatně dif.)	6	8,2 %	16	8,3 %	
G4 (dediferencovaný)	3	4,1 %	2	1,0 %	
Chybějící data	5	6,8 %	25	13,2 %	

V obou skupinách převládalo postižení levého tračníku v porovnání s ostatními částmi tlustého střeva (screening 91,8 %; kontrola 75 %). Postižení rektosigmoidea dominuje nad postižením ostatních částí tračníku (Tabulka 6).

Tabulka 6. Lokalizace KRK

Lokalizace	Screening (N = 73)		Kontroly (N = 192)		P
	N	%	N	%	
Cékum + colon ascendens	10	13,7 %	41	17,7 %	
Colon transversum	3	4,1 %	16	8,3 %	
Colon descendens + sigmoideum	39	53,4 %	77	40,1 %	
Rektum	28	38,4 %	67	34,9 %	

Celkem 58 pacientů (79,5 %) ve skupině screening a 155 pacientů (80,8 %) v kontrolní skupině podstoupilo chirurgické řešení. R0 resekce byla provedena v 65,8 % v případě screeningové skupiny. V druhé kontrolní skupině byla provedena R0 v 46,4 % případů ($p = 0,015$). R1 a R2 resekce byla provedena pouze v minimálním počtu případů v obou skupinách (1,4 % vs. 5,3 %) (Tabulka 6). Devět pacientů ve skupině screening (12,3 %) a osm pacientů v kontrolní skupině (4,2 %) bylo léčeno endoskopicky ($p = 0,032$), a to radikální polypektomií. Medián doby od stanovení diagnózy po chirurgické řešení byl 30 dní pro screeningovou skupinu a 21,5 dne pro pacienty v kontrolní skupině ($p = 0,022$) (Tabulka 7).

Tabulka 7. Chirurgická léčba

	Screening (N = 73)		Kontroly (N = 192)		
	N	%	N	%	P
Chirurgická léčba	58	(79,5)	155	80,8 %	
Kontraindikace pro pokročilý KRK	1	1,4 %	12	6,3 %	
Kontraindikace pro komorbidity	2	2,7 %	7	3,6 %	
Kontraindikace pro jiné příčiny	12	16,4 %	18	9,4 %	
Endoskopická léčba	9	12,3 %	8	4,2 %	<0,05
Typ operace					
Pravostranná hemikolektomie	10	13,7 %	37	19,3 %	
Resekce transversa	1	1,4 %	6	3,1 %	
Levostranná hemikolektomie	4	5,5 %	14	7,3 %	
Resekce sigmatu	20	27,4 %	42	21,9 %	
Nízká resekce rekta	17	23,3 %	25	13,0 %	
Abdominoperineální resekce	1	1,4 %	25	13,0 %	
Resekce tlustého střeva a metastáz v jedné době	0	0,0 %	1	0,5 %	
Paliativní zavedení stentu	0	0,0 %	4	2,1 %	
Chybějící data	5	6,8 %	1	0,5 %	
Resekční okraje					
RX	13	17,8 %	51	26,6 %	
R0	48	65,8 %	89	46,4 %	<0,05
R1	0	0,0 %	5	2,6 %	
R2	1	1,4 %	9	4,7 %	
Chirurgická revize	6	8,2 %	14	7,3 %	
Čas mezi diagnózou a operací (dny, medián 95 % CI)	30 (24,0–35,0)		21,5 (19,0–24,0)		<0,05

Pacientů léčených systémovou paliativní terapií bylo významně více v kontrolní skupině než ve skupině screening (p = 0,018). Rozdíl mezi počtem pacientů léčených adjuvantní či neoadjuvantní terapií nebyl statisticky významný (Tabulka 8).

Tabulka 8. Chemoterapie

	Screening (N = 73)		Kontroly (N = 192)		<i>P</i>
	N	%	N	%	
Typ terapie					
Neoadjuvantní terapie	6	8,2 %	24	12,5 %	
Adjuvantní terapie	22	30,1 %	53	27,6 %	
Systémová terapie	2	2,7 %	23	12,0 %	<0,05

4.4. Diskuse

Multicentrická observační prospektivní studie, kterou jsme provedli ve 12 centrech ČR, ukázala, že KRK diagnostikovaný screeningem se liší z klinicko-patologického hlediska od symptomatického KRK.

KRK diagnostikovaný screeningem má celkově příznivější klinicko-patologické vlastnosti, a to především v časných stádiích onemocnění, tedy ve stadiu 0, I a II. Výsledky se shodují se studii publikovanými v nedávné době, které se také zabývaly problematikou screeningu KRK. Například v multicentrické studii Brennera a spol. byla porovnávána prognóza stejně rozdělených dvou skupin pacientů jako v naší práci. Do studie bylo zařazeno a vyhodnoceno celkem 2450 pacientů s KRK. První skupina pacientů s KRK diagnostikovaný pomocí screeningu vykazovala 68 % nemocných ve stádiích I a II, zatímco druhá skupina pacientů v 50 % (Brenner et al. 2016). Ve studii Zorzi a spol. bylo vyhodnoceno celkem 23 668 pacientů ve věku 50 až 69 let, 2806 bylo diagnostikováno screeningem. Pacienti s KRK diagnostikovaní pomocí screeningu měli opět celkově příznivější klinicko-patologickou charakteristiku KRK. Stadium I bylo zastiženo ve 42,8 % pacientů diagnostikovaných pomocí screeningu ve srovnání s 16,2 % pacienty diagnostikovaných pro symptomy. Pro stadium IV byl procentuální rozdíl skupin 6,2 % vs. 19,8 % (Zorzi et al. 2015). Amri a spol. dospěli k obdobným výsledkům, kde bylo retrospektivně vyhodnoceno celkem 1071 pacientů a 217 z nich bylo diagnostikováno screeningem. Pacienti s KRK diagnostikovaní pro symptomy měli celkově vyšší zastoupení pokročilejších stadií KRK oproti pacientům diagnostikovaných screeningem ($\geq T3$ 74,5 % vs. 37,8 %, RR = 1,96, $p < 0,001$). Rovněž míra rekurence KRK byla vyšší v kontrolní skupině oproti pacientům ve skupině screening (13,1 % vs. 6,0 %, $p = 0,004$) (Amri et al. 2013).

Výskyt metastatického postižení a využití systémové paliativní terapie byl v naší studii významně vyšší u kontrolní skupiny oproti screeningové skupině. Naše výsledky jsou v úzké korelaci se studií od Kubische a spol. V jejich retrospektivní analýze 524 953 koloskopií bylo diagnostikováno celkem 6065 pacientů s KRK, kdy 1750 z nich bylo diagnostikováno screeningem. M1 metastázy byly častěji identifikovány v kontrolní skupině než ve skupině screening (18,37 % vs. 10,48 %) (Kubisch et al. 2016).

V našem souboru pacientů nebyl nižší grading tumoru spjat s nižším celkovým stadiem onemocnění. To mohlo být způsobeno malým počtem zařazených pacientů. Výsledky jsou v kontrastu se studií od Zorziho a spol., kde bylo zařazeno 23 668 pacientů a kde byl nižší grading (odds ratio pro špatně diferencovaný KRK byl 0,86, 95 % CI: 0,75-1,00) spojen s nižším stadiem onemocnění (Zorzi et al. 2015).

Rozdílná lokalizace KRK v tračniku má několik možných příčin, a to od odlišné patogeneze KRK, embryonálního původu jednotlivých částí tlustého střeva, odlišného cévního zásobení jednotlivých částí či odlišného složení mikrobiomu v rozdílných částech střeva (Al-Sohaily et al. 2012; Brackmann et al. 2009; G. H. Lee et al. 2015; Phipps et al. 2013; Xi et al. 2019). Většina KRK v naší studii byla lokalizována v levém tračniku. Obdobné výsledky můžeme také pozorovat v retrospektivní studii od Vasila a spol. Zařazeno bylo celkem 302 pacientů s KRK, kde 41,8 % KRK bylo lokalizováno v levém tračniku a 34,3 % bylo lokalizováno v rektu (Vasile et al. 2012). Další studie od Wraye a spol., kde bylo analyzováno celkem 82 926 pacientů KRK, došla k obdobným výsledkům, kde 42 % případů KRK bylo situováno v levém tračniku a 48 % v pravém tračniku (cékum, vzestupní tračník, hepatální ohbí). Recentně publikovaná multicentrická studie od Lu a spol. se zaměřila na výskyt KRK u pacientů mladších 50 let. Bylo zhodnoceno více jak 1,3 milionů pacientů s KRK ve věku nad 50 let a 117 686 pacientů s KRK pod 50 let. Celkem 74,4 % KRK u pacientů pod 50 let a 56,1 % KRK u pacientů nad 50 let bylo lokalizováno v levém tračniku (P. Lu et al. 2019). Zbýlých 10 % bylo lokalizováno v příčném tračniku (Wray et al. 2009).

Endoskopická léčba KRK je považována za kurativní v případě, že se jedná o časný tumor (dobře diferencovaný, bez přítomnosti hluboké invaze – sm3, bez lymfovaskulární infiltrace), který byl radikálně odstraněn. Takový tumor má nízké riziko metastatického postižení a endoskopická léčba s adekvátním následným sledováním

je možná. V našem souboru takových pacientů s neinvazivním tumorem bylo významně více ve skupině screening než v kontrolní skupině. Obdobné výsledky ukázala studie Mounzera a spol., kde bylo analyzováno 10 403 pacientů s maligním polypem. Endoskopickou léčbu podstoupilo celkem 2688 pacientů (26 %) a 7715 (74 %) podstoupilo chirurgické řešení. Pacienti léčení endoskopicky byli nejčastěji ti, kteří měli stadium 0, kde endoskopická léčba má dlouhodobě příznivé výsledky (T. Chen et al. 2018; Mounzer et al. 2015).

V naší studii byl medián doby od stanovení diagnózy po chirurgické řešení 30 dní u screeningové skupiny a 21 dní u kontrolní skupiny. Rozdíl mediánu může vyplývat z alarmující symptomatologie u části nemocných v kontrolní skupině. Retrospektivní studie od Gillise a spol. ukázala, že delší doba čekání na chirurgické řešení KRK může být způsobena nutností podrobného vyšetření pacientů zahrnující počítačovou tomografii, magnetickou rezonanci, echokardiografii či specializovaná konzilia, a to obzvláště u pacientů s komorbiditami (Gillis et al. 2014).

Naše prospektivní multicentrická studie potvrdila efektivitu screeningového programu, který jasně ukazuje celkově lepší klinicko-patologický profil KRK oproti pacientům diagnostikovaným pro symptomy a je podpůrným argumentem pro všeobecnou implementaci.

5. MicroRNA expresní profil u rektální formy KRK se liší od expresního profilu nádoru tlustého střeva a nenádorové tkáně

5.1. Úvod do problematiky

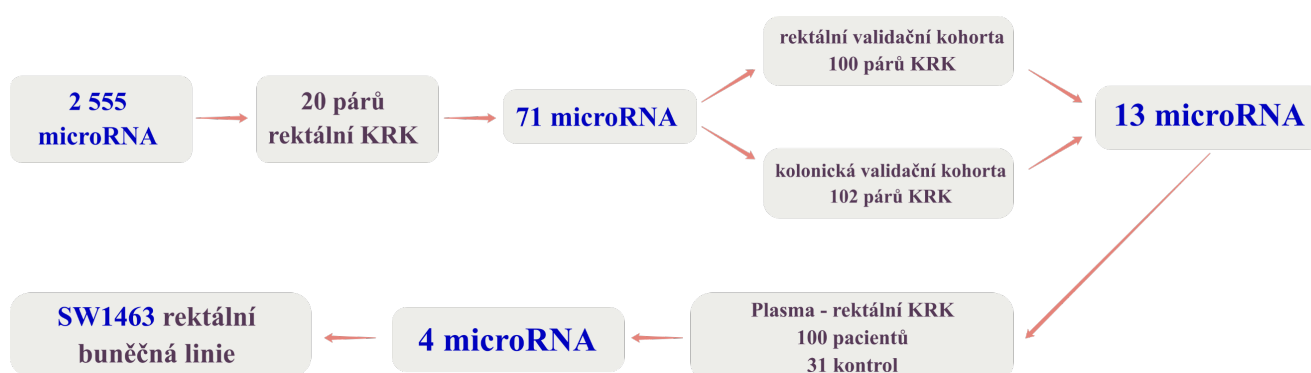
Jak již bylo zmíněno, KRK je závažné nádorové onemocnění tlustého střeva, které má celosvětově stále vysokou incidenci a mortalitu. Navzdory pokroku v chirurgické operativě KRK a novým onkologickým režimům léčby mají pacienti se stejným stadiem KRK rozdílnou odpověď na léčbu a dlouhodobé přežívání (De Divitiis et al. 2014). Identifikace nových prediktivních a prognostických markerů odpovědi na léčbu je proto zcela nezbytná. Potenciálním markerem odpovědi na léčbu by vzhledem ke své roli v onkogenezi mohla být microRNA. Ta reguluje genovou expresi prostřednictvím degradace či blokace mRNA, čímž ovlivňuje regulaci biologických procesů, jako jsou apoptóza, buněčná proliferace, diferenciace a angiogeneze (Mendell and Olson 2012).

V poslední době roste počet informací o souvislosti mutací genů microRNA se změnou genové exprese onkogenů a tumor-supresorových genů vedoucích k iniciaci a progresi KRK. Ke kompletizaci významu microRNA chybí množství dalších údajů a jedním z nich je specifická v souvislosti s lokalizací KRK (Schetter et al. 2012; A. M. Strubberg and Madison 2017a). Jak již bylo zmíněno výše, existuje mnoho rozdílů mezi rektální a kolonickou formou KRK. Jedná se o rozdíly například v embryologii, anatomii, fyziologii, genetice, chirurgické léčbě a odpovědi na léčbu jako takovou (Frattini et al. 2004; Konishi et al. 1999; G. H. Lee et al. 2015). Tato fakta poukazují na to, že se pravděpodobně jedná o dvě rozdílné patofyziologické jednotky. Přesto nadále existuje jen omezený počet studií zabývajících se pouze rektální formou KRK nebo popisují expresní profil microRNA v korelaci s odpovědí na neoadjuvantní terapii u pacientů právě s rektální formou KRK.

Cílem naší studie bylo zmapovat expresní profil doposud známých microRNA u rektální formy KRK a porovnat je s expresním profilem microRNA u kolonické formy KRK. Zároveň bylo cílem zhodnotit specifické microRNA v souvislosti s odpovědí na léčbu u pacientů s rektální formou KRK.

5.2. Metody

Provedli jsme analýzu doposud známých microRNA (2555) u rektální formy KRK za užití 3D-Gene Toray microrray. Kandidátní microRNA jsme následně validovali na nezávislé kohortě pacientů – tlusté střevo a konečník (tkáň, plazma, exosom). MicroRNA s nejvíce změněným expresním profilem jsme následně studovali v buněčných kulturách odvozených od primárních KRK (Obr. 8.).



Obr. 8. Přehled projektu, převzato z (Kral et al. 2018)

Do studie jsme zařadili pacienty ze Všeobecné fakultní nemocnice, Thomayerovy nemocnice a Fakultní nemocnice Plzeň. Pacientům s diagnostikovaným KRK (rektální forma, kolonická forma) byla odebrána tkáň z tumoru, nenádorová tkáň střeva z okolí tumoru a krev. Vzorky byly okamžitě po odběru zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odebrali jsme krev do EDTA zkumavky, a následně jsme provedli centrifugaci při 500 g po dobu 10 minut a opět jsme vzorek zamrazili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zaznamenali jsme údaje pacientů týkajících se lokalizace KRK, TNM klasifikace, onkologické léčby (neoadjuvantní/adjuvantní/paliativní chemoradioterapie), lokální či vzdálená rekurence a 5leté přežití. Všechny vzorky a anamnestická data jsme anonymizovali. Studie byla schválena etickými komisemi lokálních nemocnic a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie.

5.2.1 Izolace a kontrola kvality RNA

Hluboko zmražené vzorky tkání pacientů jsme homogenizovali za užití homogenizátoru tkání (MagNA Lyser Instrument; F. Hoffmann-La Roche, Švýcarsko). Po homogenizaci tkání jsme izolovali celkovou RNA, včetně microRNA, za užití *mirVana*[™] miRNA Isolation Kitu bez microRNA obohacení (Thermo Fisher Scientific, USA). Následně jsme změřili kvalitu a koncentraci izolované microRNA za pomoci Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies,

USA) s využitím Small RNA Analysis Kitu (Agilent Technologies). K izolaci extracelulární microRNA z plazmy a exosomu jsme využili Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kitu (Norgene Biotek, Kanada). Exosomální microRNA jsme dále izolovali pomocí ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (System Biosciences, USA). V posledním kroku jsme provedli kontrolu kvality mirRNA za užití Qubit 3.0 fluorometru a Qubit dsDNA HS Assay Kitu (Thermo Fisher Scientific).

5.2.2 Screening microRNA pomocí 3D-Gene microarray

Celkem 400 ng RNA ze vzorku tkáně jsme spojili s miRNA spike (kat. číslo TRT-XR304; Toray). Dále jsme provedli hybridizaci a promytí dle manuálu od výrobce (Toray, H-M-R miRNA protocol 4-Plex V E2 1 EG) za užití Toray miRNA Labeling Kitu (kat. číslo TRT-XE211) a čipu Toray Human miRNA Oligo chip 4plex (kat. číslo TRT-XR518). Intenzitu signálu jednotlivých microRNA jsme analyzovali pomocí 3D-Gene Scanneru 3000 (Toray, Japonsko).

5.2.3 Kvantitativní PCR vzorků

U všech RNA vzorků jsme provedli reverzní transkripci (RT) za užití TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kitu (Thermo Fisher Scientific) a PCR cyklieru C1000 Touch™ thermal cycler (Bio-Rad). Rovněž jsme u všech vzorků provedli preamplifikaci užitím TaqMan MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific) a C1000 Touch™ thermal cycler (Bio-Rad, USA). Vzorky jsme následně validovali pro multiplex RT, preamplifikaci a kvantitativní PCR (qPCR), které jsme provedli na BioMark™ HD systému (Fluidigm, USA) využívající pro genovou expresi 48.48 nebo 96.96 Dynamic Array™ IFC. Validované assaye jsou popsány v Tabulce 9.

Tabulka 9. Validované TaqMan microRNA assaye (Thermo Fisher Scientific, USA)

miRNA family	název miRNA	miRNA ID	miRNA sekvence
miR-1	hsa-miR-1	MIMAT0000416	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
miR-10	hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
miR-15	hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGC
miR-17	hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
	hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
miR-18	hsa-miR-18a-5p	MIMAT0000072	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
	hsa-miR-18b-5p	MIMAT0001412	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
miR-19	hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA
	hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
miR-21	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-28	hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA
miR-103	hsa-miR-103-5p	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
	hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG
miR-133	hsa-miR-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA
miR-143	hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
miR-145	hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
miR-186	hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU
miR-378	hsa-miR-378i	MIMAT0019074	ACUGGACUAGGAGUCAGAAGG
miR-497	hsa-miR-497-5p	MIMAT0002820	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU
miR-744	hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	UGC GGGGCUAGGGCUAACAGCA

5.2.4 Buněčné kultury

Jako buněčné kultury jsme využili lidské buňky RC (SW1463 Sigma-Aldrich; kat. číslo 90112713). Buňky jsme kultivovali v mediu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) obohaceného o 10% bovinní sérum (Gibco), 1mM l-glutaminu (Biosera, Francie), 1 mM sodium pyruvátu (Biosera) a 1mM penicilin-streptomycin (Biosera). Kultivace probíhala za teploty 20 °C a plynů 20 % O₂ a 5 % CO₂. Buňky jsme dále přenesli na destičku se šesti komůrkami s 2,5 pmol MISSION miRNA mimics (hsa-miR-18a, hsa-miR-18b, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b; Sigma-Aldrich) nebo s miRNA mimics negativních kontrol bez homologie s lidským genomem (HMC0003; Sigma-Aldrich) za užití Lipofectain® RNAiMAX 2000 (Invitrogen™, USA). Efektivitu transfekce jsme hodnotili pomocí míry exprese microRNA v porovnání s negativními kontrolami užitím qPCR.

Buňky jsme uložili na destičku se šesti komůrkami, kdy v jedné komůrce bylo zhruba 500 buněk. Po 12 dnech byly kolonie fixovány v 3% formaldehydu, obarveny 1% krystalovou violetí a ručně spočítány. K proliferačnímu testu jsme buňky implantovali na destičku

s 96 komůrkami o hustotě 3×10^4 buněk na komůrku. Metabolickou aktivitu jsme změřili dle návodu výrobce (Roche) po 24 h přidáním ve vodě rozpustného tetrazolia-1 roztoku. Absorbance na vlnové délce 450 a 690 nm jsme měřili pomocí BioTek ELx808 absorbance microplate readeru (BioTek, USA).

Migraci buněk jsme realizovali pomocí Transwell permeable support 8.0 μm . Migrace buněk proběhla během 48 hodin skrze membránu do RPMI média obsahující 20% bovinní sérum. Migrované buňky jsme fixovali pomocí 3% formaldehydu, obarveny 1% krystalovou violetí a spočítali ve čtyřech náhodně vybraných polích při 200násobném zvětšení.

5.2.5 Předběžné zpracování qPCR dat

K předběžnému zpracování dat z qPCR jsme využili následující programy: Fluidigm Real-Time PCR Analysis software (Fluidigm) a GenEx qPCR data analysis software verze 6 (MultiD, Švédsko). Chybějící data z 3D-Gene microarray jsme nahradili hodnotami z pozadí. Data z BioMark™ HD Systému jsme upravili následovně: Cq práh jsme nastavili stejně pro každý array; data z čtených array jsme normalizovali kalibrátorem. Cq hodnoty, které byly mimo kvantitativní limit, jsme odstranili. Chybějící data jsme nahradili nejvyšší Cq hodnotou +2. Expresní hladiny tkání jsme normalizovali na expresní profil microRNA 186, který jsme vybrali pomocí NormFinder algoritmu. Expresní hladina vzorků plazmy jsme normalizovali dle průměrné expresní hladiny všech microRNA.

5.2.6. Statistická analýza

Statistickou analýzu jsme provedli užitím GenEx qPCR data analysis software verze 6 (MultiD), SAS 9.3 software (SAS Institute) a programu R verze 3.4.0 (<https://www.r-project.org/>). Analýzy jsme provedli separátně pro jednotlivé typy vzorků (rektum či kolon). Hladina významnosti jsme nastavili na $\alpha = 0,05$. P hodnoty jsme korigovali dle Bonferroniho.

5.3. Výsledky

5.3.1. Screening microRNA

V prvním kroku jsme provedli screening celkem 2 555 microRNA na 20 párech vzorků (20 RC a 20 zdravých tkání) – tzv. „Discovery set“. Vzorky v Discovery setu nebyly vystaveny neoadjuvantní terapii, tudíž je jednalo o naivní pacienty. V těchto vzorcích jsme identifikovali

71 deregulovaných microRNA. Identifikované microRNA byly deregulované v nádorové tkáni bez ohledu na TNM charakteristiku. Celkově bylo 57 microRNA se sníženou expresí a 14 s expresí zvýšenou (Tabulka 10). Následně jsme provedli validaci deregulovaných microRNA identifikovaných v Discovery setu na větším souboru pacientů s RC.

Prvním krokem před verifikací deregulovaných microRNA bylo testování 71 TaqMan MicroRNA assayí pomocí BioMark HD Systemu. Ze 71 prób prošlo všemi selekčními kritérii pro kvantitativní PCR dle doporučení 22 prób (Tabulka 9). Těchto 22 microRNA jsme následně testovali v tzv. Rectal Validation kohortě, kde bylo celkem 100 párů tkání (tumor a nenádorová tkáň). Do této analýzy jsme zahrnuli pacienty, kteří byli naivní z hlediska neoadjuvantní terapie, tak pacienty, kteří neoadjuvantní terapii podstoupili. Výsledky ukázaly, že v nádorové tkáni bylo celkově deregulováno 13 microRNA, kdy 10 z nich vykazovalo vyšší a 3 nižší exprese (Obr. 8A). Tyto rozdíly jsme našli pouze u kohorty pacientů, která byla naivní z hlediska neoadjuvantní terapie. Ti, co podstoupili neoadjuvantní terapii, neměli tyto změny v expresním profilu přítomny (Obr. 8B). Naše výsledky ukazují rozdílný expresní profil microRNA u rektálního karcinomu v porovnání s nenádorovou tkání a potlačení těchto rozdílů v průběhu neoadjuvantní terapie.

Tabulka 10. Seznam 71 microRNA deregulovaných v Discovery setu (20 páru vzorků; tumor a zdravá tkáň). Screening na 2 555 doposud známých microRNA za využití 3D-Gene Toray microarray.

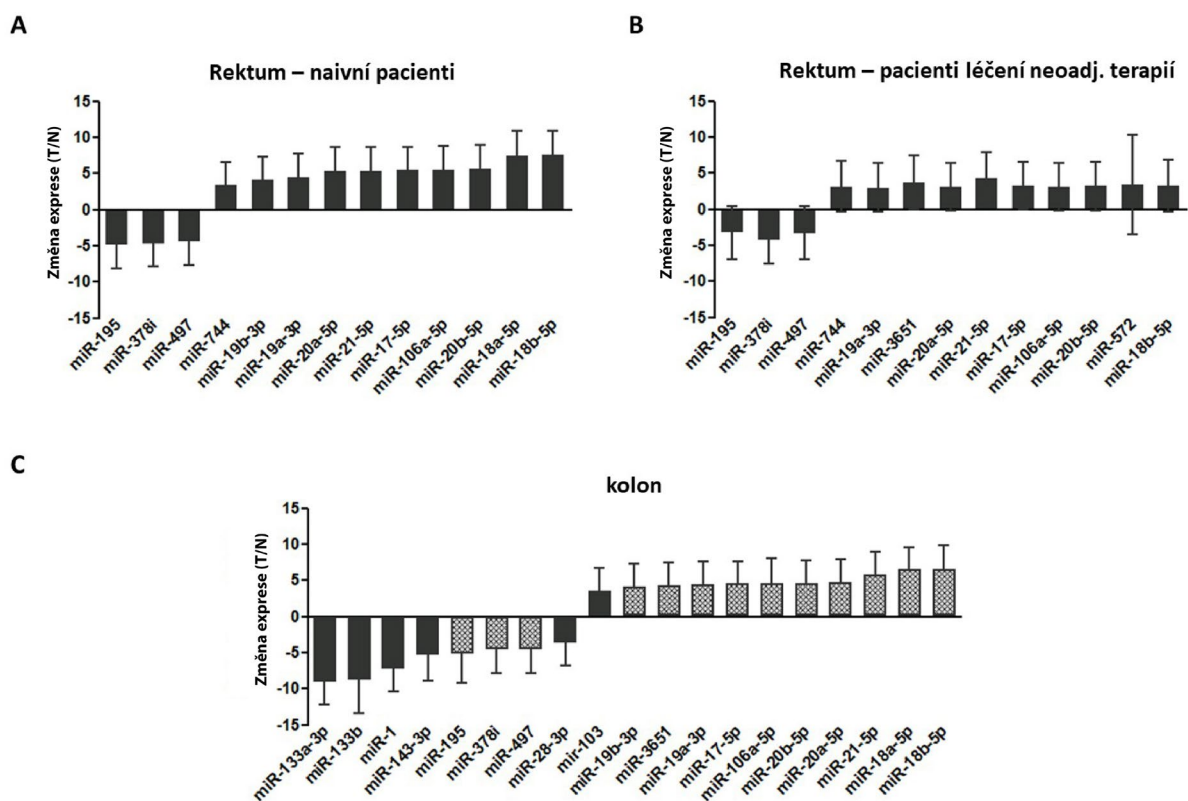
miRNA	miRNA ID	Log ₂ (T/N)*	P
Downregulované (57)			
miR-145-5p	MIMAT0000437	-2,900	0,00482
miR-143-3p	MIMAT0000435	-2,321	0,0249
miR-378i	MIMAT0019074	-2,257	0,00466
miR-4294	MIMAT0016849	-2,252	0,0182
miR-6786-5p	MIMAT0027472	-2,219	0,00699
miR-572	MIMAT0003237	-2,199	0,00352
miR-6749-5p	MIMAT0027398	-2,163	0,00831
miR-1	MIMAT0000416	-2,123	0,00286
miR-4741	MIMAT0019871	-2,108	0,00434
miR-6085	MIMAT0023710	-2,095	0,00918
miR-378e	MIMAT0018927	-2,082	0,00561
miR-378g	MIMAT0018937	-2,064	0,00850
miR-6131	MIMAT0024615	-2,058	0,0317
miR-4327	MIMAT0016889	-1,990	0,0499

miR-195-5p	MIMAT0000461	-1,981	0,0496
miR-4328	MIMAT0016926	-1,948	0,0195
miR-6781-5p	MIMAT0027462	-1,931	0,0196
miR-6798-5p	MIMAT0027496	-1,904	0,0377
miR-4746-3p	MIMAT0019881	-1,876	0,00238
miR-6721-5p	MIMAT0025852	-1,876	0,0209
miR-497-5p	MIMAT0002820	-1,870	0,0399
miR-133b	MIMAT0000770	-1,860	0,00515
miR-8078	MIMAT0031005	-1,827	0,0231
miR-744-5p	MIMAT0004945	-1,818	0,0416
miR-4665-5p	MIMAT0019739	-1,776	0,0371
miR-4651	MIMAT0019715	-1,776	0,0354
miR-6820-5p	MIMAT0027540	-1,766	0,0423
miR-6762-5p	MIMAT0027424	-1,757	0,0404
miR-378d	MIMAT0018926	-1,728	0,0466
miR-92a-2-5p	MIMAT0004508	-1,725	0,0306
miR-4655-5p	MIMAT0019721	-1,719	0,0327
miR-6068	MIMAT0023693	-1,716	0,0169
miR-378f	MIMAT0018932	-1,706	0,0432
miR-1909-3p	MIMAT0007883	-1,699	0,0441
miR-6752-5p	MIMAT0027404	-1,698	0,0434
miR-564	MIMAT0003228	-1,674	0,00762
miR-133a-3p	MIMAT0000427	-1,652	0,00923
miR-7704	MIMAT0030019	-1,633	0,0288
miR-4747-3p	MIMAT0019883	-1,633	0,0241
miR-1203	MIMAT0005866	-1,618	0,0405
miR-30c-1-3p	MIMAT0004674	-1,580	0,0499
miR-4258	MIMAT0016879	-1,529	0,0487
miR-4638-3p	MIMAT0019696	-1,506	0,0270
miR-3122	MIMAT0014984	-1,479	0,0153
miR-99b-5p	MIMAT0000689	-1,473	0,0416
miR-4787-3p	MIMAT0019957	-1,414	0,0415
miR-143-5p	MIMAT0004599	-1,394	0,0475
miR-615-5p	MIMAT0004804	-1,371	0,0258
miR-28-3p	MIMAT0004502	-1,333	0,0394
miR-186-5p	MIMAT0000456	-1,268	0,0379
miR-4783-5p	MIMAT0019946	-1,252	0,0315
miR-193	MIMAT0000459	-1,100	0,0492

miR-1226-5p	MIMAT0005576	-1,029	0,0440
miR-1193	MIMAT0015049	-1,027	0,0342
miR-4313	MIMAT0016865	-1,017	0,0358
miR-514b-5p	MIMAT0015087	-1,015	0,0406
miR-6780a-5p	MIMAT0027460	-1,002	0,0490
Upregulované (14)			
miR-7515	MIMAT0029310	1,067	0,0448
miR-96-5p	MIMAT0000095	1,317	0,0322
miR-3651	MIMAT0018071	1,572	0,0243
miR-3175	MIMAT0015052	1,665	0,0477
miR-6516-3p	MIMAT0030418	1,755	0,00654
miR-19b-3p	MIMAT0000074	1,818	0,0382
miR-19a-3p	MIMAT0000073	1,982	0,0282
miR-18a-5p	MIMAT0000072	1,991	0,00474
miR-18b-5p	MIMAT0001412	2,018	0,00370
miR-20b-5p	MIMAT0001413	2,453	0,0131
miR-17-5p	MIMAT0000070	2,515	0,00431
miR-106a-5p	MIMAT0000103	2,530	0,00254
miR-20a-5p	MIMAT0000075	2,562	0,00473
miR-21-5p	MIMAT0000076	2,942	0,00478

5.3.2. Profil microRNA u rektální a kolonické formy KRK

V našem projektu jsme si rovněž chtěli zodpovědět otázku, zda deregulované microRNA identifikované u RC jsou pro tento nádor charakteristické. Z tohoto důvodu jsme otestovali námi zjištěných 22 microRNA, které prošly všemi validacemi pomocí qPCR, a otestovali jsme je na tzv. Colon Validation kohortě čítající celkem 102 párů tkání (tumor a zdravá tkáň). Většina z identifikovaných microRNA byla shodná jak pro RC, tak pro kolonickou formu KRK (Obr. 9A). Pouze microRNA 744 měla vyšší expresi jen u RC, nikoliv však u kolonické formy KRK. Na druhou stranu některé microRNA byly deregulovány pouze v kolonické formě KRK (miR-133a, -133b, -1, -143, -28 – snížená exprese), (miR-103 – zvýšená exprese) a nikoliv u RC (Obr. 9C). Z dosavadních výsledků je zřejmé, že profil microRNA u RC a kolonické formy KRK je podobný s výjimkou několika microRNA specifických buď pro rektální nebo kolonický karcinom.

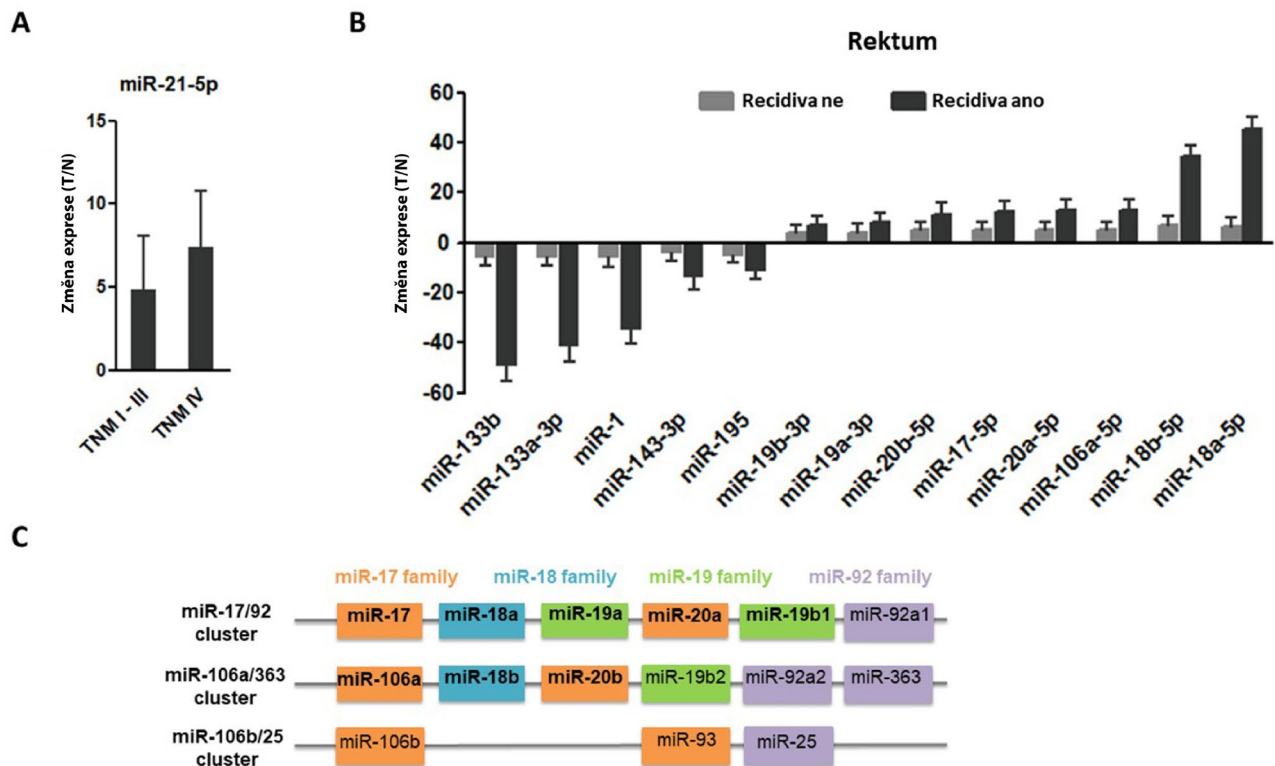


Obr. 9. Signifikantně deregulované microRNA v tumoru (T) a zdravé tkáni (N). (A) MicroRNA deregulované v RC u 69 neoadjuvantně naivních pacientů. (B) Rozdíly v expresním profilu microRNA nejsou detekovány mezi tumorem a zdravou tkání u pacientů léčených neoadjuvantní terapií. (C) Deregulované microRNA u celkově 102 párů (tumor/zdravá tkáň) nádorů kolon. Šrafované sloupce reprezentují microRNA společně pro RC a tumor kolon (Kral et al. 2018).

5.3.3. Profil microRNA a odpověď na léčbu

Identifikované microRNA u RC jsme dále korelovali s klinicko-patologickou charakteristikou pacientů. Jednalo se především o pokročilost nádorového onemocnění (TNM klasifikace), odpověď pacienta na adjuvantní terapii a 5leté přežívání pacientů od stanovení diagnózy. V této analýze jsme vyhodnotili celkem 69 pacientů, kteří absolvovali neoadjuvantní terapii. Identifikovali jsme microRNA, která je spojena s progresí nádorového procesu, to znamená s TNM klasifikací v době diagnózy. Hladina miR-21 byla signifikantně vyšší u nádorů ve stadiu IV ($n = 15$) než ve stadiu I-III ($n = 50$) (Obr. 10A). Několik microRNA se ukázalo být odlišně exprimováno v RC, který pozitivně reagoval na adjuvantní terapii (bez známek recidivy tumoru po dokončení terapie, $n = 50$) oproti těm pacientům, kteří nereagovali na léčbu a měli recidivu onemocnění (lokální recidiva tumoru na konci léčby, $n = 7$) (Obr. 10B). Tyto microRNA se zdají být specifické pro RC, žádná z nich nebyla spojena s odpovědí na léčbu či přežíváním

u kolonické formy KRK. Většina těchto microRNA je organizována do clusteru miR-17/92 (Obr. 10C).

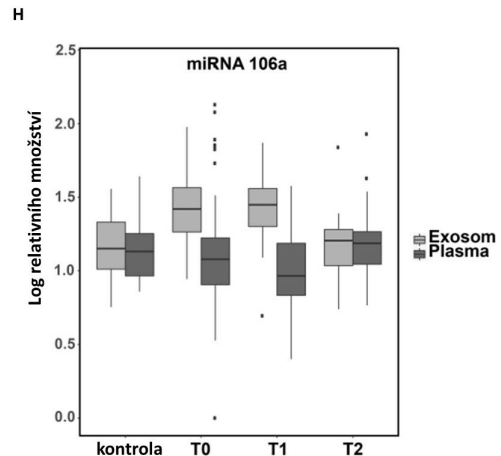
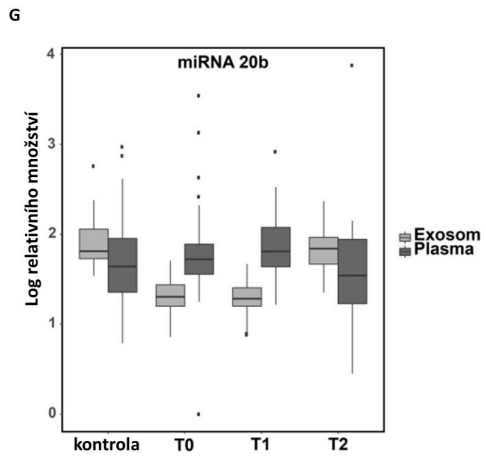
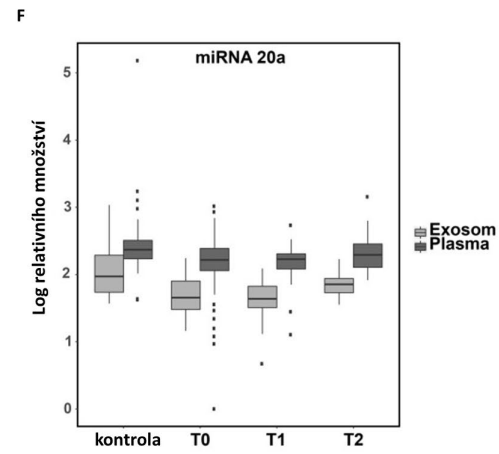
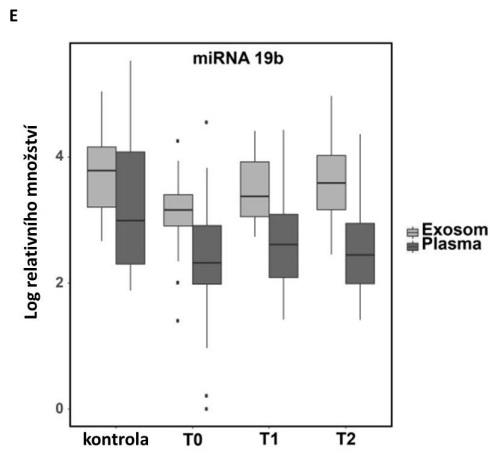
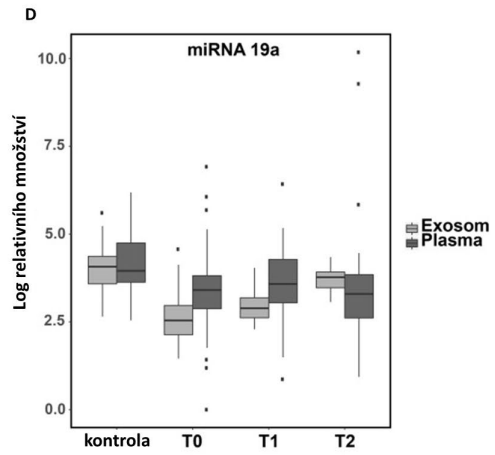
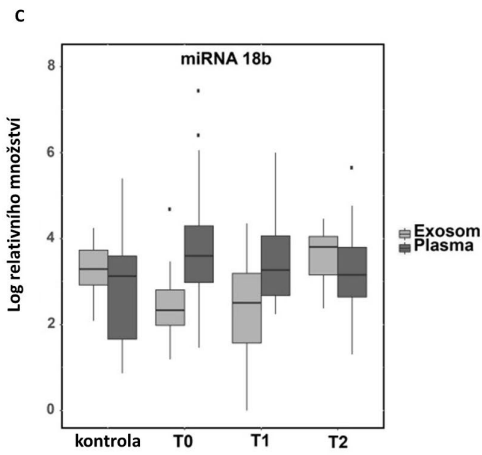
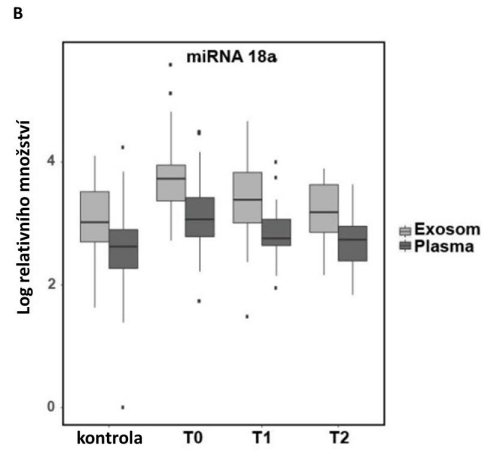
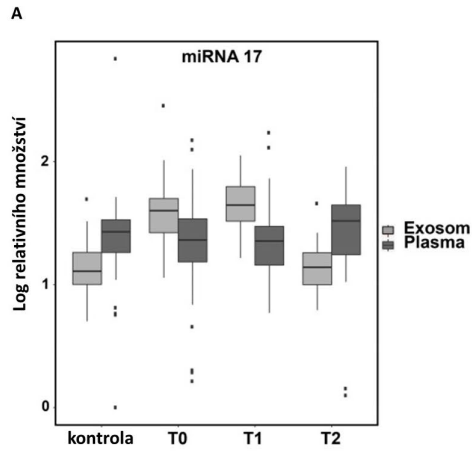


Obr. 10. MicroRNA spojené s progresí nádoru a odpovědí na léčbu. (A) Expresní hladina microRNA 21 je spojena s diseminací RC, upregulace této microRNA byla detekována u stadia IV oproti stadiu I-III. (B) Panel microRNA spojené s recidivou RC po adjuvantní terapii. Většina identifikovaných microRNA patří do clusteru miR-17/92. (C) Členové clusteru miR-17/92 obsahuje dva paralogy – miR-106a/363 a miR-106b/25. MicroRNA identifikovány v našem projektu jsou tučně. Členové clusteru rodiny miR-17 jsou oranžově zvýrazněni, rodina miR-18 tyrkysově, rodina miR-92 fialově (Kral et al. 2018).

5.3.4. Cluster miR-17/92 a odpověď na léčbu

Z našich dosavadních výsledků plyne, že microRNA v clusteru miR-17/92 byly nejenom deregulované v nádorové tkáni, ale rovněž byly spjaty s odpovědí na adjuvantní chemoterapii. Dalším krokem našeho projektu bylo zhodnocení expresního profilu clusteru miR-17/92 v plazmě a exosomu v korelaci s odpovědí pacienta na léčbu. Vyšetřili jsme celkem 100 pacientů s RC, kterým byla odebrána plazma v době diagnózy (T0), dále v době po skončení adjuvantní terapie (T1) a rok od stanovení diagnózy (T2). Pacienti v T2 byli pouze ti, kteří neměli známky recidivy základního onemocnění. Ve skupině T0 jsme vyšetřili celkem 88 vzorků

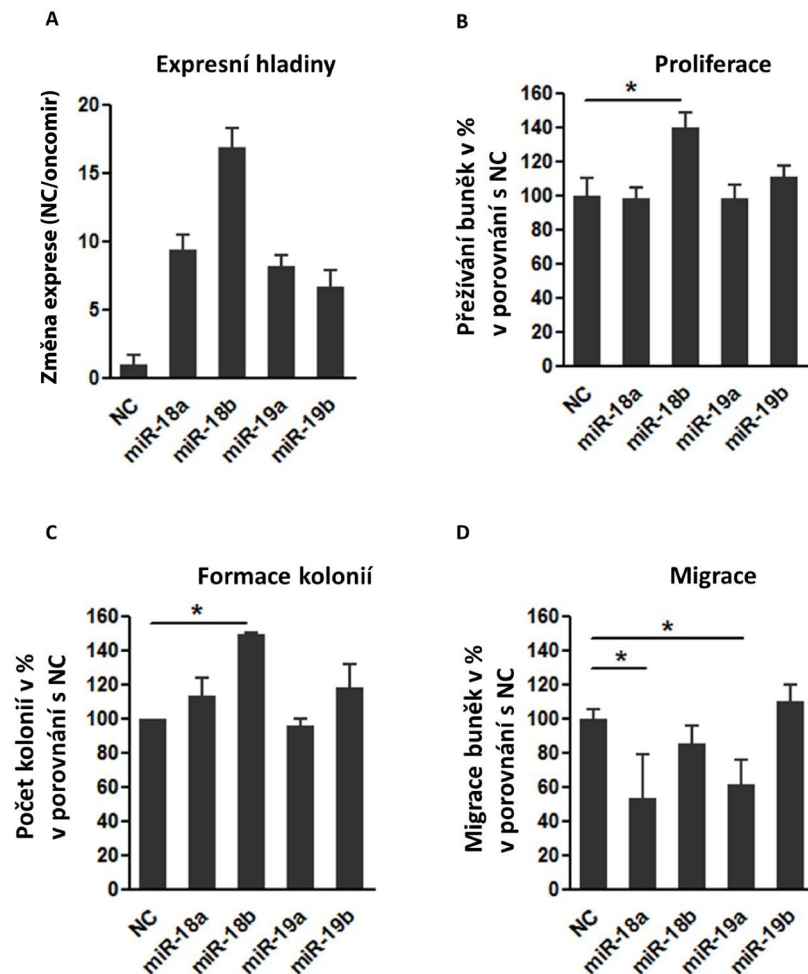
plazmy a 52 vzorků exosomu, ve skupině T1 bylo celkem 38 vzorků plazmy a 35 vzorků exosomu a nakonec ve skupině T2 jsme analyzovali 27 vzorků plazmy a 22 vzorků exosomu. Pacienty s RC jsme porovnali s 31 kontrolními osobami. Veškeré microRNA jsme detekovali jak v plazmě, tak v exosomu. Expresní hladiny microRNA z plazmy se nelišily mezi pacienty s KRK a zdravými kontrolami. Rozdíly nebyly patrné napříč skupinami T0, T1 a T2. Expresní hladiny microRNA se na rozdíl od vzorků plazmy lišily u exosomu. V době diagnózy (T0) byly u těchto pacientů detekovány rozdílné expresní hladiny oproti zdravé kontrole. Těchto rozdílů v expresním profilu microRNA v exosomu naopak ubývalo s časem, respektive u pacientů, kde již karcinom nebyl přítomen (T2) (Obr. 11 A-H). Naše data ukazují, že exosomální profil microRNA u RC výrazně lépe odráží průběh onemocnění.



Obr. 11. Expresní profil clusteru miR-17/92 u pacientů s RC v porovnání se zdravou kontrolou. (A-H) hladiny microRNA měřené v exosomu se lišili u pacientů s RC oproti zdravé kontrole. Hladiny microRNA měřené v plazmě nebyly rozdílné oproti zdravé kontrole. Vzorky byly odebírané v době diagnózy karcinomu (T0), po dokončení adjuvantní terapie (T1) a rok od stanované diagnózy (T2). Pacienti ve skupině T2 byli bez známek recidivy základního onemocnění. T0: exosom n = 52, plazma = 88; T1: exosom n = 35, plazma = 38; T2: exosom n = 22, plazma = 27. *P <0,05, *P <0,001 (Kral et al. 2018).**

5.3.5. microRNA 18 a 19 ovlivňují proliferaci a migraci buněk

MicroRNA 18 (18a a 18b) a 19 (19a a 19b) byly v našem souboru spojeny s odpovědí na léčbu. Z tohoto důvodu jsme zhodnotili vliv těchto microRNA na proliferaci a migraci buněk s RC. V buněčných kulturách SW1463 jsme zjistili zvýšenou expresi jak microRNA 18a/18b, tak 19a/19b. Analýza rovněž ukázala jejich schopnost vyvolat zvýšení proliferace a migrace buněčné kolonie. Tyto výsledky jsme potvrdili pomocí qPCR (Obr. 12A). Pozorovali jsme významně zvýšenou proliferační aktivitu buněk SW1463, které zvýšeně exprimovali microRNA-18b (Obr. 12B-C). Naše výsledky poukazují, že microRNA-18b by mohla být zvýhodňujícím faktorem pro růst nádorových buněk. Na druhou stranu jsme pozorovali nižší schopnost migrace buněk SW1463 při zvýšené expresi microRNA-18a a -19a (Obr. 12D). Naše analýza ukázala, že microRNA rodiny -18 a -19, které jsou rovněž součástí clusteru miR-17/92, mají schopnost ovlivnit migraci a proliferaci buněk RC.



Obr. 12. Expresní profil microRNA z clusteru miR-17/92 a jejich vliv na migraci a proliferaci buněk rektálního karcinomu. (A) Schopnost buněk SW1463 transfekce v porovnání s negativní kontrolou (NC) reprezentované změnou expresního profilu dané microRNA. (B) Vliv microRNA-18a/18b a microRNA-19a/19b na proliferaci, (C) formování kolonie a (D) schopnost migrace. *P <0,05 (Kral et al. 2018).

5.4. Diskuse

MicroRNA hraje ústřední roli v regulaci genové exprese a v patogeneze nádorového onemocnění a může vystupovat jako onkogen či tumor-supresorový gen (C. Z. Chen 2005). I přes všechny rozdíly v léčbě a prognóze adenokarcinomu rekta a kolon jsou tyto dvě entity studovány jako jedna choroba. Tento fakt nás vedl k zhodnocení molekulárních odlišností těchto dvou entit se zaměřením na rozdíly v expresním profilu microRNA a vztahu těchto microRNA k odpovědi na léčbu.

Provedli jsme široký screening celkem 2 555 microRNA na 20 párech vzorků (tumor a nenádorová tkáň), kde jsme identifikovali celkem 71 deregulovaných microRNA u rektální formy KRK. Většina těchto microRNA měla sníženou expresi oproti nenádorové tkáni (57 versus 14). To nás vedlo k závěru, že během karcinogeneze rektální formy KRK je expresní profil většiny microRNA snížený. Z dosavadních studií se zdá být snížená exprese microRNA v patogenezi nádorového onemocnění častější než její zvýšení (J. Lu et al. 2005; M. Williams et al. 2017). Snížené exprese microRNA v patogenezi nádorového procesu lze vysvětlit poruchami v syntéze microRNA, mutacemi genů pro microRNA či epigenetickými změnami v promotorových oblastí genů pro microRNA. Tímto dochází k poruše regulace genové exprese vedoucí k poruše diferenciaci buňky a apoptózy, které následně vedou ke vzniku nádorové buňky (C. Z. Chen 2005). V poslední době bylo publikováno několik studií, které se zaměřily na expresní profil microRNA u rektální formy KRK (Carames et al. 2015; Carames et al. 2016; Drebber et al. 2011; Lopes-Ramos et al. 2014; Pelossof et al. 2016; Svoboda et al. 2008; Svoboda et al. 2012; Yu et al. 2016). Bohužel většina těchto studií je limitována malým počtem vyšetřovaných pacientů, či nízkým počtem testovaných microRNA bez předchozího screeningu kandidátních microRNA. Další limitací studií byla odlišná metodologie uložení vzorků. Tato fakta pravděpodobně vedla k rozdílným výsledkům napříč studiemi, a tudíž i k obtížné interpretaci výsledků v kontextu dosavadní literatury. Výjimkou v těchto studiích byla studie publikovaná Gaedckem a spol., která zhodnotila 57 RC a nenádorových tkání (Gaedcke et al. 2012). Autoři provedli screening celkem 2 090 microRNA, kde identifikovali 20 microRNA, které měly zvýšenou expresi a 29 microRNA se sníženou expresí. V porovnání s našimi daty jsme přesto nepozorovali významné překrytí výsledků, pouze některé microRNA se shodovaly s výsledky Gaedckeho a spol., včetně charakteru exprese. Ve shodě byly následující microRNA: **a)** miR-17, -18a, -21 měly exprese zvýšené; **b)** miR-195, -378, -143, -145, -1 pak snížené.

V následující fázi projektu byla provedena validace 71 microRNA na setu 100 RC a zdravé tkáně, kde jsme identifikovali celkem 13 deregulovaných microRNA. Nicméně je třeba podotknout, že z 71 microRNA zjištěné screeningem jich bylo k analýze využito pouze 22 microRNA, a to pro nesplnění kritérií zbylých microRNA pro optimální qPCR dle MIQE doporučení (Bustin et al. 2009). Respektování těchto doporučení mohlo vést k arteficiálnímu snížení počtu akceptovaných microRNA.

V našem projektu bylo identifikováno celkem 8 microRNA se zvýšenou expresí, které jsou součástí clusteru miR-17/92. Přesto, že v patogenezi karcinomů (prs, plíce, pankreas, prostata, kolon, žaludek) nacházíme především microRNA s expresí sniženou, tak cluster miR-17/92 je vždy se zvýšenou expresí (He et al. 2005; Volinia et al. 2006). Tento cluster je zodpovědný za četné procesy v buňce jako je buněčná proliferace (TGF- β , SMAD), regulace buněčného cyklu (p21, E2F1) či buněčná smrt (PTEN, BCL2) (Mogilyansky and Rigoutsos 2013).

Lokálně pokročilá forma rektální formy KRK je v první fázi léčena neoadjuvantní terapií. Z tohoto důvodu byli ve screeningu zahrnuti pouze pacienti naivní k neoadjuvantní terapii. Na druhou stranu validační kohorta obsahovala jak pacienty léčené neoadjuvantní terapií, tak pacienty, kteří nebyli léčeni. Důvodem bylo pozorování efektu léčby na expresní profil microRNA. Svoboda a spol. identifikovali dvě microRNA (miR-125b a miR-137), které měly zvýšenou expresi u 6 RC před a po dvou týdnech neoadjuvantní léčby. Autoři předpokládali, že hladiny microRNA se navrátí do normálu poté, co dojde k dostatečnému zaléčení nádorového procesu (Svoboda et al. 2008). Snížení rozdílu v expresi microRNA u nádoru léčeného neoadjuvantní terapií a zdravé tkáně má dvě možné příčiny: **i)** změna exprese microRNA u tumoru reagujícího na léčbu směrem k expresnímu profilu zdravé tkáně; **ii)** poměr nádorových a stromálních buněk je posunut směrem ke stromatu, a následně ztrácí profil nádorové tkáně. Vyšetření takové tkáně by pomocí laserové mikrodisekce mohlo tuto otázku zodpovědět.

Porovnání expresního profilu microRNA u kolon a rekta ukazuje řadu podobností. Přesto jsme zaznamenali drobné rozdíly. Šest microRNA bylo specifických pro kolon, z čehož miR-744 má zvýšenou expresi pouze u rektální formy KRK. Na druhé straně miR-17, -18a/b, -20a/b, -21 a -106a mají expresi sniženu v obou lokalizacích (Motoyama et al. 2009; Slattery et al. 2016; Ashlee M. Strubberg and Madison 2017b). Naše data rovněž ukazují, že cluster miR-17/92 hraje důležitou roli v patogenezi KRK bez ohledu na lokalizaci.

V posledních letech byla microRNA zkoumána jako možný biomarker časného záchytu nádoru a odpovědi na léčbu. Z tohoto důvodu jsme vyhodnotili profil microRNA u RC s klinickými daty včetně odpovědi pacientů na léčbu. Po vyhodnocení klinických dat s korelací s expresním profilem jsme identifikovali miR-21, která byla výrazně exprimována u pacientů s pokročilým nádorem (TNM IV). Naše výsledky jsou v souladu s publikovanými

studiemi, které ukazují, že vyšší hladiny miR-21 jsou nacházeny u pacientů s více pokročilým KRK a celkově horší prognózou (Faltejškova et al. 2012; Kulda et al. 2010; Mima et al. 2016; Schetter et al. 2008). Rovněž negativní korelace mezi expresí miR-21 a mortalitou byla popsána jen pro RC (Li et al. 2013; Slattery et al. 2016). V naší studii jsme rovněž pozorovali, že cluster miR-17/92 byl spojený s odpovědí pacientů na adjuvantní terapii. Hladiny miR-17, -18a/b, -19a/b, -20a/b a -106a měly zásadně zvýšenou expresi v nádorech, které měly následně po léčbě rekurenci oproti nádorům, které byly v remisi. Rovněž kromě clusteru miR-17/92 i další microRNA (miR-133a/b, -1, -143, -195) byly spjaty s odpovědí na léčbu. Žádné z těchto microRNA neměly vztah k odpovědi na léčbu u KRK.

V projektu jsme provedli také analýzu clusteru miR-17/92 v periferní krvi. Byla analyzována plazma a plazmatické exosomy pacientů s rektální formou KRK. Vzorky plazmy byly odebrány v době diagnózy karcinomu a následně 6 a 12 měsíců od stanovení diagnózy. Poslední vzorky byly odebírány u pacientů v remisi. Z výsledků můžeme konstatovat, že spíše než plazma jako taková, plazmatické exosomy lépe odrážejí průběh onemocnění. Exosomy jsou drobné lipidové částice tvořené buňkami, které hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci. Jsou aktivně vylučovány nádorovými buňkami do svého okolí s cílem ovlivnit přilehlé buňky. Exosomy poskytují microRNA lepší ochranu před degradací, a tudíž je jejich koncentrace vyšší než v běžné plazmě. Exosomy z tohoto důvodu slouží jako zdroj možných biomarkerů (Matsumura et al. 2015; Ogata-Kawata et al. 2014). Podařilo se nám prokázat, že jak hladina clusteru miR-17/92 v exosomech, tak i v tumoru, vykazuje spojitost s rekurencí RC. K objasnění našeho pozorování jsme simulovali zvýšení exprese miR-18a/b a miR-19a/b na buněčné kultuře SW1463 a pozorovali jsme buněčnou proliferaci a migraci. Post-transfekční exprese miR-18b byla výrazně vyšší oproti ostatním třem microRNA, a proto tento fakt mohl ovlivnit naše pozorování. Nicméně zvýšení exprese miR-18b bylo spjato s růstem buněk rektálního karcinomu, což může být důvodem, proč cluster miR-17/92 bývá běžně nadměrně exprimován v KRK. Tento fakt rovněž podporuje nově publikovaná práce o miR-19a, která podporuje proliferaci a migraci nádorových buněk kolon (Liu et al. 2017). V naší studii miR-18a a -19a mají inhibiční efekt na migraci nádorových buněk rekta. Tento nálezný je ale v rozporu se vzorky lidské tkáně, kde vysoké hladiny exprese byly spojeny s relapsem nádoru, a to spíše poukazuje na pozitivní efekt z hlediska migrace nádorových buněk. Pravděpodobným důvodem, proč cluster miR-17/92 bude mít pozitivní vliv na migraci, je inhibice transkripčního

faktoru E2F1-3. Rovněž E2F1-3 blokuje zpětně expresi clusteru miR-17/92. Tento zpětnovazebný efekt mezi clusterem miR-17/92 a E2F zajišťuje mechanismus regulace buněčného cyklu. V případě nadměrné exprese clusteru miR-17/92 je tento zpětnovazebný mechanismus narušen a dochází k buněčné proliferaci (Woods et al. 2007).

6. Exprese lokusů kvantitativního znaku u genů ABC transportérů a jejich vliv na přežívání pacientů s KRK léčených 5-FU

6.1. Úvod do problematiky

Genové varianty (např. SNP) hrají významnou roli v predispozici, rozvoji a progresi KRK (Valle et al. 2019). Díky moderním technologiím, jako je sekvenování nové generace či GWAS studie, byly identifikovány oblasti genů (lokusy), které by mohly být spojeny s predispozicí ke KRK. Existují pouze omezená data, která by přímou spojitost mezi expresí identifikovaného lokusu s predispozicí nebo progresí KRK potvrdila (Bonjoch et al. 2019; Huyghe et al. 2019). Výzkum spojitostí mezi SNPs a jejich vliv na genovou expresi na genomové úrovni známé jako QTL (lokus, jehož genotyp významně ovlivňuje variabilitu kvantitativního znaku) by mohl vést k lepší interpretaci funkce těchto variant v patogenezi KRK (Closa et al. 2014). Stanovení exprese QTL (eQTL) je metoda, díky které můžeme identifikovat lokusy zodpovědné za riziko vzniku onemocnění a tím zvýšit sílu GWAS studií, popřípadě odhalit geny, které by poukázaly na nové mechanismy spojené s patogenezi KRK či odpovědí na léčbu (Abo et al. 2012).

ATP-binding cassette (ABC) transportéry jsou odpovědné za export exogenních látek z buňky do zevního prostředí, a tím hrají klíčovou roli ve vzniku chemorezistence (Choi and Yu 2014). Exprese genů pro ABC transportéry a aktivita transportérů na bazolaterální a apikální straně epitelu je zásadní v souvislosti s dostupností léčiva, interakcemi mezi léčivými, odpovědí na léčbu, a s toxicitou (Hlavata et al. 2012).

Cílem našeho projektu je zhodnocení, zda eQTL pro ABC transportéry mohou ovlivnit metabolické dráhy léčiva a tím odpověď pacienta na léčbu (Pardini et al. 2012).

6.2. Metodika studie

6.2.1 Studovaný soubor

Do našeho projektu jsme zařadili 1098 pacientů s KRK a 1442 kontrol. Detailní charakteristika souboru je uvedena v příloze 3 (Vymetalkova et al. 2014). Všichni pacienti

zařazení do studie podepsali informovaný souhlas, studie byla schválena Etickou komisí při Institutu klinické a experimentální medicíny a Thomayerově nemocnici s multicentrickou působností (Praha).

6.2.2 Follow-up pacientů

Pacienti s KRK jsme sledovali do 31. prosince 2016. U všech jsme zaznamenali klinická data jako jsou diagnóza, lokalizace nádoru, TNM klasifikace, diferenciacie nádoru, zahájení adjuvantní chemoterapie, přítomnost vzdálených metastáz, recidiva onemocnění a úmrtí. Celkem 411 pacientů s KRK obdrželo adjuvantní terapii na bázi 5-FU. U pacientů bylo kombinováno několik možných režimů adjuvantní chemoterapie: **I) Mayo** – 5-FU (425 mg/m²) a leukovorin (10 mg/m²) po dobu 5 dnů každé 4 týdny, celkem 6 cyklů; **II) DeGramont** – leukovorin (200 mg/m²) na 2 hodiny, následně bolus 5-FU (400 mg/m²) a poté kontinuální infuze 5-FU (2400-3000 mg/m²) po dobu 46 hodin. Pacienti s metastatickým KRK podstoupili následující režim: **III) FOLFOX4** – oxaliplatina (85 mg/m²) a leukovorin (200 mg/m²) po dobu 2 hodin simultánně, následně bolus 5-FU (400 mg/m²) a poté opět 5-FU (600 mg/m²) první den, druhý den následně leukovorin (200 mg/m²) a poté bolus 5-FU (400 mg/m²) a následně opět 5-FU (600 mg/m²). Tento režim byl opakován každé dva týdny. Celkem 440 pacientům nebyla podána adjuvantní chemoterapie po chirurgické resekci nádoru.

6.2.3 Výběr eQTL polymorfismů

Existuje 7 rodin genů pro ABC transportéry, které kódují 48 odlišných proteinů. Pro každý ABC gen jsme vyhledali informace o kódujících a nekódujících SNPs za využití SCAN databáze (<http://www.scandb.org/newinterface/about.html>). Databáze poskytuje informace o počtu odlišně přepisovaných genů pro každý SNP v lymfoblastických buněčných liniích. Vybrané eQTL SNP byly dále selektovány dle MAF >5 % (minor allele frequency) v evropské populaci. Vybrané SNP jsme rovněž analyzovali jako možné tzv. master regulators of expression (geny, které regulují expresi další řady genů). V tomto případě master regulator of expression byl definován jako gen, který reguluje minimálně dalších 40 genů (Pardini et al. 2012). Kandidátní eQTL SNPs jsme validovali pomocí Genopyte-Tissue Expression project (GTEx; <https://gtexportal.org/home/>, verze V6p) (Battle et al. 2017). K analýze exprese vybraných genů jsme využili EnrichR software (Kuleshov et al. 2016).

6.2.4 Analýza SNP

DNA jsme izolovali z lymfocytů z periferní krve. Genotypizaci vybraných 14 ABC SNP jsme provedli pomocí KASP^{ar} od LGC Genomics (Hoddesdon, Herts, UK, <http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/>). Z důvodu kontroly kvality jsme stejný počet vzorků od pacientů s KRK a kontrol rozložili náhodně na každou desku. Duplicitní vzorky (5 % všech vzorků) jsme analyzovali pro každý SNP. Genotypy s nejasným výsledkem jsme vyřadili ze studie. Dvě genotypové assaye neprošly validací a byly vyřazeny. Genotypová korelace mezi duplicitními vzorky byla vyšší než 95 %. Genotype call rate (proporce genotypů bez chybějících dat) mezi SNP se pohyboval mezi 94 a 99 %.

6.2.5 Statistická analýza

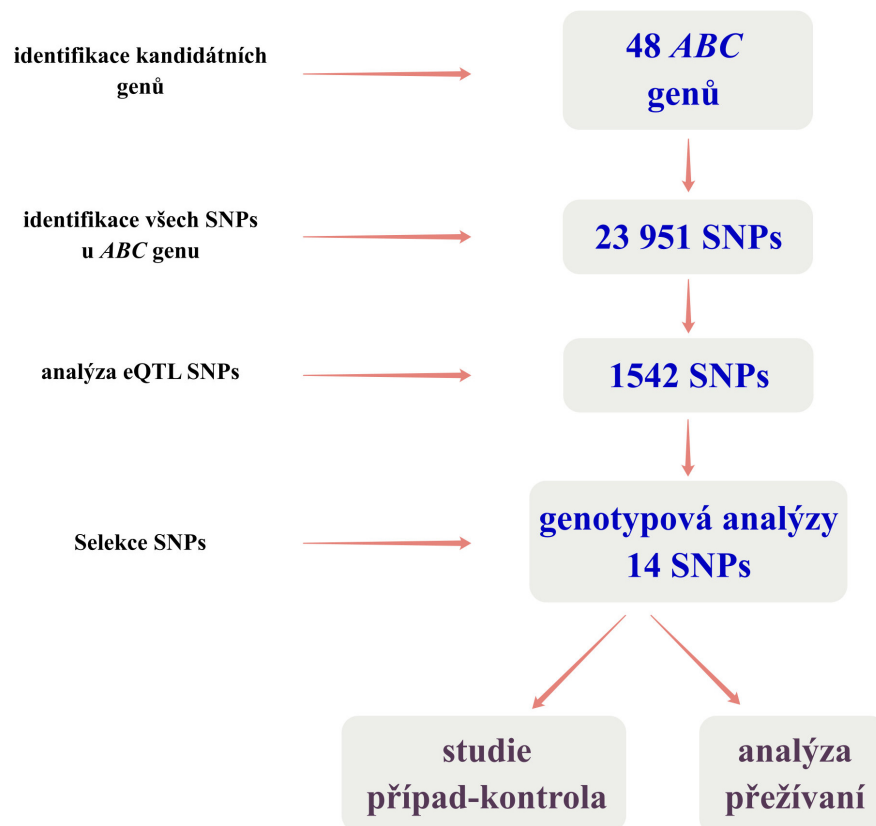
Pomocí χ -kvadrát testu jsme nastavili hladinu významnosti na $\alpha = 0,05$. Genotypy u kontrolní skupiny byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Ke stanovení spojitosti mezi genotypy a rizikem KRK byla použita metoda multivariantní regresní analýzy. Spojitost mezi SNP a rizikem vzniku KRK byla stanovena pomocí odhadnutí míry relativního rizika (Odds ratio, OR) s 95 % intervalem spolehlivosti. P hodnoty byly považovány za statisticky významné při hodnotě $p \leq 0,05$. Bonferroniho korekce měla hranici významnosti nastavenou na 0,004 pro 12 studovaných SNP.

Celkové přežívání pacientů (OS) s KRK jsme hodnotili pomocí data úmrtí, pro ty kteří byli naživu pak ukončením studie (31. 12. 2016). Přežívání bez progresu onemocnění (PFS) jsme definovali jako dobu od operace nebo ukončení terapie do objevení se vzdálených metastáz, rekurence základního onemocnění nebo smrti. Relativní riziko rekurence či smrti jsme odhadli pomocí poměru rizik (hazard ratio, HR) použitím Coxovy regresní analýzy. Křivku přežití jsme vytvořili pomocí Kaplan-Meierovy metody. Multivariantní analýza přežití byla upravena s ohledem na věk, pohlaví, TNM klasifikaci a chemoterapii. Statistickou analýza byla zpracována pomocí R softwaru (<http://www.rproject.org>).

6.3. Výsledky

6.3.1 Výběr SNP

Z celkového počtu 23 951 SNP, které jsme identifikovali ve 48 genech ABC transportérů, jsme vybrali ve SCAN databázi 1542 SNP z důvodu jejich pravděpodobné funkce regulátorů genové exprese dalších genů (<http://www.scandb.org/newinterface/about.html>). Z těchto 1542 SNP jsme vybrali SNP dle dalších kritérií (MAF >5 % v evropské populaci, analýza vazebné nerovnováhy). Následně jsme vytvořili seznam 26 eQTL v 15 genech pro ABC transportéry. V dalším kroku jsme opět pomocí SCAN databáze vybrali SNP s rolí master regulators. Po aplikaci všech kritérií bylo vybráno 6 ABC SNPs jako tzv. master regulators. Výběr jsme následně rozšířili o SNP fungující jako eQTL regulující více jak 25 genů, ale méně jak 40. Nakonec jsme vybrali 6 SNP jako master regulators a 8 SNP regulující více jako 25 genů, ale méně jak 40. Assaye pro SNP rs3758953 v *ABCC8* a rs12113924 v *ABCF2* genech neprošly validací a vykazovaly pouze nespecifickou amplifikaci. Z tohoto důvodu byly vyloučeny z analýzy (Obr. 13.).



Obr. 13. Přehled projektu, převzato z (Vymetalkova et al. 2020)

6.3.2 Výběr kandidátních SNPs – eQTL analýza

V SCAN databázi byly pro SNP rs6958591, rs2188966, rs2608288, rs4148105, rs4147825 a rs480562 přítomné alely, které signifikantně ovlivňovaly expresi 124, 72, 57, 49, 44 a 41 genů. Tyto SNP byly označeny v eQTL jako tzv. master regulators (Tabulka 11). Dle dat z GTEx portálu, SNPs rs2254884, rs4147825, rs9895649, rs11185610, rs218966, rs6958591, rs2608288, rs4148105 a rs11685669 nebyly signifikantně spojené s eQTL v žádné tkáni. SNPs rs4147864 v *ABCB4* měl signifikantní dopad na eQTL v oblasti terminálního ilea. Významný efekt cis-eQTL jsme pozorovali u SNPs rs3819720 v genu *ABCB3/TAP2* a genu *HLA-DQB1* ve štítné žláze, svalové tkáni, kůži, arterii, jícnu, srdci, tukové tkáni, prsu a tenkém střevě. Signifikantní efekt eQTL SNP rs3819720 s *HLA-DQB2* genem jsme pozorovali v tlustém střevě, pankreatu, plicích a arteriích. Obdobný výsledek jsme pozorovali také u rs3819720 s *HLA-DMA*, *HLA-DOB*, *PSMB9*, *SKIV2L*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQA2* a *C4A* geny. SNP rs480562 v *ABCB11* funguje jako eQTL pro gen *G6PC2* v plicích, kůži, nervové tkáni, tuku a žaludku. Tento SNP má rovněž efekt na gen *NOSTRIN* ve varlatech.

Tabulka 11. ABC geny analyzované pro eQTL SNP dle SCAN databáze

Gen	Počet SNP	SNP s genovou expresí (CEU)	Seznam SNP	Počet regulovaných genů pomocí SNP	MAF
ABCA1	1070	79	rs1331924	23	0,192
			rs2254884	29	0,350
ABCA4	1287	96	rs4147864	27	0,053
			rs4147825	44	0,398
			rs3789433	24	0,243
ABCA5	410	25	rs1476749	22	0,085
			rs9895649	32	0,103
			rs4968854	24	0,112
ABCA10	441	8	rs1476749	22	0,085
ABCA13	2164	238	rs11185610	30	0,219
ABCB3/TAP2	264	20	rs3819720	36	0,376
ABCB10	221	6	rs927204	23	0,138
ABCB11	685	61	rs480562	41	0,442
ABCC1	1657	91	rs3784860	20	0,477
			rs215049	23	0,302
ABCC4	2192	128	rs17189561	22	0,119
ABCC8	559	21	rs3758953	38	0,482
			rs2188966	72	0,429
ABCF1	123	10	rs3132610	21	0,115
ABCF2	130	17	rs6958591	124	0,483
			rs6949587	23	0,442
			rs12113924	26	0,094
			rs3800792	21	0,447
			rs2608288	57	0,450
ABCG1	633	25	rs4148105	49	0,397
ABCG8	301	27	rs11685669	27	0,204

Tyto tzv. *in silico* analýzy nám ukázaly, že nejvíce exprimované geny ve střevní tkáni byly MHC (*HLA-DQB1*, *HLA-BQB*, atd.). Je dobře známo, že prezentace antigenů pomocí MHC glykoproteinů je stěžejní pro imunitní odpovědi organismu na nádorové onemocnění (Reeves and James 2017).

6.3.3 Studie případů a kontrol

Do studie jsme zařadili celkem 1098 pacientů s KRK, 708 mělo diagnostikovan KRK tračnicku a 369 KRK rekta. U 21 pacientů nebyla lokalizace KRK známa, a proto jsme je zařadili pouze do studie přežívání. Pacienti s KRK v porovnání s kontrolami byli starší, měli vyšší BMI, častěji pozitivní rodinnou anamnézu na KRK a nižší dosažené vzdělání. V kontrolní skupině bylo více mužů a aktivních kuřáků (Tabulka 12).

Tabulka 12. Charakteristika souboru

Proměnná	Charakteristika	KRK (%)	Kontroly (%)	OR	95 % CI	P
věk (věkové rozmezí v letech)	(18-47)	86 (8,0 %)	583 (40,4 %)	Ref		
	(47-55)	204 (18,9 %)	413 (28,6 %)	3,35	2,53–4,44	<0,00001
	(55-65)	363 (33,6 %)	278 (19,3 %)	8,85	6,72–11,65	<0,00001
	(65-91)	427 (39,5 %)	168 (11,7 %)	17,23	12,91–22,99	<0,00001
pohlaví	ženy	418 (38,7 %)	647 (44,9 %)	Ref		
	muži	662 (61,3 %)	795 (55,1 %)	1,29	1,10–1,51	0,002
BMI	(0-23.7)	184 (22,6 %)	359 (26,5 %)	Ref		
	(23.7-26.2)	189 (23,1 %)	356 (26,3 %)	1,04	0,81–1,33	0,80
	(26.2-28.9)	219 (26,9 %)	320 (23,6 %)	1,34	1,04–1,71	0,02
	(28.9-53.1)	223 (27,4 %)	319 (23,6 %)	1,36	1,07–1,75	0,01
kouření	nekuřáci	526 (51,7 %)	800 (58,4 %)	Ref		
	kuřáci	160 (15,7 %)	319 (23,3 %)	0,76	0,61–0,95	0,02
	ex kuřáci	331 (32,6 %)	250 (18,3 %)	2,01	1,65–2,45	< 0,001
rodinná anamnéza KRK	ano	720 (83,5 %)	1181 (89,5 %)	Ref		
	ne	142 (16,5 %)	138 (10,5 %)	1,69	1,31–2,17	< 0,0001
místo bydliště	město	507 (58,1 %)	932 (68,3 %)	Ref		
	město a venkov	126 (14,5 %)	170 (12,4 %)	1,36	1,06–1,76	0,02
	venkov	239 (27,4 %)	263 (19,3 %)	1,67	1,36–2,05	< 0,00001
vzdělání	základní	268 (31,0 %)	221 (16,2 %)	Ref		
	středoškolské	457 (52,9 %)	801 (58,9 %)	0,47	0,38–0,58	< 0,00001
	vysokoškolské	139 (16,1 %)	339 (24,9 %)	0,34	0,26–0,44	< 0,00001

Distribuce genotypů v kontrolní skupině byla v Hardy-Weinbergovou rovnováze pro všechny SNPs. Nosičství genotypu GA v rs3819720 genu *ABCB3/TAP2* bylo spojeno s vyšším rizikem vzniku KRK oproti nosičství GG genotypu (GA vs. GG; OR = 1,30; 95 % CI = 1,03–1,65; $P = 0,03$). Obdobné výsledky jsme pozorovali v dominantním modelu. Po Bonferroniho korekci nebyly však spojitosti statisticky významné.

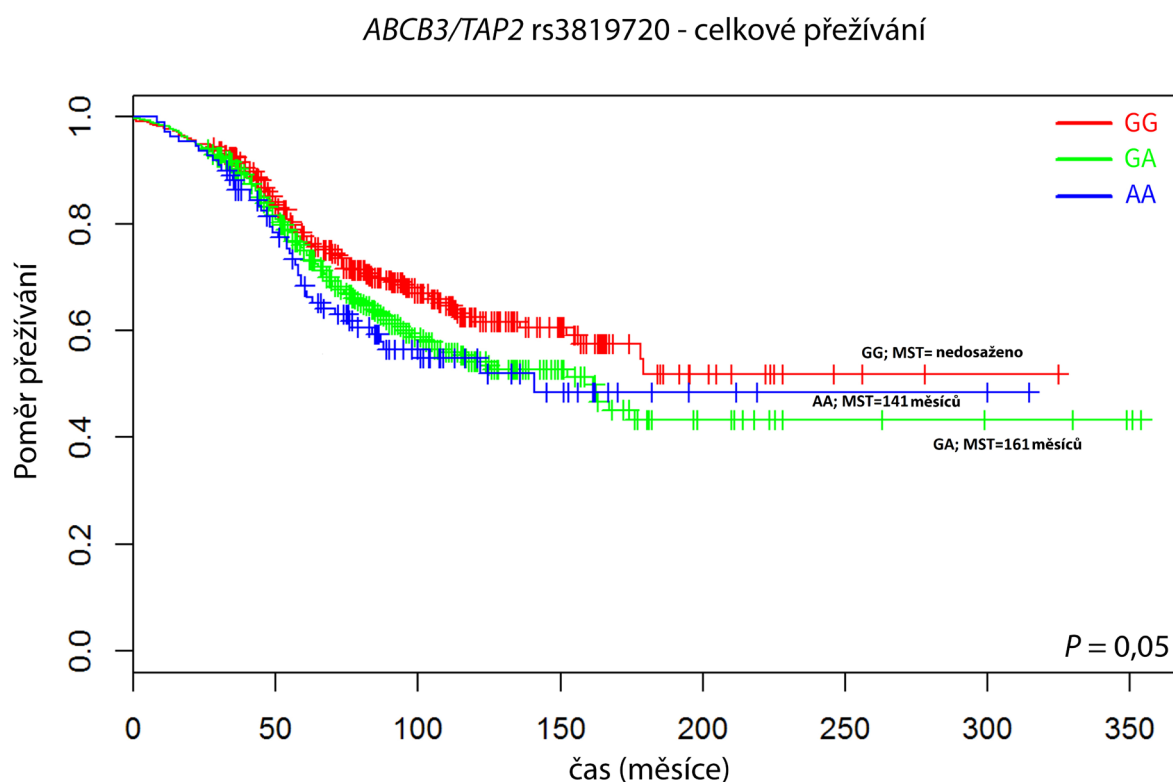
6.3.4 Studie přežívání

Do studie přežívání bylo zařazeno celkem 1098 pacientů s KRK. V univariální analýze bylo několik faktorů, které byly spojeny s kratším přežíváním pacientů. Mezi ně patří mužské pohlaví, vyšší věk, kouření a stadium tumoru (Tabulka 13). Celkem 5 SNP bylo spojeno buď s celkovým přežíváním nebo s PFS. Nicméně pokud jsme pracovali s hladinou významnosti $P = 0,004$, tak většina těchto spojitostí nebyla statisticky významná.

Tabulka 13. Data ovlivňující OS a PFS u pac. S KRK s dokončeným follow-up

Proměnná		N	OS		PFS	
Charakteristika			HR (95 % CI)	P	HR (95 % CI)	P
Pohlaví	Ženy	427	Ref		Ref	
	Muži	656	1,54 (1,23–1,92)	0,0001	1,35 (1,09–1,68)	0,006
věk (roky)	≤55	293	Ref		Ref	
	56–62	248	1,43 (1,05–1,95)	0,02	1,41 (1,06–1,87)	0,02
	63–70	294	1,39 (1,04–1,88)	0,03	1,19 (0,90–1,58)	0,22
	>70	248	2,02 (1,50–2,72)	<0,0001	1,04 (0,76–1,42)	0,80
Kouření*	Ne	533	Ref		Ref	
	Ano	493	1,26 (1,02–1,56)	0,03	1,14 (0,93–1,41)	0,19
T	1	50	Ref		Ref	
	2	166	2,64 (0,94–7,40)	0,06	2,18 (0,8–5,55)	0,10
	3	535	5,84 (2,17–15,71)	0,0005	5,58 (2,30–13,53)	0,0001
	4	136	9,21 (3,36–25,26)	<0,0001	6,96 (2,80–17,27)	<0,0001
N	0	498	Ref		Ref	
	1	260	2,17 (1,69–2,79)	<0,0001	1,87 (1,46–2,41)	<0,0001
	2	68	3,40 (2,35–4,91)	<0,0001	3,43 (2,45–4,81)	<0,0001
M	0	725	Ref		Ref	
	1	177	4,80 (3,83–6,02)	<0,0001	4,56 (3,68–5,65)	<0,0001
5-FU terapie	Ano	411	Ref		Ref	
	Ne	440	1,42 (1,13–1,790)	0,003	0,85 (0,68–1,06)	0,14
Stadium	I	149	Ref		Ref	
	II	293	2,14 (1,32–3,48)	0,002	2,47 (1,51–4,05)	0,0003
	III	244	3,75 (2,33–6,03)	<0,0001	3,87 (2,38–6,31)	<0,0001
	IV	177	11,87 (7,44–18,95)	<0,0001	11,86 (7,42–18,98)	<0,0001

V případě všech pacientů s KRK byl SNP rs3819720 v *ABCB3/TAP2* statisticky významně spojen s celkovým přežíváním v kodominantním a dominantním modelu, i při Bonferroniho korekci (GA vs. GG; HR = 1,48; 95 % CI = 1,15–1,90; $P = 0,002$; AA vs. GG; HR = 1,70; 95 % CI = 1,18–2,43; $P = 0,004$; a GA + AA vs. GG; HR = 1,52; 95 % CI = 1,20–1,93; $P = 0,0006$; log-rank test $P = 0,05$). Při rozdělení dle lokalizace tumoru zůstaly výsledky statisticky významné pro všechny oblasti tlustého střeva (kolon: GA vs. GG; HR = 1,38; 95 % CI = 1,01–1,88; $P = 0,04$; a GA + AA vs. GG; HR = 1,40; 95 % CI = 1,04–1,89; $P = 0,03$; rektum: GA + AA vs. GG; HR = 1,57; 95 % CI = 1,03–2,40; $P = 0,04$) (Obr. 14).

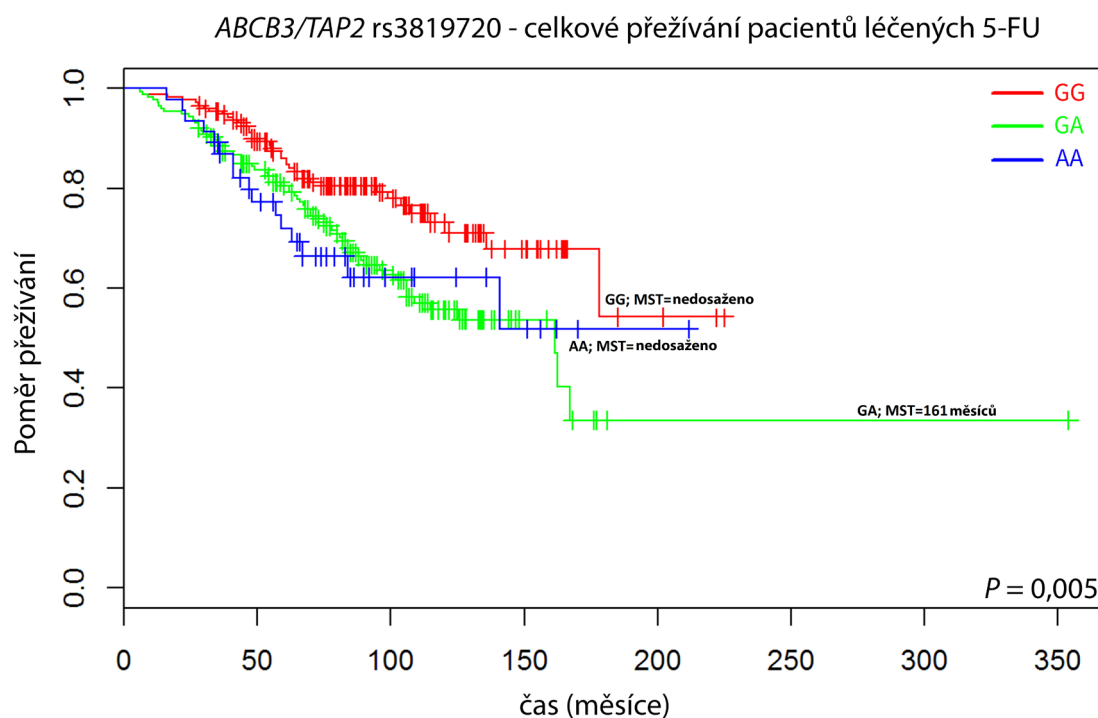


Obr. 14. Kaplan-Meierova křivka přežívání u KRK pacientů s rs3819720 v genu *ABCD3/TAP2*, převzato z (Vymetalkova et al. 2020)

6.3.5 Přežívání a léčba

Ke zhodnocení vztahu mezi analyzovanými SNP a odpovědí na léčbu jsme pacienty rozdělili do tří skupin dle aplikované terapie: **I)** pacienti s KRK bez terapie, **II)** pacienti s KRK léčení 5-FU, **III)** pacienti s KRK léčení 5-FU v kombinaci s oxaliplatinou. Z univariantské analýzy

jsme zjistili, že některé genotypy byly signifikantně spojeny s OS a PFS dle režimu aplikované léčby (Tabulka 13). U pacientů, kteří nebyli léčeni chemoterapií, nebyly SNP statisticky signifikantně spojeny s délkou přežívání. Ze souboru pacientů léčených pomocí 5-FU bez oxaliplatiny, vykazovali heterozygoti GA rs3819720 v genu *ABCB3/TAP2* horší celkové přežívání (GA vs. GG; HR = 1,59; 95 % CI = 1,05–2,41; $P = 0,03$ a GA + AA vs. GG; HR = 1,60; 95 % CI = 1,07–2,38; $P = 0,02$; log-rank test $P = 0,008$) (Obr. 14). Po Bonferroniho korekci nebyly spojitosti statisticky významné.



Obr. 15. Kaplan-Meierova křivka přežívání u KRK pacientů léčených 5-FU s rs3819720 v genu *ABCD3/TAP2*, převzato z (Vymetalkova et al. 2020)

6.4. Diskuse

Varianty genů kódujících membránové ABC transportéry mohou sehrávat významnou úlohu při stratifikaci pacientů a stanovení rizika abnormální farmakokinetiky a farmakodynamiky chemoterapeutik (Hlavata et al. 2012). V klinické praxi jsou v léčbě KRK nejdůležitější dva faktory: odpověď pacienta na léčbu a léky indukovaná toxicita. Díky genetickému testování se otevírá možnost individualizace terapie, odhadování odpovědi na léčbu a predikce léky indukované toxicity (Bhushan et al. 2009). Jednou z možností zvýšení

efektu terapie a redukce toxicity je vyhledání podskupiny pacientů s KRK, pro které bude terapie 5-FU nejvhodnější.

V naší studii jsme prokázali, že z 12 polymorfismů v genech kódujících ABC transportéry, které regulovaly genovou expresi velkého počtu genů, neprokázal ani jeden z nich spojitost s rizikem vzniku KRK. Nicméně rs3819720 v genu *ABCB3/TAP2* byl spojen s celkovým přežíváním u obou forem KRK (kolon i rektum) po léčbě 5-FU. Pacienti, kteří byli GA heterozygoti a variantní homozygoti (AA) měli 1,5x vyšší riziko úmrtí nežli ti, kteří variantu alelu neměli. Na základě funkčních studií na buněčných kulturách ze SCAN databáze, byl identifikován SNP rs3819720 jako regulátor 36 genů, a to především v hlavním MHC. *ABCB3* se účastní procesu prezentace antigenu transportem MHC proteinů (MHC I. třídy) z cytoplazmy do endoplazmatického retikula. Snížení exprese *ABCB3* je spojen s poklesem HLA I. třídy v nádorových buňkách a tím možným agresivním chováním KRK (Atkins et al. 2004; Singal et al. 1996). Předpokládáme, že varianta rs3819720 by mohla hrát roli ve funkci *ABCB3/TAP2* a tím regulovat expresi celé řady genů. Potvrdila by tak spojitost s přežíváním pacientů léčených 5-FU.

Expese tumor-specifického antigenu hraje důležitou roli v protinádorové imunitní odpovědi zvýšenou produkcí specifických T-lymfocytů. Současné studie ukazují, že nádory s celou řadou nových antigenů jsou více imunogenní, a tak nám dávají větší prostor k efektivnější imunoterapii. MSI instabilita u KRK generuje 10–50x více neoantigenů než MSI stabilní KRK (Llosa et al. 2015). Vyšší expese antigenů u pacientů s MSI ukazuje signifikantní nárůst infiltrace T-lymfocyty a tím lepší prognózu pacienta (Boissière-Michot et al. 2014).

Studie ukazují, že některé nádory mají sníženou expresi receptorů pro MHC I. třídy, čímž dochází ke snížení prezentace nádorových antigenů na povrchu buňky (Rieth and Subramanian 2018). Snížení exprese MHC I. třídy u pacientů s KRK je rovněž spojeno s horší prognózou (Watson et al. 2006). Pokles exprese receptorů MHC I. třídy může vést k určité míře imunotolerance vůči nádorovým buňkám. Snížení počtu receptorů však plně tento jev vysvětlit nedokáže. Proces lze do určité míry vysvětlit působením dalších onkolytických mechanismů, jako je například působení NK buněk (Rieth and Subramanian 2018).

Jak již bylo řečeno, gen *ABCB3/TAP2* hraje roli ve vzniku chemorezistence (Knox et al. 2018). Rezistence na 5-FU může mít mnoho příčin, jako je porucha v influxu či efluxu léčiva,

inaktivace léčiva nebo mutace v cílových strukturách léčiva. Kasajima a spol. ukázali, že proteiny TAP1 a TAP2 jsou spojeny s koncentrací infiltrujících T-lymfocytů, které jsou pozitivním prognostickým markerem KRK (Kasajima et al. 2010). Snížená exprese TAP2 byla spojena s lepší odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii u pacientek s karcinomem prsu (Litviakov et al. 2016).

Odlišné genové exprese napříč jedinci může být analyzována jako kvantitativní fenotyp. Nicméně je třeba mít na mysli, že objevené vztahy byly zjištěny na lymfoblastových buněčných liniích, na kterých lze věrohodně interpretovat spojitost u onemocnění, ale rovněž mají své limity a artefakty (Nica et al. 2010). Ještě do nedávna existovala omezená data popisující regulátory exprese a jejich spojitost s rizikem vzniku nádorů, a to především díky složitosti a komplexnosti eQTL studií. Díky pokroku v technice, a především sekvenaci nové generace, se daří tyto limity překonávat.

Je třeba brát v potaz, že většina spojitostí, která nám ve studii vyšla, byla statisticky signifikantní pouze při nominální hodnotě P nebo při Bonferroniho korekci při malém počtu testovaných hypotéz. Tento fakt je limitací naší studie, nicméně tato studie byla explorativní a jejím cílem bylo zhodnotit potenciál eQTL specifických genů. Naše výsledky musí být validovány na větší kohortě pacientů.

Závěrem můžeme říct, že pátrání po eQTL polymorfismech u specifických genů, které regulují expresi dalších genů, může být podkladem pro zhodnocení individuální odpovědi pacientů na léčbu.

7. Souhrn výsledků

1. KRK diagnostikovaný screeningem liší z klinicko-patologického hlediska od KRK diagnostikovaného u symptomatického pacienta. Studie potvrdila efektivitu screeningového programu, který jasně ukazuje celkově lepší klinicko-patologický profil KRK v porovnání s vyšetřenými symptomatickými pacienty.

2. Expresní profil microRNA u rektální formy KRK je rozdílný od nenádorové tkáně. Rozdíly byly patrné také při porovnání rektální a kolonické formy KRK. Ke změnám expresního profilu vedla i onkologická terapie, některé microRNA přímo korelovaly s odpovědí na léčbu, jiné microRNA byly spojeny s vyšší pokročilostí nádorového onemocnění a kratším přežíváním pacientů.

3. SNP v genech pro ABC transportéry ovlivňují individuální odpověď na léčbu a přežívání pacientů s KRK. Neprokázáli jsme spojitost mezi těmito SNP a rizikem vzniku KRK. Pro SNP rs3819720 v *ABCB3/TAP2* jsme prokázali spojitost s kratším celkovým přežíváním u specifických genotypů.

8. Budoucí perspektivy

KRK nadále zůstává závažné nádorové onemocnění na které ročně zemře celosvětově téměř 900 000 pacientů (Bray et al. 2018). I přes screeningový program, který byl zaveden v celé řadě zemí, se nadále potýkáme s nízkou účastí obyvatel na tomto programu. Studie jasně ukazují, gTOKS vedl ke snížení incidence i mortality KRK. Sigmoidoskopie ukázala, že si vede ještě lépe nežli gTOKS, nicméně pouze stran snížení incidence nikoliv mortality. Zdá se, že koloskopie vede k výraznějšímu snížení incidence KRK v porovnání se sigmoidoskopií, ale výsledky nejsou zcela konkluzivní (Lauby-Secretan et al. 2018). Doposud neexistuje screeningový model, který by byl všeobecně akceptovaný napříč odbornými skupinami. Ideální model je t. č. takový, který je ekonomicky v dané zemi realizovatelný a akceptovatelný pacienty. Budoucnost screeningového programu je především v primární prevenci (redukce behaviorálních rizikových faktorů a následně sekundární prevence, vedoucí ke stratifikaci rizik (skórovací systémy) a tím tzv. užití screeningu na míru pro každého pacienta, což povede ke snížení nákladů. S tím ruku v ruce půjde i vývoj techniky, která zlepší senzitivitu diagnostických metod, jako je například užití umělé inteligence v detekci neoplastických lézí tlustého střeva (Maida et al. 2017).

V posledních dvou dekádách jsou extenzivně studovány nové biomarkery, které by mohly sloužit k diagnostice, predikci, či jako prognostické ukazatele. Mezi některé nové prognostické biomarkery, které jsou studovány patří například Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3 (IMP3), S100A2 protein, Traf2-interacting kinase, Mutated in Colorectal Cancer (MCC), atd. Mezi prediktivní markery odpovědi na léčbu oxaliplatinou u stadia II a III KRK patří například ERCC – 1 a další. Insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) je naopak studován jako možný plazmatický diagnostický marker k časně detekci KRK. Existuje mnoho dalších markerů, které jsou extenzivně studovány (např. miRNA) (Das et al. 2017). V brzké době můžeme očekávat klinické studie zabývající se specificitou a senzitivitou jednotlivých markerů a jejich kombinaci s dosavadními metodami. S postupným průnikem těchto biomarkerů do klinické praxe můžeme očekávat individualizaci diagnosticky, terapie a follow-up pacienta s KRK.

Nové technologie v analýze lidského genomu, jako je například sekvenace nové generace, se stále rozvíjí a umožňují nám nahlédnout do variant v genetické informaci

a především odkrýt možné vztahy mezi jednotlivými geny a tím jejich význam v patogenezi celé škály onemocnění. Tyto metody budou hrát významnou roli v tzv. funkční genomice, která se v budoucnu stane nedílnou součástí diagnosticko-terapeutického procesu u pacienta. Díky funkční genomice budeme moci individualizovat nejenom terapii jako takovou, ale také predikovat odpověď na danou léčbu a odhadovat prognózu či rekurenci onemocnění.

9. Reference

- Abo, R., et al. (2012), 'Identifying the genetic variation of gene expression using gene sets: application of novel gene Set eQTL approach to PharmGKB and KEGG', *PLoS One*, 7 (8), e43301.
- Akhoondi, S., et al. (2007), 'FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer', *Cancer Res*, 67 (19), 9006-12.
- Al-Sohaily, S., et al. (2012), 'Molecular pathways in colorectal cancer', *J Gastroenterol Hepatol*, 27 (9), 1423-31.
- Aleksandrova, Krasimira, et al. (2014), 'Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study', *BMC Medicine*, 12 (1), 168.
- Amri, R., et al. (2013), 'Impact of screening colonoscopy on outcomes in colon cancer surgery', *JAMA Surg*, 148 (8), 747-54.
- Arakawa, Hirofumi (2004), 'Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis', *Nat Rev Cancer*, 4 (12), 978-87.
- Archambault, A. N., et al. (2019), 'Cumulative Burden of Colorectal Cancer-Associated Genetic Variants is More Strongly Associated With Early-onset vs Late-onset Cancer', *Gastroenterology*.
- Armaghany, T., et al. (2012), 'Genetic alterations in colorectal cancer', *Gastrointest Cancer Res*, 5 (1), 19-27.
- Aslam, M. I., et al. (2012), 'MicroRNA manipulation in colorectal cancer cells: from laboratory to clinical application', *J Transl Med*, 10, 128.
- Atkin, W. S., et al. (2010), 'Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial', *Lancet*, 375 (9726), 1624-33.
- Atkins, D., et al. (2004), 'MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma', *Int J Cancer*, 109 (2), 265-73.
- Baglietto, L., et al. (2006), 'Measures of familial aggregation depend on definition of family history: meta-analysis for colorectal cancer', *J Clin Epidemiol*, 59 (2), 114-24.
- Baran, B., et al. (2018), 'Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature', *Gastroenterology Res*, 11 (4), 264-73.
- Battle, A., et al. (2017), 'Genetic effects on gene expression across human tissues', *Nature*, 550 (7675), 204-13.
- Benedix, F., et al. (2010), 'Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival', *Dis Colon Rectum*, 53 (1), 57-64.
- Benchabane, H. and Ahmed, Y. (2009), 'The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis', *Adv Exp Med Biol*, 656, 75-84.
- Berger, A. H., Knudson, A. G., and Pandolfi, P. P. (2011), 'A continuum model for tumour suppression', *Nature*, 476 (7359), 163-9.
- Bettington, M., et al. (2013), 'The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges', *Histopathology*, 62 (3), 367-86.
- Bhushan, S., McLeod, H., and Walko, C. M. (2009), 'Role of pharmacogenetics as predictive biomarkers of response and/or toxicity in the treatment of colorectal cancer', *Clin Colorectal Cancer*, 8 (1), 15-21.
- Bodmer, W. F., et al. (1987), 'Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5', *Nature*, 328 (6131), 614-6.
- Bogaert, J. and Prenen, H. (2014), 'Molecular genetics of colorectal cancer', *Ann Gastroenterol*, 27 (1), 9-14.
- Boissière-Michot, F., et al. (2014), 'Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer', *Oncoimmunology*, 3, e29256.
- Bonfrate, L., et al. (2013), 'MicroRNA in colorectal cancer: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment', *J Gastrointest Liver Dis*, 22 (3), 311-20.

- Bonjoch, L., et al. (2019), 'Approaches to functionally validate candidate genetic variants involved in colorectal cancer predisposition', *Mol Aspects Med*, 69, 27-40.
- Brackmann, S., et al. (2009), 'Two distinct groups of colorectal cancer in inflammatory bowel disease', *Inflamm Bowel Dis*, 15 (1), 9-16.
- Bray, Freddie, et al. (2018), 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (6), 394-424.
- Brenner, H., et al. (2016), 'Survival of patients with symptom- and screening-detected colorectal cancer', *Oncotarget*.
- Bustin, S. A., et al. (2009), 'The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments', *Clin Chem*, 55 (4), 611-22.
- Butterworth, A. S., Higgins, J. P., and Pharoah, P. (2006), 'Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis', *Eur J Cancer*, 42 (2), 216-27.
- Carames, Cristina, et al. (2016), 'MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (6).
- Carames, Cristina, et al. (2015), 'MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer', *International Journal of Colorectal Disease*, 30 (7), 899-906.
- Castets, Marie, et al. (2012), 'DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity', *Nature*, 482 (7386), 534-37.
- Closa, A., et al. (2014), 'Identification of candidate susceptibility genes for colorectal cancer through eQTL analysis', *Carcinogenesis*, 35 (9), 2039-46.
- Das, V., Kalita, J., and Pal, M. (2017), 'Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges', *Biomed Pharmacother*, 87, 8-19.
- Davies, Helen, et al. (2002), 'Mutations of the BRAF gene in human cancer', *Nature*, 417 (6892), 949-54.
- De Divitiis, C., et al. (2014), 'Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: between hope and reality', *World J Gastroenterol*, 20 (41), 15049-59.
- Demes, M., et al. (2013), 'Signature of microsatellite instability, KRAS and BRAF gene mutations in German patients with locally advanced rectal adenocarcinoma before and after neoadjuvant 5-FU radiochemotherapy', *J Gastrointest Oncol*, 4 (2), 182-92.
- Devaud, N. and Gallinger, S. (2013), 'Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer', *Fam Cancer*, 12 (2), 301-6.
- Drebber, Uta, et al. (2011), 'Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy', *International Journal of Oncology*, 39 (2), 409-15.
- Duman-Scheel, M. (2012), 'Deleted in Colorectal Cancer (DCC) pathfinding: axon guidance gene finally turned tumor suppressor', *Curr Drug Targets*, 13 (11), 1445-53.
- Dušek L, et al. (2015), 'Epidemiologie a populační screening nádorů tlustého střeva a konečníku v České republice na podkladě nově dostupných dat.', *Gastroent Hepatol*, 509-17.
- East, J. E., Saunders, B. P., and Jass, J. R. (2008), 'Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management', *Gastroenterol Clin North Am*, 37 (1), 25-46, v.
- Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C. (2015), 'AJCC 7th Edition Cancer Staging Manual', 672.
- Faltejškova, P., et al. (2012), 'Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells', *Int J Colorectal Dis*, 27 (11), 1401-8.
- Farkas, S. A., et al. (2014), 'DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/beta-catenin signaling pathway genes', *Epigenomics*, 6 (2), 179-91.
- Fearnhead, N. S., Wilding, J. L., and Bodmer, W. F. (2002), 'Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis', *Br Med Bull*, 64, 27-43.

- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990), 'A genetic model for colorectal tumorigenesis', *Cell*, 61 (5), 759-67.
- Fedirko, V., et al. (2011), 'Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies', *Ann Oncol*, 22 (9), 1958-72.
- Feldman, Friedman, and Brandt (2016), 'Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease 10th edition', *Elsevier*, 2359.
- Ferlay, et al. 'GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].', <<http://globocan.iarc.fr/Pages/references.aspx>>, accessed.
- Flossmann, E. and Rothwell, P. M. (2007), 'Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies', *Lancet*, 369 (9573), 1603-13.
- Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H. (2001), 'APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer', *Nat Rev Cancer*, 1 (1), 55-67.
- Ford, A. C., et al. (2008), 'Diagnostic utility of alarm features for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis', *Gut*, 57 (11), 1545-53.
- Foutch, P. G., et al. (1988), 'Risk factors for blood loss from adenomatous polyps of the large bowel: a colonoscopic evaluation with histopathological correlation', *J Clin Gastroenterol*, 10 (1), 50-6.
- Frattini, M., et al. (2004), 'Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis', *Clin Cancer Res*, 10 (12 Pt 1), 4015-21.
- Frič, P., et al. (1994), 'An adapted program of colorectal cancer screening--7 years experience and cost-benefit analysis', *Hepatogastroenterology*, 41 (5), 413-6.
- Gaedcke, Jochen, et al. (2012), 'The Rectal Cancer microRNAome - microRNA Expression in Rectal Cancer and Matched Normal Mucosa', *Clinical Cancer Research*, 18 (18), 4919-30.
- Gala, M. K., et al. (2014), 'Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas', *Gastroenterology*, 146 (2), 520-9.
- Garzon, Ramiro, Calin, George A., and Croce, Carlo M. (2009), 'MicroRNAs in Cancer', *Annual Review of Medicine*, 60 (1), 167-79.
- Gillis, Amy, et al. (2014), 'A patient-centred approach toward surgical wait times for colon cancer: a population-based analysis', *Canadian Journal of Surgery*, 57 (2), 94-100.
- Glebov, O. K., et al. (2003), 'Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12 (8), 755-62.
- Gregga, Tomáš, et al. (2016), 'Current principles of colorectal cancer screening – from opportunistic screening to a population-based screening program', *Gastroenterologie a hepatologie*, 70 (5), 383-92.
- Gualco, G., et al. (2006), 'Flat elevated lesions of the colon and rectum: a spectrum of neoplastic and nonneoplastic entities', *Ann Diagn Pathol*, 10 (6), 333-8.
- Haggar and Boushey (2009), 'Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors', *Clin Colon Rectal Surg*, 22 (4), 191-7.
- Harris, P. A., et al. (2009), 'Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support', *J Biomed Inform*, 42 (2), 377-81.
- Haug, U., et al. (2011), 'Sensitivity of immunochemical faecal occult blood testing for detecting left- vs right-sided colorectal neoplasia', *Br J Cancer*, 104 (11), 1779-85.
- He, L., et al. (2005), 'A microRNA polycistron as a potential human oncogene', *Nature*, 435 (7043), 828-33.
- Heresbach, D., et al. (2011), 'Accuracy of computed tomographic colonography in a nationwide multicentre trial, and its relation to radiologist expertise', *Gut*, 60 (5), 658-65.
- Hlavata, I., et al. (2012), 'The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer', *Mutagenesis*, 27 (2), 187-96.
- Holleran, G., et al. (2014), 'Colon capsule endoscopy as possible filter test for colonoscopy selection in a screening population with positive fecal immunology', *Endoscopy*, 46 (6), 473-8.
- Hrasovec, S. and Glavac, D. (2012), 'MicroRNAs as Novel Biomarkers in Colorectal Cancer', *Front Genet*, 3, 180.

- Hughes, L. A. E., et al. (2017), 'Lifestyle, Diet, and Colorectal Cancer Risk According to (Epi)genetic Instability: Current Evidence and Future Directions of Molecular Pathological Epidemiology', *Curr Colorectal Cancer Rep*, 13 (6), 455-69.
- Huyghe, J. R., et al. (2019), 'Discovery of common and rare genetic risk variants for colorectal cancer', *Nat Genet*, 51 (1), 76-87.
- Chan, D. S., et al. (2011), 'Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies', *PLoS One*, 6 (6), e20456.
- Chen, C. Z. (2005), 'MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors', *N Engl J Med*, 353 (17), 1768-71.
- Chen, T., et al. (2018), 'Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for high-grade dysplasia and early-stage carcinoma in the colorectum', *Cancer Commun (Lond)*, 38 (1), 3.
- Cheng, Y. and Li, G. (2012), 'Role of the ubiquitin ligase Fbw7 in cancer progression', *Cancer Metastasis Rev*, 31 (1-2), 75-87.
- Chew, M. H., et al. (2015), 'Genomics of Hereditary Colorectal Cancer: Lessons Learnt from 25 Years of the Singapore Polyposis Registry', *Ann Acad Med Singapore*, 44 (8), 290-6.
- Chin, L. J. and Slack, F. J. (2008), 'A truth serum for cancer--microRNAs have major potential as cancer biomarkers', *Cell Res*, 18 (10), 983-4.
- Choi, Y. H. and Yu, A. M. (2014), 'ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development', *Curr Pharm Des*, 20 (5), 793-807.
- Iacopetta, B., et al. (2006), 'Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study', *Annals of Oncology*, 17 (5), 842-47.
- Imperiale, T. F., et al. (2019), 'Performance Characteristics of Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer and Advanced Adenomatous Polyps: A Systematic Review and Meta-analysis', *Ann Intern Med*, 170 (5), 319-29.
- Issa, I. A. and Nouredine, M. (2017), 'Colorectal cancer screening: An updated review of the available options', *World Journal of Gastroenterology*, 23 (28), 5086-96.
- Itzkowitz, S., et al. (2008), 'A simplified, noninvasive stool DNA test for colorectal cancer detection', *Am J Gastroenterol*, 103 (11), 2862-70.
- Jacob, S. and Praz, F. (2002), 'DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis', *Biochimie*, 84 (1), 27-47.
- Jass, Jeremy R. (2004), 'Limitations of the Adenoma-Carcinoma Sequence in Colorectum', *Clinical Cancer Research*, 10 (17), 5969-70.
- Kam, Y., et al. (2014), 'Detection of a long non-coding RNA (CCAT1) in living cells and human adenocarcinoma of colon tissues using FIT-PNA molecular beacons', *Cancer Lett*, 352 (1), 90-6.
- Karakas, B., Bachman, K. E., and Park, B. H. (2006), 'Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers', *Br J Cancer*, 94 (4), 455-9.
- Karapetis, C. S., et al. (2008), 'K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer', *N Engl J Med*, 359 (17), 1757-65.
- Kartheuser, A., et al. (1995), 'The genetic background of familial adenomatous polyposis. Linkage analysis, the APC gene identification and mutation screening', *Acta Gastroenterol Belg*, 58 (5-6), 433-51.
- Kasajima, A., et al. (2010), 'Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer', *Hum Pathol*, 41 (12), 1758-69.
- Khalid, U., et al. (2007), 'Symptoms and weight loss in patients with gastrointestinal and lung cancer at presentation', *Support Care Cancer*, 15 (1), 39-46.
- Kloor, M. and von Knebel Doeberitz, M. (2016), 'The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer', *Trends Cancer*, 2 (3), 121-33.
- Knox, B., et al. (2018), 'A functional SNP in the 3'-UTR of TAP2 gene interacts with microRNA hsa-miR-1270 to suppress the gene expression', *Environ Mol Mutagen*, 59 (2), 134-43.
- Knudson, A. G., Jr. (1985), 'Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes', *Cancer Res*, 45 (4), 1437-43.
- Konishi, K., et al. (1999), 'Clinicopathological differences between colonic and rectal carcinomas: are they based on the same mechanism of carcinogenesis?', *Gut*, 45 (6), 818-21.

- Král, Hucl, and Špičák (2017), 'Přínos screeningového vyšetření u příbuzných pacientů s karcinomem tlustého střeva', *Medicina pro praxi*, 230-33.
- Kral, J., et al. (2016), '[Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer]', *Klin Onkol*, 29 (6), 419-27.
- Kral, J., et al. (2018), 'Expression profile of miR-17/92 cluster is predictive of treatment response in rectal cancer', *Carcinogenesis*.
- Kubisch, C. H., et al. (2016), 'Screening for Colorectal Cancer is Associated with Lower Disease Stage: A Population-Based Study', *Clin Gastroenterol Hepatol*.
- Kuipers, Ernst J., et al. (2015), 'Colorectal cancer', *Nature Reviews Disease Primers*, 15065.
- Kulda, V., et al. (2010), 'Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases', *Cancer Genet Cytogenet*, 200 (2), 154-60.
- Kuleshov, M. V., et al. (2016), 'Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update', *Nucleic Acids Res*, 44 (W1), W90-7.
- Kusenda, B., et al. (2006), 'MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150 (2), 205-15.
- Kwong, L. N. and Dove, W. F. (2009), 'APC and its modifiers in colon cancer', *Adv Exp Med Biol*, 656, 85-106.
- Ladabaum, U., et al. (2019), 'Cost-Effectiveness and National Effects of Initiating Colorectal Cancer Screening for Average-Risk Persons at Age 45 Years Instead of 50 Years', *Gastroenterology*, 157 (1), 137-48.
- Lamy, A., et al. (2011), 'Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls', *Mod Pathol*, 24 (8), 1090-100.
- Lauby-Secretan, B., et al. (2018), 'The IARC Perspective on Colorectal Cancer Screening', *N Engl J Med*, 378 (18), 1734-40.
- Lee, G. H., et al. (2015), 'Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review', *Eur J Surg Oncol*, 41 (3), 300-8.
- Lee, J. K., et al. (2014), 'Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis', *Ann Intern Med*, 160 (3), 171.
- Leung, P. H. M., et al. (2019), 'Characterization of Mucosa-Associated Microbiota in Matched Cancer and Non-neoplastic Mucosa From Patients With Colorectal Cancer', *Front Microbiol*, 10, 1317.
- Li, T., et al. (2013), 'MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker', *World J Gastroenterol*, 19 (34), 5615-21.
- Litviakov, N. V., et al. (2016), 'Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy', *Oncotarget*, 7 (7), 7829-41.
- Liu, Y., et al. (2017), 'miR-19a promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting TIA1', *Mol Cancer*, 16 (1), 53.
- Llosa, N. J., et al. (2015), 'The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints', *Cancer Discov*, 5 (1), 43-51.
- Lopes-Ramos, C. M., et al. (2014), 'Overexpression of miR-21-5p as a predictive marker for complete tumor regression to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer patients', *BMC Med Genomics*, 7, 68.
- Lu, J., et al. (2005), 'MicroRNA expression profiles classify human cancers', *Nature*, 435 (7043), 834-8.
- Lu, P., et al. (2019), 'Anatomic Distribution of Colorectal Adenocarcinoma in Young Patients', *Dis Colon Rectum*, 62 (8), 920-24.
- Ma, H., et al. (2018), 'Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer', *Pathology*, 50 (1), 49-59.
- Maida, M., et al. (2017), 'Screening of colorectal cancer: present and future', *Expert Rev Anticancer Ther*, 17 (12), 1131-46.
- Malik, P. (2016), 'A novel multitarget stool DNA test for colorectal cancer screening', *Postgrad Med*, 128 (2), 268-72.
- Mandel, J. S., et al. (1993), 'Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study', *N Engl J Med*, 328 (19), 1365-71.

- Markowitz, S. D. and Bertagnolli, M. M. (2009), 'Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer', *N Engl J Med*, 361 (25), 2449-60.
- Matsumura, T., et al. (2015), 'Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer', *Br J Cancer*, 113 (2), 275-81.
- Mazelin, Laetitia, et al. (2004), 'Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis', *Nature*, 431 (7004), 80-84.
- Medical Advisory, Secretariat (2009), 'Magnetic Resonance (MR) Colonography for Colorectal Cancer Screening: An Evidence-Based Analysis', *Ontario health technology assessment series*, 9 (8), 1-35.
- Meguid, R. A., et al. (2008), 'Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers?', *Ann Surg Oncol*, 15 (9), 2388-94.
- Mehlen, P. and Fearon, E. R. (2004), 'Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis', *J Clin Oncol*, 22 (16), 3420-8.
- Mendell, J. T. and Olson, E. N. (2012), 'MicroRNAs in stress signaling and human disease', *Cell*, 148 (6), 1172-87.
- Midthun, L., et al. (2019), 'Concomitant KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer', *J Gastrointest Oncol*, 10 (3), 577-81.
- Mima, K., et al. (2016), 'MicroRNA MIR21 (miR-21) and PTGS2 Expression in Colorectal Cancer and Patient Survival', *Clinical Cancer Research*, 22 (15), 3841-48.
- Misawa, M., et al. (2018), 'Artificial Intelligence-Assisted Polyp Detection for Colonoscopy: Initial Experience', *Gastroenterology*, 154 (8), 2027-29 e3.
- Moertel, C. G., et al. (1995), 'Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report', *Ann Intern Med*, 122 (5), 321-6.
- Mogilyansky, E. and Rigoutsos, I. (2013), 'The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease', *Cell Death and Differentiation*, 20 (12), 1603-14.
- Motoyama, Kazuo, et al. (2009), 'Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer', *International Journal of Oncology*, 34 (4), 1069-75.
- Mounzer, R., et al. (2015), 'Endoscopic and surgical treatment of malignant colorectal polyps: a population-based comparative study', *Gastrointest Endosc*, 81 (3), 733-40.e2.
- Murphy, N., et al. (2019), 'Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility', *Mol Aspects Med*, 69, 2-9.
- Nakama, H., Zhang, B., and Zhang, X. (2001), 'Evaluation of the optimum cut-off point in immunochemical occult blood testing in screening for colorectal cancer', *Eur J Cancer*, 37 (3), 398-401.
- Navarro, M., et al. (2017), 'Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update', *World J Gastroenterol*, 23 (20), 3632-42.
- Nawa, T., et al. (2008), 'Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology', *J Gastroenterol Hepatol*, 23 (3), 418-23.
- Ngo, Ondřej, et al. (2019), 'Current results of colorectal cancer screening and potential value of colon capsule endoscopy in the Czech Republic', *Gastroenterologie a hepatologie*, 73 (5), 387-91.
- Nguyen, L. H., Goel, A., and Chung, D. C. (2020), 'Pathways of Colorectal Carcinogenesis', *Gastroenterology*, 158 (2), 291-302.
- Nian, J., et al. (2017), 'Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Clin Transl Gastroenterol*, 8 (1), e216.
- Nica, A. C., et al. (2010), 'Candidate causal regulatory effects by integration of expression QTLs with complex trait genetic associations', *PLoS Genet*, 6 (4), e1000895.
- Noffsinger, A. E. (2009), 'Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy', *Annu Rev Pathol*, 4, 343-64.
- Ogata-Kawata, H., et al. (2014), 'Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer', *PLoS One*, 9 (4), e92921.

- Ohhara, Y., et al. (2016), 'Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer', *World J Gastrointest Oncol*, 8 (9), 642-55.
- Palles, C., et al. (2013), 'Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas', *Nat Genet*, 45 (2), 136-44.
- Pande, R., et al. (2013), 'Survival outcome of patients with screening versus symptomatically detected colorectal cancers', *Colorectal Dis*, 15 (1), 74-9.
- Papadopoulos, N. and Lindblom, A. (1997), 'Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes', *Hum Mutat*, 10 (2), 89-99.
- Pardini, B., et al. (2012), 'Gene expression variations: potentialities of master regulator polymorphisms in colorectal cancer risk', *Mutagenesis*, 27 (2), 161-7.
- Pardoll, D. M. (2012), 'The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy', *Nat Rev Cancer*, 12 (4), 252-64.
- Park, Y., et al. (2005), 'Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies', *Jama*, 294 (22), 2849-57.
- Passardi, A., et al. (2017), 'Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment', *Int J Mol Sci*, 18 (6).
- Pelossof, Raphael, et al. (2016), 'Integrated genomic profiling identifies microRNA-92a regulation of IQGAP2 in locally advanced rectal cancer', *Genes Chromosomes & Cancer*, 55 (4), 311-21.
- Peters, U., Bien, S., and Zubair, N. (2015), 'Genetic architecture of colorectal cancer', *Gut*, 64 (10), 1623-36.
- Petrelli, F., et al. (2017), 'Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis', *JAMA Oncol*, 3 (2), 211-19.
- Pezzi, A., et al. (2009), 'Relative role of APC and MUTYH mutations in the pathogenesis of familial adenomatous polyposis', *Scand J Gastroenterol*, 44 (9), 1092-100.
- Phipps, A. I., Chan, A. T., and Ogino, S. (2013), 'Anatomic subsite of primary colorectal cancer and subsequent risk and distribution of second cancers', *Cancer*, 119 (17), 3140-7.
- Podolsky, et al. (2015), *Yamada's Textbook of Gastroenterology* (John Wiley & Sons).
- Poschl, G. and Seitz, H. K. (2004), 'Alcohol and cancer', *Alcohol Alcohol*, 39 (3), 155-65.
- Pox, C. P., et al. (2012), 'Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer', *Gastroenterology*, 142 (7), 1460-7 e2.
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., and Nguyen, H. T. (2013), 'Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer', *World J Gastroenterol*, 19 (20), 2985-96.
- Reeves, E. and James, E. (2017), 'Antigen processing and immune regulation in the response to tumours', *Immunology*, 150 (1), 16-24.
- Rex, D. K., et al. (2017), 'Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer', *Am J Gastroenterol*.
- Rieth, J. and Subramanian, S. (2018), 'Mechanisms of Intrinsic Tumor Resistance to Immunotherapy', *Int J Mol Sci*, 19 (5).
- Roos, V. H., et al. (2019), 'Effects of Family History on Relative and Absolute Risks for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Clin Gastroenterol Hepatol*, 17 (13), 2657-67.e9.
- Rosty, C., et al. (2013), 'Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features', *Mod Pathol*, 26 (6), 825-34.
- Royds, J. A. and Iacopetta, B. (2006), 'p53 and disease: when the guardian angel fails', *Cell Death Differ*, 13 (6), 1017-26.
- Rozen, P. (1999), 'The OMED Colorectal Cancer Screening Committee: a report of its aims and activities. Organisation Mondiale d'Endoscopie Digestive', *Gastrointestinal endoscopy*, 50 (3), 449-53; discussion 53-4.
- Rustgi, A. K. (2007), 'The genetics of hereditary colon cancer', *Genes Dev*, 21 (20), 2525-38.
- Sahin, I. H., et al. (2013), 'Rare Though Not Mutually Exclusive: A Report of Three Cases of Concomitant KRAS and BRAF Mutation and a Review of the Literature', *J Cancer*, 4 (4), 320-2.
- Samuels, Y. and Waldman, T. (2010), 'Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers', *Curr Top Microbiol Immunol*, 347, 21-41.

- Sandouk, F., Al Jerf, F., and Al-Halabi, M. H. (2013), 'Precancerous lesions in colorectal cancer', *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 457901.
- Sartore-Bianchi, A., et al. (2009), 'PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies', *Cancer Res*, 69 (5), 1851-7.
- Seeber, A. and Gastl, G. (2016), 'Targeted Therapy of Colorectal Cancer', *Oncol Res Treat*, 39 (12), 796-802.
- Segnan, N., et al. (2011), 'Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial--SCORE', *J Natl Cancer Inst*, 103 (17), 1310-22.
- Senore, C., et al. (2019), 'Performance of colorectal cancer screening in the European Union Member States: data from the second European screening report', *Gut*, 68 (7), 1232-44.
- Schetter, A. J., Okayama, H., and Harris, C. C. (2012), 'The role of microRNAs in colorectal cancer', *Cancer J*, 18 (3), 244-52.
- Schetter, A. J., et al. (2008), 'MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma', *Jama*, 299 (4), 425-36.
- Schreuders, Eline H., et al. (2015), 'Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes', *Gut*, 64 (10), 1637-49.
- Singal, D. P., et al. (1996), 'Markedly decreased expression of TAP1 and LMP2 genes in HLA class I-deficient human tumor cell lines', *Immunol Lett*, 50 (3), 149-54.
- Slaby, O., et al. (2009), 'MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application', *Mol Cancer*, 8, 102.
- Slattery, M. L., et al. (2016), 'MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas, and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression', *Carcinogenesis*.
- Slyskova, J., et al. (2012), 'Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls', *Mutagenesis*, 27 (4), 519-22.
- Smith, Gillian, et al. (2002), 'Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (14), 9433-38.
- Sobrero, A., et al. (2000), 'Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy', *Semin Oncol*, 27 (5 Suppl 10), 72-7.
- Song, L., et al. (2017), 'The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: A meta-analysis', *Sci Rep*, 7 (1), 3032.
- Soussi, T., et al. (2005), 'Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations', *Hum Mutat*, 25 (1), 6-17.
- Stigliano, V., et al. (2008), 'Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients', *J Exp Clin Cancer Res*, 27, 39.
- Strimpakos, A. S., Syrigos, K. N., and Saif, M. W. (2009), 'Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer', *Pharmacogenomics J*, 9 (3), 147-60.
- Strubberg, A. M. and Madison, B. B. (2017a), 'MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications', *Dis Model Mech*, 10 (3), 197-214.
- Strubberg, Ashlee M. and Madison, Blair B. (2017b), 'MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications', *Disease Models & Mechanisms*, 10 (3), 197-214.
- Suchánek, et al. (2013), 'Screening kolorektálního karcinomu', *Onkologie*.
- Svoboda, M., et al. (2008), 'Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer', *Int J Oncol*, 33 (3), 541-7.
- Svoboda, M., et al. (2012), 'MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients', *Radiat Oncol*, 7, 195.
- Svoboda, M., et al. (2014), 'HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients', *Carcinogenesis*, 35 (7), 1510-5.
- Tan, Y., Sangfelt, O., and Spruck, C. (2008), 'The Fbxw7/hCdc4 tumor suppressor in human cancer', *Cancer Lett*, 271 (1), 1-12.

- Tejpar, S., et al. (2017), 'Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials', *JAMA Oncol*, 3 (2), 194-201.
- Ten Dijke, P., et al. (2002), 'Regulation of cell proliferation by Smad proteins', *J Cell Physiol*, 191 (1), 1-16.
- Trautmann, K., et al. (2006), 'Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer', *Clin Cancer Res*, 12 (21), 6379-85.
- Tsoi, K. K., et al. (2009), 'Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies', *Clin Gastroenterol Hepatol*, 7 (6), 682-88.e1-5.
- Uno, Y. and Munakata, A. (1995), 'Endoscopic and histologic correlates of colorectal polyp bleeding', *Gastrointest Endosc*, 41 (5), 460-7.
- Vaja, Rakesh, McNicol, Larry, and Sisley, Imogen (2010), 'Anaesthesia for patients with liver disease', *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 10 (1), 15-19.
- Valle, L., et al. (2019), 'Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis', *Mol Aspects Med*, 69, 10-26.
- van de Velde, C. J., et al. (2014a), 'Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012: science, opinions and experiences from the experts of surgery', *Eur J Surg Oncol*, 40 (4), 454-68.
- van de Velde, C. J., et al. (2014b), 'EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum', *Eur J Cancer*, 50 (1), 1.e1-1.e34.
- Varesco, L. (2004), 'Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology', *Tech Coloproctol*, 8 Suppl 2, s305-8.
- Vasile, L., et al. (2012), 'Prognosis of colorectal cancer: clinical, pathological and therapeutic correlation', *Rom J Morphol Embryol*, 53 (2), 383-91.
- Veldkamp, R., et al. (2005), 'Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial', *Lancet Oncol*, 6 (7), 477-84.
- Verwaal, V. J., et al. (2008), '8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer', *Ann Surg Oncol*, 15 (9), 2426-32.
- Vodenkova, S., et al. (2018), 'Base excision repair capacity as a determinant of prognosis and therapy response in colon cancer patients', *DNA Repair (Amst)*, 72, 77-85.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000), 'Surfing the p53 network', *Nature*, 408 (6810), 307-10.
- Vogelstein, B., et al. (2013), 'Cancer genome landscapes', *Science*, 339 (6127), 1546-58.
- Volinia, S., et al. (2006), 'A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (7), 2257-61.
- Vuik, F. E., et al. (2019), 'Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years', *Gut*, 68 (10), 1820-26.
- Vymetalkova, V., et al. (2014), 'Variations in mismatch repair genes and colorectal cancer risk and clinical outcome', *Mutagenesis*, 29 (4), 259-65.
- Vymetalkova, V., et al. (2020), 'Expression quantitative trait loci in ABC transporters are associated with survival in 5-FU treated colorectal cancer patients', *Mutagenesis*.
- Walther, A., et al. (2009), 'Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer', *Nat Rev Cancer*, 9 (7), 489-99.
- Wang, Z., et al. (2012), 'Tumor suppressor functions of FBW7 in cancer development and progression', *FEBS Lett*, 586 (10), 1409-18.
- Watson, N. F., et al. (2006), 'Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis', *Int J Cancer*, 118 (1), 6-10.
- Wieszczyn, P., et al. (2020), 'Colorectal Cancer Incidence and Mortality After Removal of Adenomas During Screening Colonoscopies', *Gastroenterology*, 158 (4), 875-83.e5.
- Williams, D. S., et al. (2020), 'Overexpression of TP53 protein is associated with the lack of adjuvant chemotherapy benefit in patients with stage III colorectal cancer', *Mod Pathol*, 33 (3), 483-95.

- Williams, M., et al. (2017), 'Exploring Mechanisms of MicroRNA Downregulation in Cancer', *Microna*, 6 (1), 2-16.
- Wilson, James Maxwell Glover, Jungner, Gunnar, and World Health, Organization (1968), 'Principles and practice of screening for disease / J. M. G. Wilson, G. Jungner', (Public health papers ; no. 34; Geneva: World Health Organization).
- Wilson, Matthew R., et al. (2019), 'The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA', *Science*, 363 (6428), eaar7785.
- Winawer, S. J., et al. (1993), 'Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup', *N Engl J Med*, 329 (27), 1977-81.
- Wolf, Andrew M.D., et al. (2018), 'Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (4), 250-81.
- Wolpin, B. M. and Mayer, R. J. (2008), 'Systemic treatment of colorectal cancer', *Gastroenterology*, 134 (5), 1296-310.
- Wong, S. H. and Yu, J. (2019), 'Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16 (11), 690-704.
- Woods, K., Thomson, J. M., and Hammond, S. M. (2007), 'Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors', *J Biol Chem*, 282 (4), 2130-4.
- Wouters, M. D., et al. (2011), 'MicroRNAs, the DNA damage response and cancer', *Mutat Res*, 717 (1-2), 54-66.
- Wray, C. M., et al. (2009), 'Tumor subsite location within the colon is prognostic for survival after colon cancer diagnosis', *Dis Colon Rectum*, 52 (8), 1359-66.
- Xi, Y., et al. (2019), 'Analysis of prognosis, genome, microbiome, and microbial metabolome in different sites of colorectal cancer', *J Transl Med*, 17 (1), 353.
- Xu, M. D., Qi, P., and Du, X. (2014), 'Long non-coding RNAs in colorectal cancer: implications for pathogenesis and clinical application', *Modern Pathology*, 27 (10), 1310-20.
- Yang, C., et al. (2016), 'Passive Smoking and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Observational Studies', *Asia Pac J Public Health*, 28 (5), 394-403.
- Yin, Y. and Shen, W. H. (2008), 'PTEN: a new guardian of the genome', *Oncogene*, 27 (41), 5443-53.
- Young, G. P., Rabeneck, L., and Winawer, S. J. (2019), 'The Global Paradigm Shift in Screening for Colorectal Cancer', *Gastroenterology*, 156 (4), 843-51 e2.
- Yu, Jing, et al. (2016), 'Circulating serum microRNA-345 correlates with unfavorable pathological response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer', *Oncotarget*, 7 (39), 64233-43.
- Zavoral, et al. (2009), 'Populační screening kolorektálního karcinomu v České republice', *Rozhledy v chirurgii : měsíčník Československé chirurgické společnosti pro tvorbu domácí a rozhledy po chirurgii zahraniční*, 88 (6), 292-94.
- Zavoral, M. (2005), 'Screening sporadického kolorektálního karcinomu', *Interní medicína pro praxi*, (12/2005).
- Zhang, B., et al. (2010), 'Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer', *Gastroenterology*, 138 (3), 969-80.e1-3.
- Zhang, H., et al. (2019), 'Altered intestinal microbiota associated with colorectal cancer', *Front Med*.
- Zhu, Q. C., et al. (2013), 'The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer', *Tumor Biology*, 34 (3), 1285-300.
- Zorzi, M., et al. (2015), 'Screening for colorectal cancer in Italy: 2011-2012 survey', *Epidemiol Prev*, 39 (3 Suppl 1), 108-14.

10. Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1. Incidence, mortalita a prevalence KRK ve světě

Obr. 2. Nárůst počtu členů Komise pro screening KRK v průběhu let, WEO

Obr. 3. Screeningový program v České republice

Obr. 4. Adenom-karcinom sekvence

Obr. 5. APC signální dráha

Obr. 6. KRAS signální dráha

Obr. 7. Vznik microRNA

Obr. 8. Přehled projektu

Obr. 9. Signifikantně deregulované microRNA v tumoru (T) a zdravé tkáni (N)

Obr. 10. MicroRNA spojené s progresí nádoru a odpovědí na léčbu

Obr. 11. Expresní profil clusteru miR-17/92 u pacientů s rektálním karcinomem v porovnání se zdravou kontrolou

Obr. 12. Expresní profil microRNA z clusteru miR-17/92 a jejich vliv na migraci a proliferaci buněk rektálního karcinomu

Obr. 13. Přehled projektu

Obr. 14. Kaplan – Meierova křivka přežívání u KRK pacientů s rs3819720 v genu *ABCD3/TAP2*

Obr. 15. Kaplan – Meierova křivka přežívání u KRK pacientů léčených 5-FU s rs3819720 v genu *ABCD3/TAP2*

Tabulka 1. Stadia KRK a TNM klasifikace dle AJCC

Tabulka 2. Souhrn rozdílů mezi pravostrannou a levostrannou formou KRK

Tabulka 3. Základní charakteristika pacientů ve skupině screening a kontrola

Tabulka 4. Diagnostické metody ve skupině screening a kontrola

Tabulka 5. Stadia, metastázy, grading KRK

Tabulka 6. Lokalizace KRK

Tabulka 7. Chirurgická léčba

Tabulka 8. Chemoterapie

Tabulka 9. Validované TaqMan microRNA assaye

Tabulka 10. Seznam 71 microRNA deregulovaných v Discovery setu (20 páru vzorků; tumor a zdravá tkáň). Screening na 2 555 doposud známých microRNA za využití 3D-Gene Toray microarray

Tabulka 11. ABC geny analyzované pro eQTL SNP dle SCAN databáze

Tabulka 12. Charakteristika souboru

Tabulka 13. Data ovlivňující OS a PFS u pac. S KRK s dokončeným follow-up