

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Mgr. Aneta Landecká

Potenciál cirkulujících mikroRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem ve vztahu k predikci
odpovědi na léčbu

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Veronika Vymetálková, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze 23.4.2023

.....

Aneta Landecká

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především vedoucí práce Ing. Veronice Vymetákové, Ph.D. a konzultance Mgr. Kláře Červené za jejich věcné rady a připomínky, jak při psaní práce, tak při samotném zpracování materiálu v laboratoři. Dále také celému kolektivu Oddělení biologie nádorů ÚEM AV ČR za poskytnutí prostorů a materiálu a také za vstřícné přijetí.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
2. Kolorektální karcinom.....	11
2.2. Problematika kolorektálního karcinomu v České republice a ve světě	12
2.3. Genetické faktory vedoucí ke vzniku kolorektálního karcinomu	15
2.3.1. Dráha chromozomální nestability (CIN)	15
2.3.2. CIMP (CpG metylátorový fenotyp)	16
2.3.3. Mikrosatelitová nestabilita (MSI)	17
2.3.4. Serátní cesta	18
2.4. Typy a charakteristika kolorektálního karcinomu	18
2.5. Screening a současná léčba kolorektálního karcinomu	20
2.5.1. Neinvazivní testy stolice	20
2.5.2. Invazivní vyšetření.....	21
2.5.3. Léčba kolorektálního karcinomu	21
2.6. Onkomarkery CA-19-9 a CEA	23
3. MikroRNA.....	26
3.1. Charakteristika mikroRNA	26
3.2. MikroRNA a rakovina	26
3.3. Funkce a biogeneze mikroRNA.....	27
3.4. Cirkulující miRNA.....	29
3.5. Sledované mikroRNA miR-122-5p a miR-142-5p	30
4. Cíle.....	31
5. Materiál a metody	32
5.1. Sběr biologického materiálu	32
5.2. Použité přístroje a reagentie	33
5.3. Izolace plazmy z krve	34
5.4. Izolace RNA.....	34
5.5. Vybrané mikroRNA a jejich sekvence	36

5.6.	Reverzní transkripce	36
5.7.	Preamplifikace	37
5.8.	Real-Time PCR.....	38
5.9.	Izolace RNA z tkáně	39
5.10.	Měření koncentrace RNA	40
5.11.	Měření RIN	41
5.12.	Cílové geny	42
5.13.	Izolace proteinů.....	43
5.14.	Elektroforéza a Western blot	44
5.15.	Statistické vyhodnocení	46
6.	Výsledky	47
6.1.	MikroRNA s významnými rozdíly mezi zdravými kontrolami a jednotlivými odběry pacientů v plasmě	47
6.2.	MikroRNA a jejich rozdíly v závislosti na pohlaví	49
6.3.	MikroRNA a jejich spojitost se stádiem KRK.....	50
6.4.	MikroRNA a jejich spojitost s recidivou onemocnění.....	52
6.5.	MikroRNA a jejich spojitost s přežitím pacientů.....	54
6.6.	Korelace onkomarkerů a BMI pacientů	57
6.7.	Korelace CEA a CA-19-9	58
6.8.	Korelace miR-122-5p a miR-142-5p v plasmě	59
6.9.	Korelace miR-122-5p a miR-142-5p ve tkáních.....	59
6.10.	Měření RIN	61
6.11.	Expresí cílených genů	62
6.12.	Western Blot	64
7.	Diskuze	66
8.	Závěr	70
9.	Použitá literatura.....	71
10.	Seznam obrázků.....	78
11.	Seznam tabulek.....	79
12.	Seznam grafů	80

Abstrakt

Kolorektální karcinom (KRK) patří mezi nejčastější nádorová onemocnění jak ve světě, tak i v České republice. Predispozice pro vznik KRK zahrnují faktory genetické i epigenetické změny, dále také faktory zevního prostředí a mikroprostředí. Tyto nádory často velmi dobře reagují na léčbu, především v raných stádiích, nicméně u části pacientů dochází k brzkému návratu onemocnění. Vzhledem k tomu, že incidence KRK v posledních letech stále neklesá, jedná se o aktuální problém vyžadující nový přístup, jehož cílem je zlepšení diagnostiky, přežívání i kvality života pacientů s KRK. Z tohoto důvodu se stále více do popředí zájmu dostává takzvaná tekutá biopsie, která představuje minimálně invazivní přístup k pacientovi a umožňuje sledovat změny v organismu v reálném čase.

Jedny z biomarkerů, které mohou být detekovány pomocí tekuté biopsie, jsou malé nekódující molekuly RNA - mikroRNA (miRNA). V této diplomové práci byla analyzována genová exprese dvou miRNA, konkrétně miR-122-5p a miR-142-5p v plazmě a tkáních pacientů s KRK a v plazmě kontrolní skupiny zdravých dárců krve. V rámci naší studie jsme identifikovali významné změny v expresních hladinách obou miRNA u pacientů s KRK v porovnání se zdravými jedinci bez nádorového onemocnění. Konkrétně byly pozorovány vyšší expresní hladiny obou miRNA u KRK pacientů oproti kontrolní skupině bez nádorového onemocnění. K dispozici byly opakované odběry krve pacientů s KRK, které byly odebrány v čase diagnózy, 6 až 9 měsíců od diagnózy a rok od diagnózy. Rok od diagnózy jsme pozorovali pokles exprese obou mikroRNA u pacientů, kteří poté v blízké době zemřeli.. Dále byla v tkáních nádorů sledována exprese cílových genů pro vazbu mikroRNA. Sledovali jsme geny *BLC1L2*, *KIF2C* a *RPF2*. Jako referenční byl zvolen gen *ACTB*. Signifikantní změny jsme pozorovali u cíleného genu *RPF2*, jehož nižší expresní hladina odpovídala vyšší expresi miRNA. Toto pozorování bylo potvrzeno i při stanovení proteinové hladiny cílových genů.

Dle našich výsledků, mikroRNA představují slibný biomarker pro diagnostiku, ale také pro stanovení prognozy pacientů s KRK.

Klíčová slova: cirkulující biomarker, mikroRNA, kolorektální karcinom, odpověď na léčbu

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers both in the world and in the Czech Republic. Predispositions for the development of CRC include genetic and epigenetic changes, as well as environmental and microenvironmental factors. These tumours often respond very well to treatment, especially in the early stages, but some patients experience early recurrence of the disease. As the incidence of CRC has not declined in recent years, this is a current problem requiring a new approach aimed at improving diagnosis, survival and quality of life of patients with CRC. For this reason, liquid biopsy, which is a minimally invasive approach to the patient and allows real-time monitoring of changes in the body, is increasingly gaining prominence.

One of the biomarkers that can be detected by liquid biopsy are small non-coding RNA molecules - microRNAs (miRNAs). In this thesis, the gene expression of two miRNAs, namely miR-122-5p and miR-142-5p, was analyzed in plasma and tissues of CRC patients and in plasma of a control group of healthy blood donors. In our study, we identified significant changes in the expression levels of both miRNAs in CRC patients compared to healthy cancer-free subjects. Specifically, higher expression levels of both miRNAs were observed in CRC patients compared to the cancer-free control group. Repeat blood samples from CRC patients were available and were collected at the time of diagnosis, 6 to 9 months after diagnosis, and 1 year after diagnosis. One year after diagnosis, we observed a decrease in expression of both microRNAs in patients who then died in the near term. Furthermore, the expression of target genes for microRNA binding was monitored in tumor tissues. We monitored the genes BLC1L2, KIF2C and RPF2. ACTB gene was chosen as a reference gene. Significant changes were observed in the target gene RPF2, whose lower expression level corresponded to higher miRNA expression. This observation was also confirmed when the protein levels of the target genes were determined.

According to our results, microRNAs represent a promising biomarker for diagnosis, but also for determining the prognosis of CRC patients.

Keywords: Circulating biomarker, MicroRNA, colorectal cancer, therapy response

Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
ACTB	Gen kódující β -aktin
ALDOA	Aldoláza A
APC	Adenomatous polyposis coli
BCL2L1	Bcl-2-like protein 1
BCLx	Alternativní sestřih genu BCL2L1
BFB	Break fusion bridge
BMI	Body mass index
BSA	Bovin serum albumin
CA 9-19	Carbohydrate antigen 19-9
CARM1	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
CEA	Carcinoembryonic antigen, karcioembryonální antigen
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CpG	CG bohaté oblasti DNA
CRC	Colorectal carcinom, kolorektální karcinom
CTC	Cirkulující nádorové buňky
ctDNA	Cirkulující nádorová DNA
DCC	Netrinový receptor DCC
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA metyltransferáza
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
FIT	Fekální imunochemický test
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
gTOKS	Guajakový test na okultní krvácení ve stolici
GTP	Guanosintrifosfát
HNPPC	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
CHRPE	Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium
KIF2C	Kinesis family member 2C
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
KRK	Kolorektální karcinom

LOH	Lost of heterozygosity
MCAK	Mitotic centromere-associated kinesin
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
miRNA	MikroRNA
MSI	Microsatellite instability
MSS	Mikrosatelitně stabilní polypy
MUTYH	Gen kódující DNA MUTYH glykosylázu
PBS	Fosfátový pufr
PCA	Principal component analysis
PTEN	Gen kódující homolog fosfatázy a tenzinu
RIN	RNA integrity number
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleová kyselina
rpm	revolution per minute (otáčky za minutu)
RT-PCR	Real-Time PCR
SD	Směrodatná odchylka
SDHB	Sukcinát dehydrogenáza
SMAD4	Člen rodiny SMAD 4, patří k proteinům transkripčních faktorů
SSA	Přisedlé serátní adenomy
STR	Short tandem repeats
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
TNM	Systém pro hodnocení stádia nádorového onemocnění
TP53	Gen kódující protein p53
TSA	Tradiční serátní adenomy
ÚEM	Ústav experimentální medicíny
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor
WB	Western Blot
XPO5	Exportin 5

1. Úvod

Kolorektální karcinom (KRK) je nádorové onemocnění, které patří mezi nejčastější typ rakoviny ve světě i v ČR a podle současných statistických údajů patří ČR mezi státy s nejvyšší incidencí KRK i přesto, že prevence a osvěta proti onemocnění stoupá. Navzdory tomu, značná část pacientů s KRK je diagnostikována až v pokročilém stádiu onemocnění, a proto se stále více klade důraz nejen na provádění preventivního screeningu, ale také na nové metody a přístupy v diagnostice KRK či sledování terapeutické odpovědi pacientů na podávanou léčbu.

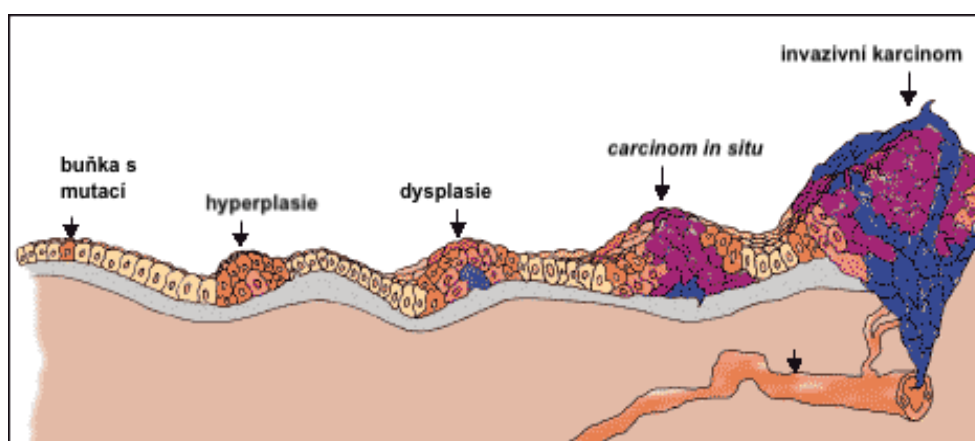
Screeningové programy cílí především na osoby ve věku nad 50 let. Jedním ze screeningových testů je test na okultní krvácení ve stolici (TOKS), po kterém v případě pozitivního výsledku, následuje provedení kolonoskopie. Hlavní nevýhodou kolonoskopie je její invazivita, diskomfort pro pacienta a možná rizika jako je protržení stěny střeva. Proto se dostává stále více do popředí tzv. tekutá biopsie - hledání nových biomarkerů, které by mohly detekovat KRK časněji s minimální invazivitou. Pomocí tekuté biopsie lze sledovat heterogenitu onemocnění a jeho případné změny v aktuálním čase bez vystavení pacienta invazivním zákrokům. Zefektivněním screeningu lze snížit výskyt KRK a s tím související úmrtnost.

Mezi slibné biomarkery patří i mikroRNA (miRNA). Jedná se o krátké (~ 22 nukleotidů) nekódující RNA, které mohou regulovat expresi genů na post-transkripční úrovni a uplatňují se skoro ve všech buněčných procesech. Bylo také dokázáno, že miRNA vykazují potenciál i v regulaci maligní transformace a jsou tak předmětem mnoha výzkumných studií. Jejich hlavní výhodou je, že je lze snadno detekovat v různých tělních tekutinách a vykazují potřebnou stabilitu. I proto jsou považovány za velmi slibné nádorové biomarkery.

Cílem diplomové práce bylo ověřit, zda cirkulující miRNA představují diagnostické, prognostické nebo prediktivní markery u pacientů s KRK a zda námi identifikované miRNA vykazují slibnější potenciál než běžně stanovované biomarkery CEA a CA-19-9. Obě miRNA – miR-122-5p a miR-142-5p byly zvoleny na základě předchozí studie (Cervena *et al.*, 2021).

2. Kolorektální karcinom

KRK je nádorové multifaktoriální onemocnění, podmíněné jak genetickými, tak i epigenetickými příčinami a v neposlední řadě i faktory zevního prostředí a mikroprostředí. Jedná se o onemocnění, u kterého se také předpokládá souvislost s nezdravým životním stylem, tedy i způsobem jakým se stravujeme. Hlavním rysem KRK je maligní transformace epitelové buňky tlustého střeva z adenomu v karcinom mnohastupňovým procesem (**Obrázek č. 1**). V genomu buňky dochází k postupné akumulaci genetických změn, jejichž výsledkem může být právě maligní transformace. Tyto genetické změny mohou být dědičné nebo sporadické v důsledku kancerogenních faktorů, kterým je buňka během svého života vystavena (Sawicki *et al.*, 2021).



Obrázek 1: Maligní transformace buňky (Karen Miller, 2005)

Kolorektální karcinomy jsou klasifikovány podle lokalizace v tlustém střevě na nádory tlustého střeva – diagnóza s označením C18, nádory rektosigmoidálního spojení – diagnóza s označením C19 a nádory rekta – diagnóza s označením C20 (Wittekind and Sobin, 2004). Nádory tlustého střeva zaujímají cca 63 % všech KRK. (Carethers, 2018), (Granados-Romero *et al.*, 2017a).

KRK dosahuje několika různých stádií v průběhu svého rozvoje. Na klasifikaci stádia KRK závisí další léčebný postup, ale i prognóza pacienta. Nejvyužívanější je systém TNM, který ustanovila organizace *American Joint Committee on Cancer* (www.facs.org). Písmeno *T* označuje tumor a říká nám, jak je tumor velký a do jaké hloubky vrstev tlustého střeva prorůstá. Písmeno *N* označuje nodus (lymfatická uzlina) a podává informaci o přítomnosti nádorových buněk v lymfatických uzlinách. Písmeno *M* označuje metastázy a jejich rozšíření (Granados-Romero *et al.*, 2017a). Přehled systému TNM je uveden v **Tabulce 1**.

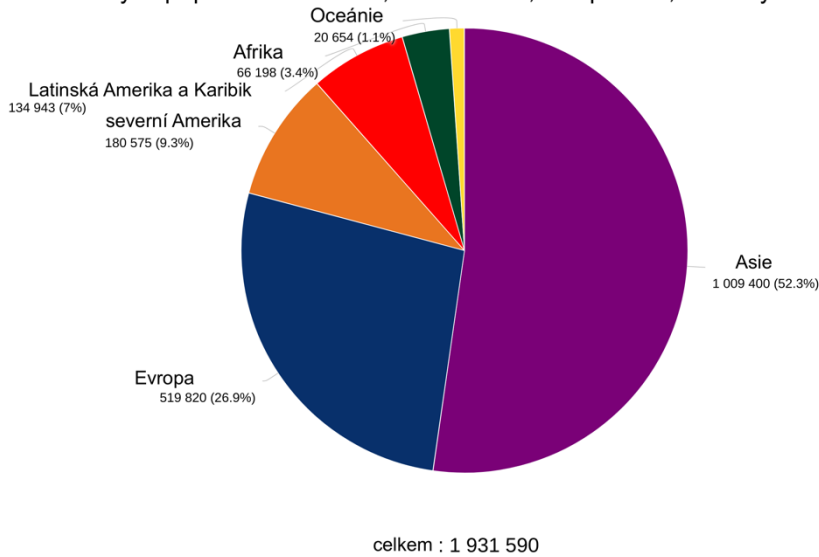
Tabulka 1: Přehled systému TNM (upraveno) (Kim, 2010)

T (tumor)		N (noduli)		M (metastázy)	
Tx	velikost nelze zjistit	Nx	nelze stanovit	Mx	nelze stanovit
T0	není	N0	regionální lymfatické uzliny nejsou postiženy	M0	bez vzdálených metastáz
T1	<1 až 5 cm	N1	postižena 1 až 3 uzliny	M1	metastázy přítomny
T2	>3 až 5 cm	N2	postiženy více jak 4 uzliny		
T3	>5 až 7 cm	N3	postiženy jakékoliv uzliny podél cévního kmene		
T4	prorůstá do okolních tkání, >7 cm				
Tis	carcinoma <i>in situ</i>				
Finální stádia					
St. 0	carcinoma <i>in situ</i> , bez metastáz				
St. I	malý invazivní karcinom, bez metastáz				
St. II	větší invazivní karcinom, může být velké postižení uzlin				
St. III	rozsáhlý invazivní karcinom, rozsáhlé postižení uzlin				
St. IV	vzdálené metastázy při jakémkoliv rozsahu primárního nádoru				

2.2. Problematika kolorektálního karcinomu v České republice a ve světě

V roce 2020 bylo celosvětově diagnostikováno více než 1,9 milionu nových případů KRK a 930 000 úmrtí. Incidence onemocnění byla nejvyšší v Austrálii, na Novém Zélandu a také v Evropě. Z těchto dat se předpokládá, že do roku 2040 vzroste počet nových případů KRK na 3,2 milionu ročně a 1,6 milionu úmrtí (Morgan *et al.*, 2023). KRK patří v České republice k nejčastějším nádorovým onemocněním jak u mužů, tak u žen. Incidence KRK v roce 2020 byla přes 8 000 nových případů maligních nádorů tlustého střeva nebo konečníku (Obrázek č. 2 a 3).

Počet nových případů v roce 2020, tlusté střevo, obě pohlaví, všechny věkové skupiny

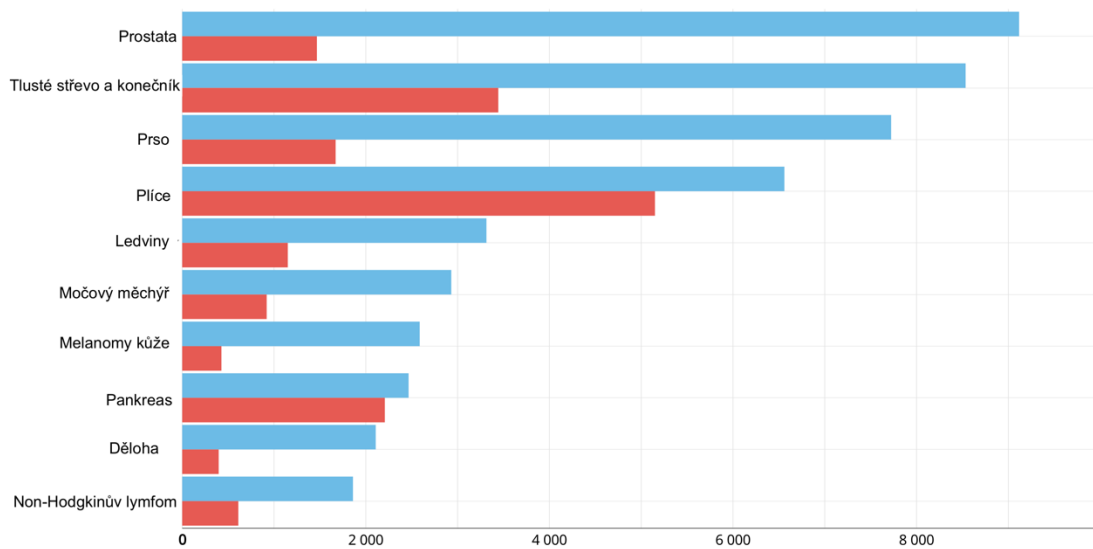


Data source: Globocan 2020
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Obrázek 2: Počet nových případů KRK celosvětově v roce 2020 (GLOBOCAN, 2020)

Incidence a mortalita ČR (2020), obě pohlaví, všechny věkové kategorie



Data source: Globocan 2020
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Obrázek 3: Incidence a mortalita nádorových onemocnění v ČR v roce 2020 (GLOBOCAN, 2020)

U pacientů v mladším věku je onemocnění často diagnostikováno v pokročilém stádiu, což významně zhoršuje prognózu i kvalitu života (Patel and Ahnen, 2018). Ferlay a kol. uvádí, že přibližně 9,7 % všech nově diagnostikovaných nádorů se nachází v tlustém střevě (Ferlay *et al.*, 2010). Jak už bylo zmíněno KRK je heterogenní onemocnění, dosud byly identifikovány čtyři hlavní molekulární dráhy, které vedou k maligní transformaci a vzniku

KRK. Jedná se o chromozomální nestabilitu (CIN), hypermetylaci CpG ostrůvků (CIMP), mikrosatelitovou nestabilitu (MSI) a serátní cestu (Harrison and Benziger, 2011). Molekulárně-genetické odlišnosti jednotlivých drah vzniku KRK budou dále popsány v kapitole 2.3.

Mezi širokou škálu klinických příznaků KRK patří bolest břicha, změny ve vyprazdňování, úbytek hmotnosti, nevolnosti a zvracení nebo abdominální distenze. U karcinomů, které jsou lokalizovány ve střevě distálně je typické krvácení z konečníku oproti proximálním karcinomům, u kterých dochází spíše k okultnímu krvácení. Toto krvácení může také způsobit anémii jako sekundární příznak. Metastázování KRK nacházíme většinou v játrech kvůli blízké lokalizaci a oběhu krve a také v plicích (Granados-Romero *et al.*, 2017b).

U pacientů s KRK je pětileté přežívání 65 % (jedná se o pacienty přežívající déle než 5 let od diagnózy KRK bez ohledu na věk a stádium onemocnění), desetileté přežívání je 58 %. Doba přežití také souvisí se stádiem KRK v době diagnózy (Granados-Romero *et al.*, 2017a). Obecně je doba přežívání kratší se zvyšujícím se stádiem. Pětileté přežívání až 90 % nalezneme u lokalizovaného tumoru bez postižení lymfatických uzlin, při postižení lymfatických uzlin přežívání klesá na 68 % a ve stádiu *IV* s rozvinutými vzdálenými metastázami klesá až na 10 % (Granados-Romero *et al.*, 2017a). Metastázy se vyvinou přibližně u 50-60 % diagnostikovaných pacientů (Granados-Romero *et al.*, 2017a). Ovšem doba přežití pacienta je také závislá na přítomnosti konkrétního typu mutace, kdy při některých mutacích genů může být přežívání ve vyšším stádiu onemocnění lepší než v nižším stupni (Granados-Romero *et al.*, 2017a). Například pacienti s mutacemi v genu *KRAS* mají horší dobu přežití než pacienti s divokým typem *KRAS*. S horší prognózou byla také spojena mutace v genu *BRAF* (Mouradov *et al.*, 2013; Zeineddine *et al.*, 2023).

Riziko vzniku KRK je také zvýšeno u pacientů trpících chronickými zánětlivými onemocněními střev, avšak ještě není zcela popsáno, jakým mechanismem zánět zprostředkovává karcinogenezi. Zánět může zvyšovat mutagenezi generováním oxidačního stresu a tvorbou volných radikálů (Boland and Goel, 2010a). Další rizikové faktory jsou častý a vyšší příjem alkoholu, obezita, kouření a častá konzumace zpracovaného a červeného masa, zejména pak sedavý způsob života s nedostatkem pohybu. Tyto rizikové faktory jsme ale schopni ovlivnit a přizpůsobit tak životní styl a dietní omezení a tím do určité míry riziko vzniku KRK snížit. Dále snižuje riziko fyzická aktivita, dostatečný příjem zeleniny a ovoce

ve stravě, postmenopauzální hormonální terapie a nesteroidní protizánětlivé léky (Johnson et al., 2013).

2.3. Genetické faktory vedoucí ke vzniku kolorektálního karcinomu

Genetické změny mohou být různé povahy, často se jedná o bodové mutace, které se objevují v průběhu života a postihují jednotlivé buňky. V těchto případech hovoříme o sporadických karcinomech. Vyznačují se heterogenní patogenezí, jelikož bodové mutace ovlivňují různé geny. U KRK ale lze pozorovat specifickou posloupnost mutací, kterou následuje morfologická změna začínající tvorbou adenomu (Mármol *et al.*, 2017a).

Genetické změny se týkají především onkogenů, tumor-supresorových genů a genů zahrnutých do opravy DNA poškození. V buňce dochází vlivem mutací těchto genů k narušení regulace proliferace, diferenciace a následné selekční růstové výhodě. U sporadických typů karcinomu stoupá frekvence mutací s věkem. Sporadických KRK je cca 90-95 %, zbývajících 5-10 % KRK se projevují jako dědičné syndromy. Typickým rysem pro dědičné syndromy je časný nástup onemocnění a určitý typ nádoru (tato problematika je podrobněji popsána v kapitole 2.2.) (Sawicki *et al.*, 2021).

Díky genetickým a histologickým vyšetřením bylo zjištěno, že KRK často vznikají jako postupně se vyvíjející dysplázie normální sliznice střeva. Na počátku 90. let minulého století byla navržena hypotéza, že existují genetické dráhy, která vede ke zvratu adenomu v karcinom (Fearon and Vogelstein, 1990). Doposud byly identifikovány čtyři hlavní dráhy vedoucí k maligní transformaci KRK. Jedná se o cestu chromozomální nestability (CIN), dráhu označovanou jako CIMP (CpG metylátorový fenotyp), dráhu mikrosatelitové nestability (MSI) a serátní cestu (Harrison and Benziger, 2011; Nguyen, Goel and Chung, 2020; Vodicka et al., 2020).

2.3.1. Dráha chromozomální nestability (CIN)

Velké množství KRK vzniká cestou chromozomální nestability, pro kterou je charakteristická ztráta nebo zisk již v počtu chromozomů nebo jejich částí. S abnormalitami v karyotypu u nádorů spjatými s cestou CIN je spojena akumulace charakteristických mutací ve specifických tumor-supresorových genech (např. *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4* či *DCC*) a onkogenech (např. *KRAS*, *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4* či *DCC*). CIN se objevuje u 65–70 % sporadických KRK. Fenotyp CIN může vzniknout důsledkem defektů v drahách, které

zajišťují přesnou segregaci chromozomů. Další možností vzniku CIN může být výskyt abnormálního počtu centromer a jejich funkce, nebo také dysfunkce telomer (Pino and Chung, 2010a), koncových částí eukaryotických chromozomů (Tomasova *et al.*, 2020). Charakteristická ztráta heterozygoty (LOH) způsobuje ztrátu průměrně 25–30 % alel v nádorech, ale mohou se objevit i ztráty kolem 75 % alel. U KRK dochází nejčastěji ke ztrátě na chromozomu 1, 5, 8, 17 a 18, kde u chromozomu 18 se většinou jedná o ztrátu části chromozomu, která je nejspíše způsobena mitotickou nondisjunkcí (Mármol *et al.*, 2017b).

U dráhy CIN nejčastěji dochází k aktivaci Wnt signalizace pomocí narušení genu *APC* na chromozomu 5q21.51. Zárodečné mutace v genu *APC* jsou zodpovědné za familiární adenomatózní polypózu (FAP), na druhou stranu, somatické mutace jsou pozorovány u 5 % dysplastických aberantních krypt, 30–70 % adenomů a až u 72 % sporadických nádorů. Dalším genem je pak protoonkogen *KRAS*, který se nachází na chromozomu 12 a uplatňuje se v transdukci intracelulárních signálů. Mutace v genu *KRAS* byly nalezeny u 30-50 % případů KRK (Hong, 2018). Dalším významným genem, který se podílí na vzniku KRK je gen *TP53*, který se nachází na krátkém raménku 17. chromozomu. Jedná se o nádorový tumor-supresor a představuje hlavní koordinátor buněčných odpovědí na stres, včetně poškození DNA, oxidačního stresu a dalších. Mutace v genu *TP53* vedou hlavně k syntéze neaktivního proteinu s dlouhým poločasem životnosti (Pino and Chung, 2010b).

2.3.2. CIMP (CpG metylátorový fenotyp)

Jedná se o druhou nejčastější cestu vedoucí k maligní transformaci tkáně střeva a vyskytuje se asi u 15 % sporadických KRK. Charakteristickým znakem je umlčení tumor-supresorových genů pomocí hypermetylace příslušných promotorů a současné globální hypometylace DNA. Promotory, které obsahují CpG ostrůvky, akumulované CpG dinukleotidy, jsou náchylné k hypermetylaci (Harrison and Benziger, 2011), (Illingworth and Bird, 2009). Nejčastěji dochází k umlčení pomocí metylace v genech *MLH1*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT31* a *p16* (Rhee, Kim and Kang, 2017). Methylace DNA je uskutečňována přes enzymy – DNA metyltransferázy (DNMT), kdy tyto enzymy přidají metylovou skupinu do 5' polohy cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu (Nazemalhosseini Mojarad *et al.*, 2013).

Předchozí studie odhalily, že u KRK se objevují 2 typy metylací, které jsou spojeny s progresí rakoviny. Methylace typu A je související s věkem, methylace typu C, která je pro rakovinu specifická. Nejprve vzniká methylace typu A jako důsledek normálního stárnutí

epiteliálních buněk ve střevě. Tento typ metylace může také vést ke vzniku nádoru ve střevě. Metylaci typu C byla nalezena výhradně u pacientů vykazujících fenotyp CIMP. K aberantní metylaci genů dochází převážně v časných stádiích vzniku KRK a méně se pak podílí na progresi (Nazemalhosseini Mojarad *et al.*, 2013). Předchozí studie uvádí, že pacienti s vysokým CIMP u nádoru vykazují kratší dobu přežití než pacienti s negativním CIMP, ale v dalších studiích nebylo toto srovnání statisticky významné (Ward *et al.*, 2003), (Advani *et al.*, 2021).

2.3.3. Mikrosatelitová nestabilita (MSI)

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice (STR) o délce 1-6 párů bází. Tvoří asi 3 % celého lidského genomu a díky své opakované struktuře jsou náchylné k vysoké mutační frekvenci (v těchto sekvencích DNA polymeráza nejčastěji chybí). Nestabilita genomu je v tomto případě způsobena chybami (vznik delších nebo kratších sekvencí), které se vyskytují v těchto opakujících se sekvencích nukleotidů v celém genomu. Nejběžněji se vyskytující a asociované s onemocněním jsou trinukleotidové repetice CAG, CTG, CGG a GAA. U zdravých jedinců jsou tato opakování stabilní (Harrison and Benziger, 2011). Jako nestabilitu označujeme přítomnost opakujících se sekvencí DNA o alternativní velikosti, které ale nejsou přítomné v zárodečné DNA (Nojadeh, Behrouz Sharif and Sakhinia, 2018). Výskyt mutací souvisí se systémem oprav chybného párování DNA (DNA mismatch repair - MMR) dráhy, který opravuje chyby v DNA způsobené polymerázami během procesu replikace. Pokud dojde k inaktivaci MMR genů, začnou se chyby nejen v mikrosatelitech hromadit, což vede ke vzniku MSI a ta ke vzniku KRK. Mutace v genech MMR se vyskytují především u Lynchova syndromu. Dalším způsobem, jak dochází k defektu těchto genů je jejich umlčení pomocí hypermetylace jejich promotorů (Harrison and Benziger, 2011). Prognóza pacientů s Lynchovým syndromem spojeným s MSI je ale lepší než u pacientů se sporadickým KRK s MSI (Boland and Goel, 2010).

Kolorektální karcinomy spojené s poruchou v MSI mají charakteristické rysy jako je vznik v proximálním tračníku, lymfocytární infiltrát a vzhled pečetního prstenu se špatně diferencovanými nebo mucinózními buňkami. Nádorové buňky jsou často diploidní a vykazují menší míru LOH. U většiny těchto nádorů se objevuje ztráta exprese proteinu MLH1 a PMS2, kdy ztráta exprese MLH1 se zvyšuje s věkem (exprese proteinu je ztracena u 90 % pacientů starších 90 let). Tato skutečnost také souvisí s tím, že pacienti se sporadickým KRK spojeným s MSI byli vyššího věku než pacienti s familiární formou KRK spojeného s MSI.

V roce 1997 byla definice MSI standardizována, kdy se termín MSI vztahuje ke KRK s MSI-high (MSI-H) – 30 % panelu mikrosatelitních markerů mutováno, MSI-low (MSI-L) se vyskytuje u mnoha typů nádorů, kde je alespoň 1 mutovaný mikrosatelit ve větší části KRK (Boland and Goel, 2010).

2.3.4. Serátní cesta

V minulosti byly kolorektální polypy rozlišovány pouze na 2 typy, a to adenomy a hyperplastické polypy. Hyperplastické polypy byly považovány za benigní bez maligního potenciálu a adenomy jako prekuzory KRK. Novější studie ovšem prokázaly, že hyperplastické polypy ve skutečnosti zahrnují širokou a rozmanitou skupinu polypů, které můžeme dále rozlišovat – tradiční serátní adenomy (TSA), přisedlé serátní adenomy (SSA) a skutečné hyperplastické polypy. Jedná se o nejběžnější druh polypů především v levém tračníku a konečníku. TSA můžeme od SSA polypů odlišit tak, že jsou mnohem jednodušší v populaci buněk než přisedlé polypy (SSA). Bylo také zjištěno, že tyto rozdílné druhy polypů postupují k malignímu zvratu odlišnými cestami. Zatímco TSA jsou většinou MSI-L nebo mikrosatelitně stabilní (MSS), tak 15–20 % serátních adenokarcinomů pochází z SSA a jsou MSI-H (Harrison and Benziger, 2011).

Cesta vzniku karcinomu ze serátní léze se částečně překrývá s rolí MSI i metylace CpG ostrůvků. U téměř 80 % TSA lézí rekta byly nalezeny mutace genu *KRAS*, které jsou naopak vzácné u SSA. Dále se u serátních lézí vyskytují mutace genu *BRAF*, které se ale vzájemně vylučují s mutacemi *KRAS* (Harrison and Benziger, 2011).

2.4. Typy a charakteristika kolorektálního karcinomu

Většina KRK se vyskytuje u pacientů bez genetické predispozice, ale až 25 % pacientů má KRK v rodinné anamnéze, což naznačuje, že množství genů, které mohou zapříčinit toto onemocnění ještě nebylo popsáno. Sporadické karcinomy se vyskytují nejčastěji u pacientů, u kterých se střední věk pohybuje v rozmezí 70–75 let a většina karcinomů se nachází v distálním tračníku (Yamagishi *et al.*, 2016). V posledních dekádách se stále častěji můžeme setkat s pacienty s KRK ve věku pod 40 let. Vzhledem k tomu, že většina screeningových programů je mířena na osoby nad 50 let, je u mladších pacientů častější pozdější záchyt onemocnění a s tím spojená i horší prognóza. Incidence KRK diagnostikovaných před 40. rokem života se pohybuje v rozmezí 0,8 až 15 % (Campos, 2017).

KRK se také může vyskytovat v dědičných formách, kam patří hereditární nepolypózní kolorektální karcinom a familiární adenomatózní polypóza. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které označujeme také jako Lynchův syndrom (prevalence Lynchova syndromu se pohybuje v rozmezí 1:550-2 000 z KRK) (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2022). Celoživotní riziko KRK je 28–78 % u mužů, u žen je pak o něco méně nižší. U pacientů s HNPCC je zvýšené riziko výskytu i dalších nádorů, u žen se jedná o nádory endometria a vaječníků, dále také karcinom žaludku, močového ústrojí, tenkého střeva i nádoru mozku. Nádorové onemocnění propuká v mladém věku. U více než 90 % pacientů s diagnostikovaným HNPCC je přítomen defekt v párování bází a tím způsobená chromozomová nestabilita (Mantovani, 2020). Geny a mutace těchto genů zodpovědné za vznik kolorektálního karcinomu jsou *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Defektní systém oprav párování bází způsobuje nestabilitu mikrosatelitů v DNA nádoru. Tyto chyby se typicky vyskytují u pacientů s HNPCC (více než 90 %) naproti tomu u sporadických nádorů se vyskytují asi jen v 15 %. U pacientů se mohou vyskytovat sebaceózní karcinomy (karcinomy vyvíjející se ze sebocytů v dermis a podkožní tkáni, nejčastěji lokalizované kolem oka), benigní i maligní kožní nádory (Mantovani, 2020).

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je autozomálně dominantně děděné onemocnění, které se vyznačuje mnohočetným výskytem polypů. Gen zodpovědný za toto onemocnění je tumor-supresor *APC* v autozomálně dominantní formě, v autozomálně recesivní formě se uplatňuje mutace v genu MYH-associated polyposis (*MUTYH*). Incidence onemocnění je 1:8 300 (v EU 1:11 300-37 600) u obou pohlaví a tvoří méně než 1 % KRK. Počet polypů v tlustém střevě se pohybuje ve stovkách až tisících, typicky v distální části střeva. Polypy se mohou začít vyskytovat již v dětském věku a v období dospívání. Velká část pacientů je i asymptomatická a onemocnění se projeví až při značném množství polypů, které začnou způsobovat rektální krvácení, anémii, případně až karcinom. Přidruženými novotvary mohou být osteomy (benigní mezenchymální nádor kosti), polypy žaludku a duodena, nádory měkkých tkání nebo desmoidní nádory. Dále také zubní anomálie nebo vrozená hypertrofie pigmentového epitelu retiny (CHRPE). Vyskytuje se v klasické nebo atenuované formě (Half, Bercovich and Rozen, 2009), (Cyrany *et al.*, 2018).

2.5. Screening a současná léčba kolorektálního karcinomu

2.5.1. Neinvazivní testy stolice

Mezi neinvazivní screeningové vyšetření patří především vyšetření stolice, které zahrnují guajakový test na okultní krvácení ve stolici (gTOKS) a fekální imunohistochemické vyšetření (FIT). Guajakový test je chemický test, založený na reakci guajakolu s hemoglobinem ve stolici. Test FIT je imunochemický a je založen na využití specifických protilátek proti lidskému hemoglobinu (Schreuders *et al.*, 2015).

Zvětšující se karcinom ve střevě může způsobovat krvácení, které je často okultní a přerušované. Test gTOKS detekuje přítomnost hemu ve stolici a tím přítomnost krvácení. Stolica se umístí na papír, který je impregnovaný guajakovou pryskyřicí a v přítomnosti hemu dochází k peroxidázové reakci způsobující zmodrání papíru. V tomto testu se jedná o kvalitativní vyhodnocení a testující osoba musí tedy vyhodnotit, zda je barevná změna adekvátní. Pro správné vyhodnocení se odebírají vzorky stolice z několika různých míst. Test není specifický pro jen lidskou krev, a tak může docházet z pozitivně falešným výsledkům, například při požití červeného masa nebo potravin s přirozeně vysokým obsahem peroxidázy jako je křen, květák nebo brokolice. Z těchto důvodů je vhodné dietně upravit stravu v dostatečném předstihu před provedením testu (Bevan and Rutter, 2018).

Fekální imunohistochemické vyšetření (FIT) analyzuje vzorky stolice na přítomnost krve pomocí mono- nebo poly-klonálních protilátek proti lidskému hemoglobinu ve stolici. Pokud je hemoglobin ve stolici přítomen tak tvoří s protilátkou komplex, který lze kvantifikovat. FIT není ovlivněn falešně pozitivními výsledky jako gTOKS a vyžaduje méně odběrů, často stačí jen jeden vzorek. Tento test umožňuje kvantitativní přístrojovou analýzu množství krve ve stolici, a proto má různé hranice pro detekci. Nejčastěji používané hraniční hodnoty jsou 20, 50 a 100 $\mu\text{g/g}$, rozptyl hodnot je způsoben použitím různých analyzátorů a také nastavením screeningových programů v různých státech. Senzitivita FIT pro KRK je 0,79 a specifita 0,94 (Bevan and Rutter, 2018).

K neinvazivnímu testování lze také využít testování DNA ve stolici. Spolu se stolicí se mohou uvolňovat do stolice i nádorové buňky ze střeva. Tato oblast se teprve rozvíjí a je ve fázi výzkumu. Další oblasti výzkumu se zabývají RNA markery, proteinovými markery nebo biomarkery založenými na zkoumání mikrobiomu. Ale v současnosti použití těchto metod omezuje hlavně jejich ekonomická nákladnost a praktičnost použití (Bevan and Rutter, 2018).

2.5.2. Invazivní vyšetření

Hlavním invazivním vyšetřením při prevenci a detekci KRK je kolonoskopie. Kolonoskopie snižuje dlouhodobě úmrtnost na KRK. Existuje různá aplikace tohoto vyšetření napříč screeningovými programy, v některých se jedná o primární nástroj screeningu, jinde je preference dvoustupňového přístupu, kde se kolonoskopie využívá jako diagnostické objasnění u pacientů s pozitivním testem např. gTOKS nebo FIT (Schreuders *et al.*, 2015). Primárním cílem kolonoskopie je detekce KRK a sekundárním cílem je odstranění adenomů. Nevýhodou kolonoskopie je především nutnost provedení zkušeným odborníkem a jisté nepohodlí pro pacienta. Dále je nutná příprava před samotným provedením a podání sedativ a vyčištění střeva. Nejzávažnější komplikací je pak perforace střeva a krvácení (Bevan and Rutter, 2018). Dále jsou u pacientů sledovány hladiny biomarkerů CEA a CA-19-9, těmto biomarkerům se podrobněji věnuje kapitola 2.5.

2.5.3. Léčba kolorektálního karcinomu

Jelikož je KRK heterogenní onemocnění existuje několik přístupů při jeho léčbě. V ideálním případě je cílem léčby dosáhnout úplného odstranění nádoru a případných metastáz pomocí chirurgického zákroku. Pokud je onemocnění ve stádiu 0, lze ho léčit pouhým odstraněním rakovinných buněk pomocí kolonoskopie. U vyšších stádií rakoviny tlustého střeva je nutné provedení chirurgického zákroku, standardně v podobě kolektomie postiženého segmentu střeva. Hojně jsou využívány radioterapie a chemoterapie, aby došlo k co největšímu zmenšení nádoru a potlačení jeho šíření. Radioterapie i chemoterapie může být aplikována před, jako neoadjuvantní, i po operaci nádoru, jako adjuvantní léčba (Xie, Chen and Fang, 2020), (Granados-Romero *et al.*, 2017a).

Neoadjuvantní terapie se typicky používá u pacientů s rektálním karcinomem ke zmenšení nádoru a jeho snadnější resekci a také u pacientů s metastázami, které jsou potencionálně resekovatelné při chirurgickém zákroku. Cílem je zmenšení velikosti nádoru nebo metastáz. Po chirurgickém odstranění nádoru se pro minimalizování recidivy a prodloužení přežití pacientů nasazuje adjuvantní terapie. Při adjuvantní terapii se musí brát zřetel na toxicitu podávaných přípravků a nyní jsou ve fázi studií některé pomocné a přídavné látky, které by měly pomoci pacientům s nežádoucími účinky podávané terapie (Xie, Chen and Fang, 2020). U pacientů s metastatickým nebo recidivujícím KRK je první volbou léčby

systemová terapie tzv. FOLFOX. Tento systém zahrnuje léčbu v kombinaci 5-FU, leukovorin a oxaliplatin (Lu *et al.*, 2020).

Nasazení systémové chemoterapie se hodnotí pomocí výkonostního stavu pacienta. Chemoterapii lze nasadit u pacientů s dobrým výkonostním stavem v době zahájení terapie. To znamená, že pacient je schopen se o sebe samostatně starat a je aktivní po většinu denní doby. Některé studie ukázaly, že pacienti ve špatném výkonostním stavu jsou náchylnější k toxicitě léků a užitek z terapie není tak velký. Pacienti jsou pečlivě kontrolováni, aby bylo možné sledovat účinnost terapie. Pro sledování účinnosti se používají standardizovaná měřítka jako kritéria RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) (Gold and Freedman, 1965). Za úplnou odpověď se považuje vymizení všech klinicky detekovatelných onemocnění (Goodwin and Asmis, 2009). V současné době je v klinické praxi málo spolehlivých biomarkerů pro hodnocení prognózy a úspěšnosti léčby, proto je vyvíjen tlak na jejich nalezení.

Chemoterapie je založena převážně na bázi fluoropyrimidinu 5-fluorouracilu (5-FU) v podobě monoterapie nebo v kombinaci s dalšími přídatnými léčivými přípravky, jako je leukovorin, oxaliplatin nebo irinotekan. Kombinované přípravky jsou používány častěji v první linii léčby (Vodicka *et al.*, 2019). U přídatných látek je účinnost velmi podobná a liší se spíše v projevu nežádoucích účinků (např. FOLFOX a FOXFIRI) (Vodenkova *et al.*, 2020; Xie, Chen and Fang, 2020). Hlavním nežádoucím účinkem chemoterapie je ničení i nezhoubných buněk. Jelikož dochází k zániku rychle se dělících buněk, ovlivňuje chemoterapie nejen nádorové buňky ale také buňky vlasových folikul, sliznice v dutině ústní a trávicím traktu, erytrocyty a leukocyty (Rejhová *et al.*, 2018).

Další možností léčby KRK je použití imunoterapie, tato možnost se hojně využívá u KRK spojených s MSI. Pro nádory s hodnocením MSI-high byl schválený lék pembrolizumab asociovaný s vysokou úspěšností odpovědi na tuto terapii. Předmětem mnoha výzkumů jsou také vakcíny, které se již používají u jiných typů nádorů k vyvolání protinádorové imunitní odpovědi. U KRK se využívají autologní, peptidové, virové vektory a dendritické buňky. Autologní vakcíny obsahují buňky přímo z pacientova nádoru a zahrnují antigeny asociované s nádorem. Většina těchto vakcín ale stále nedosahuje dostatečné klinické využitelnosti, protože antigeny jsou většinou přítomny i na normálních buňkách a imunitní odpověď tak není specifická pro rakovinné buňky (Ganesh *et al.*, 2019), (Kalyan *et al.*, 2018).

Velkým průlomem v léčbě metastatického KRK bylo zavedení tzv. biologické léčby. V rozvoji nádoru hraje roli také angiogeneze, kterou reguluje angiogenní vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), který představuje v dnešní době také terapeutický cíl podávaných léčiv, např. monoklonální protilátka bevacizumab. Toto léčivo inhibuje VEGF a využívá se především v léčbě metastatického KRK (Seeber *et al.*, 2018). Dalším biologickým lékem, je cetuximab, který cílí proti receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Po aktivaci tohoto receptoru dochází ke spuštění dráhy Ras/Raf, která reguluje buněčný růst, přežití nebo migraci. Bylo zjištěno, že u pacientů, kteří mají mutovaný gen *KRAS* není odpověď na léčbu tolik uspokojivá, protože jeho onkogenní signál je nezávislý na EGFR aktivaci, a proto jsou mutace v genu *KRAS* prediktory špatné odpovědi na biologickou léčbu (Xie, Chen and Fang, 2020).

Nově se rozvíjející oblastí léčby KRK jsou také onkolytické viry, které lze použít ke zničení rakovinných buněk. Tyto viry se selektivně replikují v rakovinných buňkách a poškozují tak nádorovou tkáň bez poškození okolní zdravé tkáně. Viry jsou často geneticky modifikovány, aby bylo dosaženo požadované nádorové selektivity. Také existuje mnoho různých metod podání onkolytických virů, mohou být aplikovány do samotného nádoru, do tkáňového prostředí nebo systémově (Schirmacher, 2019).

Poslední možností léčby je paliativní péče o pacienty, kteří mají nevléčitelné stádium KRK, těchto pacientů může být až 80 % u metastatického KRK. Paliativní péče má za úkol prodloužit život pacienta v pokročilém stádiu onemocnění, co možná nejvíce zmírnit bolesti a další nejen tělesná strádání a zároveň, co možná nejvíce se snažit o zachování pacientovi důstojnosti. Při paliativní péči se využívají chirurgické zákroky pro zkvalitnění pacientova života i chemoterapeutické přípravky a další léčebné látky (Osagiede *et al.*, 2019).

2.6. Onkomarkery CA-19-9 a CEA

Pro časnou diagnostiku a následné sledování stavu pacienta se hojně využívají biomarkery. Biomarker označuje širokou škálu lékařských objektivních indikací pacienta. V roce 1998 byl termín biomarker definován skupinou v National Institute of Health Biomarkes Definitions Working Group jako „*charakteristiku, která je objektivně měřena a hodnocena jako indikátor normálních biologických procesů nebo farmakologických reakcí na terapeutickou intervenci*“ (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Biomarkerem tak může být v podstatě jakákoliv měřená funkční nebo fyziologická odpověď od pulsu nebo

krevního tlaku až po laboratorní krevní nebo tkáňové testy (Strimbu and Tavel, 2010). V ideálním případě by měl takový biomarker splňovat několik kritérií, především dostatečnou specifitu a senzitivitu. Současně hrají roli i ekonomické faktory, kdy by metoda jejich detekce měla být nízkonákladová a také bezpečná (Henry and Hayes, 2012). V současnosti patří mezi nejčastěji stanovované biomarkery karcinoembryonální antigen (CEA) a sacharidový antigen 19-9 (CA-19-9), které budou dále popsány v této kapitole.

Rodina CEA obsahuje 29 genů, přičemž 11 z těchto genů řadíme do podskupiny glykoproteinů, které jsou specifické pro těhotenství a 7 z nich do podskupiny onkofetálních antigenů. CEA je také důležitým nádorovým markerem pro KRK, ale i některé další karcinomy, například nádory pankreatu, žaludku, jícnu nebo žlučových cest. Prvně popsali nádorově asociovaný antigen CEA Gold a Freedman (Gold and Freedman, 1965). CEA jsou asociované s buněčnou membránou a jsou exprimovány v normálních i v nádorových tkáních (Hammarström, 1999). Jeho zvýšené hladiny jsou spojovány s horší prognózou onemocnění (Thomsen *et al.*, 2018).

CA-19-9 je tetrasacharid, který je syntetizován v gastrointestinálním epitelu. Jedná se také o běžně používaný biomarker pro monitoring léčby pacientů s KRK nebo s karcinomem pankreatu (Thomsen *et al.*, 2018). Tento marker sice označujeme jako asociovaný s nádorem, ale není nádorově specifický. Lze ho také detekovat u nádorů žlučníku, jater nebo i žaludku. Některé studie ovšem uvádí, že jeho účinnost je pouze u pokročilých karcinomů a není užitečný pro asymptomatické pacienty (KIM *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2021).

Bohužel oba tyto sérové onkomarkery nevykazují dostatečnou specifitu a jejich zvýšené hladiny nemusí souviset s maligním onemocněním. I proto se v dnešní době řada vědců a lékařů snaží nalézt nové biomarkery, které by usnadnily diagnostiku maligního onemocnění. Jeden z přístupů představuje tekutá biopsie a malé nekódující molekuly RNA.

Přehled hodnot markerů CEA a CA-19-9 je uveden v **Tabulce 2**.

Tabulka 2: Přehled hodnot CEA a CA-19-9 (zdroj: postudium.cz)

	CEA ($\mu\text{g/L}$)	CA-19-9 (kIU/L)
Normální hodnoty	0-3	0-30
Hraniční hodnoty	3-5	30-40
Patologické hodnoty	>5	>40
Metastatický karcinom	>20	

3. MikroRNA

3.1. Charakteristika mikroRNA

MiRNA jsou malé jednořetězcové nekódující RNA o délce 21-23 nukleotidů, které vznikají z primárního transkriptu. Jejich významnou funkcí je regulace genové exprese a více než 30 % genů je cílem miRNA. Aby RNA mohla být označena jako miRNA musí splňovat několik kritérií – i) jednoznačná detekce pomocí real-time PCR nebo Northern blotu, ii) prekurzorová vlásenková struktura je asi 70 nukleotidů dlouhá, iii) musí být fylogeneticky konzervovaná a iv) inhibicí klíčových ribonukleáz (Dicer) v biogenezi dochází k poklesu hladiny miRNA a akumulaci její prekurzorové struktury (O'Brien *et al.*, 2018; Yao, Chen and Zhou, 2019).

K objevu miRNA došlo v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* skupinou vědců pod vedením Rosalinde C. Lee (Harvard University, USA). První popsanou miRNA byla *lin-4*, u které bylo zjištěno, že negativně reguluje hladinu proteinu LIN-14. *Lin-14* gen se uplatňuje při regulaci vývoje háďátka, k jeho 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) mRNA jsou komplementární transkripty kódované genem *lin-4*. Transkripty navázané do této oblasti způsobí represi translace genu *lin-14* (Lee, Feinbaum and Ambros, 1993). Později bylo objeveno, že *lin-4* působí jako supresor i u exprese genu *lin-28* stejným mechanismem jako u proteinu LIN-14 (Stark *et al.*, 2021).

V lidském genomu se nachází asi 2 300 maturovaných miRNA. MiRNA jsou typicky kódovány mezi geny, ale mohou se objevovat i v intronech. Až 40 % genů miRNA je u člověka shlukováno do klusterů. Tyto shluky mohou být transkribovány jako jeden velký transkript kódující více miRNA s podobnými expresními vzory a podobnými nebo i odlišnými funkcemi. MiRNA v klastrech se mohou regulovat vzájemně mezi sebou a při jejich narušení mohou vznikat vývojové defekty (Stark *et al.*, 2021).

3.2. MikroRNA a rakovina

K regulaci genové exprese dochází post-transkripčně pomocí degradace mRNA transkriptů nebo inhibicí translace mRNA (Otmani and Lewalle, 2021). Bylo zjištěno, že u většiny nádorových onemocnění je hladina miRNA značně deregulovaná v nádorové tkáni. Různé typy nádorů mohou vykazovat specifickou změnu různých miRNA, kterou lze odlišit od nenádorové tkáně i od jiných nádorových typů. V různých typech nádorů můžeme

pozorovat, že značná část exprese miRNA je potlačena. Například u difúzního velkobuněčného B lymfomu hladina exprese miR-21 klesá s progresí onemocnění. Naopak miRNA mohou být u jiných typů nádorů exprimovány ve zvýšené míře. Již zmíněná miR-21 je ve vyšší míře exprimována u solidních nádorů (např. nádory prsu) nebo u hematologických malignit (Ali Syeda *et al.*, 2020).

Deregulace miRNA vede k tkáňovým změnám, které lze považovat za znaky maligní transformace, jako je trvalá proliferace buněk, vyhýbání se apoptóze, indukce angiogeneze nebo rezistence na léčiva. MiRNA mohou působit jako onkogeny ale i jako tumor-supresory (Stark *et al.*, 2021).

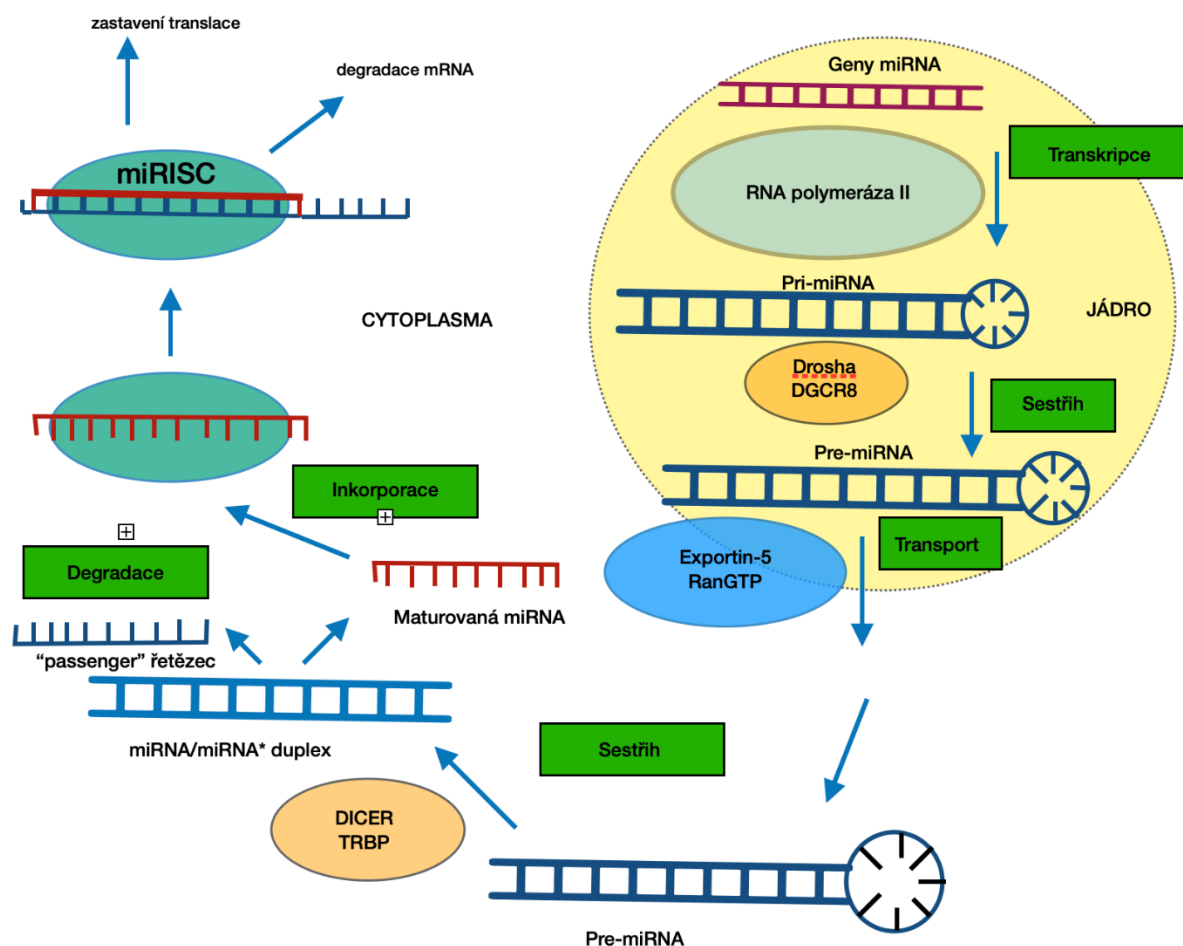
Několik miRNA již bylo identifikováno ve spojitosti s KRK. Příkladem může být miR-143 a miR-145, jejichž snížené hladiny byly asociovány s přítomností KRK. Proto je můžeme označit jako tumor-supresorové miRNA (Zhang *et al.*, 2021). Jako tumor-supresory fungují miR-15/16, jejichž represe cílové onkogenní mRNA vede k inhibici tumorogeneze. Tyto miRNA vykazují nižší hladiny u solidních nádorů, melanomů, nádorech močového měchýře i u KRK. U KRK se také uplatňuje například miR-140, která inhibuje progresi KRK a jatrných metastáz cílením na *BCL9* a *BCL2* (Otmani and Lewalle, 2021).

MiRNA mohou regulovat také epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT), který hraje důležitou roli při procesu metastázování (Zhang *et al.*, 2021). EMT je reverzibilní proces, který je důležitý pro tvorbu tkání a orgánů. Nepohyblivé epiteliální buňky jsou přeměněny na jednotlivé pohyblivé mezenchymální buňky (Filip *et al.*, 2020). MiRNA mohou podporovat nebo naopak inhibovat migraci a invazivitu nádorových buněk pomocí regulace transkripčních faktorů EMT (Zhang *et al.*, 2021).

3.3.Funkce a biogeneze mikroRNA

MiRNA jsou přepisovány RNA polymerázou II z DNA sekvence do primární miRNA (pri-miRNA), dále do prekurzorové miRNA (pre-miRNA) a finálně maturovány na miRNA. Jsou známy dvě cesty biogeneze miRNA, nekanonická cesta a dominantní je tzv. kanonická cesta biogeneze. Primární transkript je dále v jádře rozštěpen ribonukleázou Drosha a DGCR8 proteinem (DiGeorge syndrom critical region 8), tento komplex proteinů označujeme jako mikroprocesorový komplex. Vzniká charakteristická vlásenková struktura – pre-miRNA. Prekurzorové miRNA jsou dále exportovány do cytoplasmy pomocí proteinu exportin 5

(XPO5). K přenosu přes membránu dochází za účasti kofaktoru RanGTP. V cytoplasmě je pre-miRNA zpracována enzymem DICER, kdy dochází k odstranění terminální smyčky a vzniká maturovaná miRNA (**Obrázek č. 4**) (O'Brien *et al.*, 2018).



Obrázek 4: Biogeneze miRNA, upraveno (Winter *et al.*, 2009)

Následně se na duplex váže protein Argonaut (AGO) a vytváří RISC komplex (RNA-induced silencing complex). Komplex RISC obsahuje to vlákno, které obsahuje méně stabilní 5'konec a jeho úkolem je navádět tento komplex na cílovou molekulu mRNA a následně ji regulovat (Schwarz *et al.*, 2003).

Nekanonická dráha biogeneze má několik možností, vždy dochází k vynechání některé ze složek, které se účastní typické kanonické dráhy. Příkladem je dráha nezávislá na Drosha/DGCR8. Ta zahrnuje mirtrony, což jsou pre-miRNA vytvořené sestřihem intronů a enzymů v jádře. Po sestřihu jsou exportovány do cytoplasmy pomocí XPO5 a zpracovány Dicer enzymem a RISC. Jiné dráhy nekanonické biogeneze mohou být nezávislé na Dicer

enzymu. Dochází ke zpracování vlásenkové RNA pomocí Drosha v jádře, dále se exportuje do cytoplasmy, kde ji zpracují komplex RISC a AGO2 (Stark *et al.*, 2021).

Interakce s komplementární sekvencí na cílové molekule mRNA ovlivňuje specifčnost komplexu pomocí miRNA response elements (MRE). Mechanismy regulace cílových genů jsou represe translace nebo degradace cílové mRNA. Úplná komplementarita mezi miRNA a mRNA se vyskytuje především u rostlin a ovlivňuje degradaci mRNA. U živočichů je typická neúplná komplementarita, která ovlivňuje represi translace mRNA (O'Brien, 2018). Pomocí regulace genové exprese dochází k udržování správné homeostázy (Stark *et al.*, 2021).

3.4.Cirkulující miRNA

Invazivní techniky (**kapitola 2.4.2.**) začínají být pomalu ale jistě nahrazovány neinvazivními metodami, jako je například “tekutá biopsie”. Tekutá biopsie tedy představuje alternativní metodu tkáňové biopsie. Kromě minimální invazivity je výhodou tekuté biopsie možnost sledování onemocnění v reálném čase a možnost opakovaného odběru vzorku (Lianidou and Pantel, 2019; Alix-Panabières and Pantel, 2021).

Cirkulující (extracelulární) miRNA nalezneme ve všech tělních tekutinách. První publikovaný článek o cirkulujících miRNA byl v roce 2008 od Lawrie a kol., kde se zabývali využitím miRNA jako diagnostických markerů u rakoviny, konkrétně u pacientů s difúzním velkobuněčným B-lymfomem (Lawrie *et al.*, 2008). Byly srovnávány hladiny miR-155, miR-210 a miR-21 v séru pacientů se zdravými kontrolami (Lawrie *et al.*, 2008). Cirkulující miRNA se v posledních letech ukazují jako slibné biomarkery jak v diagnóze, tak i v prognóze mnoha různých onemocnění. Ovšem hladiny detekované v tělních tekutinách nemusí vždy odpovídat změnám v nádorové tkáni. Kinetiku cirkulujících miRNA ovlivňuje mnoho faktorů. Další výzvou je samotná detekce miRNA, protože jsou exprimovány v nízkých hladinách a v tekuté biopsii jsou tyto hladiny ještě nižší. Standardně se pro detekci využívá Real-Time PCR (RT-PCR), Northern blot a oligonukleotidové čipy. Tyto metody mají různá omezení od časové náročnosti, ceny až po nízkou citlivost, a tím je zatím omezeno jejich využití v oblasti diagnostiky v klinické praxi. Všechny tyto problémy jsou v současnosti předmětem mnoha výzkumných témat (Mori *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2021).

Většina cirkulujících miRNA je ve formě, která není spojena s vezikulami a jsou ve formě ribonukleoproteinového komplexu. Tento komplex má pro miRNA ochranou funkci, protože pokud se z něj miRNA uvolní, mohou být miRNA snadno degradovány RNázou. Ochranu a transport extracelulární miRNA zajišťuje protein Ago2 spolu s glycin tryptofanovým proteinem (GW182). Dalším ochranným proteinem pro miRNA je nukleofosmin 1 (NPM1). MiRNA se také podílejí na buněčné komunikaci, jsou schopny se zapouzdřit do útvarů pomocí vezikuly a takto sbalené jsou schopny dosáhnout vzdálené oblasti a ovlivnit recipientní buňky, především buňky imunitního systému v mikroprostředí nádorů. Tímto mechanismem ve vzdálených tkání jsou miRNA schopné ovlivňovat i progresi onemocnění. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách deregulace miRNA u nádorových onemocnění otvírá prostor pro využití miRNA jako biomarkerů pro sledování progresu onemocnění nebo terapeutické odpovědi (Cui *et al.*, 2019).

3.5.Sledované mikroRNA miR-122-5p a miR-142-5p

Nedávno byla na Oddělení molekulární biologie nádorů na Ústavu experimentální medicíny (ÚEM) publikována studie Červená a kol., 2021 (Cervena *et al.*, 2021), kde autoři zjistili, že pacienti s rektálním karcinomem vykazovali signifikantní změny v hladině exprese miR-122-5p a miR-142-5p, jak v plazmě, tak i v extracelulárních vezikulách u pacientů s karcinomem rekta a kontrolní skupinou bez nádorového onemocnění. Hodnoty exprese miRNA byly porovnány se zdravými kontrolami, kde byly značně odlišné oproti pacientů s rektálním karcinomem. Hladiny exprese miRNA se také významně lišily u pacientů reagujících na terapii. Tato studie ukázala potenciální využití miR-122-5p a miR-142-5p jako biomarkerů pro včasnou detekci karcinomu i sledování účinnosti léčebného plánu. V další studii Červená a kol., 2023 (Cervena K *et al.*, 2023) ti samí autoři zjistili, že tyto dvě miRNA vykazují u pacientů s rektálním karcinomem potenciál předpovídat návrat onemocnění u pacientů s metastatickým rektálním karcinomem. V předkládané diplomové práci jsme se zaměřili na zjištění, zda tyto miRNA vykazují specifitu jen pro pacienty s karcinomem rekta nebo se tyto výsledky dají zobecnit na veškeré diagnózy spadající do KRK, tedy i na pacienty s diagnózou C18 a C19.

4. Cíle

Hypotézou této diplomové práce je, že cirkukující miRNA (miR-122-5p a miR-142-5p) v plazmě představují diagnostické, prediktivní či prognostické markery u pacientů s nádory tlustého střeva a rektosigmoidálního spojení. Hlavním cílem mé diplomové práce bylo charakterizovat expresní hladiny vybraných miRNA v plazmě u kontrolní skupiny osob a pacientů s nádory tlustého střeva a rektosigmoidálního spojení při dlouhodobém sledování pacientů. Dalším cílem je zjistit, zda námi identifikované miRNA vykazují vhodnější a slibnější potenciál než běžně stanovované biomarkery CEA a CA-19-9. A zároveň určit, zda a jak se tyto vybrané miRNA liší od předchozí studie Červená a kol., která byla uskutečněná u pacientů s rektálním karcinomem (Cervena *et al.*, 2021).

5. Materiál a metody

5.1. Sběr biologického materiálu

V rámci této diplomové práce byly využity vzorky krve od 49 pacientů s karcinomem tlustého střeva, konkrétně se stanovenou diagnózou C18 – C19. Odběry krve (n=49) a tkání (n=9) byly provedeny na chirurgickém oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze. Odběry biologického materiálu byly schváleny etickými komisemi v rámci příslušného projektu Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky (ÚEM AV ČR). Veškerý biologický materiál byl skladován při -80 °C.

Pacienti s diagnózou kolorektálního karcinomu pod označením C18 – C19 byly vybráni vzhledem k tomu, že karcinomem rekta, který spadá pod diagnózu C20 se samostatně zabývala práce dalších pracovníků Oddělení molekulární biologie nádorů ÚEM (Cervena *et al.*, 2021). V diplomové práci byly použity vzorky pacientů pouze se sporadickou formou KRK, jakékoliv formy hereditárního KRK byly ze skupiny pacientů vyřazeny. Stejně tak pacienti, kteří trpěli předchozím maligním onemocněním. V této studii byly také analyzovány vzorky zdravých jedinců, které sloužili jako kontroly.

Skupina pacientů byla tvořena 23 muži a 26 ženami, průměrný věk byl 74,7 let (SD $\pm 10,8$ let). U pacientů byly provedeny 2 nebo 3 odběry periferní krve. První odběr byl proveden v čase diagnózy onemocnění, druhý odběr po zhruba 6 až 9 měsících od diagnózy (pokrývá období chemoterapeutické léčby) a třetí odběr po roce od stanovení diagnózy. U některých pacientů jsou k dispozici pouze 2 ze 3 odběrů, a to v kombinaci první a druhý odběr nebo první a třetí odběr. U všech pacientů byly shromážděny údaje jako datum narození, anamnéza, TMN klasifikace, přežívání, přítomnost případné recidivy a absolvované terapie, tyto údaje jsou shrnuty v **Tabulce 3**.

Tabulka 3: Charakteristika pacientů

Charakteristiky pacientů		N
Věk v době diagnózy	Průměr +SD	74,7 \pm 10,8
Pohlaví	Muži	23
	Ženy	26
Neoadjuvantní terapie	Ano	6
	Ne	42

Adjuvantní terapie	Ano	14
	Ne	35
T (rozsah tumoru)	Tis	2
	1	2
	2	14
	3	21
	4	5
N (postižení lymfatických uzlin)	0	36
	1	11
	2	2
M (metastázy)	0	44
	1	5
Přežívání	Žijící	43
	Zemřelí	5
Recidiva	ano	3
	ne	44

5.2. Použité přístroje a reagentie

Použité přístroje: box s digestoří, termomixér C (Eppendorf, Německo), vortex, centrifuga Jouan BR4i, centrifuga HERMLE Z 323K, termocykler MJ Research PTC 200 (Bio-Rad, USA), Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA), homogenizátor MagNA Lyser (Roche, Švýcarsko), Real-Time PCR ABI 7500 FAST (Applied Biosystems, USA), NanoDrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher, USA), AZURE 600 (Azure biosystems, USA), ELx808 (BioTek, USA)

Použité kity: Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA purification kit (Slurry Format, Norgen Biotek, Kanada), Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent, USA), Qubit microRNA Assay kits (ThermoFisher, USA), high-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with RNase Inhibitor (ThermoFisher, USA), AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagene, Německo)

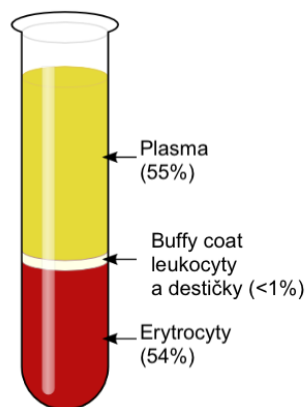
Další použité reagentie: 96% ethanol, beta-merkptoethanol, TaqMan Universal master mix II (ThermoFisher, USA), IQ supermix (Bio-Rad, USA), TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA), RLT pufr, Tris-HCl, SDS, TBS, Ponceau S, MilliQ voda,

BSA, mléko, APS, Bradfordovo činidlo, protilátky pro Wester Blot - MCAK, BCL2L1 (SigmaAldrich, USA)

5.3. Izolace plazmy z krve

Izolace plazmy z periferní krve pacientů byla provedena pracovníky laboratoře Oddělení molekulární biologie nádorů ÚEM podle následujícího protokolu.

1. Periferní krev ponecháme 30 minut při pokojové teplotě bez přítomnosti světla
2. Centrifugace po dobu 10 minut při 14000 rpm
3. Ve zkumavce jsou po centrifugaci vytvořeny 3 vrstvy, kde horní vrstva obsahuje plazmu (**Obrázek č. 5**)
4. Pomocí Pasteurovy pipety odebereme horní vrstvu plazmy do označené čisté zkumavky
5. Skladujeme při -80°C



Obrázek 5: Centrifugace krve k oddělení plazmy (zdroj: *Metody separace buněk a funkční testy lymfocytů, ústav imunologie 2LF UK a FN Motol*)

5.4. Izolace RNA

K izolaci plazmy byl použit komerční kit Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA purification kit (Slurry Format, Norgen Biotek, Kanada). Izolace probíhala v boxu s digestoří kvůli použití beta-merkptoethanolu, který má specifický zápach. A byla provedena podle následujícího protokolu.

A. Příprava před zahájením izolace

1. Zahřátí Slurry C2 na 60°C po dobu cca 20 minut

2. Příprava lyzačního pufru A (LBA – lysis buffer A): k izolaci 6 vzorků plazmy bylo použito 40 µl beta-merkaptoethanolu a 4 ml LBA
3. Zahřátí LBA na 60°C cca 20 minut
4. Příprava wash solution: do komerčně připraveného roztoku Wash solution, který je součástí kitu přidáme 90 ml 96-100% ethanolu
5. Vzorky plazmy rozmrazíme při pokojové teplotě (asi 5 minut)

B. Postup izolace

1. Centrifugace vzorku plazmy na 13000 rpm po dobu 5 minut, při 4°C
2. Do 5 ml zkumavek připravíme 200 µl Slurry C2 a 300 µl LBA (pro každý vzorek) a vortexujeme
3. Přidáme 200 µl vzorku plasmy a 50 µl PBS, vortexujeme 15 sekund
4. Inkubace po dobu 10 minut při 60 °C v termomixéru
5. Přidáme 750 µl 96% ethanolu a vortexujeme 15 sekund
6. Centrifugace po dobu 90 sekund při 1000 rpm
7. Vzniklý supernatant slijeme
8. Ke zbylé peletě přidáme 300 µl LBA a vortexujeme 15 sekund
9. Inkubace 10 minut při 60 °C v termomixéru
10. Přidáme 300 µl 96% ethanolu a vortexujeme 15 sekund
11. Na připravenou promývací kolonku přeneseme 650 µl směsi a centrifugujeme 1 minutu při 14000 rpm
12. Na kolonku přidáme 400 µl Wash solution A a centrifugujeme 1 minutu při 14000 rpm
13. Tento krok opakujeme 2x
14. Poté centrifugujeme prázdnou kolonku při 14000 rpm po dobu 3 minut, abychom se zbavili zbytku Wash solution A ze vzorku
15. Kolonku přemístíme do eluční zkumavky a přidáme 20 µl Elution solutiouon A
16. Centrifugujeme 2 minuty při 2000 rpm a následně 3 minuty při 14000 rpm
17. Izoláty skladujeme při -80°C

5.5. Vybrané mikroRNA a jejich sekvence

Pro účely této diplomové práce byly zvoleny dvě miRNA, konkrétně miR-122-5p a miR-142-5p. Tyto miRNA byly vybrány na základě předchozích vědeckých prací a publikací výzkumného týmu Oddělení molekulární biologie nádorů. Diplomová práce tak navazuje na dříve publikovaný článek „*Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy in Rectal Cancer Patients*“ (Cervena et al., 2021). Sekvence a lokalizace vybraných miRNA jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

Tabulka 4: Vybrané miRNA, jejich sekvence a lokalizace, zdroj: DIANA TarBase v8.0

Gen	Sekvence	Lokalizace
miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	chr.18
miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	chr.17

5.6. Reverzní transkripce

Izoláty RNA byly přepsány pomocí reverzní transkripce do cDNA (complementary DNA) pomocí TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, USA). Reakční směs pro 1 vzorek byla připravena podle **Tabulky 5**.

Tabulka 5: Reakční směs pro reverzní transkripci (1 vzorek)

	Objem (μl)
100 mM dNTPs	0,15
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
10x RT Buffer	1,5
Nuclease-free voda	1,16
RNAse Inhibitor	0,19
Celkové množství	4

Reakční směs byla vortexována po dobu 15 sekund. Do reakce pro reverzní transkripci bylo použito 4 μl reakční směsi, 5 μl vyizolované RNA a 3 μl příslušného primeru. Následně byly takto připravené vzorky vloženy do termocykleru. Teplotní profil reverzní transkripce je uveden v **Tabulce 6**.

Tabulka 6: Teplotní profil reverzní transkripce

Čas	Teplota
30 minut	16°C
30 minut	42°C
5 minut	85°C
∞	4°C

Vzorky byly po reverzní transkripci uchovávány při -20°C.

5.7. Preamplifikace

Preamplifikace slouží k získání dostatečného množství vzorku pro následné analýzy. Byly použity 2 sady genově-specifických forward a reverse primerů, kvůli malému množství výchozího materiálu. Preamplifikace byla použita pouze u vzorků získaných z plazmy pacientů, nikoliv u vzorků ze tkání. Reakční směs byla připravena podle **Tabulky 7**.

Tabulka 7: Reakční směs pro preamplifikaci (1 vzorek)

	Objem (μl)
cDNA přepsaná pomocí RT	2
IQ SuperMix (BioRad)	5
Primer pool	1,5
Nuclease-free voda	1,5
Celkové množství	10

Preamplifikace probíhala v cyklu podle teplotního profilu uvedeného v **Tabulce 8**.

Tabulka 8: Teplotní profil preamplifikace

Čas	Teplota	Počet cyklů
3 minuty	95°C	1
15 sekund	95°C	18
4 minuty	59°C	18
∞	4°C	-

Po preamplifikaci byl každý vzorek naředěn v poměru 1 μ l vzorku a 199 μ l nuclease-free vody a byly uskladněny při -20°C.

5.8. Real-Time PCR

Expres jednotlivých mi-RNA byla měřena pomocí RT-PCR na analyzátoru 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). Nejprve byla pro každý primer zvlášť připravena reakční směs (**Tabulka 9**), která byla nanášena do 96-jamkové destičky v objemu 9 μ l do každé jamky. Následně byl přidán 1 μ l vzorku. Každý vzorek byl do destičky nanášen v triplicátu. Jako referenční byly zvoleny miR-48 a miR-6B. Teplotní profil RT-PCR je uveden v **Tabulce 10**.

Tabulka 9: Reakční směs pro Real-Time PCR (1 vzorek)

	Objem (μ l)
Primers	0,5
2xMasterMix	5
Voda	3,5
Vzorek	1

Tabulka 10: Teplotní profil Real-Time PCR

Čas	Teplota	Počet cyklů
2 minuty	50°C	1
10 minut	95°C	1
15 sekund	95°C	40
1 minuta	60°C	60

5.9. Izolace RNA z tkáně

U pacientů, kteří měli k dispozici nejen vzorek krve, ale také vzorek tkáně byla provedena izolace RNA i z těchto tkání podle následujícího protokolu komerčním kitem AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Německo).

- A. Ke vzorku tkáně bylo přidáno 350 μ l RLT pufru a tkáň byla homogenizována pomocí homogenizátoru (MagNA Lyser, Roche) s kuličkami po dobu 30 sekund
- B. Příprava roztoku DNase I: do DNase I, která je součástí kitu přidáme 550 μ l Nuclease-free vody a promícháme
- C. Postup izolace
 1. Homogenizovanou tkáň centrifugujeme při 10000 rpm a veškerý lyzát přeneseme do nové zkumavky
 2. K lyzátu přidáme dvojnásobné množství 70% ethanolu, nevortexujeme!
 3. 700 μ l směsi přenesena na RNeasy spin kolonku, která je vložena do 2 ml collection zkumavky
 4. Takto centrifugujeme po dobu 15 sekund při 10000 rpm
 5. Přidáme 350 μ l RW1 pufru a centrifugujeme po dobu 15 sekund při 10000 rpm
 6. 10 μ l DNase I roztok promícháme se 70 μ l pufru RDD. Tento objem přeneseme na kolonku a inkubujeme po dobu 15 minut při pokojové teplotě
 7. Na kolonku nanese 350 μ l RW1 pufru a centrifugujeme po dobu 15 sekund při 10000 rpm
 8. Přidáme 500 μ l RPE pufru a centrifugujeme po dobu 15 sekund při 10000 rpm. Následně přidáme na kolonku znovu 500 μ l RPE pufru a centrifugujeme 2 minuty při 1000 rpm
 9. RNeasy spin kolonku přeneseme do nové 2 ml collection zkumavky a centrifugujeme 1 minutu při 10000 rpm, abychom se zbavili zbytku promývacích pufrů
 10. RNeasy spin kolonku přeneseme do nové 1,5 ml collection zkumavky a přidáme 40 μ l RNasy-free vody
 11. Centrifugujeme 1 minutu při 10000 rpm pro eluci RNA. V případě malého výtěžku lze krok 11. opakovat

5.10. Měření koncentrace RNA

Po izolaci RNA z tkání pacientů následovalo ověření dostatečné koncentrace RNA ve vzorcích pomocí přístroje NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher, USA). Dále bylo provedeno měření koncentrace pomocí přístroje Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fischer, USA). Vzorky pro toto měření byly připraveny podle následujícího protokolu.

A. Příprava standardů pro kalibraci měření

1. Pro měření vzorků a přípravu standardů je třeba připravit MasterMix: 199 μ l Qubit microRNA pufru a 1 μ l barviva
2. Ve zkumavce smícháme 190 μ l MasterMixu a 10 μ l Standardu no. 1, obdobně připravíme Standard no. 2
3. Reakční směs pro měření 1 vzorku připravíme ze 199 μ l MasterMixu a 1 μ l vzorku

B. Pomocí připravených standardů nejprve přístroj zkalibrujeme a následně měříme připravené vzorky

Na základě naměřených hodnot bylo vypočítáno množství vzorku a nuclease-free vody potřebné pro následnou reverzní transkripci tak, aby objem reakce pro 1 vzorek (40 ng/ μ l DNA) byl 10 μ l naředěného vzorku a 10 μ l reakční směsi připravené podle **Tabulky 11**.

Tabulka 11: Reakční směs pro reverzní transkripci (1 vzorek)

	Objem (μ l)
10x RT Buffer	2
dNTP	0,8
10x Random Primers	0
Nuclease-free voda	3,2
Multiscribe Reverse transcriptase	1
Inhibitor	1

Teplotní profil reverzní transkripce je uveden v **Tabulce 12**.

Tabulka 12: Teplotní profil reverzní transkripce

Teplota	Čas
25°C	10minut
37°C	120 minut
85°C	5 minut
4°C	∞

Po proběhnutí reverzní transkripce byly vzorky naředěny 20 μ l nuclease-free vody a uskladněny při -20 °C.

5.11. Měření RIN

U izolované RNA ze vzorků tkání pacientů bylo provedeno měření kvality, takzvaný RNA integrity number (RIN). RIN je algoritmus pro přiřazování hodnot integrity měřením RNA. Měření probíhalo na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer pomocí kitu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent, USA). Příprava vzorků pro měření probíhala podle následujícího protokolu.

A. Potřebný gel a Ladder z komerčního kitu byly již připraveny pro použití a skladovány při -70°C

6. Do připraveného gelu přidáme 1 μ l barviva a dobře zvortexujeme
7. Čip umístíme do stanice a do příslušné jamky přidáme 9 μ l gelu s barvivem
8. Uzavřeme stanici a stiskneme píst
9. Stanici opět otevřeme a přidáme gel s barvivem do všech příslušných jamek
10. Do příslušných jamek přidáme 5 μ l RNA markeru

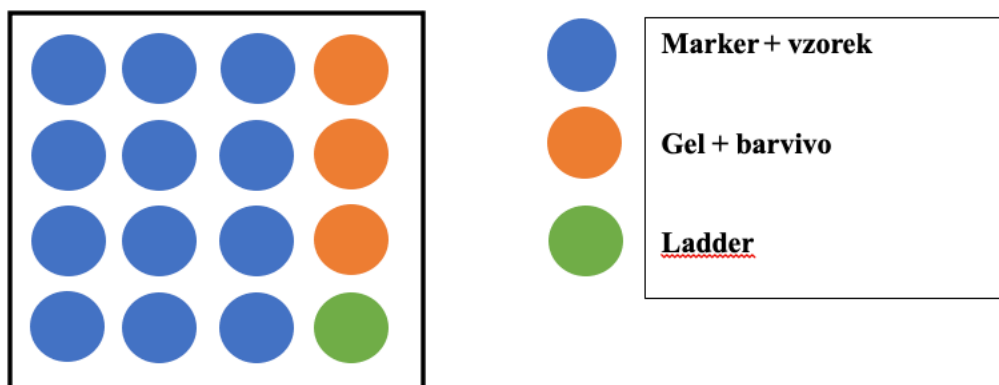
B. Ladder a vzorky

1. Připravený Ladder přidáme do příslušné jamky v objemu 1 μ l
2. Následně do jamek, které jsou naplněny RNA markerem napipetujeme 1 μ l vzorku (**Obrázek č. 6**)
3. Celý čip vortexujeme 1 minutu při 2400 rpm pomocí IKA vortexer

4. Čip (Obrázek č. 7) analyzujeme pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer



Obrázek 6: Čip ve stanici s pístem (RNA 6000 Nano Assay Q*U*ick Reference Guide)



Obrázek 7: Schéma čipu pro měření RIN

5.12. Cílové geny

Izoláty RNA získané z tkání pacientů byly dále použity pro stanovení targetů pro vazbu miRNA. Pro experiment byly zvoleny geny *BCL2L1*, *RPF2*, *KIF2C*, a referenční geny *GADPH* a *ACTB*. Expres genů byla opět měřena pomocí přístroje Real-Time PCR na analyzátoru 7500 ABI Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). Reakční směs pro jeden vzorek a teplotní profil jsou uvedeny v **Tabulce 13 a 14**.

Tabulka 13: Reakční směs pro Real-Time PCR

	Objem (μl)
Primers F+R	0,5
2xMasterMix	5
Nuclease-free voda	3,5
Celkové množství	9

Tabulka 14: Teplotní profil Real-Time PCR

Čas	Teplota	Počet cyklů
2 minuty	50°C	1
10 minut	95°C	1
15 sekund	95°C	40
1 minuta	60°C	60

5.13. Izolace proteinů

Ze vzorků tkání pacientů byly dále vyizolovány proteiny podle následujícího protokolu. Práce probíhala na suchém ledu, aby se zamezilo degradaci proteinů.

1. Ke každému vzorku tkáně bylo přidáno 300 μl směsi pufru a inhibitoru (1 ml RIPA pufru a 20 μl proteázového inhibitoru)
2. Tkáň byla homogenizována pomocí homogenizátoru s kuličkami po dobu 30 sekund (MagNA Lyser, Roche)
3. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 200000 g po dobu 20 minut při 4°C
4. Supernatant byl přemístěn do čistých 2 ml zkumavek a rozpuštěn v SDS
5. Vzorky byly po dobu 5 min vařeny při 95°C a uskladněny v -80°C

Koncentraci vyizolovaných proteinů jsme změřili pomocí metody podle Bradforda. Nejprve jsme připravili kalibrační řadu potřebnou pro měření. Do 1 ml Bradfordova činidla jsme přidali 2 μl vzorku a vortexovali. Takto připravené vzorky jsme měřili pomocí spektrofotometru ELx808 (BioTek). Na základě změřené koncentrace jsme vypočítali potřebné množství každého vzorku pro nanesení na SDS-PAGE.

5.14. Elektroforéza a Western blot

Proteiny získané ze vzorků tkání pacientů byly dále použity pro SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu) a následně pro Western blot.

A. Příprava gelů pro SDS-PAGE

Akrylamid-Bis roztok

- 1,5 M Tris HCl, pH 8,8: rozpustíme 27,3 g ve 120 ml a pomocí HCl upravíme pH na požadovaných 8,8. Poté doplníme do 150 ml objemu MilliQ vodou
- 1M Tris HCl, pH 6,8: rozpustíme 12,1 g v 80 ml a pomocí HCl upravíme pH na požadovaných 6,8. Poté doplníme do 100 ml objemu MilliQ vodou
- 10% SDS: 10g SDS rozpustíme ve 100 ml MilliQ vody
- 10% APS: 1g rozpustíme v 10 ml MilliQ vody

Další použité roztoky:

- BSA: 5g BSA a 100 ml TBS-T
- Mléko: 5g mléka a 100 ml TBS-T

B. Příprava aparatury

1. Vyčistíme desky a hřebeny pro tvorbu jamek v gelu pomocí 70% ethanolu a jemně oťreme. Je důležité očistit veškerou aparaturu od prachu nebo zbývajícího polyakrylamidového gelu z předchozích použití
2. Upevníme desky do držáku pro nalití gelů a ujistíme se, že je vše pevně uchyceno, aby nedocházelo k protékání
3. Pro vytvoření gelu tloušťky 1 mm je zapotřebí cca 5 ml reakční směsi (**Tabulka 15**)

Tabulka 15: Reakční směs pro přípravu gelu

12% gel	Objem 10 ml
Voda	2,4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH8,8)	2,5 ml
30% Acryl/Bis-acryl	5 ml
10% SDS	100 μ l
10% APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

4. Po přidání TEMED začne polymerace gelu. Reakční směs napipetujeme mezi desky upevněné v aparatuře
5. Na povrch gelu převrstvíme vodu nebo ethanol. Gel polymeruje 30 - 45 minut
6. Poté odmyjeme z povrchu gelu převrstvenou vodu (ethanol)
7. Pro přípravu „stacking“ gelu potřebujeme 1,2 ml reakční směsi (**Tabulka 16**)

Tabulka 16: Reakční směs pro přípravu "stacking" gelu

4% gel	Objem 5 ml
Voda	3,675 ml
1M Tris-Hcl (pH 6,8)	0,625 ml
30% Acryl/Bis-acryl	0,65 ml
10% SDS	50 μ l
10% APS	25 μ l
TEMED	5 μ l

A. SDS-PAGE elektroforéza proteinů

1. Do první jamky v gelu vždy použijeme velikostní marker, do následujících jamek pipetujeme požadované množství vzorku
2. Elektroforéza je spuštěna po dobu 60-90 min a 12-15 mA/gel

B. Westernblot

1. Odstraníme „stacking“ gel a promyjeme vodou
2. Vytlačíme všechny bubliny a gel převrstvíme z obou stran papírem
3. Do aparatury umístíme „pad“ a převrstvený gel a pevně uchyťme do blotovacího boxu
4. Blotting probíhá 90 minut při 80 V při maximálním nastavení ampérů
5. Membránu lehce opláchneme vodou a vložíme do 0,1% Ponceau S a protřepeme
6. Promyjeme TBS-T
7. Pro naše provedení následně použijeme roztok BSA a mléka
8. Takto membrány inkubujeme do druhého dne při 4 °C
9. Druhý den slijeme roztoky BSA. Mléka z membrány a naředíme sekundární protilátky v poměru 1:1000, tzn. 50 ml BSA + 16 ul protilátky a 12 ml mléka + 4 ul protilátky)
10. Membránu 3x promyjeme po dobu 5 minut TBS-T
11. Následně membránu převrstvíme připravenými protilátkami a necháme inkubovat 60 minut
12. Následuje opětovné promytí po dobu 5 minut pomocí TBS-T
13. Pro vizualizaci použijeme roztok 2 ml peroxidázy a 2 ml luminolu, pomocí přístroje AZURE 600 (Azure Biosystems)

5.15. Statistické vyhodnocení

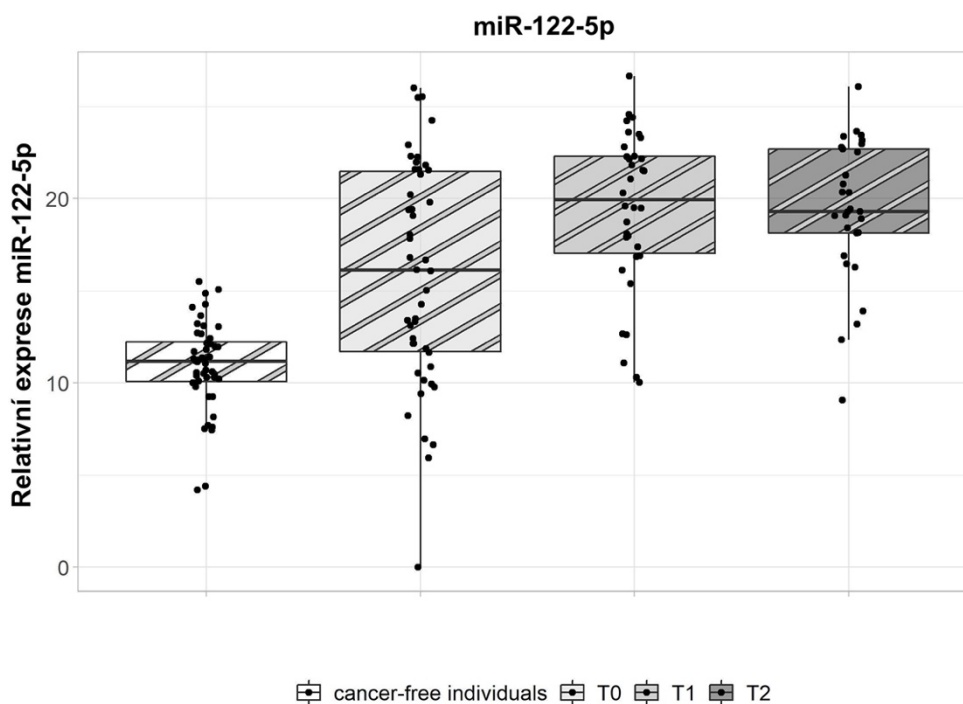
Kandidátní miRNA miR-122-5p a miR-142-5p byly normalizovány vůči RNU6B a kandidátní cílové geny *BCL1L2*, *RPF2* a *KIF2C* vůči *ACTB*. Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru GenEx qPCR data analysis software (version 6, MultiD) pro tkáň, v softwaru R (v. 4.2.2) a GraphPad Prism (GraphPad, USA) pro plazmu pomocí Studentova t-testu a Mann-Whitneyho testu. Statistická signifikance byla stanovena na $p \geq 0.05$. Kaplan-Meierova křivka byla použita ke stanovení přežívání pacientů.

6. Výsledky

Obecná charakteristika pacientů, jejichž biologický materiál byl použit pro získání výsledků v této diplomové práci je uvedena v **Tabulce 3** v předchozí kapitole.

6.1. MikroRNA s významnými rozdíly mezi zdravými kontrolami a jednotlivými odběry pacientů v plasmě

Nejdříve jsme porovnali expresní hladiny obou vybraných miRNA pacientů se zdravými kontrolami. Z **Grafu 1** je patrné, že pacienti v čase diagnózy (T0) měli vyšší expresní hladiny miR-122-5p než zdravé kontroly (cancer-free individuals) (difference a p-hodnoty jsou uvedeny v **Tabulce 17**). U miR-122-5p byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi zdravými kontrolami a jednotlivými odběry pacientů. Signifikantní rozdíly jsme pozorovali mezi 1. odběrem (T0) pacientů a zdravými kontrolami (cancer-free individuals) ($p=2,35e-07$, difference 4,90), mezi 2. odběrem (T1) pacientů a zdravými kontrolami ($p=0,00e+0$, difference 8,29) a také mezi 3. odběrem (T2) pacientů a zdravými kontrolami ($p=2,95e-14$, difference 7,69). V případě těchto pacientů byly pozorovány vyšší rozdíly v expresi oproti zdravým kontrolám než u pacientů s rakovinou rekta a zdravými kontrolami (zdravé kontroly použité z (Cervena *et al.*, 2021)).

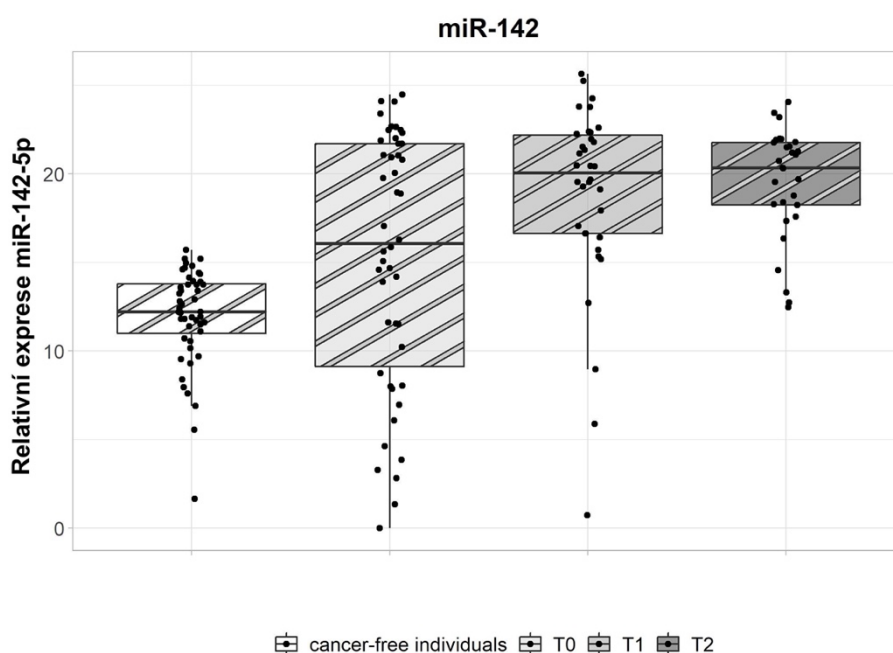


Graf 1: Exprese miR-122-5p u kontrol a pacientů

Tabulka 17: p-hodnoty a difference u miR-122-5p

	p-hodnoty	difference
1. odběr vs. kontroly	2,35e-07	4,90
2. odběr vs. kontroly	0,00e+00	8,29
3. odběr vs. kontroly	2,95e-14	7,69
1. odběr vs. 2. odběr	1,89e-04	-3,38
1. odběr vs. 3. odběr	6,19e-03	-2,79
2. odběr vs. 3. odběr	9,20e-01	0,60

Obdobně jako u miR-122-5p, jsme pozorovali signifikantní rozdíly v expresní hladině mezi zdravými kontrolami a odběry pacientů i u miR-142-5p (**Graf 2**) (difference a p-hodnoty jsou uvedeny v **Tabulce 18**). Signifikantní rozdíly jsme pozorovali mezi zdravými kontrolami a 1. odběrem (T0) pacientů ($p=7,20e-03$, difference 3,32), mezi zdravými kontrolami a 2. odběrem (T1) pacientů ($p=3,99e-06$, difference 6,70) a mezi zdravými kontrolami a 3. odběrem (T2) pacientů ($p=2,84e-08$, difference 6,67).



Graf 2: Exprese miR-142-5p u kontrol a pacientů

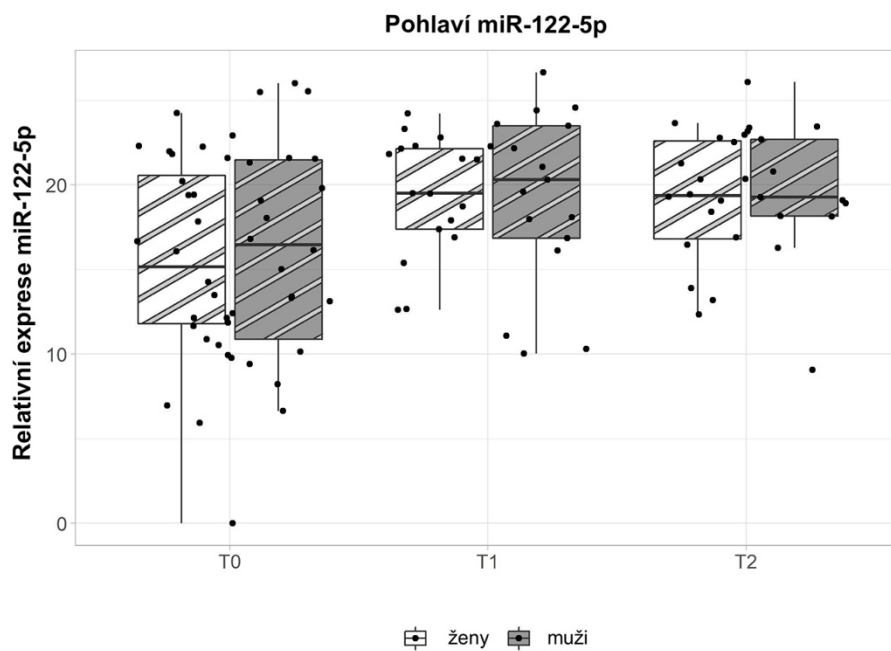
Tabulka 18:p-hodnoty a difference u miR-142-5p

	p-hodnoty	difference
1. odběr vs. kontroly	7,21e-03	3,32
2. odběr vs. kontroly	3,99e-06	6,70
3. odběr vs. kontroly	2,84e-08	6,67
1. odběr vs. 2. odběr	1,78e-03	-3,38
1. odběr vs. 3. odběr	4,87e-03	-3,35
2. odběr vs. 3. odběr	9,99e-01	0,03

Nepozorovali jsme žádnou staticky významnou souvislost mezi hladinami jednotlivých miRNA a hladinami onkomarkerů CEA a CA-19-9 a proto tyto výsledky nejsou v diplomové práci uvedeny.

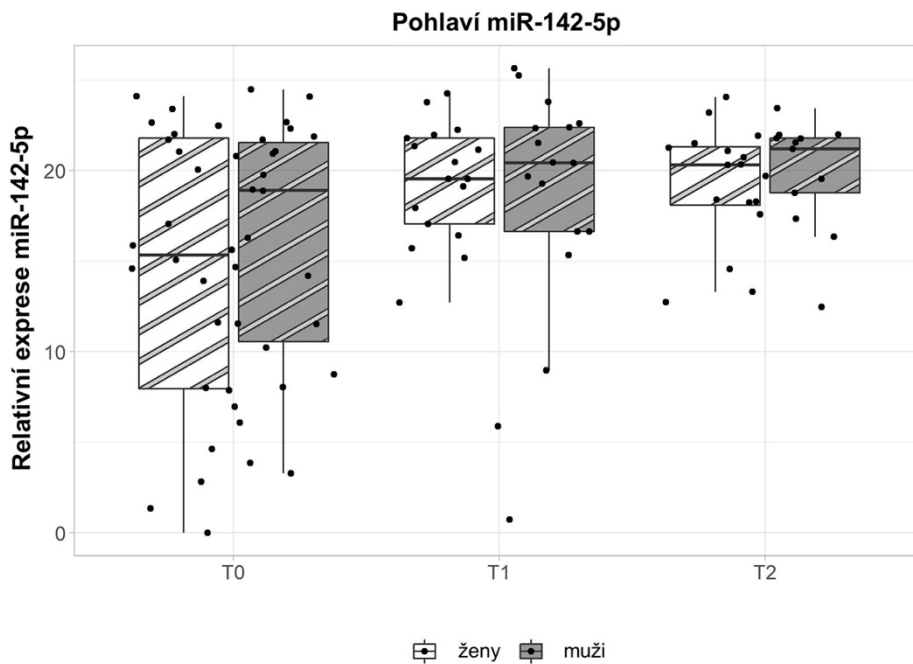
6.2. MikroRNA a jejich rozdíly v závislosti na pohlaví

Jako další jsme sledovali, zda se liší expresní hladiny obou miRNA mezi pohlavím. U mužů nebyla zaznamenána žádná signifikantní asociace s expresí obou miRNA. V případě miR-122-5p jsme pozorovali signifikantní rozdíl u žen, jak ukazuje **Graf 3**, a to konkrétně mezi 1. odběrem (T0) a 2. odběrem (T1) ($p=0,01$, difference -4,15).



Graf 3: Expresí miR-122-5p u jednotlivých odběrů a pohlaví

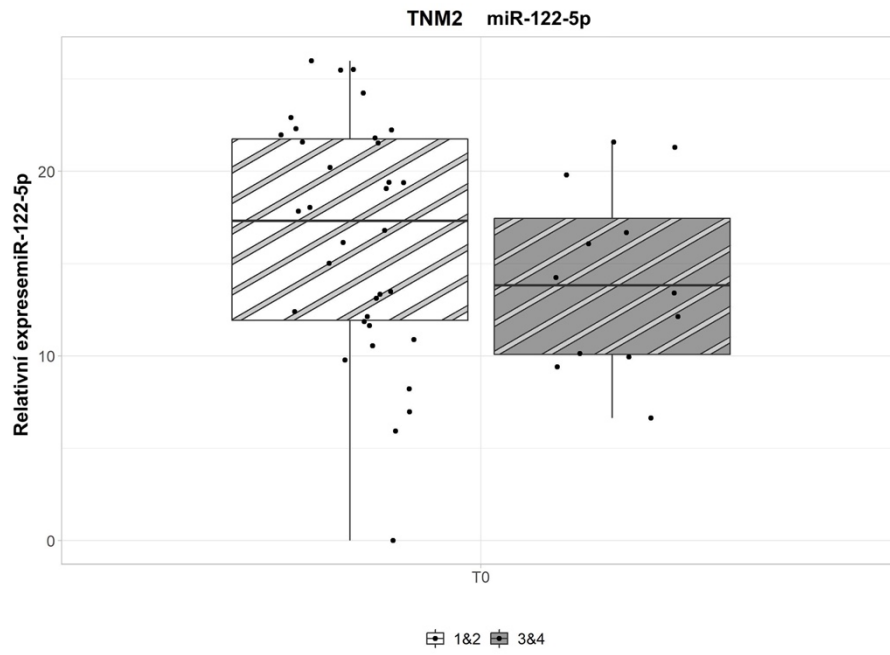
Stejný trend jsme pozorovali také u expresní hladiny miR-142-5p u žen (**Graf 4**), opět nárůst v expresi mezi 1. odběrem (T0) a 2. odběrem (T1) ($p=0,01$, difference -4,71).



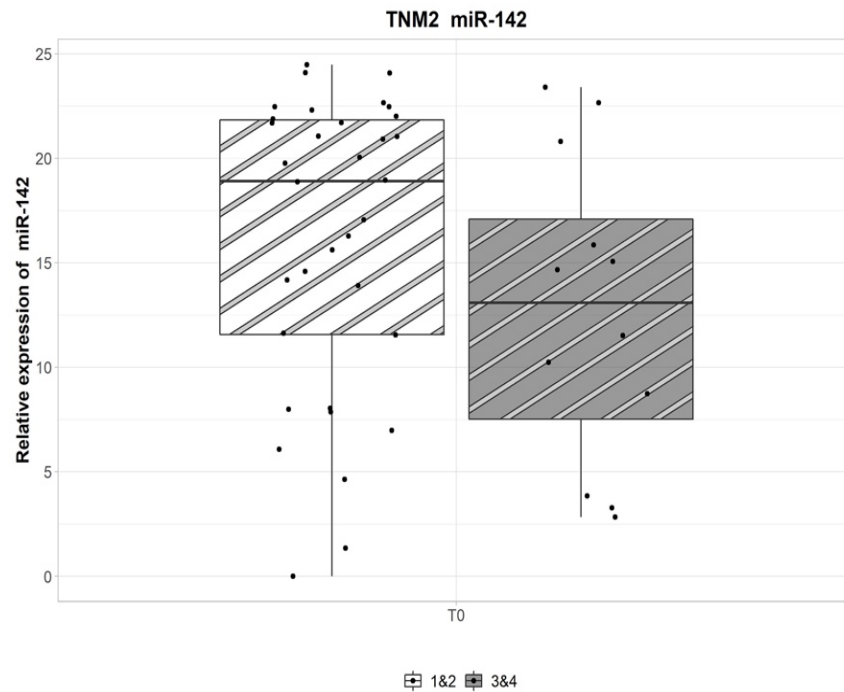
Graf 4: Expresa miR-142-5p u jednotlivých odběrů a pohlaví

6.3. MikroRNA a jejich spojitost se stádiem KRK

Při korelaci miR-122-5p a miR-142-5p a stádia KRK u pacientů jsme nezaznamenali statisticky významné asociace, nicméně můžeme zde pozorovat trend klesající hladiny exprese u obou miRNA (**Graf 5 a Graf 6**) s vyšším stádiem onemocnění. Stádia KRK jsou v grafu znázorněna seskupené *I.+II.* stádium a *III.+IV.* stádium, vzhledem k malému počtu pacientů, kteří měli onemocnění ve *IV.* stádiu



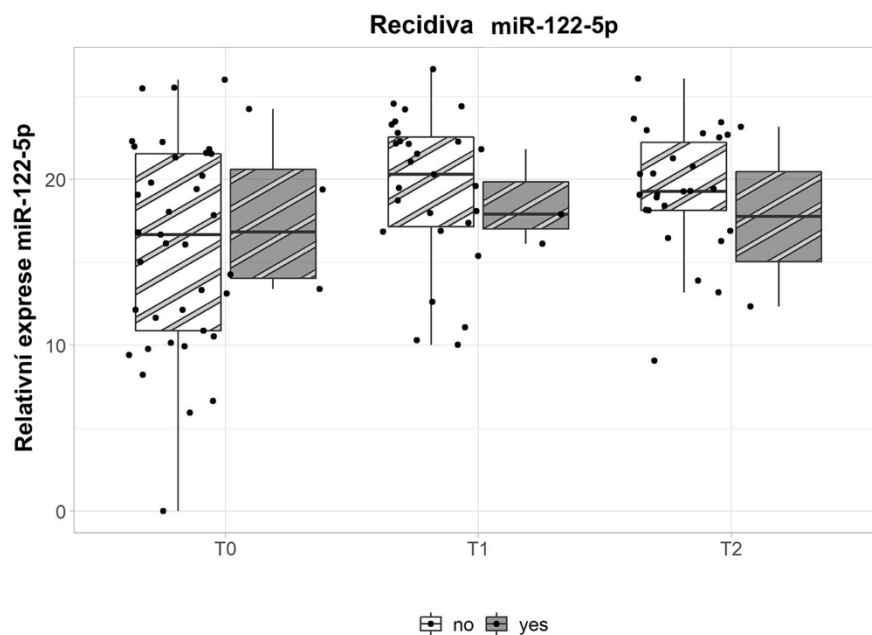
Graf 5: Expese miR-122-5p a stádium KKK



Graf 6: Expese miR-142-5p a stádium KKK

6.4. MikroRNA a jejich spojitost s recidivou onemocnění

U pacientů bez recidivy (**Graf 7**) jsme pozorovali signifikantní nárůst exprese miR-122-5p mezi 1. odběrem (T0) a 2. odběrem (T1) ($p=0,011$, difference -3,16 v tabulce 19), stejně tak i mezi 1. odběrem (T0) a 3. odběrem (T2) ($p=0,042$, difference -2,79 v tabulce 19). Stejná signifikance byla pozorována i u pacientů s karcinomem rekta ve studii (Cervena *et al.*, 2021).

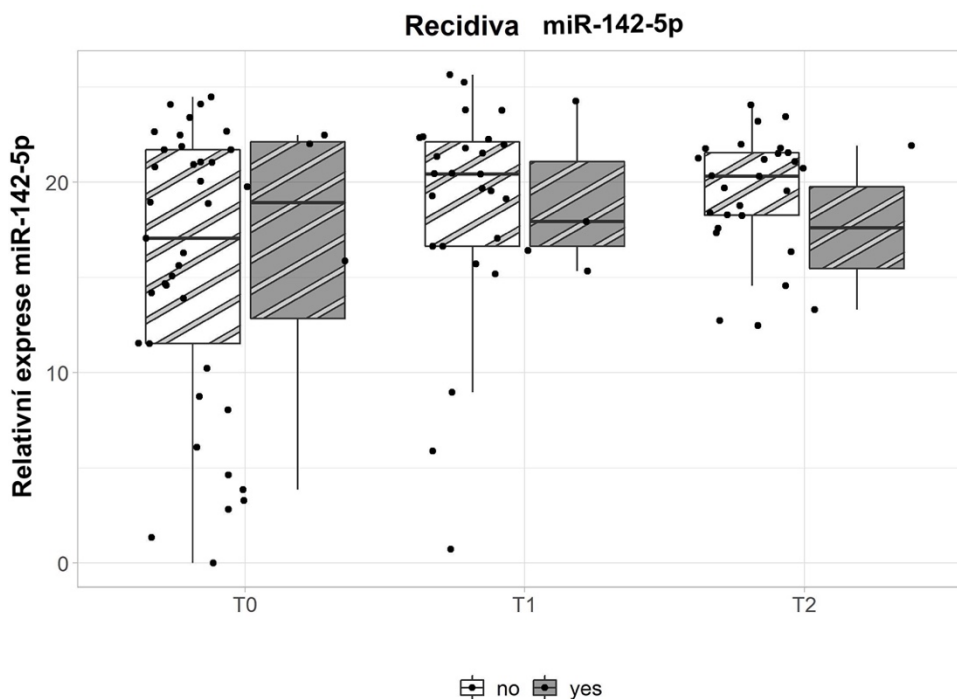


Graf 7: Expresa miR-122-5p u jednotlivých odběrů pacientů a recidivy, no-bez recidivy, yes-s recidivou

Tabulka 19: p-hodnoty a difference u miR-122-5p

	p-hodnoty	difference
1. odběr bez recidivy vs. recidiva	0,98	-1,87
2. odběr bez recidivy vs. recidiva	0,99	-0,97
3. odběr bez recidivy vs. recidiva	0,93	3,21
1. odběr vs. 2. odběr bez recidivy	0,01	-3,16
1. odběr vs. 2. odběr recidiva	0,96	-2,26
1. odběr vs. 3. odběr bez recidivy	0,04	-2,79
1. odběr vs. 3. odběr recidiva	0,98	2,29
2. odběr vs. 3. odběr bez recidivy	0,99	0,37
2. odběr vs. 3. odběr recidiva	0,80	4,56

U pacientů bez recidivy jsme dále pozorovali hraničně signifikantní nárůst exprese (Graf 8, Tabulka 20) u miR-142-5p mezi 1. odběrem (T0) a 3. odběrem (T2) ($p=0,056$, difference -3,11).



Graf 8: Expresa miR-142-5p u jednotlivých odběrů pacientů a recidivy

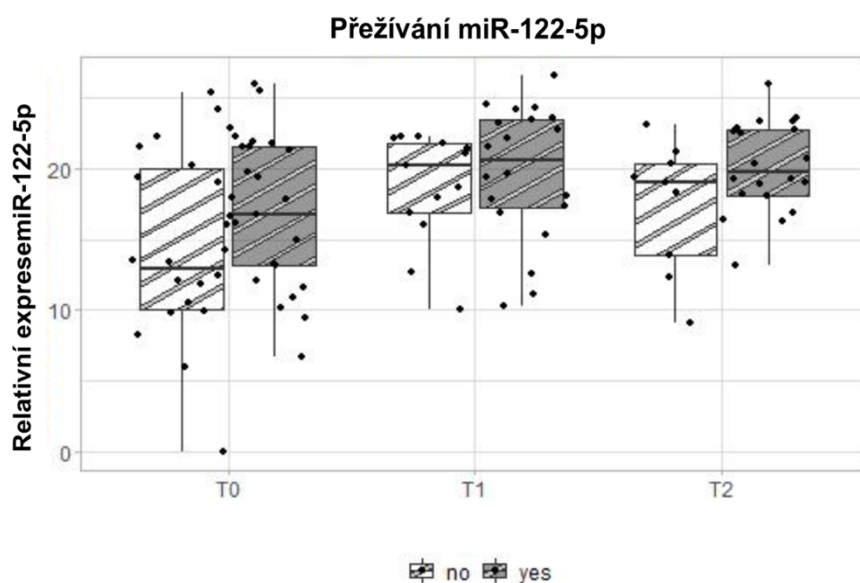
Tabulka 20: p-hodnoty a difference u miR-142-5p

	p-hodnoty	difference
1. odběr bez recidivy vs. recidiva	0,99	-0,33
2. odběr bez recidivy vs. recidiva	0,98	-2,27
3. odběr bez recidivy vs. recidiva	0,86	4,44
1. odběr vs. 2. odběr bez recidivy	0,15	-2,63
1. odběr vs. 2. odběr recidiva	0,71	-4,57
1. odběr vs. 3. odběr bez recidivy	0,06	-3,11
1. odběr vs. 3. odběr recidiva	0,99	1,67
2. odběr vs. 3. odběr bez recidivy	0,99	-0,48
2. odběr vs. 3. odběr recidiva	0,66	6,24

U hladin obou onkomarkerů (CEA a CA-19-9) jsme u pacientů nepozorovali žádnou statisticky významnou souvislost s výskytem recidivy, proto tyto výsledky nejsou v diplomové práci uvedeny.

6.5. MikroRNA a jejich spjitost s přežitím pacientů

Po absolvování léčby jsme u pacientů pozorovali signifikantní nárůst expresní hladiny miR-122-5p při porovnávání 1. odběru (T0) a 2. odběru (T1) ($p= 0,03$, difference -4,12 v **Tabulce 21**) jak je vidět v **Grafu 9**. Následně exprese této miRNA opět klesá u pacientů, kteří v blízké době zemřeli (označení „no“ v grafu).

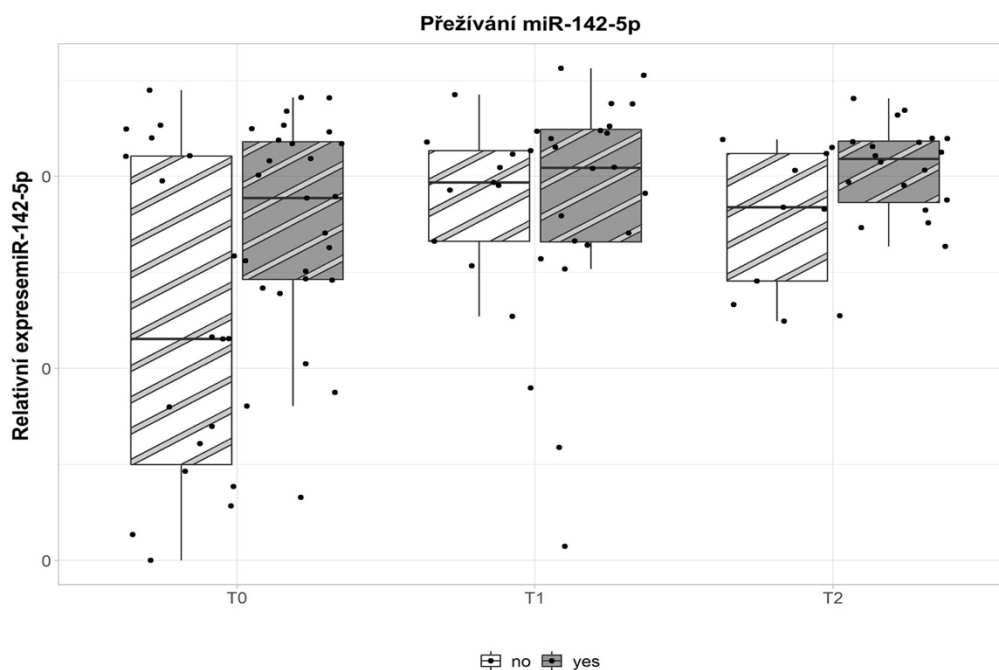


Graf 9: Exprese miR-122-5p u žijících a zemřelých, no-mrtví, yes-živí

Tabulka 21: p-hodnoty a difference miR-122-5p

	p-hodnoty	difference
1. odběr žijící vs. zemřelí	0,43	-2,64
2. odběr žijící vs. zemřelí	0,99	-1,04
3. odběr žijící vs. zemřelí	0,82	-2,19
1. odběr vs. 2. odběr zemřelí	0,03	-4,12
1. odběr vs. 2. odběr žijící	0,19	-2,51
1. odběr vs. 3. odběr zemřelí	0,50	-2,72
1. odběr vs. 3. odběr žijící	0,29	-2,27
2. odběr vs. 3. odběr zemřelí	0,96	1,40
2. odběr vs. 3. odběr žijící	0,99	0,24

Stejnou asociaci jsme pozorovali i u miR-142-5p, jak je znázorněno v **Grafu 10**. Signifikantní je nárůst expresní hladiny miR-142-5p při porovnávání 1. odběru (T0) a 2. odběru (T1) ($p=0,0009$, difference -6,25 v **Tabulce 22**). U této konkrétní miRNA jsme dále pozorovali i hraniční hodnoty při porovnávání exprese miR-142-5p u 1. odběru (T0) a 3. odběru (T2) pacientů, kteří zemřeli (označení no – v grafu) ($p=0,06$, difference -5,006 v **Tabulce 22**).



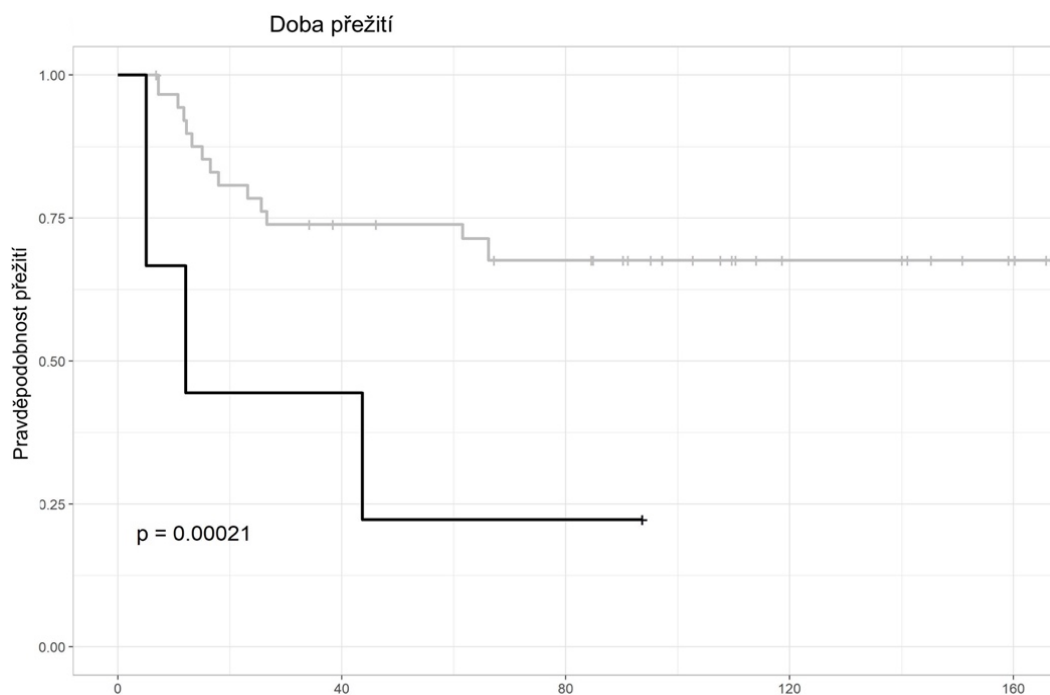
Graf 10: Exprese miR-142-5p u žijících a zemřelých, no-mrtví, yes-živí

Tabulka 22: p-hodnoty a difference miR-142-5p

	p-hodnoty	difference
1. odběr žijící vs. zemřelí	0,03	-5,06
2. odběr žijící vs. zemřelí	1,00	0,03
3. odběr žijící vs. zemřelí	0,95	-1,78
1. odběr vs. 2. odběr zemřelí	0,0009	-6,25
1. odběr vs. 2. odběr žijící	0,93	-1,15
1. odběr vs. 3. odběr zemřelí	0,06	-5,006
1. odběr vs. 3. odběr žijící	0,71	-1,73
2. odběr vs. 3. odběr zemřelí	0,99	1,24
2. odběr vs. 3. odběr žijící	0,99	-0,58

Toto pozorování je ve shodě s porovnáním ve studii (Cervena *et al.*, 2021). U pacientů s recidivou a těch, kteří v blízké době zemřeli jsme dále pozorovali signifikantní pokles u obou sledovaných miRNA ve 3. odběru v porovnání s expresní hladinou pacientů, kteří recidivu neměli a kteří dále žili. I toto pozorování je v souladu s předchozí výsledky oddělení. Tyto získané výsledky činí z obou miRNA slibný potencionální prediktivní marker, zda pacient bude trpět recidivou onemocnění či nikoliv. Ovšem toto tvrzení je třeba ještě ověřit další výzkumem a větším počtem pacientů. Skupina pacientů se špatnou prognózou by na základě hladin těchto miRNA ve vzorku tekuté biopsie mohla být tak dříve identifikována a bylo by možné zahájit účinnou a potřebnou léčbu před manifestací jaterních metastáz.

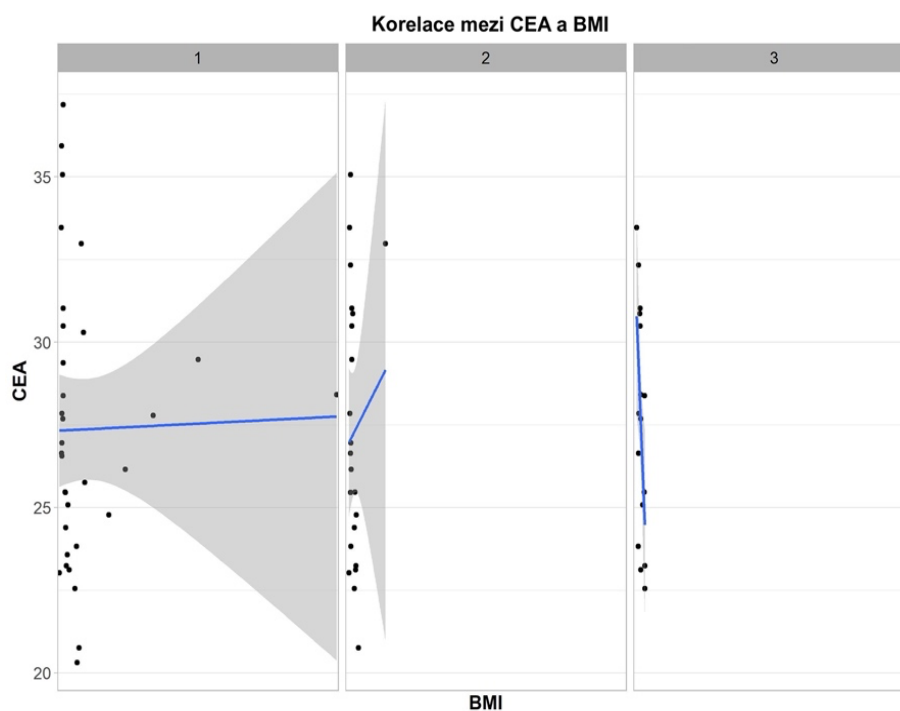
Kaplan-Meierova křivka v **Grafu 11** ukazuje, že přežití pacientů, kteří měli recidivu KRK (v grafu značeno černou křivkou) je kratší než pacientů bez recidivy onemocnění (v grafu značeno šedou křivkou) ($p=0,00021$).



Graf 11: Doba přežití pacientů bez recidivy vs. s recidivou KRK

6.6. Korelace onkomarkerů a BMI pacientů

Korelace hodnot onkomarkeru CEA a BMI hodnot v **Grafu 12** u pacientů v době 3. odběru ukazuje, že čím je BMI nižší, tím vyšší hodnoty onkomarkeru CEA byly naměřeny.



Graf 12: Korelace CEA a BMI

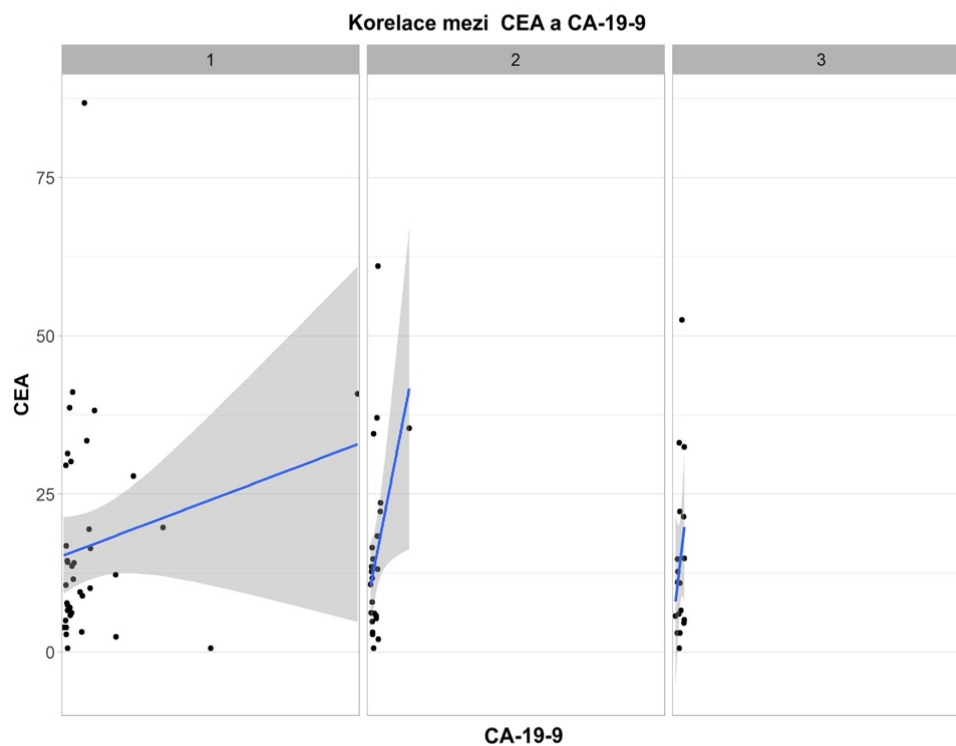
V **Tabulce 23** jsou uvedeny p-hodnoty a difference.

Tabulka 23: p-hodnoty a korelační faktor BMI a CEA

	p-hodnoty	korelační faktor
1. odběr	0,91	0,02
2. odběr	0,63	0,11
3. odběr	0,012	-0,59

6.7. Korelace CEA a CA-19-9

Korelace obou sledovaných sérových onkomarkerů v **Grafu 13** ukazuje, že se zvyšující se hodnotou CEA se také zvyšuje hodnota CA-19-9 v čase 2. odběru. V **Tabulce 24** jsou uvedeny p-hodnoty a difference.



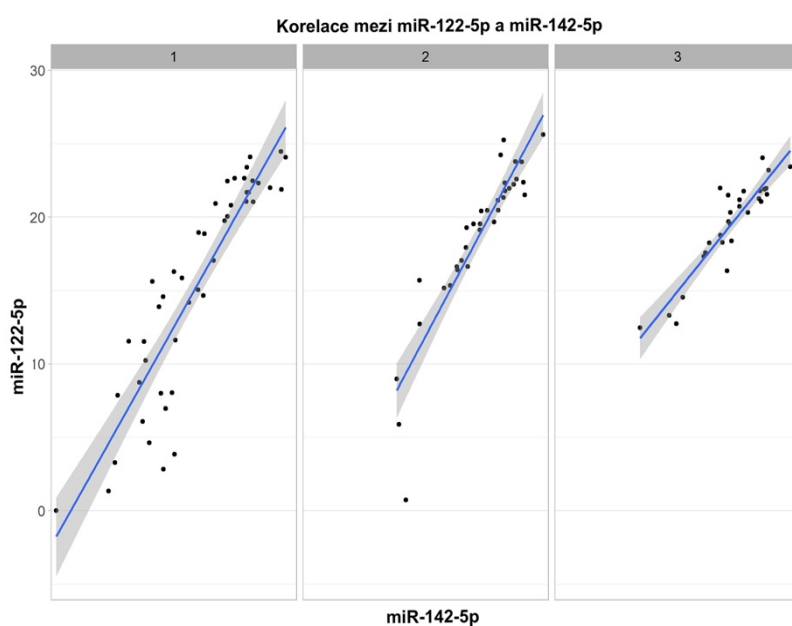
Graf 13: Korelace CEA a CA-19-9

Tabulka 24: p-hodnoty a korelační faktor

	p-hodnoty	korelační faktor
1.odběr	0,245	0,19
2.odběr	0,03	0,42
3.odběr	0,26	0,28

6.8. Korelace miR-122-5p a miR-142-5p v plasmě

Korelací expresních hladin miR-122-5p a miR-142-5p v plasmě jsme zjistili, že zvýšená hladina miR-122-5p je spojena se zvýšenou hladinou miR-142-5p ve všech odběrech (znázorněno v **Grafu 14**). V **Tabulce 25** jsou uvedeny p-hodnoty a difference.



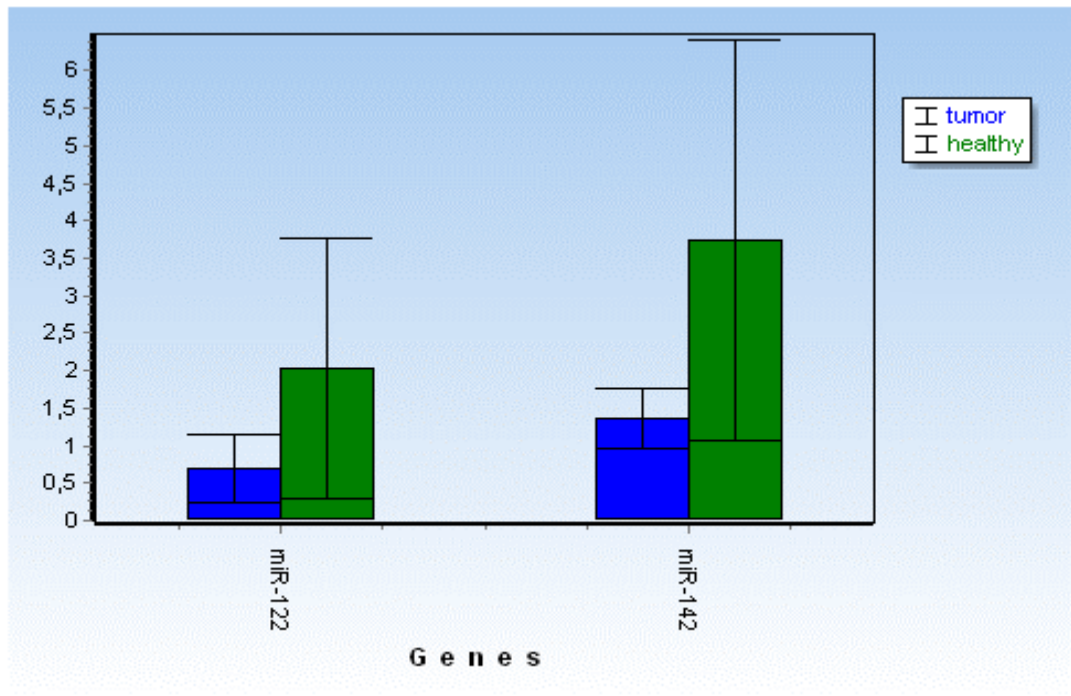
Graf 14: Korelace miR-122-5p a miR-142-5p v plasmě

Tabulka 25: p-hodnoty a korelační faktor

	p-hodnoty	korelační faktor
1.odběr	1,86e-17	0,89
2.odběr	4,95e-14	0,91
3.odběr	3,16e-12	0,92

6.9. Korelace miR-122-5p a miR-142-5p ve tkáních

Expresní hladiny vybraných miRNA jsme obdobně jako v plasmě pacientů stanovili také ve tkáních u vybraných pacientů, kteří měli k dispozici vzorek tkáně tumoru a také vzorek zdravé tkáně. Tato korelace je znázorněna v **Grafu 15**, p-hodnoty a difference jsou uvedeny v **Tabulce 26**. Jak je z **Grafu 15** patrné hladiny obou pozorovaných miRNA jsou ve zdravé tkáni zvýšené oproti tkáni tumoru.



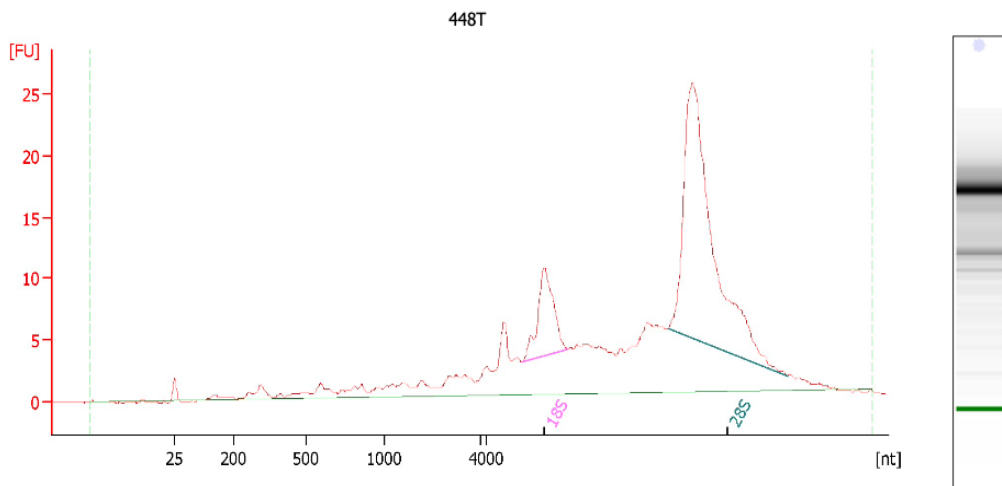
Graf 15: Expresní hladiny miR-122-5p a miR-142-5p ve tkáni tumoru a ve zdravé tkáni

Tabulka 26: p-hodnoty a difference

tumor vs. healthy	p-hodnoty	difference
miR-142-5p	0,06	-2,38
miR-122-5p	0,09	-1,33

6.10. Měření RIN

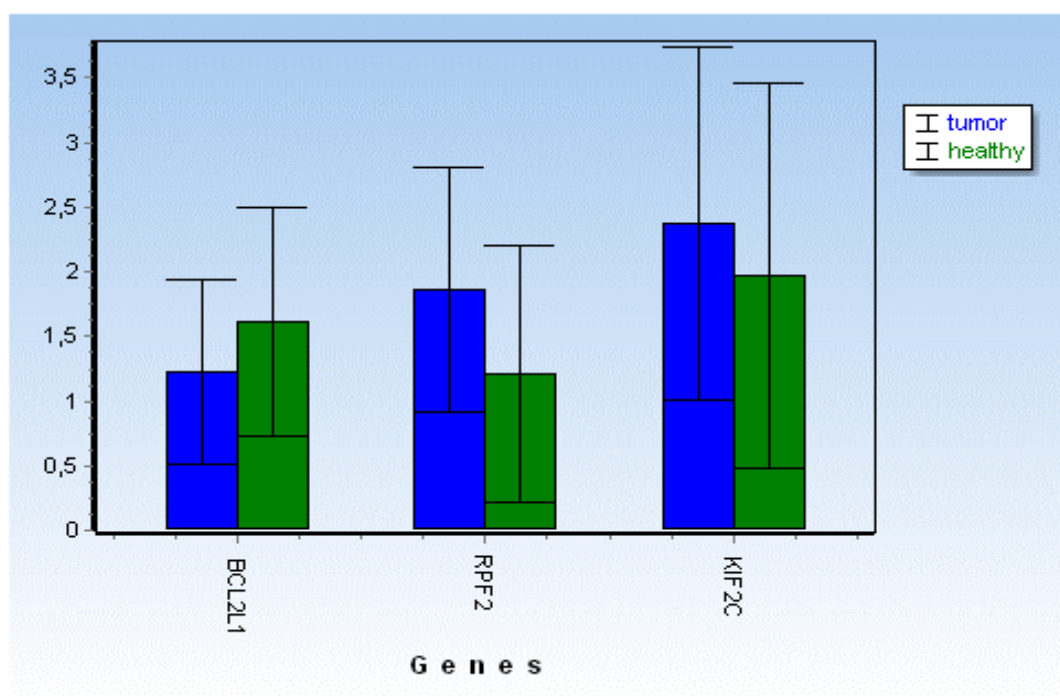
V diplomové práci jsem se dále zabývala studováním cílových genů pro studované miRNA. Abychom mohli studovat expresi těchto genů, je potřebné mít mRNA v dostatečné kvalitě a kvantitě. Kvalitu izolované mRNA jsme stanovili pomocí měření tzv. RIN hodnoty, kde hodnoty vyšší než 7 jsou použitelné pro další analýzy. Všechny vyizolované mRNA vykazovali vysoké hodnoty RIN (**Obrázek č. 9**).



Obrázek 8: RIN pacienta ID 448T, RIN=8,1

6.11. Expresse cílených genů

U vybraných vzorků tkání pacientů byly stanoveny hladiny exprese genů *KIF2C*, *RPF2*, *BCL2L1* a jako referenční byl použit gen *ACTB*. Hladiny exprese byly vždy stanoveny u každého pacienta ze vzorku zdravé tkáně a ze vzorku tkáně tumoru. Nejprve jsme porovnali expresní hladinu targetů mezi zdravou tkání a tkání tumoru (**Graf 16**). Hodnoty difference a p-hodnoty jsou uvedeny v **Tabulce 27**. Signifikantní hodnoty jsme zaznamenali u genu *RPF2* ($p=0,002$, difference 0,65). Hodnoty u zbývajících targetů nevykazovali žádnou signifikanci, to může být způsobeno malým počtem pacientů, ale také tím, že jedna miRNA může mít více různých targetů. A současně může být každý target regulovaný více miRNA.



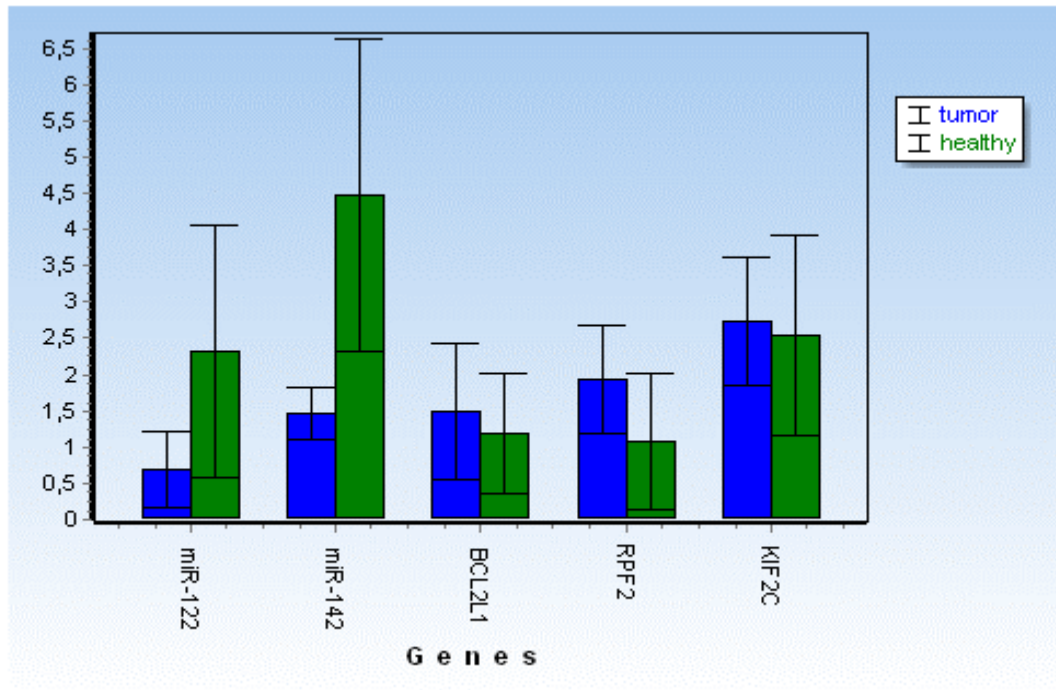
Graf 16: Expresní hladina genů ve zdravé tkáni a ve tkáni tumoru

Tabulka 27: p-hodnoty a difference

tumor vs. healthy	p-hodnoty	difference
<i>RPF2</i>	0,002	0,65
<i>BCL2L1</i>	0,34	-0,40
<i>KIF2C</i>	0,55	0,41

Následně jsme porovnali expresní hladiny sledovaných miRNA s expresními hladinami targetů ve tkáni tumoru a ve zdravé tkáni pacientů. Tato korelace je znázorněna v **Grafu 17**, p-hodnoty a difference jsou uvedeny v **Tabulce 29**. V **Grafu 17** lze pozorovat, že

čím je vyšší expresní hladina miRNA ve zdravé tkáni, tím je nižší expresní hladina vybraných genů. Signifikantní hodnoty jsou opět u genu *RPF2* ($p=0,003$, difference 0,86) a miR-142-5p ($p=0,03$, difference -3,02).



Graf 17: Expresní hladiny miRNA a targetů ve zdravé tkáni a ve tkáni tumoru

Tabulka 28: p-hodnoty a difference

tumor vs. healthy	p-hodnoty	difference
<i>RPF2</i>	0,003	0,86
miR-142-5p	0,03	-3,02
miR-122-5p	0,08	-1,62
<i>BCL2L1</i>	0,57	0,28
<i>KIF2C</i>	0,78	0,2

6.12. Western Blot

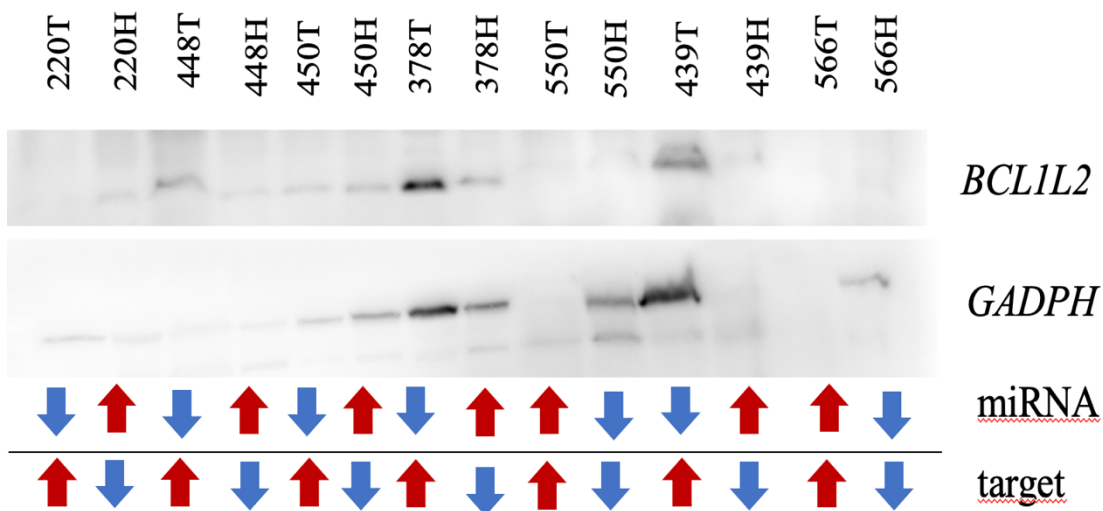
Ze vzorků tkání tumorů a zdravých tkání pacientů jsme nakonec izolovali proteiny, k jejichž analýze jsme využili SDS-PAAGE a Western blot (WB). Při WB jsme studovali expresi proteinů RPF2, KIF2C a BCL1L2. Přehled použitých proteinů je uveden v **Tabulce 30**. Jako referenční jsme zvolili protein GADPH, protože se vyskytuje ve všech lidských tkáních. Cíle byly zvoleny na základě databáze miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>). Pro miR-122-5p je cílový gen *BCL1L2*, pro miR-142-5p jsou cílové geny *RPF2* a *KIF2C*. Vzhledem k malému počtu pacientů a tkání použitých v této metodě nelze z našich výsledků udělat jednoznačný závěr a mezi zvolenými proteiny jsme nepozorovali žádný signifikantní výsledek.

Tabulka 29: Přehled proteinů a jejich funkcí

Protein	Funkce
MCAK	Mitotický kinesin asociovaný s centromerou
BCL2L1	Anti-apoptický protein

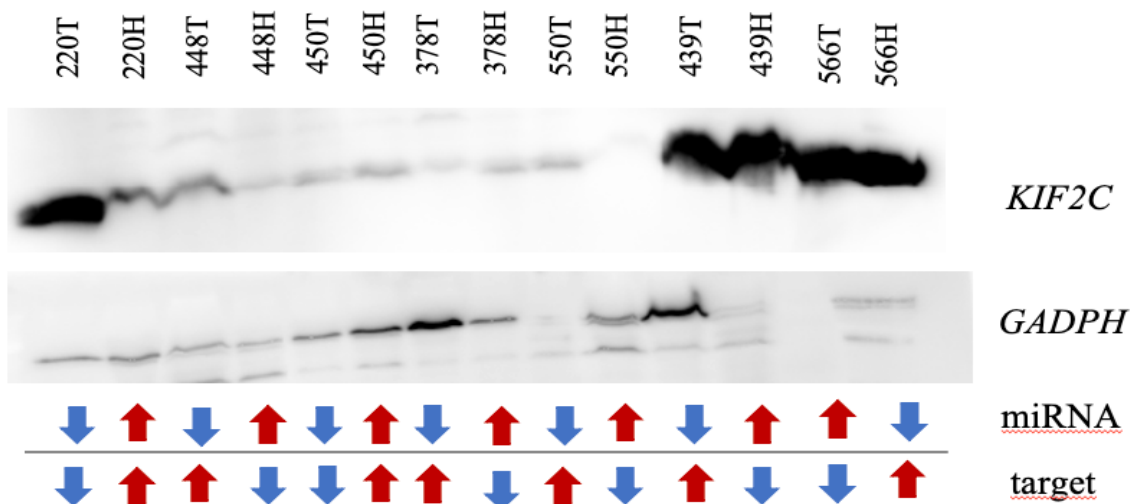
Protein RPF2 se nám bohužel nepodařilo při analýze stanovit, a proto nejsou tyto výsledky v práci dále uvedeny.

Na **Obrázku č. 9** je expresní hladina proteinu BCL2L1 v porovnání s expresními hladinami obou stanovovaných miRNA a targetovaného genu *BCL1L2*. Expresní hladina sledovaných miRNA je zvýšená u vzorků ze zdravé tkáně téměř u všech pacientů (ozn. H) a snižená u vzorků z nádorové tkáně (ozn. T). U pacientů ID 566 a ID 550 jsme pozorovali vyšší hodnotu exprese u vzorků z nádorové tkáně (T) než u zdravé tkáně (H). U cíleného genu jsou tyto hodnoty opačné. Mezi hladinou exprese cíleného genu a hladinou exprese proteinu je mezi pacienty velká variabilita. U části pacientů odpovídá zvýšená hladina exprese targetu i vyšší expresi proteinu ve tkáni tumoru než ve zdravé tkáni (ID 448 a 378). Ovšem u některých pacientů jsou tyto hodnoty opačné nebo je nelze zhodnotit.



Obrázek 9: Expresní hladina proteinu *BCL1L2* a porovnání exprese miRNA a targetovaného genu

Na **Obrázku č. 10** je expresní hladina proteinu *KIF2C* v porovnání s expresními hladinami obou stanovovaných miRNA a cíleného genu *KIF2C*. Expresní hladina sledovaných miRNA je zvýšená u vzorků ze zdravé tkáně pacientů (ozn. H) a snižená u vzorků z nádorové tkáně (ozn. T). Pouze u pacienta ID 566 je vyšší expresní hladina sledovaných miRNA u vzorku tkáně tumoru (T) než u vzorku zdravé tkáně (H). U cíleného genu *KIF2C* jsou hodnoty exprese různé, u některých pacientů jsou zvýšené ve tkáni tumoru (T) (ID 448, 378, 550 a 439), ale u některých pacientů je hladina exprese vyšší u zdravé tkáně (H) (ID 220, 450 a 566). Hladina exprese proteinu je opět značně variabilní. U pacientů ID 448 a 550 odpovídá zvýšená hladina exprese cíleného genu vyšší expresní hladině proteinu, u dalších pacientů jsou expresní hladiny opačné nebo je nelze zhodnotit.



Obrázek 10: Expresní hladina proteinu *KIF2C* a porovnání exprese miRNA a targetovaného genu

7. Diskuze

V posledních letech došlo k velkému pokroku jak v diagnostice, tak i v terapii KRK, přesto je incidence i úmrtnost na KRK stále vysoká. Z tohoto důvodu je snaha o nalezení nových a specifických biomarkerů stále aktuální téma. Nové specifičtější biomarkery by mohly umožnit časnou detekci onemocnění a tím zlepšit samotnou prognózu pacientů. Další oblastí, kde by se nové biomarkery mohly uplatnit je dlouhodobé sledování pacienta a předpovědět, jak pacient bude na vybranou léčbu reagovat. Spolu s rozvojem diagnostiky a terapie došlo také k rozvoji samotných technik k získávání biologického materiálu od pacientů. Jedná se především o stále méně invazivní techniky provádění odběru, kdy začíná převládat trend tekuté biopsie. Tekutá biopsie umožňuje odebrat vzorky opakovaně bez větší zátěže na stav pacienta, jako by tomu bylo u odebrání tkáně při samotném chirurgickém zákroku. V tekuté biopsii lze sledovat změny v heterogenitě nádoru, které nastávají v čase. Nejčastěji studovanými biomarkery jsou cirkulující nekódující RNA a cirkulující volná DNA.

Cirkulující miRNA se zabývala i má diplomová práce, která navazuje na předchozí studie Oddělení molekulární biologie nádorů ÚEM. V těchto studiích byly identifikovány kandidátní miRNA (miR-122-5p a miR-142-5p), u kterých byly prokázány signifikantní rozdíly mezi zdravými jedinci (cancer-free individuals) a pacienty s KRK. Tyto miRNA vykazují potenciál pro sledování účinnosti terapie u pacientů trpících KRK, případně pro predikci recidivy onemocnění. Předchozí studie se zabývala pouze karcinomem rekta, protože mezi karcinomem rekta a karcinomem tlustého střeva jsou molekulárně-genetické i klinické rozdíly.

V této diplomové práci jsme pozorovali, že obě miRNA, miR-122-5p i miR142-5p mají signifikantně vyšší expresní hladiny v plasmě u pacientů s KRK než byly naměřeny u zdravých kontrol. U pacientů s rektálním karcinomem byl trend přesně opačný. Expresní hladiny obou miRNA byly výrazně nižší v plasmě pacientů s rektálním karcinomem ve srovnání se zdravými kontrolami. Nicméně u obou typů nádorů se pozorovaly výrazné rozdíly v expresi mezi pacienty a kontrolami a lze proto usuzovat, že námi sledované miRNA vykazují diagnostický potenciál u pacientů s KRK.

MiR-122-5p je spojována s výskytem rakoviny jater, a protože játra jsou hlavní oblastí, kde se vyskytují metastázy při KRK, je tato miRNA také v oblasti zájmu při studiu KRK. Bylo prokázáno, že miR-122-5p zvyšuje citlivost buněk jaterních karcinomů na

oxaliplatinu cílením na dráhu Wnt/ β -catenin, konkrétně na gen *MDR1* (Cao and Yin, 2019). Oxaliplatin je běžně používaný lék při metastatickém KRK, avšak při dlouhodobém používání může vést k rezistenci na toto léčivo. Další studie prokázala, že downregulace miR-122-5p způsobuje nadměrnou expresi antiapoptického proteinu XIAP v buňkách KRK rezistentních na oxaliplatin, ale při obnovení exprese miR-122-5p může opět navést buňky k apoptóze, která je zprostředkována pomocí inhibice exprese proteinu XIAP (Hua *et al.*, 2018). Další studie naopak uvádí zvýšenou hladinu miR-122-5p v nádorové tkáni a její asociaci s výskytem metastáz KRK v játrech (Sun *et al.*, 2020).

Zvýšenou expresní hladinu miR-142-5p v KRK uvádí ve své studii (Islam *et al.*, 2018). S touto zvýšenou expresní hladinou byla spojena nadměrná buněčná proliferace a tvorba buněčných kolonií. V jiné studii Liu a kol. byla zaznamenána negativní korelace mezi miR-142-5p a enzymem sukcinát dehydrogenáza B (SDHB) (Liu *et al.*, 2017). Tento protein je součástí Krebsova cyklu, buněčné proliferace a apoptózy. Snížená hladina SDHB způsobila v buňkách KRK přechod z oxidativní fosforylace na aerobní glykolýzu a tím byla podpořena proliferace buněk. Kong a kol. se ve své studii zabývali expresí miR-142-5p a proteinu *Tiam1* ve tkáni KRK (Kong *et al.*, 2019). Zjistili, že exprese miR-142-5p byla signifikantně nižší ve tkáni KRK než v přilehlých tkáních a exprese genu *Tiam1* byla naopak vyšší ve tkáni KRK než v přilehlé tkáni. Tímto pozorováním byla zjištěna signifikantně negativní korelace mezi expresí *Tiam1* a miR-142-5p. Ve stejné studii, byla porovnáváním exprese miR-142-5p mezi I. a II. stádiem a III. a IV. stádiem KRK pozorována významně vyšší exprese v nižších stádiích a zároveň bylo zjištěno, že exprese miR-142-5p je vyšší u pacientů s KRK bez metastáz než u KRK s metastázami do lymfatických uzlin. Závěrem této studie bylo, že miR-142-5p a *Tiam1* jsou potencionální markery v diagnostice KRK. Stejný pokles v expresní hladině miR-142-5p u pacientů ve III. a IV. stádiu KRK jsme pozorovali také, ale v našem případě nebylo možné stanovit statistickou významnost tohoto klesajícího trendu, vzhledem k malému počtu pacientů zahrnutých do studie, kteří měli KRK ve IV. stádiu.

Tím, že naše výsledky dokazují, že obě miRNA vykazují signifikantně vyšší expresní hladinu u pacientů s KRK než u zdravých kontrol lze říci, že obě sledované miRNA mají onkogenní účinek. Expresní hladiny obou miRNA mezi sebou korelovaly ve všech časových odběrech, proto by bylo možné je vzájemně verifikovat.

Zajímavým zjištěním bylo, že u hladin obou onkomarkerů (CEA a CA-19-9) jsme u pacientů nepozorovali žádnou statisticky významnou souvislost s výskytem recidivy. To opět poukazuje na jejich nízkou senzitivitu a specifitu vůči diagnostice návratu onemocnění.

Při terapii pacientů s KRK je také důležité sledovat jejich odpověď na podávanou terapii a případný návrat (recidivu) onemocnění, který může nastat. Pro sledování účinnosti terapie je proto vhodné hledat nové biomarkery, které by umožnily nejen neinvazivní získání potřebných vzorků ale také časnou a personalizovanou diagnostiku návratu onemocnění. U pacientů bez recidivy a těch co zůstali naživu v průběhu jejich setrvání ve studii jsme pozorovali signifikantní nárůst u expresních hladin obou miRNA mezi 1. odběrem a dalšími odběry, to znamená, že pacienti, kteří odpovídali na léčbu vykazovali po léčbě zvýšené hladiny obou miRNA v porovnání s hladinami v čase diagnózy.

Dále jsme se věnovali sledování expresních hladin miRNA v tkáních a zároveň i jejich cílových genů a proteinů v nádorové tkáni. Na základě *in silico* dat byly vybrány tři již validované cílové geny, *RPF2*, *BCLIL2* a *KIF2C*. Kromě genu *BCLIL2* jsme zaznamenali vyšší expresní hladiny cílových genů v nádorové tkáni v porovnání se zdravou tkáni. Tyto výsledky poukazují na korelaci mezi miRNA-cílový gen, kde jsme v případě obou miRNA zaznamenali přesně opačný trend. U genu *BCLIL2* může být pozorovaný opačný trend vysvětlen malým počtem jedinců zahrnutých do studie. Transkripční regulace genu *BCLIL2* se účastní transkripční faktor NF- κ B. Ve studii González-Quezada a kol., 2018 autoři pozorovali expresi NF- κ B u pacientů s KRK ve všech stádiích onemocnění a u zdravé kontrolní skupiny. Bylo zjištěno, že u II., III, i IV. stádia KRK byla exprese transkripčního faktoru vyšší oproti kontrolní skupině. Dále pozorovali významný nárůst exprese mezi počátečními a pokročilými stádii KRK a NF- κ B byl pozitivně spojen s progresí KRK. S touto studií jsou v souladu i naše výsledky zvýšené exprese *BCLIL2* v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni (González-Quezada et al., 2018).

V souladu se studií autorů Li a kol. 2022 jsou naše výsledky, kde je signifikantní hodnota targetu genu *RPF2*, který také vykazoval zvýšenou expresní hladinu v tkáni tumoru oproti zdravé tkáni. Autoři ve své studii uvádí, že gen *RPF2* může aktivovat signální dráhu AKT/GSK-3 β prostřednictvím interakce s CARM1 a tím podporuje EMT a zvyšuje migrační a invazní schopnost buněk KRK. Tato zjištění otevírají otázku, zda by se *RPF2* mohl stát

novým terapeutickým cílem při léčbě lokálního i metastazujícího KRK (Li *et al.*, 2022), (Li *et al.*, 2017).

Výsledky mé diplomové práce dokazují, že expresní hladiny obou miRNA v plazmě se liší u pacientů s nádory tlustého střeva a rektosigmoidálního spojení oproti zdravým kontrolám. Závěrem lze říci, že studované miRNA představují slibné biomarkery jak pro detekci, tak i pro stanovení předpovědi návratu onemocnění. Nicméně pro zavedení do klinické praxe je potřeba ještě provést další studie na rozsáhlejšímu počtu pacientů.

8. Závěr

Při KRK, a stejně tak u dalších nádorových onemocněních, hraje důležitou roli časná a přesná diagnostika. Brzké odhalení onemocnění zvyšuje šanci pacientů na účinnou terapii a celkové uzdravení. Proto stále vzrůstá tlak na nalezení nových a spolehlivých biomarkerů, která by pomohly detekovat onemocnění v co nejčasnější fázi. Stejně tak se stále více klade důraz na samotné získávání vzorků pro diagnostiku z těla pacientů a dává se přednost, co nejméně invazivním přístupům jako je tekutá biopsie.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda by miR-122-5p a miR-142-5p mohly sloužit jako diagnostické, prediktivní či prognostické markery u pacientů s KRK. Byla zvolena skupina pacientů s karcinomem tlustého střeva a rektosigmoideálního spojení (C18-C19), abychom porovnali, zda a jak se výsledky liší od předchozí studie (Cervena *et al.*, 2021), která pracovala pouze s pacienty s karcinomem rekta (C20). Dalším úkolem bylo zjistit, zda vybrané miRNA vykazují slibnější potenciál než v současnosti běžně využívané markery CEA a CA9-19.

V této práci jsme prokázali statisticky významné rozdíly v expresních hladinách obou zvolených miRNA u pacientů s KRK a kontrolní skupiny. Také jsme pozorovali signifikantní rozdíly v hodnotách exprese mezi jednotlivými odběry v tekuté biopsii u obou miRNA. Korelací získaných výsledků jsme zjistili, že zvyšující se hladina miR-122-5p odpovídá zvyšující se hladině miR-142-5p. Dále jsme poukázali na souvislost poklesu hladiny miR-122-5p v čase rok od diagnózy a recidivou onemocnění u pacientů a u těch, kteří v krátké době zemřeli. Hraniční signifikance byla také prokázána i u miR-142-5p.

Pomocí RT-PCR jsme identifikovali také signifikantní změny v expresi genu *RPF2* (cílový gen pro vazbu miR-142-5p) ve tkáních pacientů v porovnání se zdravou tkání. A tento gen by se tak mohl potencionálně stát terapeutickým cílem při léčbě KRK.

Žádnou asociaci sérových onkomarkerů ve vztahu k diagnostice recidivy onemocnění v žádném z časových odběrů jsme neprokázali.

Na základě výsledků této diplomové práce lze konstatovat, že miR-122-5p a miR-142-5p by mohly představovat slibné diagnostické, prognostické i prediktivní markery u kolorektálního karcinomu. Má diplomová práce byla součástí výzkumu Oddělení molekulární biologie nádorů ÚEM, kde budou následovat ještě další studie v tomto výzkumu.

9. Použitá literatura

- Abu-Ghazaleh, N. *et al.* (2022) 'Worldwide prevalence of Lynch syndrome in patients with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis', *Genetics in Medicine*, 24(5), pp. 971–985. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.01.014>.
- Advani, S.M. *et al.* (2021) 'Epidemiology and Molecular-Pathologic Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer', *Clinical Colorectal Cancer*, 20(2), pp. 137-147.e1. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.09.007>.
- Ali Syeda, Z. *et al.* (2020) 'Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), p. 1723. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>.
- Alix-Panabières, C. and Pantel, K. (2021) 'Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application', *Cancer Discovery*, 11(4), pp. 858–873. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>.
- Bevan, R. and Rutter, M.D. (2018) 'Colorectal Cancer Screening—Who, How, and When?', *Clinical Endoscopy*, 51(1), pp. 37–49. Available at: <https://doi.org/10.5946/ce.2017.141>.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001) 'Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), pp. 89–95. Available at: <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- Boland, C.R. and Goel, A. (2010) 'Microsatellite Instability in Colorectal Cancer', *Gastroenterology*, 138(6), pp. 2073-2087.e3. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>.
- Campos, F.G. (2017) 'Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge', *World Journal of Gastroenterology*, 23(28), p. 5041. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i28.5041>.
- Cao, F. and Yin, L.-X. (2019) 'miR-122 enhances sensitivity of hepatocellular carcinoma to oxaliplatin via inhibiting MDR1 by targeting Wnt/ β -catenin pathway', *Experimental and Molecular Pathology*, 106, pp. 34–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.10.009>.
- Carethers, J.M. (2018) 'Risk factors for colon location of cancer', *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 3, pp. 76–76. Available at: <https://doi.org/10.21037/tgh.2018.09.15>.
- Cervena, K. *et al.* (2021) 'Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy In Rectal Cancer Patients', *Frontiers in Oncology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.702258>.
- Cervena K *et al.* (2023) 'Can Plasma miR- 122-5 and miR-142-5p Predict Relapse in Metastatic Colorectal Cancer Patients?', *J Dis Markers*, 8(1).
- Cui, M. *et al.* (2019) 'Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge', *Frontiers in Genetics*, 10, p. 626. Available at: <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00626>.
- Cyrany, J. *et al.* (2018) 'Familial adenomatous polyposis', *Vnitřní lékařství*, 64(issue 6), pp. 635–641. Available at: <http://casopisvnitrnilekarstvi.cz/doi/10.36290/vnl.2018.087.html>.

- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) 'A genetic model for colorectal tumorigenesis', *Cell*, 61(5), pp. 759–767. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I).
- Ferlay, J. *et al.* (2010) 'Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008', *International Journal of Cancer*, 127(12), pp. 2893–2917. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- Filip, S. *et al.* (2020) 'Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients—Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), p. 5255. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21155255>.
- Ganesh, K. *et al.* (2019) 'Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(6), pp. 361–375. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0126-x>.
- Gold, P. and Freedman, S.O. (1965) 'DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES', *Journal of Experimental Medicine*, 121(3), pp. 439–462. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.121.3.439>.
- González-Quezada, B.A. *et al.* (2018) 'Expression profile of NF- κ B regulated genes in sporadic colorectal cancer patients', *Oncology Letters*, 15(5), pp. 7344–7354. Available at: <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8201/HTML>.
- Goodwin, R. and Asmis, T. (2009) 'Overview of Systemic Therapy for Colorectal Cancer', *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(04), pp. 251–256. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242465>.
- Granados-Romero, J.J. *et al.* (2017a) 'Colorectal cancer: a review', *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11), p. 4667. Available at: <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914>.
- Granados-Romero, J.J. *et al.* (2017b) 'Colorectal cancer: a review', *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11), p. 4667. Available at: <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914>.
- Half, E., Bercovich, D. and Rozen, P. (2009) 'Familial adenomatous polyposis', *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1), p. 22. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-22>.
- Hammarström, S. (1999) 'The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues', *Seminars in Cancer Biology*, 9(2), pp. 67–81. Available at: <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>.
- Harrison, S. and Benziger, H. (2011) 'The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications', *The Surgeon*, 9(4), pp. 200–210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.surge.2011.01.011>.
- Henry, N.L. and Hayes, D.F. (2012) 'Cancer biomarkers', *Molecular Oncology*, 6(2), pp. 140–146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>.
- Hong, S.N. (2018) 'Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer', *Intestinal Research*, 16(3), p. 327. Available at: <https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.3.327>.

- Hua, Y. *et al.* (2018) ‘miR-122 Targets X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein to Sensitize Oxaliplatin-Resistant Colorectal Cancer Cells to Oxaliplatin-Mediated Cytotoxicity’, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(5), pp. 2148–2159. Available at: <https://doi.org/10.1159/000495832>.
- Illingworth, R.S. and Bird, A.P. (2009) ‘CpG islands - “A rough guide”’, *FEBS Letters*, 583(11), pp. 1713–1720. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>.
- Islam, F. *et al.* (2018) ‘MiR-142-5p act as an oncogenic microRNA in colorectal cancer: Clinicopathological and functional insights’, *Experimental and Molecular Pathology*, 104(1), pp. 98–107. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.01.006>.
- Johnson, C.M. *et al.* (2013) ‘Meta-analyses of colorectal cancer risk factors’, *Cancer Causes & Control*, 24(6), pp. 1207–1222. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0201-5>.
- Kalyan, A. *et al.* (2018) ‘Updates on immunotherapy for colorectal cancer’, *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(1), pp. 160–169. Available at: <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.01.17>.
- Karen Miller (2005) *Mysterious Cancer*, NASA. Available at: https://www.nasa.gov/vision/space/livinginspace/09may_mysteriouscancer.html (Accessed: 11 February 2023).
- Kim, A.Y. (2010) ‘Imaging Diagnosis of Colorectal Cancer’, *Journal of the Korean Medical Association*, 53(7), p. 562. Available at: <https://doi.org/10.5124/jkma.2010.53.7.562>.
- KIM, J.-E. *et al.* (2004) ‘Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population’, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(2), pp. 182–186. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03219.x>.
- Kong, W. *et al.* (2019) ‘Diagnostic Value of miR-142-5p and Tiam-1 in Colon Cancer Patients’, *Clinical Laboratory*, 65(12/2019). Available at: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.190721>.
- Lawrie, C.H. *et al.* (2008) ‘Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma’, *British Journal of Haematology*, 141(5), pp. 672–675. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) ‘The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*’, *Cell*, 75(5), pp. 843–854. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
- Li, H. *et al.* (2022) ‘Ribosome production factor 2 homolog promotes migration and invasion of colorectal cancer cells by inducing epithelial–mesenchymal transition via AKT/Gsk-3 β signaling pathway’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 597, pp. 52–57. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.090>.
- Li, X. *et al.* (2017) ‘Oxidative stress destabilizes protein arginine methyltransferase 4 via glycogen synthase kinase 3 β to impede lung epithelial cell migration’, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 313(3), pp. C285–C294. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00073.2017>.
- Lianidou, E. and Pantel, K. (2019) ‘Liquid biopsies’, *Genes, Chromosomes and Cancer*, 58(4), pp. 219–232. Available at: <https://doi.org/10.1002/gcc.22695>.

- Liu, S. *et al.* (2017) ‘miR-142-5p promotes development of colorectal cancer through targeting SDHB and facilitating generation of aerobic glycolysis’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, pp. 1119–1127. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.134>.
- Lu, W. *et al.* (2020) ‘FOLFOX treatment response prediction in metastatic or recurrent colorectal cancer patients via machine learning algorithms’, *Cancer Medicine*, 9(4), pp. 1419–1429. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.2786>.
- Mantovani, G. (2020) ‘Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer HNPCC: From Diagnosis to Surgical Management of the Main Hereditary Form of Colorectal Cancer: A Review’, *Journal of Surgery and Research*, 03(01). Available at: <https://doi.org/10.26502/jsr.2642-10020051>.
- Mármol, I. *et al.* (2017a) ‘Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), p. 197. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- Mármol, I. *et al.* (2017b) ‘Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), p. 197. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- Morgan, E. *et al.* (2023) ‘Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN’, *Gut*, 72(2), pp. 338–344. Available at: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>.
- Mori, M.A. *et al.* (2019) ‘Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease’, *Cell metabolism*, 30(4), pp. 656–673. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2019.07.011>.
- Mouradov, D. *et al.* (2013) ‘Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations’, *American Journal of Gastroenterology*, 108(11), pp. 1785–1793. Available at: <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.292>.
- Nazemalhosseini Mojarad, E. *et al.* (2013) ‘The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer.’, *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 6(3), pp. 120–8.
- Nguyen, L.H., Goel, A. and Chung, D.C. (2020) ‘Pathways of Colorectal Carcinogenesis’, *Gastroenterology*, 158(2), pp. 291–302. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>.
- Nojadeh, J.N., Behrouz Sharif, S. and Sakhinia, E. (2018) ‘Microsatellite instability in colorectal cancer.’, *EXCLI journal*, 17, pp. 159–168. Available at: <https://doi.org/10.17179/excli2017-948>.
- O’Brien, J. *et al.* (2018) ‘Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation’, *Frontiers in Endocrinology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00402/full>.
- Osagiede, O. *et al.* (2019) ‘Predictors of palliative treatment in stage IV colorectal cancer’, *The American Journal of Surgery*, 218(3), pp. 514–520. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2018.12.016>.

- Otmami, K. and Lewalle, P. (2021) ‘Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications’, *Frontiers in Oncology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.708765>.
- Patel, S.G. and Ahnen, D.J. (2018) ‘Colorectal Cancer in the Young’, *Current Gastroenterology Reports*, 20(4), p. 15. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0618-9>.
- Pino, M.S. and Chung, D.C. (2010a) ‘The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer’, *Gastroenterology*, 138(6), pp. 2059–2072. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- Pino, M.S. and Chung, D.C. (2010b) ‘The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer’, *Gastroenterology*, 138(6), pp. 2059–2072. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- Rao, H. *et al.* (2021) ‘Clinical value of serum CEA, CA24-2 and CA19-9 in patients with colorectal cancer’, *Clinical Laboratory*, 67(4), pp. 1079–1089. Available at: <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2020.200828>.
- Rejhová, A. *et al.* (2018) ‘Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, pp. 582–594. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.039>.
- Rhee, Y.-Y., Kim, K.-J. and Kang, G.H. (2017) ‘CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway’, *Gut and Liver*, 11(1), pp. 38–46. Available at: <https://doi.org/10.5009/gnl15535>.
- Sawicki, T. *et al.* (2021) ‘A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis’, *Cancers*, 13(9), p. 2025. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>.
- Schirrmacher, V. (2019) ‘From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review).’, *International journal of oncology*, 54(2), pp. 407–419. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>.
- Schreuders, E.H. *et al.* (2015) ‘Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes’, *Gut*, 64(10), pp. 1637–1649. Available at: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309086>.
- Schwarz, D.S. *et al.* (2003) ‘Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex’, *Cell*, 115(2), pp. 199–208. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1).
- Seeber, A. *et al.* (2018) ‘Anti-Angiogenics: Their Value in Colorectal Cancer Therapy’, *Oncology Research and Treatment*, 41(4), pp. 188–193. Available at: <https://doi.org/10.1159/000488301>.
- Stark, V.A. *et al.* (2021) ‘The Role of miRNAs, miRNA Clusters, and isomiRs in Development of Cancer Stem Cell Populations in Colorectal Cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(issue 3), pp. 1–17. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1424>.
- Strimbu, K. and Tavel, J.A. (2010) ‘What are biomarkers?’, *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), pp. 463–466. Available at: <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>.
- Sun, L. *et al.* (2020) ‘Serum exosomal miR-122 as a potential diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer with liver metastasis’, *Journal of Cancer*, 11(3), pp. 630–637. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.33022>.

- Thomsen, M. *et al.* (2018) ‘Prognostic role of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in metastatic colorectal cancer: a BRAF-mutant subset with high CA 19-9 level and poor outcome’, *British Journal of Cancer*, 118(12), pp. 1609–1616. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0115-9>.
- Tomasova, K. *et al.* (2020) ‘Telomere maintenance in interplay with DNA repair in pathogenesis and treatment of colorectal cancer’, *Mutagenesis*, 35(3), pp. 261–271. Available at: <https://doi.org/10.1093/mutage/geaa005>.
- Vodenkova, S. *et al.* (2020) ‘5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future’, *Pharmacology & therapeutics*, 206. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.107447>.
- Vodicka, P. *et al.* (2019) ‘DNA repair capacity and response to treatment of colon cancer’, <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0070>, 20(17), pp. 1225–1233. Available at: <https://doi.org/10.2217/PGS-2019-0070>.
- Vodicka, P. *et al.* (2020) ‘Oxidative Damage in Sporadic Colorectal Cancer: Molecular Mapping of Base Excision Repair Glycosylases in Colorectal Cancer Patients’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), p. 2473. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS21072473>.
- Ward, R.L. *et al.* (2003) ‘Adverse Prognostic Effect of Methylation in Colorectal Cancer Is Reversed by Microsatellite Instability’, *Journal of Clinical Oncology*, 21(20), pp. 3729–3736. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.03.123>.
- Winter, J. *et al.* (2009) ‘Many roads to maturity’, *Nature Cell Biology*, 11(3), pp. 228–234. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>.
- Wittekind, Ch. and Sobin, L.H. (2004) *TMN Classification of malignant tumors*. 6th edn. UICC.
- Wu, Y. *et al.* (2021) ‘Circulating microRNAs: Biomarkers of disease’, *Clinica Chimica Acta*, 516, pp. 46–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.008>.
- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X. and Fang, J.-Y. (2020) ‘Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer’, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), p. 22. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>.
- Yamagishi, H. *et al.* (2016) ‘Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers’, *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), p. 4. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>.
- Yao, Q., Chen, Y. and Zhou, X. (2019) ‘The roles of microRNAs in epigenetic regulation’, *Current Opinion in Chemical Biology*, 51, pp. 11–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.024>.
- Zeineddine, F.A. *et al.* (2023) ‘Survival improvement for patients with metastatic colorectal cancer over twenty years’, *npj Precision Oncology*, 7(1), p. 16. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41698-023-00353-4>.
- Zhang, N. *et al.* (2021) ‘The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, p. 111099. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.111099>.

Internetové zdroje: <https://gco.iarc.fr>

<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>

<https://postudium.cz>

10. Seznam obrázků

Obrázek 1: Maligní transformace buňky (Karen Miller, 2005).....	12
Obrázek 2: Počet nových případů KRK celosvětově v roce 2020 (GLOBOCAN, 2020).....	14
Obrázek 3: Incidence a mortalita nádorových onemocnění v ČR v roce 2020 (GLOBOCAN, 2020)	14
Obrázek 4: Biogeneze miRNA, upraveno (Winter et al., 2009).....	30
Obrázek 5: Centrifugace krve k oddělení plazmy (zdroj: Metody separace buněk a funkční testy lymfocytů, ústav imunologie 2LF UK a FN Motol)	36
Obrázek 6: Čip ve stanici s pístem (RNA 6000 Nano Assay QUick Reference Guide.....)	44
Obrázek 7: Schéma čipu pro měření RIN	44
Obrázek 8: RIN pacienta ID 448T, RIN=8,1	62
Obrázek 9: Expresní hladina proteinu BCL1L2 a porovnání exprese miRNA a targetovaného genu.....	65
Obrázek 10: Expresní hladina proteinu RPF2/KIF2C a porovnání exprese miRNA a targetovaného genu	65

11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled systému TNM (upraveno) (Kim, 2010).....	12
Tabulka 2: Přehled hodnot CEA a CA-19-9 (zdroj: postudium.cz).....	25
Tabulka 3: Charakteristika pacientů	32
Tabulka 4: Vybrané miRNA, jejich sekvence a lokalizace, zdroj: DIANA TarBase v8.0.....	36
Tabulka 5: Reakční směs pro reverzní transkripci (1 vzorek)	36
Tabulka 6: Teplotní profil reverzní transkripce	37
Tabulka 7: Reakční směs pro preamplifikaci (1 vzorek)	37
Tabulka 8: Teplotní profil preamplifikace.....	38
Tabulka 9: Reakční směs pro Real-Time PCR (1 vzorek).....	38
Tabulka 10: Teplotní profil Real-Time PCR	38
Tabulka 11: Reakční směs pro reverzní transkripci (1 vzorek)	40
Tabulka 12: Teplotní profil reverzní transkripce	41
Tabulka 13: Reakční směs pro Real-Time PCR	43
Tabulka 14: Teplotní profil Real-Time PCR	43
Tabulka 15: Reakční směs pro přípravu gelu	45
Tabulka 16: Reakční směs pro přípravu "stacking" gelu.....	45
Tabulka 17: p-hodnoty a difference u miR-122-5p	48
Tabulka 18:p-hodnoty a difference u miR-142-5p	49
Tabulka 19: p-hodnoty a difference u miR-122-5p	52
Tabulka 20:p-hodnoty a difference u miR-142-5p	53
Tabulka 21:p-hodnoty a difference miR-122-5p	54
Tabulka 22:p-hodnoty a difference miR-142-5p	55
Tabulka 23:p-hodnoty a korelační faktor BMI a CEA	57
Tabulka 24: p-hodnoty a korelační faktor.....	58
Tabulka 25:p-hodnoty a korelační faktor.....	59
Tabulka 26: p-hodnoty a difference	60
Tabulka 28: p-hodnoty a difference	62
Tabulka 29: p-hodnoty a difference	63
Tabulka 30: Přehled proteinů a jejich funkcí.....	64

12. Seznam grafů

Graf 1:Expresse miR-122-5p u kontrol a pacientů.....	42
Graf 2:Expresse miR-142-5p u kontrol a pacientů.....	48
Graf 3:Expresse miR-122-5p u jednotlivých odběrů a pohlaví.....	49
Graf 4: Expresse miR-142-5p u jednotlivých odběrů a pohlaví.....	49
Graf 5: Expresse miR-122-5p a stádium KRK.....	51
Graf 6: Expresse miR-142-5p a stádium KRK.....	51
Graf 7: Expresse miR-122-5p u jednotlivých odběrů pacientů a recidivy	52
Graf 8: Expresse miR-142-5p u jednotlivých odběrů pacientů a recidivy	53
Graf 9: Expresse miR-122-5p u žijících a zemřelých	54
Graf 10:Expresse miR-142-5p u žijících a zemřelých	54
Graf 11:Doba přežití pacientů bez recidivy vs. s recidivou KRK	56
Graf 12:Korelace CEA a BMI	56
Graf 13:Korelace CEA a CA-9-19.....	57
Graf 14:Korelace miR-122-5p a miR-142-5p v plasmě	59
Graf 15: Expresní hladiny miR-122-5p a miR-142-5p ve tkáni tumoru a ve zdravé tkáni	60
Graf 16: Expresní hladina genů ve zdravé tkáni a ve tkáni tumoru.....	62
Graf 17: Expresní hladiny miRNA a tergetů ve zdravé tkáni a ve tkáni tumoru.....	63

