



Postgraduální doktorské studium biomedicíny

**Predikce chemosenzitivity na 5-fluorouracil  
a jeho deriváty u nemocných léčených chemoterapií  
pro kolorektální karcinom**

Doktorandská dizertační práce

**MUDr. Martina Zimovjanová**

Onkologická klinika VFN a 1. LF UK

**Školitel: Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.**

Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK v Praze

PRAHA 2009

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se svou prací a pomocí podíleli na vzniku předkládané práce.

Je to zejména můj školitel, pan profesor MUDr. Emanuel Nečas DrSc, přednosta Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK. Děkuji mu za vytvoření podmínek pro realizaci mého doktorandského studia, odborné vedení, i za lidský přístup, trpělivost a pochopení, které pro mne v průběhu doktorandského studia měl.

Mé další poděkování patří školitelce - konzultance paní docence MUDr. Marii Ludvíkové Ph.D. z Ústavu patologie 1.LF UK, která mi byla nápomocna při imunohistochemickým analýzách publikovaných v této práci.

Ráda bych také poděkovala panu profesorovi MUDr. Luboši Petruželkovi CSc., přednostovi Onkologické kliniky VFN a 1.LF UK, který svou podporou vytváří podmínky pro úspěšné zvládnutí doktorandského studia pro postgraduální studenty na svém pracovišti.

V laboratoři Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK by moje práce nebyla uskutečnitelná bez pomoci a podpory Mgr. Viktora Sýkory.

Za statistické vyhodnocení laboratorních a klinických dat děkuji Ing.Stanislavu Kormundovi z Ústavu sociálního lékařství LF UK v Plzni.

Ve výčtu poděkování mezi spolupracovníky nemohu opomenout MUDr. Jana Novotného Ph.D., který mi po celou dobu studia pomáhal a poskytoval četné rady při řešení jednotlivých zadání práce.

Díky patří mému muži Petrovi, mým rodičům a také dcerám Terezce, Aničce a Emičce, kteří měli pochopení pro mou práci a byli mi oporou po dobu studia.

Tato práce vznikla také za podpory grantu IGA MZ CR 7575-3, výzkumného záměru MSM 002 162 0808.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APAF1	apoptotické proteázy aktivující faktor 1
ASCO	Americká společnost pro klinickou onkologii
5FdUMP	5-fluorodeoxyuridinmonofosfát
5-FUMP	5-fluorouridinmonofosfát
5-FUTP	5-fluorouridintrifosfát
APC	gen familiární adenomatozní polypózy
ADCC	cytotoxicita zprostředkovaná protilátkami
AP1	transkripční faktor
Bax	bcl-2 asociovaný protein X
Bcl-2	gen B-buňky CLL/lymfom 2
BRAF	serin/threonin kináza nitrobuněčné signalizace
BRCA1	gen hereditárního karcinomu prsu 1
BRCA2	gen hereditárního karcinomu prsu 2
BSC	nejlepší podpůrná léčba
CA 19-9	nádorový marker gastrointestinálních karcinomů
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CD 95	receptor smrti buňky
cdk	cyklindependentní kináza
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CEA	karcinom embryonální antigen
CGH	komparativní genomová hybridizace
CIMP	CpG metylační fenotyp
Cox-2	cyklooxygenáza 2
CRC	kolorektální karcinom
CTC	cirkulující nádorové buňky
DCC	gen chybějící (deletovaný) u kolorektálního karcinomu
DFI	interval bez známek onemocnění
DFS	přežití bez známek onemocnění
DISC	signální komplex indukující smrt buňky
DPC	gen chybějící (deletovaný) u karcinomu slinivky břišní
DPD	dihydropyrimidindehydrogenáza
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát
dUMP	deoxyuridinmonofosfát
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR (ErbB1)	receptor pro epidermální růstový faktor
ERCC1	gen reparačního systému záměny bazí
FBAL	fluoro-β-alanin
FOBT	test na okultní krvácení ze stolice
FOLFIRI	chemoterapie 5-FU + leukovorin + irinotekan
FOLFOX	chemoterapie 5-FU + leukovorin + oxaliplatin
FUDR	5-fluorodeoxyuridin
FUFA	chemoterapie 5-FU + leukovorin
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
GTP	guanosintrifosfát
GARFT	guanylylribonukleotidtransferáza

GBM	glioblastoma multiforme
GSTP1	gen glutation-S-transferáza
HIA	hepatální arteriální infuze
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IMVD	nitronádorová hustota kapilár
JP	juvenilní polypóza
K-RAS	gen Kirsten-ras
LV	leukovorin
MCC	gen mutovaný u kolorektálního karcinomu
MMR	geny reparačního systému záměny bazí
MSI	mikrosatelitová nestabilita
MTA	antifolikum s několika léčebnými cíly
NADPH	redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NER	geny reparačního systému excize bazí
OMIM	genová databáze - Online Mendelian Inheritance in Man
OS	celkové přežití
OPRT	orotátfosforibosyltransferáza
p15, p16, p18, p19, p21	inhibitory cyklin dependentních kináz
p53	onkosupresorový gen
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-ECGF	růstový faktor pro endotelie odvozený s krevních destiček
PET	pozitronová emisní tomografie
PIGs	p53 indukované geny
PJS	Peutz- Jeghersův syndrom
PFS	přežívání bez známek progresu
PTEN	gen fosfatázový a tensinový homolog
QIF	kvantitativní imunofluorescence
Rb	gen pro retinoblastom
RECIST	kritéria hodnocení léčebné odpovědi
RNA	ribonukleová kyselina
SAGE	sériová analýza genové exprese
SNP	polymorfismus jednoho nukleotidu
SMAD4	gen familiární juvenilní polypózy
STK11	serin/threonin protein kináza 11
TAMs	makrofágy asociované s nádorem
TERT	telomerázový protein
T:R	poměr cílový/referenční gen
TKI	tyrosinkinázový inhibitor
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNM	klasifikace rozsahu nádorového onemocnění
TP	thymidinfosforyláza
TRUS	transrektální ultrasonografie
TS	thymidylátsyntáza
TTP	doba do progresu onemocnění
UGT1A1	uridindifosfátglukuronosyltransferáza 1A1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
XIAP	inhibitor apoptózy
XP	geny xeroderma pigmentosum

## OBSAH

<b>TEORETICKÝ ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>1. MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY NÁDOROVÉHO RŮSTU</b>	<b>9</b>
1.1. Onkogeny	9
1.2. Onkosupresorové geny	10
1.3. Geny regulující buněčný cyklus	13
1.4. Geny regulující apoptózu	14
1.5. Geny odpovědné za reparační mechanismy DNA	16
<b>2. KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM</b>	<b>18</b>
2.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu	18
2.2. Etiologie kolorektálního karcinomu	19
2.3. Patogeneze kolorektálního karcinomu	24
2.4. Klinická manifestace a diagnostika kolorektálního karcinomu	26
2.5. Léčba kolorektálního karcinomu	27
2.5.1. Chirurgie	28
2.5.2. Radioterapie	29
2.5.3. Chemoterapie	30
2.5.4. Cílená biologická léčba	35
2.5.5. Experimentální léčba	37
<b>3. MOŽNOSTI STANOVENÍ PROGNÓZY A PREDIKCE LÉČEBNÉHO ÚČINKU</b>	<b>38</b>
3.1. Prediktivní a prognostické faktory	38
3.2. Predikce chemosenzitivity fluoropyrimidinů	40
3.2.1. Thymidylátsyntáza (TS)	40
3.2.2. Thymidinfosforyláza (TP)	43

3.2.3.	Dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD)	46
3.3.	Metody stanovení prediktorů	48
<b>VLASTNÍ PRÁCE</b>		52
4.	CÍLE PRÁCE	52
5.	ZÁKLADNÍ SOUBOR	53
6.	SROVNÁVACÍ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE TS, TP A DPD mRNA	54
6.1.	Metodika	54
6.2.	Výsledky	57
6.3.	Diskuze	59
7.	SROVNÁVACÍ ANALÝZA PROTEINOVÉ EXPRESE TS, TP	63
7.1.	Metodika	63
7.2.	Výsledky	66
7.3.	Diskuze	74
8.	KORELACE ANALÝZ GENOVÉ A PROTEINOVÉ EXPRESE TS, TP	77
8.1.	Metodika	77
8.2.	Výsledky	77
8.3.	Diskuze	81
9.	PROGNOSTICKÝ A PREDIKTIVNÍ VÝZNAM EXPRESE TS, TP, DPD	83
9.1.	Metodika	83
9.2.	Výsledky	85
9.2.1.	Klinický průběh u pacientů s lokalizovaným CRC	85
9.2.2.	Klinický průběh u pacientů s generalizovaným CRC	89
9.2.3.	Prognostický význam stanovení exprese TS, TP, DPD	92
9.2.4.	Prediktivní význam stanovení exprese TS, TP	96
9.3.	Diskuze	98

10. SOUHRN ZÁVĚRŮ	102
<b>LITERATURA</b>	104
<b>LITERATURA AUTORKY</b>	115

## TEORETICKÝ ÚVOD

V teoretické části předkládané práce je podán přehled problematiky patogeneze nádorového bujení, základy diagnostiky, strategie léčby a predikce léčebného účinku u pacientů s kolorektálním karcinomem. Úvodní kapitoly jsou zaměřeny na zařazení tématu předkládané práce do celkového kontextu současných znalostí o molekulárně biologických charakteristikách kolorektálního karcinomu a jejich vztahu ke specifické onkologické léčbě. Dále je podán stručný přehled současných názorů na problematiku prediktivních a prognostických faktorů. Vzhledem k velmi komplexní povaze tématu není možné probrat všechny patogenetické, terapeutické a prediktivní aspekty kolorektálního karcinomu do detailů, některé směry jsou proto pouze naznačeny.



# 1. MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY NÁDOROVÉHO RŮSTU

## 1.1. ONKOGENY

Jako onkogeny označujeme geny, které prostřednictvím svých proteinových produktů působí transformaci normálního buněčného fenotypu v nádorový. Onkogeny mají klíčovou úlohu při vzniku nádorového bujení a vznikají z části normálních genů (protoonkogenů).

Protoonkogen je regulační gen, který za fyziologických podmínek řídí kaskádu zajišťující správnou posloupnost dějů buněčného cyklu (Bishop JM, 1996). Dojde-li k aktivaci protoonkogenu v nesprávný čas, v nadměrném množství nebo vznikne-li mutovaná varianta protoonkogenu s rozdílnými charakteristikami jeho produktu, stává se z protoonkogenu onkogen. Buňka získá růstovou výhodu nad buňkami fyziologickými, stává se buňkou transformovanou. Podmínkou změny buňky transformované na buňku nádorovou je většinou nahromadění dalších genetických změn.

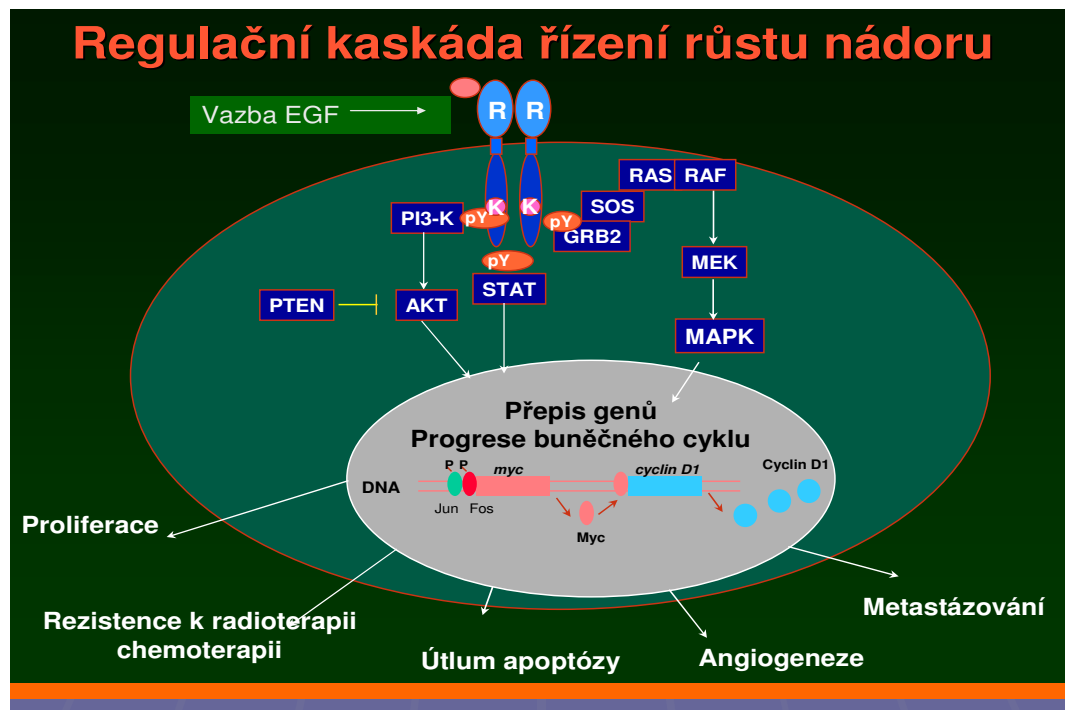
Onkogeny se projevují jako dominantně transformující geny a lze je dělit do několika tříd podle charakteru regulačních pochodů, které ovlivňují (**Tab. 1**).

Produkty onkogenu často mění přenos signálu z membránového receptoru do buněčného jádra. Stimulace buněčného dělení je zahájena v extranukleárním kompartmentu buňky navázáním signální molekuly na receptor. Dochází k aktivaci proteinkináz, které fosforylují další cytoplazmatické faktory, které následně vyústí v konečné produkty schopné aktivovat jaderné geny. Průběh přenosu signálu v buňce je graficky znázorněn (**Obr 1**).

**Tabulka 1. Příklady známých onkogenů**

<b>Onkogen</b>	<b>Mechanismus poškození</b>	<b>Nález u malignity</b>
<b>Růstový faktor</b> v-sis ( $\beta$ –řetězec PDGF) int 2 (rodina FGF) int-1 (funkce neznámá)	nadměrná exprese nadměrná exprese nadměrná exprese	gliom/fibrosarkom karcinom prsu karcinom prsu
<b>Membránový receptor bez proteinkinasové aktivity</b> Mas (receptor pro angiotenzin)	není znám	karcinom prsu
<b>Membránový receptor s tyrosinkinasovou aktivitou</b> c-erbB-1 (EGFR) c-erbB-2 (HER2/Neu) c-kit c-fms c-ret	nadměrná exprese nadměrná exprese mutace nadměrná exprese mutace	karcinom plic, tračníku karcinom prsu, slinivky břišní maligní melanom, GIST sarkom karcinom štítné žlázy
<b>Ne-receptorové tyrosinkinasy</b> Src Bcr/abl	mutace fúzní protein	sarkomy chronická myeloidní leukémie
<b>G-proteiny</b> H-ras K-ras  N-ras Gsp	bodová mutace bodová mutace  bodová mutace bodová mutace	karcinom plic karcinom slinivky břišní, karcinom tlustého střeva maligní melanom karcinom štítné žlázy
<b>Serin –threoninové kinasy</b> c-raf	nadměrná exprese	sarkom
<b>Jaderné a mitochondriální proteiny</b> c-myc N-myc c-fos c-jun bcl-2	nadměrná exprese nadměrná exprese nadměrná exprese nadměrná exprese nadměrná exprese	Burkittův lymfom neuroblastom osteosarkom karcinomy karcinom prsu a prostaty

Obrázek 1. Regulační kaskáda nitrobuněčné signalizace



Mezi nejznámější zástupce onkogenů signální transdukce patří guanosintrifosfát (GTP) – vázající proteiny z rodiny RAS. U kolorektálního karcinomu se setkáváme s mutacemi především genu K-RAS (30-50%) (Gale et al., 1993).

K-RAS má významnou úlohu v EGFR signální kaskádě s vlivem na proliferaci nádorových buněk, proces angiogeneze a metastazování. V nádorech s mutovaným genem K-RAS je permanentně produkován signální protein nezávisle na aktivaci nadřazené signální dráhy, a tak dochází ke kontinuální neregulované dostředivé signalizaci pro nádorový růst. Častým nálezem u nádorů je rovněž výskyt mutací v genech kódujících další proteiny signálních drah (BRAF-1, MEK, MAPK).

Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují expresi genů v buněčném jádře v závislosti na měnících se potřebách buňky. Patří mezi ně např. produkty protoonkogenů c-jun a c-fos, které tvoří heterodimerní transkripční faktor AP-1. Změněné onkoproteiny transkripčních faktorů vedou ke vzniku populace tzv.

imortalizovaných buněk s jinak normálním fenotypem. K nádorové transformaci dochází po následném poškození některého z dalších klíčových genů (Rauscher et al., 1988).

## 1.2. ONKOSUPRESOROVÉ GENY

Produkty onkosupresorových genů jsou bílkoviny, které, na rozdíl od onkogenů, zpomalují průběh buněčného cyklu (**Tab. 2**). Chovají se autosomálně recesivně, to znamená, že teprve výpadek fyziologické funkce obou alel podmiňuje vznik nádorového onemocnění (Fearon ER, 1998). Naprostá většina dědičně podmíněných nádorových onemocnění je způsobena právě mutacemi onkosupresorových genů (p53, RB, APC, BRCA1, BRCA2, DPC, DCC).

**Tabulka 2. Příklady onkosupresorových genů**

<b>Onkosupresorový gen</b>	<b>Funkce genu Nádor s výskytem poškození daného genu</b>
p53	G1 a G2/S kontrolní body, apoptóza kolorektální karcinom, karcinom slinivky břišní, karcinom prsu, sarkomy, leukémie
Rb	regulace časně G1 fáze buněčného cyklu retinoblastom, malobuněčný plicní karcinom
APC	kooperace s integriny a beta-keninem kolorektální karcinom
BRCA1	embryonální vývoj mléčné žlázy, reparace poškození DNA karcinom prsu, karcinom vaječnicků, kolorektální karcinom
BRCA2	reparace DNA karcinom prsu, karcinom vaječnicků, karcinom slinivky břišní, další nádory GIT
Smad4	intermediární signální molekula v transdukční kaskádě TGF- $\beta$ karcinom slinivky břišní
p16	inhibitor cyklin dependentních kinas CDK4 a CDK6 maligní melanom, karcinom slinivky břišní

### 1.3. GENY REGULUJÍCÍ BUNĚČNÝ CYKLUS

Buněčný cyklus je komplexní děj, jehož výsledkem je replikace buňky. V některých případech probíhá v rámci buněčného cyklu i diferenciace buněk.

Na řízení buněčného cyklu se podílí stovky proteinů. Základními regulačními bílkovinami buněčného cyklu jsou cykliny a cyklin dependentní kinázy (cdk). Cykliny se v buňce cyklicky syntetizují a zase rychle degradují. Tyto molekuly aktivují cdk, které jsou v buňce přítomné po celý buněčný cyklus. Komplexy cyklinů a cdk svou proteinkinázovou aktivitou regulují řadu bílkovinných substrátů zapojených do vlastních biochemických pochodů v jednotlivých fázích buněčného cyklu (proteiny zodpovědné za syntézu DNA v S-fázi, molekulární motory řídící transport chromatid při mitóze) nebo proteinů s regulačními aktivitami (produkt nádorového supresorového genu pRb) (**Tab. 3**).

**Tabulka 3. Regulátory aktivity cyklin-dependentních kináz.**

<b>Aktivace cdk</b>	<b>Inhibice cdk</b>
Vazba cyklinů na CDK	Vazba inhibitorů CDK ze skupiny INK (p15, p16, p18, p19)
Fosforylace Thr161 CDK aktivační kinasou (komplex CDK7+cyklin H)	Vazba inhibitorů ze skupiny p21, p27, p57
Defosforylace Tyr14 a Thr15 fosfatasou cdc25	Fosforylace Tyr14 a Thr15 inhibiční kinasou wee1
	Ubikvitinizace cyklinů a CDK

Na aktivitu komplexů cyklinů a cdk mají zásadní vliv jejich inhibitory, proteiny kódované nádorovými supresorovými geny např. p15, p16, p18, p19, p21, p27 a p57.

Produktem nádorového supresorového genu p53 je nukleární fosfoprotein. Jako transkripční faktor reguluje expresi řady genů, mezi které patří například protein p21 - inhibitor komplexu cyklinu D/cdk4/6. Mutace v genu p53 jsou nejčastější genetickou změnou u nádorů vůbec. Přibližně 50 % lidských nádorů nese inaktivovaný protein p53 (Lane DP, 1992). Častý je výskyt mutací v genu p53, ale dochází i k hypermetylaci promotoru genu, ztrátám alel nebo funkční inaktivaci p53 proteinu.

#### 1.4. GENY REGULUJÍCÍ APOPTÓZU

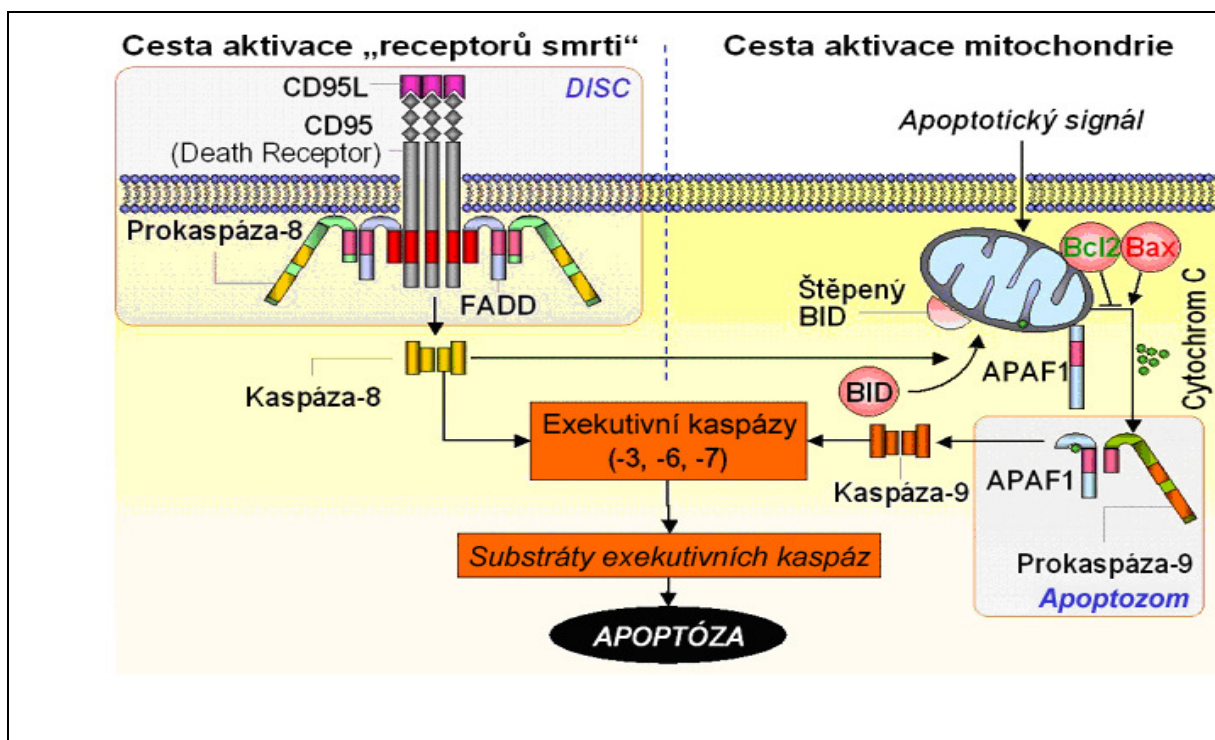
Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je velmi důležitým dějem v řízení růstu buněčných populací, stojí na opačném pólu vzhledem k mitóze. Vyžaduje aktivní účast buňky na svém vlastním zániku. V buňkách maligních nádorů často dochází k jejím poruchám. Defekty v regulaci apoptózy jsou charakteristickým rysem buněk zhoubných nádorů - podílí se na rezistenci nádorových buněk k účinkům radioterapie a chemoterapie (Cory et al., 2003).

Průběh apoptózy charakterizuje jednotný morfologický obraz se vznikem apoptotických tělísek. Biochemickou podstatou apoptózy je série regulovaných proteolytických štěpení výkonných apoptotických proteolytických enzymů (kaspáz), jejichž terminálními substráty jsou pro buňku životně důležité regulační a strukturní bílkoviny. Aktivace apoptózy probíhá vnitřní nebo vnější cestou. Tyto cesty se spojují na úrovni aktivace exekutivních kaspáz (**Obr. 2**). K primární aktivaci kaspáz z neaktivních prokaspáz v extrinzické části apoptózy dochází cestou tzv. „receptorů smrti“ (TNF, CD95), které tvoří komplex DISC (death inducing signaling complex). Spouštěcím mechanismem vnitřní cesty apoptózy je uvolnění cytochromu c z

mitochondrie a následné sestavení apoptozómu. Postupná aktivace prokaspáz již aktivními kaspázami vede jak k amplifikaci apoptotického signálu, tak také k jeho propagaci napříč buněčnými kompartmenty.

V regulaci apoptózy sehrávají důležitou roli proteiny rodiny Bcl-2. Do této rodiny patří přes 20 proteinů a obsahuje jak inhibitory (Bcl-2, Bcl-XL), tak aktivátory (Bax, Bad, Bid) apoptózy (Sirvent et al., 2004). Jejich prostřednictvím vykazuje zásadní vliv na průběh apoptózy i protein p53, který je aktivátorem exprese genu Bax a inhibítorem exprese Bcl-2. Schopnost buňky indukovat apoptózu určuje mimo jiné poměr intracelulárních koncentrací mezi skupinami proapoptotických resp. protiapoptotických zástupců rodiny Bcl-2, obvykle vyjadřovaných jako poměr jejich dvou zástupců Bcl-2/Bax. Nadměrná exprese Bcl-2 je negativním prognostickým markerem (Korsmeyer SJ, 1992), ale také možným cílem protinádorové léčby pomocí antisense oligonukleotidů (Waters et al., 2000).

**Obrázek 2. Schématické znázornění procesu apoptózy.**



## 1.5. GENY ODPOVĚDNÉ ZA REPARAČNÍ MECHANISMY DNA

Zachování nepoškozené genetické informace v buňce umožňují geny, které reparují DNA. Reparace na úrovni RNA je minimální, neboť jde obvykle o krátkodobě uchovávanou informaci v mnoha kopiích.

„Nukleotide-excision repair“ (NER) odstraňuje poměrně širokou škálu strukturálně si nepodobných lézí v DNA. Mezi nejdůležitější patří reparace poškození ultrafialovým zářením nebo chemickou kancerogenezí. Systém NER je zajišťován souborem genů xeroderma pigmentosum (XP).

Geny „mismatched repair“ systému (MMR) (MSH2, MLH1, PMS2, PMS1, MSH3, MSH6) se účastní oprav chybného párování bazí v průběhu replikace DNA. Zárodečné mutace i jen v jednom z těchto genů způsobují jejich nositelům zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu i jiných malignit.

### Role telomerázy

Telomery jsou repetitivní sekvence DNA na konci chromozomů, které přichycují konce chromatinových vláken k jadernému cytoskeletu. Telomery nejsou syntetizovány DNA polymerázou, ale prostřednictvím RNA templátu a telomerázového proteinu (TERT). Opakované buněčné cykly vedou postupně ke zkracování chromatinových vláken, což dovolí buňce jen omezený počet dělení (50 - 80). V nádorových buňkách s přítomností mutace p53 či pRb dochází k překonání replikačního limitu buňky (telomerický checkpoint) a k pokračování v buněčném cyklu. Aktivovaná telomeráza prodlužuje telomery a tím umožní chromozomálně nestabilním buňkám vyšší nebo neomezený počet dělení a progresi jejich maligního potenciálu (Buys Ch, 2000).



## 2. KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

### 2.1. EPIDEMIOLOGIE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Kolorektální karcinom je nejčastějším nádorovým onemocněním trávicího traktu. Celosvětově patří mezi onkologická onemocnění s nejvyšší incidencí. V České republice zaujímá 2. místo za karcinomem plic u mužů a karcinomem prsu u žen. V roce 2006 byl v České republice kolorektální karcinom diagnostikován u 7801 osob (UZIS ČR Novotvary, 2006).

Statistická evidence rozděluje toto onemocnění na zhoubný novotvar tlustého střeva, zhoubný novotvar rektosigmoidea a konečníku. Incidence tohoto onemocnění je mimořádně vysoká; během posledních 20 let stoupl výskyt kolorektálního karcinomu o 190% (UZIS ČR Novotvary, 2006). V celoevropském srovnání dosahujeme ve výskytu karcinomu tlustého střeva u mužů první místo, u žen místo druhé. Mortalita v uvedeném období stoupla pozvolněji, zhruba o 135%, což lze pokládat za úspěch včasější diagnostiky a účinnější léčby. Nádory tlustého střeva a konečníku představují 15% všech úmrtí na nádorovou diagnózu.

V péči o nemocné s kolorektálním karcinomem však zůstává celá řada rezerv. Celých 9-12% případů není léčeno a je poprvé diagnostikováno až při úmrtí. Podobně 10-15% případů není histologicky verifikováno. Radikální operace je provedena pouze u 60% nemocných, chemoterapií je léčeno 25% pacientů. U karcinomů rekta je předoperační radioterapie prováděna u 6-8% nemocných, pooperační radioterapie u 13-17% nemocných.

Absolutní počty nemocných s kolorektálním karcinomem jsou nejvyšší ve věkové kategorii 65-75 let, v relativních hodnotách však incidence narůstá plynule s

věkem až do nejvyššího věku. Nicméně první případy kolorektálního karcinomu se objevují již po 20. roce věku. V těchto mladších věkových kategoriích jde především o hereditárně podmíněné formy karcinomů.

## 2.2. ETIOLOGIE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Z patogenetického hlediska rozeznáváme převažující sporadickou formu kolorektálního karcinomu a hereditárně podmíněné nádory, které se vyskytují u 5% nemocných (Vasen et al., 1999). Většina kolorektálních karcinomů tedy vzniká jako civilizační onemocnění v důsledku komplexního působení faktorů genetických a faktorů nesprávného životního stylu (Sturmer et al., 2000).

### **Rizikové faktory**

V metaanalýze 15 prospektivních klinických studií byl nalezen vztah mezi množstvím spotřeby masa a incidencí nádoru tlustého střeva a konečníku (Larsson SC. et Wolk A, 2006). Způsob tepelné úpravy masa (smažení, pečení a uzení) zvyšuje množství mutagenních aminů v organismu, jejich vliv na riziko vzniku nádoru byl studován, publikované výsledky jsou však rozporuplné (Augustsson et al., 1999). Alkohol modifikuje relativní riziko (RR) onemocnění zcela minimálně - RR 1,1 (metaanalýza 27 studií - Longnecker et al., 1990). I když vláknina je stále považována za ochranný faktor (Bingham et al., 2003), výsledky randomizovaných studií neprokazují žádný prospěch na snížení incidence adenomů a karcinomů tlustého střeva u skupin osob užívajících velké denní dávky vlákniny (Cochrane review, 2002). Vyšší denní spotřeba vápníku snižuje riziko onemocnění kolorektálním karcinomem (Baron et al., 1999). Metaanalýza 18 epidemiologických studií prokázala

20% snížení rizika vzniku kolorektálního karcinomu u žen užívajících kombinovanou hormonální substituční léčbu (Grodstein et al., 1999). Vyšší fyzická aktivita snižuje riziko onemocnění o 40–50% (Friedenreich CM, 2001). Kouření zvyšuje četnost výskytu adenomů i invazivních karcinomů tlustého střeva téměř dvojnásobně (RR 1,81) (Sturmer et al., 2000). Nemocní s idiopatickými střevními záněty mají zvýšené riziko onemocnění kolorektálním karcinomem, zvláště v případě doprovodné primární sklerotizující cholangoitidy (Marchesa et al., 1997). Po desetiletém průběhu pankolitidy je riziko vzniku nádoru 1-2% ročně. Tyto nádory obvykle nevznikají (na rozdíl od sporadických forem) na podkladě adenomů.

Dle epidemiologických studií lze tedy doporučit v primární prevenci nádorového onemocnění tlustého střeva a konečníku přiměřenou tělesnou aktivitu, racionální stravu, příjem dostatečného množství vápníku a vitamínu D, vitamínu C, beta-karotenu a selenu.

### **Geneticky podmíněné nádory**

Pouze 5% kolorektálních karcinomů vzniká v důsledku vrozené predispozice. Tyto hereditární nádorové syndromy jsou způsobeny mutacemi určitých genů a mají autozomálně dominantní charakter (**Tab.4**).

#### Familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Familiární adenomatózní polypóza je autosomálně dominantní onemocnění (incidence 1 na 8000), které se typicky projevuje vznikem kolorektálního karcinomu u mladých jedinců na podkladě mnohočetných (100 až 5000) adenomatózních polypů v tlustém střevě. Genetický defekt se nachází v tumor supresorovém genu APC (adenomatous polyposis coli).

Pravděpodobnost vzniku kolorektálního karcinomu je velmi vysoká (100%) do věku 50 let. Polypy se u klasické formy FAP začínají tvořit okolo 15. roku věku, ke vzniku maligního nádoru u neléčených případů dochází nejčastěji ve čtvrtém deceniu, kdy rovněž dochází k ustálení růstu polypů. Onemocnění může být spojeno také s dalšími klinickými projevy polypózy v proximálních úsecích GIT (duodenální polypy až u 80% pacientů), maligní nádory se mohou vyskytovat i v dalších orgánech (mozek, štítná žláza, hepatoblastom, karcinom žaludku a pankreatu).

Z nenádorových symptomů FAP dominují nálezy epidermoidních cyst (30-60% nemocných), desmoidních tumorů a difuzní fibrózy mesenteria (20-30%), osteomů dolní čelisti (90% pacientů), kongenitální hypertrofie pigmentu sítnice (Gardnerův syndrom). Poslední ze zmiňovaných symptomů může sloužit jako časný biomarker mutace APC genu. Onemocnění je diagnostikováno na základě nálezu polypózy tlustého střeva a potvrzeno genetickým vyšetřením DNA v krvi na přítomnost mutací v APC genu. Pravidelná dispenzarizace u jedinců s vysokým rizikem se zahajuje mezi 11. až 14. rokem věku. Signifikantního snížení mortality lze dosáhnout jen chirurgickou léčbou. U léčených pacientů (po totální kolektomii s ileoanální anastomózou) může být příčinou úmrtí karcinom duodena (kolem 5% případů) či břišní a retroperitoneální komplikace v důsledku růstu desmoidních tumorů. Riziko vzniku karcinomu konečníku (pokud nebyla provedena proktokolektomie) vzrůstá z 3,5% po 5 letech na 10% po 10 letech. Z těchto důvodů je nezbytná pravidelná dispenzární péče pacientů po preventivním chirurgickém výkonu. Při výskytu polypů žaludku a duodena je vhodné zvážit podávání chemoprevence selektivními COX2 inhibitory.

Juvenilní polypóza (JP) a Peutz-Jeghersův syndrom (PJS) patří k dalším gastrointestinálním polypózním syndromům, které zvyšují riziko vzniku kolorektálního

karcinomu. Jejich incidence je nízká (1 na 100 000), diagnóza může být stanovena na podkladě histologického vyšetření polypů – hamartomy. Záradečná mutace v LKB1 genu predisponuje ke vzniku Peutz-Jeghersova syndromu a mutace v genech SMAD4 nebo BMPR1A ke vzniku juvenilní polypózy.

### Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC)

Pod název hereditární nepolypózní kolorektální karcinom se v současnosti zařazují autosomálně dominantní onemocnění dříve označované jako Lynchův syndrom I a II. (incidence 1 na 200 - 1 000). Pro tuto nozologickou jednotku je kromě vysokého rizika vzniku kolorektálního karcinomu (asi 80%, nejčastěji ve věku mezi 40.-50. rokem života) charakteristický i výskyt maligních nádorů v dalších lokalizacích: endometrium (celoživotní riziko 27-71%), ovárium (3-13%), žaludek (2-13%), tenké střevo (4-7%) a nádory mozku (1-4%) (Vasen et al., 2007).

Genetickým podkladem onemocnění je přítomnost hereditární mutace v jednom z DNA-reparačních genů: hMSH2, hMLH1, hPMS2, hMSH6. 90% kolorektálních karcinomů asociovaných s HNPCC je mikrosatelitově nestabilních (MSI), zatímco ve sporadických nádorech je tento rys detekován u asi 15% případů.

V rodinách s HNPCC je prováděn pravidelný screening (kolonoskopie, hysteroskopie s biopsií endometria) vzhledem k vysokému riziku vzniku nádorových onemocnění v těchto lokalizacích.

### Muir-Torre syndrom

Jedná se o vzácné autozomálně dominantní onemocnění charakterizované nádory potních žláz nebo keratoakantomy kůže asociované s viscerálními maligními nádory (kolorektální, endometriální, urologické a jiné GIT nádory).

### Turcotův syndrom

Jedná se o výskyt nádoru mozku - glioblastoma multiforme (GBM) v kombinaci s kolorektálním karcinomem. Glioblastomy u tohoto syndromu vznikají v mladém věku (okolo 20ti let) a vyznačují se mikrosatelitovou nestabilitou.

### Familiární výskyt karcinomů tlustého střeva

Epidemiologické studie prokázaly, že přími příbuzní nemocných s kolorektálním karcinomem mají 3 až 4x vyšší pravděpodobnost tohoto onemocnění ve srovnání s ostatní populací (celoživotní riziko 2%).

**Tabulka 4. Genetické abnormality u kolorektálního karcinomu**

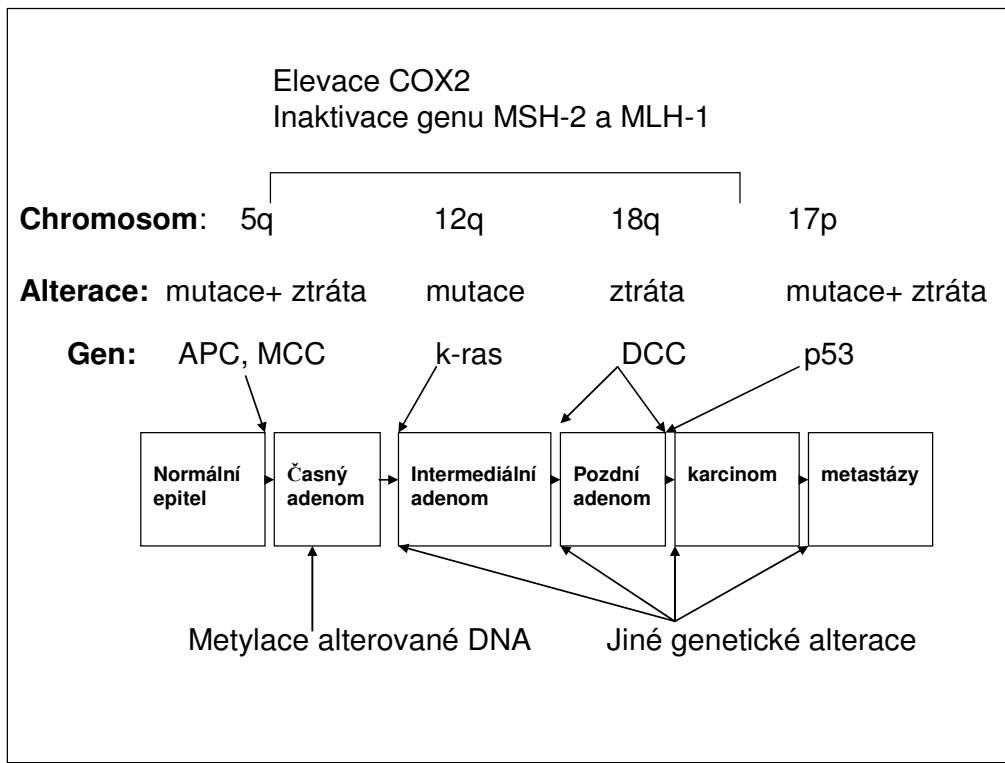
<b>Hereditární syndrom</b>	<b>Alterovaný gen</b>	<b>Lokalizace genu</b>
Familiární adenomatozní polypóza	APC	5q21-22
Peutzův-Jeghersův syndrom	STK, LKB1	11 19p13.3
Cowdenův syndrom	PTEN	10q23.3
Familiární juvenilní polyposa	SMAD4, BMPR1A	18q21.1
Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom	hMSH-2, hMSH-1	2p22 3p21.3

### 2.3. PATOGENEZE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Adenokarcinomy tlustého střeva a konečníku vycházejí z buněk střevní sliznice, která se trvale obměňuje. Intenzivní proliferace buněk je však za normálních okolností v rovnováze s jejich apoptózou a odlučováním z povrchu sliznice. Porušení regulačních mechanismů má za následek postupnou změnu fenotypu buněk, která nakonec vyústí ve vznik novotvaru. Jedním z významných faktorů, který ovlivňuje mechanismus apoptózy, je protein APC, produkt stejnojmenného genu. Tento protein je lokalizován v bazální membráně buněk sliznice tlustého střeva a jeho exprese narůstá s migrací a diferenciací buněk směrem k vrcholům krypt. Dysfunkce tohoto proteinu na základě alterace genu APC se projeví selháním apoptózy. Tato porucha může být prvním stupněm kaskády nádorového růstu, od tvorby polypů, na než navazují další defekty genu DCC na chromosomu 18q a genu p53 na chromosomu 17p (**Obr. 3**). S APC proteinem vchází do interakcí celá řada regulačních proteinů se vztahem k adhezi buněk, jako jsou  $\beta$ -catenin, axin, konduktin, mikrotubulární proteiny. Mitochondriální cesta apoptózy je aktivována prostřednictvím p53, následnou stimulací BAX, vedoucí k uvolnění cytochromu c a k aktivaci kaspáz. Inhibitory apoptózy (zahrnující např. survivin a XIAP) hrají důležitou roli v radiorezistenci u karcinomu konečníku. Z metod seriové analýzy genové exprese (SAGE) a komparativní genové hybridizace (CGH) vyplývá, že rozdíly v genovém profilu a expresi mezi normální sliznicí a kolorektálním karcinomem vykazuje více než 500 genů.

### Obrázek 3. Mechanismus kancerogeneze u kolorektálního karcinomu

(Klener P, 2002)



Epigenetické změny u kolorektálního karcinomu (DNA metylace, histonové modifikace aj.) jsou v současnosti intenzivně studovány. Předpokládá se, že epigenetické změny jsou častější příčinou vzniku onemocnění (12%) než zárodečné mutace v genech MMR a APC (5%) a mají vztah k věku, dietě a vlivu životního prostředí. Podle typu hypermetylací určitých genů, se onemocnění klasifikuje do jednotlivých skupin CIMP 1, CIMP 2, CIMP negativní (CIMP – CpG Islands Methylation Phenotype). Jednotlivé skupiny jsou charakterizovány odlišnou lokalizací vzniku onemocnění (proximální, distální část střeva) a studuje se vztah k prognóze a k léčebné odpovědi na jednotlivé modalitě léčby (Issa JP, 2008, Deng et al.,2008).



## 2.4. KLINICKÁ MANIFESTACE A DIAGNOSTIKA KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Průběh onemocnění kolorektálním karcinomem závisí na lokalizaci nádoru, rozsahu a stádiu onemocnění. Pokročilé nádory vedou ke ztrátě váhy, malnutrici, anemizaci. Hlavními akutními komplikacemi jsou obstrukce a perforace střeva. Při metastatickém postižení jater dominují bolesti v pravém podžebří, febrilie, pocení, kachektizace, vznik ascitu. Kolorektální karcinom v pravé polovině tračnicku vede často ke krvácení a ztrátové anemii, která bývá obvykle jediným příznakem onemocnění při nádorech v této oblasti. V levé polovině tračnicku ovlivňují karcinomy průchodnost střeva, vedou ke změnám defekačního stereotypu a k obstrukci. Hlavními příznaky nádorů rekta je krvácení, přítomnost hlenu ve stolici a tenezmy. Mikroskopická enteroragie je přítomna u většiny kolorektálních karcinomů bez ohledu na lokalizaci nádoru. Tento průkaz je základem screeningové metody– vyšetření stolice na okultní krvácení (hemocult - FOBT). Test spočívá ve vyšetření 3 po sobě následujících stolic. Pozitivní prediktivní hodnota testu je kolem 20% pro karcinomy a 5% pro adenomy. Při pozitivitě testu je nutné provedení pankolonoskopie.

Při klinickém vyšetření pacienta zjišťujeme anamnézu, která se zaměřuje na rodinný výskyt onemocnění, výskyt polypů či jiných malignit. Provádíme fyzikální vyšetření včetně vyšetření per rektum. Kolonoskopicky je vyšetřen celý tračník až do céka; provede se odběr vzorku tkáně k histologickému vyšetření, posoudí se lokální rozsah onemocnění, vzdálenost nádoru od anu, exulcerace nebo hrozba akutní obstrukce střeva. K určení klinického stadia a stanovení předoperačního stagingu (cTNM) se využívá kombinace zobrazovacích metod. Ultrazvuk nebo CT vyšetření

břicha a pánve umožní diagnostikovat jaterní metastázy a zvětšené lymfatické uzliny. K vyloučení plicních metastáz je nutné provedení RTG nebo CT hrudníku.

Zvláštní pozornost je třeba věnovat vyšetření nádorů v oblasti konečníku. Přesná diagnostika rozsahu nádorového onemocnění rozhoduje o indikaci předoperační (neoadjuvantní) terapie a o charakteru resekcčního výkonu. Typ operace je pro kvalitu života zásadní. Jde o amputaci konečníku či resekci s anastomózou. Obraz o lokálním nálezu nádoru v oblasti konečníku přinese rektoskopie či kolonoskopie. Hloubku invaze nádoru, postižení stěny rekta, eventuálně postižení pararektálních lymfatických uzlin lze posoudit transrektální ultrasonografií (TRUS). Podobnou informaci nám přinese také magnetická rezonance pánve. Toto vyšetření je zvláště vhodné u fixovaných nádorů. Laboratorně je sledován CEA jako hlavní marker (senzitivita je 50-60%) a Ca 19-9 jako vedlejší marker (senzitivita ~30%). Při nálezu hematurie, urologické symptomatologii nebo při podezření na šíření nádoru mimo konečník podle zobrazovacích metod se provádí urologické vyšetření, u žen je nezbytné gynekologické vyšetření. V případě nejasného nálezu nebo k doplnění stagingu je vhodné provést vyšetření pozitronovou emisní tomografií (PET nebo PET-CT).

## 2.5. LÉČBA KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Terapie kolorektálního karcinomu je komplexní, řídí se lokalizací nádoru a rozsahem onemocnění, vždy po zvážení celkového stavu pacienta.

### 2.5.1. Chirurgie

Chirurgická léčba je u kolorektálního karcinomu nejdůležitější léčebnou modalitou a nachází uplatnění ve všech stadiích onemocnění.

Profylaktická chirurgie je indikována u prekancerózních stavů, jako je familiární adenomatozní polypóza, kde se po důkladném vyšetření rozsahu změn doporučuje subtotální kolektomie, ileorektální anastomóza nebo totální proktokolektomie zakončená kontinentní ileostomií. U pacientů bez hereditární zátěže se ojedinělé stopkaté adenomy do velikosti 2 cm odstraňují endoskopickou polypektomií, větší tubulární adenomy a přisedlé vilózní adenomy je zapotřebí řešit resekci postiženého úseku střeva, popř. speciálními endoskopickými technikami.

Kurativní chirurgický výkon je hlavní léčebnou metodou lokalizovaných stadií kolorektálního karcinomu (**Tab.5**).

**Tabulka 5. Základní chirurgické výkony u lokalizovaného CRC**

Lokalizace nádoru	Typ výkonu
Karcinom céka, colon ascendens	pravostranná hemikolektomie
Karcinom transversa	resekce transversa
Karcinom colon descendens a sigmoidea	levostranná hemikolektomie
Karcinom sigmoidea a rekta	nízká přední resekce rektosigmatu abdominoperineální amputace rekta

Součástí radikální resekce je také odstranění mesokolických a pararektálních uzlin a jejich histologické vyšetření (požadovaný počet 12 lymfatických uzlin). U karcinomů I. a II. klinického stadia má radikální chirurgický výkon kurativní účinek, u vyšších stadií se podává adjuvantní chemoterapie.

Paliativní chirurgie je nezastupitelná v léčbě pokročilých a obturujících nádorů. V oblasti tračníku se indikuje omezená resekce s anastomózou, někdy (u nádorů zcela obturujících střevní lumen) je nutná prostá kolostomie. U nádorů distálního rekta může být paliativním řešením elektrokoagulace, laserová koagulace nebo kryochirurgický výkon, ať již je jeho cílem zastavení krvácení nebo pokus o rekanalizaci samoexpandibilním metalickým stentem. Kryochirurgie může mít analgetický účinek, neboť zničí senzitivní nervová vlákna. V případě metastatického postižení jater či plic se u resekabilních metastáz provádí chirurgická resekce. Dalšími lokálními léčebnými postupy při neresekabilním metastatickém postižení jater je radiofrekvenční ablace, kryoterapie či terapie laserem.

### **2.5.2. Radioterapie**

Radioterapie nachází uplatnění především u nádorů konečníku, a to zejména ve formě předoperační radioterapie často v kombinaci s chemoterapií. V léčbě těchto lokálně pokročilých či hraničně resekabilních nádorů je předoperační ozáření standardním postupem, jehož přínos pro následný rozsah chirurgického výkonu, redukci lokálních recidiv i pro dlouhodobé přežití byl prokázán. Předoperační radioterapie nádorů konečníku v kombinaci s chemoterapií přináší 10% patologických kompletních odpovědí (pCR), u 9% nemocných není dosaženo klinické odpovědi v důsledku široké heterogenity nádorových buněk karcinomu rekta (Palmer et al., 2005). Pooperační radioterapie (také chemoradioterapie) se používá u

pacientů s nádory konečníku lokalizovanými pod peritoneální řasou dle klinického stadia onemocnění.

Paliativní radioterapie se využívá v léčbě inoperabilních lokálních recidiv, může mít hemostyptický efekt u krvácejících nádorů a jako symptomatická analgetická léčba při postižení skeletu.

### **2.5.3. Chemoterapie**

Chemoterapie je důležitou součástí komplexní terapie kolorektálního karcinomu především jako adjuvantní léčba u pacientů III. klinického stadia a u pacientů II. klinického stadia s vysokým rizikem (exulcerovaný tumor, pozitivní resekční linie, operační řez v těsném sousedství nádorové infiltrace, T4 nádor, G3, nedostatečné vyšetření lymfatických uzlin < 12, angioinvaze, lymfangioinvaze, předoperační elevace CEA, manifestace nádoru ileozním stavem). Základní léčebnou modalitou je chemoterapie u pacientů s lokálně pokročilým a generalizovaným onemocněním.

Nejužívanějším chemoterapeutikem v léčbě kolorektálního karcinomu je již ~ 50 let cytostatikum ze skupiny pyrimidinových analog - 5-fluorouracil (5-FU).

**5-fluorouracil** je trvale velmi důležitou součástí kombinovaných chemoterapeutických režimů také při léčbě dalších adenokarcinomů zažívacího traktu (jícnu, žaludku, žlučových cest, slinivky břišní), nádorů prsu a spinocelulárních nádorů hlavy a krku, anu a gynekologické oblasti. 5-fluorouracil je také součástí nových režimů v kombinaci s moderní cílenou biologickou léčbou. Chemoterapie 5-fluorouracilem je dobře tolerovaná. Spektrum a intenzita nežádoucích účinků závisí na způsobu aplikace (bolusová versus kontinuální), což pravděpodobně souvisí s

odlišným mechanismem účinku. Při bolusovém podání se uplatňuje především mechanismus inhibice RNA a dominuje hematologická toxicita s incidencí 31%. Při kontinuálním podávání převažuje mechanismus inhibice thymidylátsyntázy (TS) způsobující narušení syntézy DNA a převládá toxicita slizniční a kožní toxicita (hand-foot syndrom, incidence 34%) (Sobrero et al., 1997). Zlepšení léčebné odpovědi je dosaženo kombinací s leukovorinem (LV). Režim FUFA je obecné označení pro kombinaci 5-fluorouracilu a leukovorinu. V adjuvantní indikaci byla také zkoušena cytostatika (irinotekan, oxaliplatina) v kombinaci s FUFA. Irinotekan v kombinaci s bolusovou aplikací FUFA (IFL) měl při srovnatelné efektivitě s FUFA větší procento neutropenií, febrilních neutropenií a úmrtí, proto není tato kombinace v adjuvanci používána. Naopak kombinace oxaliplatiny s kontinuálním režimem FUFA (FOLFOX) vede redukci relapsů onemocnění až o 26 %, nejčastějším nežádoucím účinkem je narůstající neurotoxicita oxaliplatiny. Kombinovaná chemoterapie FOLFOX byla zařazena do standardů pro adjuvantní chemoterapii nádorů tlustého střeva.

V paliativní chemoterapii pokročilých stádií je rovněž základním cytostatikem 5-fluorouracil, jehož léčebná účinnost v monoterapii je malá, tj. 10 – 15 % léčebných odpovědí s mediánem přežití 10 měsíců. Při kontinuálním podávání 5-fluorouracilu v kombinaci s leukovorinem (FUFA dle de Gramonta) dosahuje léčebná odpověď 33–44% a medián přežití 14 měsíců (de Gramont et al., 1998). Zásadní zlepšení léčebných výsledků u generalizovaného CRC prokázaly klinické studie III. fáze srovnávajících kombinace cytostatik nové generace (irinotekan, oxaliplatina) s kontinuálními režimy FUFA (FOLFOX, FOLFIRI) (**Tab.6**). Toto zlepšení vyplývá z léčebných odpovědí, které jsou pro režimy FOLFOX a FOLFIRI kolem 50% s prodloužením mediánu přežití až na 20 měsíců. Další alternativou je nahrazení kontinuální aplikace 5-fluorouracilu kapecitabinem. Léčebné výsledky s perorálním

kapecitabinem jsou srovnatelné s podáváním kontinuálního 5-fluorouracilu a jsou ověřeny i v rámci klinického hodnocení (Mayer RJ, 2001).

Dosažení dalšího zlepšení léčebné odpovědi přibližně o 10 % přináší podávání těchto režimů v kombinaci s biologickou léčbou - monoklonálními protilátkami (cetuximab, bevacizumab). Kombinace chemoterapie a biologické léčby podávané v rámci perioperační terapie metastatického kolorektálního karcinomu umožňují následně radikální resekci jaterních metastáz, a tím zlepšují 5leté přežití pacientů na 39% (5leté přežití pacientů s neresekabilním metastatickým CRC je 0%).

**Tabulka 6. Chemoterapeutické režimy používané v léčbě kolorektálního karcinomu (typ léčby A - adjuvantní, P – paliativní, CHT - chemoterapie).**

Typ léčby	Režim CHT	Způsob aplikace
A	FUFA	leukovorin 20mg/m <sup>2</sup> + 5-FU 425 mg/m <sup>2</sup> 5dní i.v. bolus a 28 dní
A + P	de Gramotův režim	leukovorin 200mg/m <sup>2</sup> 2 hod + 5-FU 400 mg/m <sup>2</sup> i.v.+ 5-FU 2500 mg/m <sup>2</sup> k.inf. 48 hod a 14 dní
A + P	kapecitabin	2500 mg/m <sup>2</sup> p.o. ve 2 denních dávkách 14 dní a 3 týdny
A + P	FOLFOX	oxaliplatina 85 mg/m <sup>2</sup> inf. 2hod + leukovorin 200mg/m <sup>2</sup> 2 hod + 5-FU 400 mg/m <sup>2</sup> i.v. + 5-FU 2500 mg/m <sup>2</sup> k.inf. 48 hod a 14 dní
P	FOLFIRI	irinotekan 180mg/m <sup>2</sup> inf. 1,5 hod + leukovorin 200mg/m <sup>2</sup> 2hod + 5-FU 400 mg/m <sup>2</sup> i.v. + 5-FU 2500 mg/m <sup>2</sup> k.inf. 48 hod a 14 dní
P I.linie	Kombinace s bevacizumabem	bevacizumab 5mg/kg 1 hod + FOLFOX či FOLFIRI a 14 dní
P II.linie	Kombinace s cetuximabem	Cetuximab 400mg/m <sup>2</sup> poté 250 mg/m <sup>2</sup> 1 hod + FOLFIRI či FOLFOX a 14 dní , nebo Cetuximab + irinotekan 90mg/m <sup>2</sup> a 7 dní
P	Monoterapie s panitumumabem	Panitumumab 6mg/kg a 14 dní

### Mechanismus účinku fluoropyrimidinů

Fluoropyrimidiny se svým mechanismem účinku řadí do skupiny cytostatik inhibujících biosyntézu nukleových kyselin. Způsob zásahu fluorovaných pyrimidinů (analoga uracilu) do biosyntézy nukleových kyselin je však mnohostranný.

5-fluorouracil jako mateřská látka této skupiny působí nejméně dvěma mechanismy. Teprve po intracelulární konverzi na nukleotid 5-fluorouridinmonofosfát (5-FUMP) vznikají vlastní cytotoxické látky, kterými jsou 5-fluorouridintrifosfát (5-FUTP) a 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát (5-FdUMP). Antimetabolit 5-FUTP se inkorporuje do RNA, a tím ovlivňuje její funkce v zasažené buňce. 5-FdUMP se váže na enzym thymidylátsyntázu (TS) a brání tak tvorbě nukleotidu deoxythymidinmonofosfátu (dTMP), následně vzniku deoxythymidintrifosfátu (dTTP), což vede k inhibici syntézy DNA (**Obr. 5**). Nadbytek tetrahydrolistové kyseliny (leukovorin-LV) vytváří spolu s fluorouridinem a thymidylátsyntázou komplex, který blokuje další syntézu thymidinu (Waters J, 2001).

Až 80% aplikovaného 5-FU je katabolizováno v játrech; poločas rozpadu je krátký (5–15 min). Prvním katabolickým krokem je redukce pyrimidinového kruhu 5-FU enzymem dihydropyrimidindehydrogenázou (DPD). Výsledným produktem katabolismu 5-FU je fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL). Tento metabolit je vylučován močí, má dlouhý poločas rozpadu a může působit neurotoxicky (Gorlick and Bertino, 1999, Kuhn JD, 2001).

### Další klasické fluoropyrimidiny

5-fluorodeoxyuridin (FUdR) je derivátem 5-FU vyznačujícím se nejvyšší extrakční frakcí v játrech. Jeho intraarteriální aplikace do arteria hepatica zajistí až

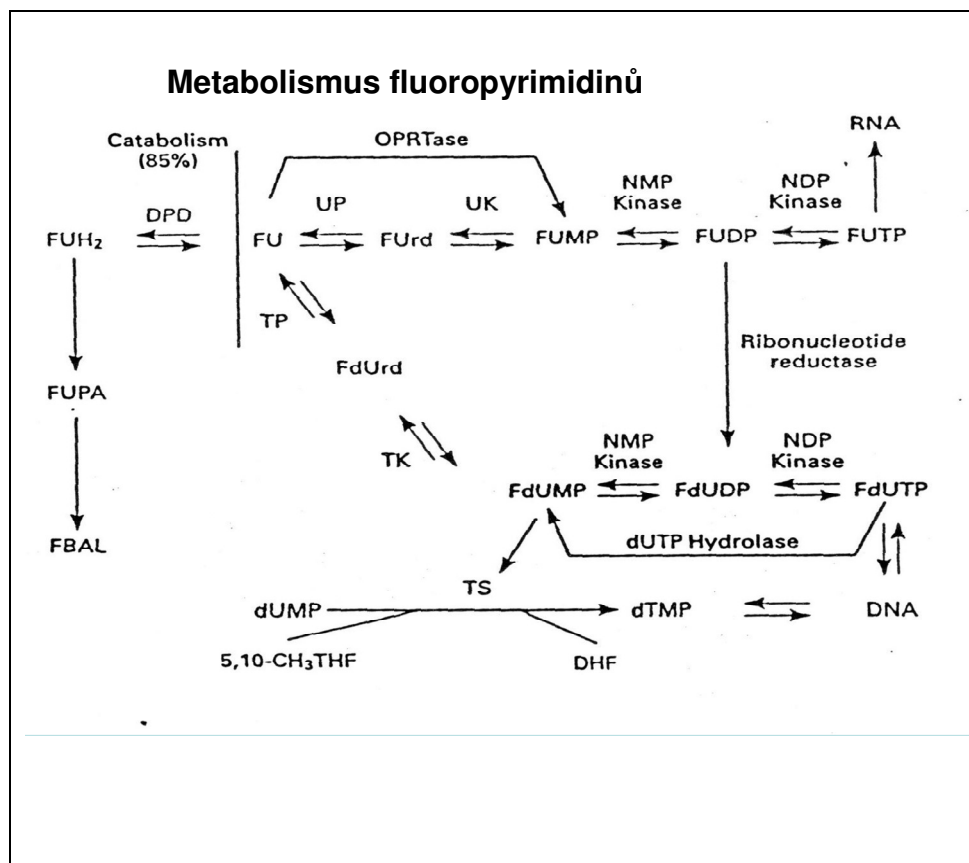


400násobnou expozici cytostatika v nádoru ve srovnání s nitrožilním podáním a zároveň nízkou systémovou toxicitou.

Tegafur (Ftorafur) je charakterizován zvýšenou lipofilitou, což rozšiřuje spektrum jeho účinnosti o mozkové nádory. Je k dispozici v perorální formě, která usnadňuje ambulantní léčbu. Vyznačuje se opožděnou hematologickou toxicitou.

Kapecitabin (Xeloda) je perorální fluoropyrimidinový prekurzor (prolék), který je v jaterní a v nádorové tkáni postupně ve 3 krocích (enzymy karboxyesterázou, cytidindeaminázou a thymidinfosforylázou) konvertován na 5-FU. Postupné uvolňování 5-FU zaručuje protražovaný účinek. Předpokládá se, že selektivní aktivace thymidinfosforylázou (TP) v nádorové tkáni zlepšuje terapeutický poměr kapecitabinu (Malet-Martino and Martino, 2002).

**Obrázek 5. Metabolismus fluoropyrimidinů (Waters J, 2001)**



### Kombinované fluoropyrimidiny

Potlačení katabolického účinku enzymu dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) je spojeno s prodloužením terapeutické aktivity 5-FU. 5-FU není tak rychle metabolizován na neaktivní látky. Inhibitory DPD mohou zvýšit chemosenzitivitu 5-FU. Významná redukce biotransformace 5-FU pomocí inhibitorů DPD musí být doprovázena také snížením dávek 5-FU, aby se zamezilo případným závažným toxickým účinkům (Haaz et al., 1996).

Ethyniluracil (Eniluracil) je ireverzibilním inaktivátorem DPD. Jeho podání snižuje inter a intraindividuální variabilitu biotransformace 5-FU a vliv cirkadiálního rytmu 5-FU. Perorálně podávaný ethyniluracil inaktivuje DPD v gastrointestinálním traktu a v játrech, čímž zlepší dostupnost 5-FU až na 100% a poločas rozpadu prodlouží z 5-15 min na 4-6 hod (Saleem et al, 2000).

UFT (Orzel) je perorální cytostatikum obsahující uracil a tegafur v poměru 4:1. Uracil v nádorové tkáni kompetitivně reverzibilně inhibuje enzym DPD. Tegafur slouží jako prekursor 5-FU, který je konvertován enzymy v játrech na 5-FU.

### Specifické inhibitory thymidylátsyntázy (TS)

Jedním z hlavních mechanismů účinku fluorovaným pyrimidinů je inhibice enzymu thymidylátsyntázy. Existují však i cytostatika ze skupiny antifolátů, které se váží na jiné vazebné místo enzymu TS, a tím inhibují tvorbu deoxythymidintrifosfátu (dTTP), klíčového nukleotidu pro syntézu DNA (Jackman et al.,1991).

Ke specifickým inhibitorům thymidylátsyntázy ze skupiny antifolik řadíme pemetrexed (MTA-multi target antifolat), nolatrexed a raltitrexed (Tomudex). Výsledky publikovaných studií s raltitrexedem prokázaly kratší dobu do progrese

onemocnění u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem a odlišný profil nežádoucích účinků (elevace transamináz) (Cocconi et al 1998).

#### **2.5.4. Cílená biologická léčba**

Hlubší poznání molekulárních principů přenosu signálu, buněčné komunikace, procesu angiogeneze a metastázování přispělo k rozvoji cílené molekulární biologické léčby, využívající přímého zásahu klíčových terčových struktur nádorové buňky. Tím se odlišuje od chemoterapie, která působí především na proliferující buňky. Cílená molekulární léčba (targeted therapy) již není jen předmětem výzkumu, ale je realitou v klinické praxi v léčbě kolorektálního karcinomu (Pfeiffer et al., 2007), také v léčbě karcinomu prsu, bronchogenního karcinomu, karcinomu ledviny, jater atd. Molekulární léky narušují základní signální dráhy, přičemž protinádorového účinku může být dosaženo cílením léčiva nejen proti nádorové buňce, ale také proti buňkám nádorového stromatu.

Základními nástroji cílené biologické léčby jsou monoklonální protilátky a nízkomolekulové jednozásahové či vícezásahové tyrosinkinázové inhibitory (**Obr. 6**). Ve srovnání s konvenční chemoterapií přináší tento léčebný způsob jiné spektrum nežádoucích účinků, převládají alergické projevy a kožní změny, které odezní většinou brzy po přerušení léčby. Kvalita života tak není výrazným způsobem negativně ovlivněna. Výskyt kožních změn (akneformní exantém) může být faktorem předpovídajícím léčebný efekt (Cunningham et al., 2004).

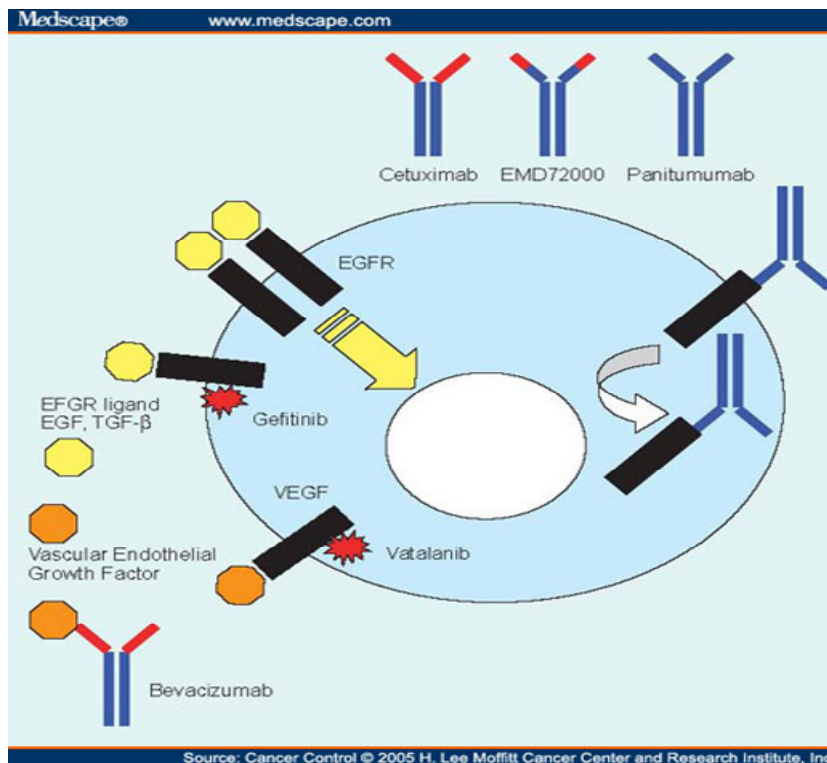
Cetuximab (Erbix) je chimérická IgG1 monoklonální protilátka. Cetuximab soutěží s endogenním ligandem o vazbu na externí doménu receptoru pro epidermální růstový faktor (erbB-1/EGFR). Navázáním cetuximabu na EGF receptor se blokuje signální transdukce, což inhibuje růst nádoru a vede k apoptóze. K dalším

účinkům patří inhibice produkce angiogenních faktorů, zprostředkování na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity (antibody-dependent cell cytotoxicity - ADCC) a synergické působení s chemoterapií a radioterapií. Analýzy studií FOLFOX+cetuximab a FOLFIRI+cetuximab prokázaly vyšší léčebnou odpověď u nemocných s normálním, nemutovaným „wild type“ K-RAS, proto je léčba EGFR inhibitory indikována pouze u pacientů s nemutovaným K-RAS.

Bevacizumab (Avastin) je monoklonální protilátka, která soutěží o vazbu na externí doménu receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Tímto způsobem potlačuje angiogenezi a zpomaluje či zastavuje růst nádoru. Přibližně u 50% pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem je VEGF nadměrně exprimován (Emmanouilides et al., 2007). Spolehlivé prediktory pro léčbu bevacizumabem se nepodařilo odhalit, účinnost bevacizumabu u normálního a mutovaného K-RAS není rozdílná (Hurwitz et al., 2009). Kombinovaná léčba 2 monoklonálními protilátkami – anti VEGF + anti EGFR s chemoterapií v první linii pokročilého kolorektálního karcinomu (studie CAIRO2 a PACCE) vedla ke zkrácení přežití a nárůstu nežádoucích účinků léčby. Přepokládá se, že dochází k negativním interakcím mezi látkami cílenými na VEGF a EGFR signální cestu.

Panitumumab (Vectibix) je anti EGFR 100% humanizovaná monoklonální protilátka, která se podává v monoterapii u pacientů s chemorefrakterním metastazujícím kolorektálním karcinomem. Vazba panitumumabu na EGFR vede k inhibici buněčného růstu, indukci apoptózy a snížení produkce interleukinu- 8 a VEGF. Nemutovaný typ K-RAS genu je nejdůležitějším pozitivním molekulárním prediktorem léčebné odpovědi na biologickou terapii panitumumabem (Amado et al, 2008), zatímco u pacientů léčených pouze chemoterapií s fluoropyrimidiny nemá stav K-RAS žádnou prediktivní hodnotu (Etienne-Grimaldi et al., 2008).

**Obrázek 6. Monoklonální protilátky a TKI EGFR- mechanismus účinku**



### 2.5.5. Experimentální léčba kolorektálního karcinomu

V současnosti probíhají klinické studie I. a II.fáze s experimentální cílenou biologickou léčbou (**Tab.7**), která ovlivňuje především procesy nitrobuněčné signalizace (např.inhibitory cyklindependentních kináz, inhibitory angiogeneze).

**Tabulka 7. Přehled experimentální léčby kolorektálního karcinomu**

Cílová molekula- mechanismus účinku	Experimentální lék v terapii CRC
TK inhibitor EGFR	Gefitinib, Erlotinib
TK inhibitor VEGFR	Vatalanib
Vazba na $\beta$ tubulin	ABT-751, Epothylon D, DJ-927
GARFT inhibitor	Pelitrexol
c-kit, bcr-abl, PDGF	Imatinib mesylát
Inhibitor angiogeneze	Thalidomid

### 3. MOŽNOSTI STANOVENÍ PROGNÓZY A PREDIKCE LÉČEBNÉHO VÝSLEDKU CHEMOTERAPIE

#### 3.1. PREDIKTIVNÍ A PROGNOSTICKÉ FAKTORY

V současnosti je v onkologii v popředí zájmu studium prognostických a prediktivních faktorů, které mohou dále charakterizovat jinak velmi heterogenní nádorové onemocnění.

Prognostický faktor je spojen s klinickým výstupem pro pacienta – s prognózou: s dobou přežití (overall survival OS), s dobou od zahájení léčby do nových příznaků nemoci (progress free survival PFS), nebo s dobou bez známek onemocnění (disease free interval DFI). Prognostické faktory působí nezávisle na podané léčbě, umožňují rozdělení pacientů do skupin (tzv. stratifikace rizika). U pacientů jednotlivých prognostických skupin je pak indikována různě intenzivní léčba, příznivé prognostické faktory mohou selektovat pacienty bez nutnosti adjuvantní onkologické léčby.

Prediktivní faktor předpovídá rozdílnou účinnost (léčebnou odpověď) na určitou onkologickou terapii. Prediktivní faktory mohou individualizovat protinádorovou léčbu (tailoring therapy). Vzhledem k tomu, že prediktivní faktory reflektují odpověď nádoru na specifickou protinádorovou léčbu, mohou tak optimalizovat výběr cytostatik a biologické léčby dle jejich mechanismu účinku a profilu toxicity.

V nádorové tkáni kolorektálního karcinomu a v okolní zdravé střevní sliznici bylo studováno přibližně 25 možných prognostických a prediktivních markerů. Mezi

velmi slibné patří chromosomální delece (DCC, DPC4), ztráta heterogenity 18q chromosomu (LOH), status p53, mikrosatelitová instabilita (MSI), nádorová DNA ploidita, CEA, EGFR, K-RAS (vztah k terapii EGFR monoklonálními protilátkami), enzymy TP, TS, DPD, OPRT (vztah k terapii 5-FU), UGT1A1 (vztah k terapii irinotekanem), ERCC1, XPD, GSTP1 (vztah k terapii oxaliplatinou). Žádný z těchto sledovaných markerů nebyl doposud doporučen ke standardnímu klinickému využití. Od roku 2008 se nově se využívá stanovení exprese EGFR a stavu K-RAS k predikci léčebné odpovědi na anti-EGFR monoklonální protilátky. Validace těchto slibných prediktivních a prognostických markerů byla a je cílem řady rozsáhlých retrospektivních a především prospektivních klinických studií. Využití moderních standardizovaných metodik vyšetření, vytváření tkáňových bank, je příslibem do budoucnosti pro volbu léčebné strategie pacientů s kolorektálním karcinomem.

Cílem farmakogenomiky je hledat korelace mezi genovým profilem pacienta (variabilita mnoha genů) a odpovědí na podávanou léčbu. Polymorfismy cílových genů, které kódují enzymy metabolismu určitých cytostatik, mohou měnit léčebnou odpověď. U některých pacientů dochází k velmi dobré efektu léčby, u jiných pouze k částečné nebo minimální léčebné odpovědi, zatímco u dalších pacientů převažují nežádoucí účinky léčby bez klinické odpovědi. Farmakogenetika pak studuje vztah mezi individuální variabilitou určitých klíčových genů účastnících se metabolismu studovaného léku a odpovědí na terapii tímto preparátem (predikce odpovědi na léčbu 5-FU, oxaliplatinou, irinotekanem atd). Farmakoproteomika přímo stanovuje proteinovou expresi studovaného enzymu (např. kvantitativní imunofluorescencí) ve vztahu k léčebné odpovědi na určitou terapii. Navzdory řadě studií, cílených k vyhledávání vhodných molekulárních prediktorů na léčbu 5-fluorouracilem, žádný ze studovaných markerů senzitivity a rezistence na 5-FU nemá dostatečné množství

důkazů pro zavedení do standardní praxe - doporučení ASCO 2006 (Locker et al., 2006).

Dosud provedené studie naznačují, že vysoké exprese určitých klíčových enzymů pyrimidinového metabolismu v nádorové tkáni: thymidylátsyntázy (TS), thymidinfosforylázy (TP) a dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) jsou negativním prognostickým faktorem pro další vývoj onemocnění u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem. Otázka metod stanovení exprese enzymů TS, TP a DPD v nádorové tkáni a predikce léčebné odpovědi na 5-FU není v doposud publikovaných studiích jednoznačně zodpovězena.

Vysoká aktivita enzymu DPD v nádorové tkáni vede k rychlé degradaci 5-FU na neaktivní metabolity, naopak snížená aktivita DPD vede k vysoké toxicitě léčby fluoropyrimidiny ve zdravých tkáních, která může v nejzávažnějších případech vyústit v život ohrožující stav.

## 3.2. PREDIKCE CHEMOSENZITIVITY FLUOROPYRIMIDINŮ

### 3.2.1. Thymidylátsyntáza (TS)

Thymidylátsyntáza je dimerický cytoplazmatický enzym, který katalyzuje metylaci deoxyuridin-5-monofosfátu (dUMP) na deoxythymidinmonofosfát (dTMP), který je zdrojem pro deoxythymidintrifosfát (dTTP) – nukleotid nezbytný k syntéze DNA. TS je klíčovým enzymem DNA syntézy a je atraktivním cílem protinádorové léčby. Thymidylátsyntázu inhibují cytostatika ze skupiny fluoropyrimidinů a antifolik. Intratumorální exprese enzymu TS hraje tedy důležitou roli v chemosenzitivitě na tato cytostatika.



Za posledních deset let bylo publikováno více než třicet studií, zabývajících se prognostickou úlohou enzymu TS. V roce 2004 byla publikována metaanalýza dvaceti prací (Popat et al., 2004). Jednalo se o třináct studií u 887 pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem a o sedm studií u 2610 pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem. Metaanalýza prokazuje, že vysoká exprese TS je nezávislým negativním prognostickým faktorem v parametrech doby do progresu onemocnění a v celkovém přežití pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem. U pacientů s časným kolorektálním karcinomem vysoká exprese TS prokazuje horší celkové přežití (OS) u pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem.

Výsledky studií zabývajících se prediktivní rolí enzymu TS (ve vztahu k léčbě fluoropyrimidiny) jsou často odlišné a vyvolávají řadu dalších otázek. V šesti klinických studiích u pacientů s lokálně pokročilým či metastazujícím kolorektálním karcinomem (Salonga et al., 2000, Corsi et al., 2002, Aschele et al., 1999, Cascinu et al., 1999, Bathe et al., 1999, Ichikawa et al., 2003) bylo zjištěno, že vysoká exprese thymidylátsyntázy je spojena s rezistencí na léčbu 5-fluorouracilem. Obdobně studie u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem léčených specifickým inhibitorem thymidylátsyntázy – raltitrexedem (Farrugia et al., 2003) prokazuje, že při vysoké expresi TS není zaznamenána klinická odpověď na tento preparát.

Méně jednoznačná je prediktivní hodnota exprese enzymu TS u pacientů s časným kolorektálním karcinomem léčených adjuvantní chemoterapií s fluoropyrimidiny. Ve studii Edlera (Edler et al., 2002) bylo zjištěno, že prospěch z adjuvantní léčby fluoropyrimidiny mají pacienti s vysokou expresí TS, naopak překvapivě pacienti s nízkou expresí TS mají horší výsledky léčby při podávání adjuvantní chemoterapie. Opačné výsledky byly zjištěny ve studii Cascina (Cascinu

et al., 2001), kde pacienti s vysokou expresí TS neodpovídali na adjuvantní léčbu fluoropyrimidiny. V nedávno publikované rozsáhlé studii s 945 pacienty (Soong et al., 2008) bylo zjištěno, že nízká exprese TS (také nízká exprese TP a DPD) u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených pouze chirurgickým výkonem byla negativním prognostickým faktorem, zatímco u pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU měla nízká exprese TS (také nízká exprese TP a DPD) pozitivní prediktivní význam. V retrospektivní studii Allegry (Allegra et al., 2003) u 706 pacientů léčených adjuvantní chemoterapií fluoropyrimidiny bylo publikováno, že exprese TS nemá prediktivní hodnotu.

Otázkou také zůstává, zda je exprese sledovaného enzymu v primárním nádoru identická s expresí v metastázách kolorektálního karcinomu. V pěti studiích (Cascinu et al., 1999, Corsi et al., 2002, Gonen et al., 2003, Saw et al., 2002, Kornmann et al., 1997) byla exprese enzymu TS v primárním tumoru a metastázách odlišná. Možným vysvětlením je klonální proliferace určitého typu nádorových buněk, které jsou schopny metastázovat, a v určitých charakteristikách se liší od buněk primárního nádoru. Pokud bychom se přiklonili k tomuto názoru, bylo by nutné provádět opakované biopsie z metastáz (event. z různých lokalizací metastáz), a znovu stanovit expresi thymidylátsyntázy. Oproti tomu nedávná studie (Kuramochi et al., 2006) neprokázala pomocí RT-PCR rozdílnou expresi v primárním tumoru a v jaterních metastázách. Studie (Kobayashi et al., 2008) pak prokázala stejnou expresi TS v synchronních jaterních metastázách a odlišnou expresi TS v metachronních jaterních metastázách kolorektálního karcinomu. V práci Ohrlingové (Ohrling et al., 2005) měla nízká exprese TS v metastázách do lymfatických uzlin pozitivní prognostický význam.

Několik prací se zabývalo také vztahem mezi polymorfismy v TS genu a klinickým průběhem onemocnění. Dosud byly identifikovány a studovány tři formy polymorfismů TS: variabilní počet repetitivních sekvencí (2R versus 3R), G>C SNP substituce na 3R alele (3RG > 3RC) a 6-bp delece na 3UTR (+6bp/- 6bp 3URT). Jednoznačná korelace mezi těmito polymorfismy a klinickým průběhem zatím nebyla nalezena (Gusella and Padriani, 2007).

Je nutné vzít v úvahu, že tyto často rozporuplné výsledky studií byly dosaženy různými metodami stanovení exprese thymidylátsyntázy, jak bude zmíněno dále.

### **3.2.2. Thymidinfosforyláza (TP)**

Thymidinfosforyláza je enzymem nezbytným pro syntézu DNA a růst buněk, katalyzuje přeměnu thymidinu na thymin. Tento enzym se účastní také metabolismu fluoropyrimidinů, přeměnou 5-deoxy-fluorouridinu na 5-fluorouracil (Iltz et al., 1985). Enzym TP je strukturou i funkcí identický s endotelovým destičkovým růstovým faktorem PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth faktor), který má vysokou afinitu k endotelu (Sumizawa et al., 1993). 2-deoxy-d-ribose - produkt katabolismu enzymu thymidinfosforylázy prokazuje chemotaktické účinky in vitro, a in vivo vykazuje angiogenní aktivitu (Miyadera et al., 1995). Vysoký stupeň exprese TP byl zjištěn v buňkách kolorektálního karcinomu, nádorů prsu, žaludku, vaječníků, ledvin a močového měchýře (Takebayashi et al., 1996, Maeda et al., 1996, Toi et al., 1995, Mori et al., 2000) a jeho aktivita koreluje s rychlým růstem a invazí maligních buněk. TP také zabraňuje přechodu buněk do apoptózy bez ohledu na stav proteinu p53 (Matsuura et al., 1999).

Enzym thymidinfosforyláza se také uplatňuje v intratumorální aktivaci fluoropyrimidinů, především perorálního kapecitabinu. Perorální kapecitabin prochází intaktně zažívacím traktem a ve třetím kroku je právě enzymem TP metabolizován na 5-FU v nádorových buňkách.

Duální a zřejmě protikladná role thymidinfosforylázy (PD-ECGF versus preferenční aktivace fluoropyrimidinů v nádoru) vede k rozporuplným výsledkům klinických studií, zabývajících se prognostickým a prediktivním významem exprese enzymu TP u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Několik studií prokazuje, že vysoká intratumorální exprese TP vede k vysoké agresivitě nádoru a ke špatným klinickým výsledkům. V práci Matsuury (Matsuura et al., 1999) bylo zjištěno, že stupeň exprese TP v nádorových buňkách dobře koreluje s nitronádorovou hustotou kapilár (IMVD intratumoral microvessel density) a tím s angiogenním potenciálem nádorových buněk a metastazováním. Proto jsou TP inhibitory syntetizovány jako látky s antiangiogenním účinkem.

Na druhou stranu z dalších studií vyplývá, že exprese TP v nádoru je pozitivním prediktivním faktorem pro léčbu fluoropyrimidiny. Jako velmi slibné se jeví strategie kombinované léčby (např. docetaxel + kapecitabin či radioterapie + fluoropyrimidiny), jejichž cílem je zvýšit aktivitu TP enzymu v nádorové tkáni a optimalizovat tak aktivaci fluoropyrimidinů cíleně v nádoru. V práci Blanquicetta (Blanquicett et al., 2002) bylo zjištěno, že ozářením xenografů glioblastoma multiforme (GBM) se zvyšuje exprese TP mRNA 60-70x ve srovnání s neozářenými kontrolními vzorky. Indukce exprese TP mRNA byla prokázána v několika klinických studiích u pacientů po neoadjuvantní chemoradioterapii karcinomu konečníku (Jakob et al., 2006, Kocáková et al., 2007). Zvýšená exprese TP mRNA byla pozorována jak u pacientů, kteří na neoadjuvantní léčbu odpovídali, tak také u pacientů bez regrese

onemocnění (hodnoceno při následném chirurgickém výkonu). Tyto rozdíly tak charakterizují komplexnost a složitost role thymidinofosforylázy v nádorové buňce – odlišný prognostický a prediktivní význam (Ciccolini et al., 2004).

V několika studiích byla imunohistochemicky studována exprese TP nejen v cytoplazmě a jádrech nádorových buněk, ale i v nádorovém stromatu – v makrofázích, lymfocytech a fibroblastech, v buňkách hladkého svalu a ve zdravé sliznici. Ve studii Shomori (Shomori et al., 1999) bylo zjištěno, že exprese TP je vyšší ve stromálních buňkách nádoru a v buňkách okolní sliznice než v samotných nádorových buňkách. Obdobně ve studii Haby (Haba et al., 1998) byla nalezena vyšší exprese TP ve stromatu nádoru než ve vlastních nádorových buňkách. Ve studii Zhanga (Zhang et al., 2004) bylo prezentováno, že stromální makrofágy (TAMs tumor-associated macrophages) jsou významným zdrojem TP v buňkách kolorektálního karcinomu. V práci Yasuna (Yasuno et al., 2005) měla intratumorózní exprese TP pozitivní vztah k hustotě nitronádorových kapilár, zatímco stromální exprese TP u pacientů, kteří podstoupili kurativní resekci predikovala dobrou klinickou odpověď na léčbu fluoropyrimidiny.

Ve studii Schullera (Schuller et al., 2000) byla u 19 pacientů vyšetřena metodou HPLC koncentrace 5-FU v nádorové tkáni, ve zdravé tkáni a v plazmě po podání kapecitabinu (pět až sedm dní). Zároveň byla studována aktivita enzymu TP katalytickou metodou. V buňkách primárního nádoru byla zjištěna průměrně 3,2x vyšší koncentrace 5-FU než ve zdravé tkáni a 3,6x vyšší aktivita TP v nádorových než zdravých buňkách. Oproti tomu v buňkách jaterních metastáz kolorektálního karcinomu byla zjištěna koncentrace 5-FU 1,4x vyšší než ve zdravých buňkách (statisticky nesignifikantní) a stejná aktivita enzymu TP v metastázách a ve zdravé

tkáni. Výsledky této práce naznačují, že kapecitabin není preferenčně aktivován pomocí enzymu TP v jaterních metastázách kolorektálního karcinomu.

V práci Meropola (Meropol et al., 2006) byla studována exprese enzymů TS, TP, DPD, poměr TP/DPD ve vzorcích primárního nádoru a v jaterních metastázách kolorektálního karcinomu (metodou IHC a RT-PCR) u pacientů léčených chemoterapií irinotekan + kapecitabin. Pozitivní IHC exprese TP v primárním nádoru i metastázách korelovala s léčebnou odpovědí na rozdíl od IHC exprese TS a DPD. Obdobně vysoká genová exprese TP mRNA stanovená pomocí RT-PCR v primárním tumoru měla vztah k léčebné odpovědi, ne tak již genová exprese TP mRNA v metastázách. Hodnocení genové exprese TS, DPD mRNA a poměr TP/DPD mRNA neprokázalo prognostický význam.

### **3.2.3. Dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD)**

DPD je počátečním a klíčovým enzymem odbourávání cytostatik ze skupiny fluoropyrimidinů na neaktivní metabolity. DPD redukuje dvojnou vazbu uracilu a thyminu. Výsledným produktem katabolismu 5-FU je fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL).

Expese DPD mRNA je tkáňově specifická, enzym DPD je přítomen u zdravých osob především v játrech a v periferních mononukleárních buňkách (Mori et al., 2000). Aktivita v tkáních je variabilní. V primárním nádoru i metastázách kolorektálního karcinomu byl popsán nižší stupeň exprese DPD než ve zdravé okolní sliznici (Tanaka-Nozaki et al., 2001). Je-li v nádorové tkáni vysoká hladina DPD mRNA a vysoká aktivita enzymu DPD, je 5-fluorouracil rychle katabolizován na FBAL a je tedy potlačena anabolická konverze 5-FUMP na 5-FUTP a 5-FdUMP. Nízká exprese enzymu DPD v nádorové tkáni je tedy považována za pozitivní prediktivní faktor pro léčby fluoropyrimidiny (Salonga et al., 2000).

Příčinou závažné toxicity až fatálních komplikací při léčbě fluoropyrimidiny je obvykle porucha metabolismu 5-FU a jeho derivátů v důsledku genetické deficiencie enzymu DPD, způsobující zvýšenou biologickou dostupnost 5-fluorouracilu. Nízká exprese enzymu DPD ve zdravé tkáni je považována za faktor předpovídající toxicitu léčby fluoropyrimidiny. Aktivita DPD může být také ovlivněna různými faktory: přítomností DPD inhibitorů (cisplatina, allopurinol, uridin), hladinou NADPH kofaktorů (Milano and McLeod, 2000). Bylo zjištěno, že hladina DPD podléhá cirkadiánnímu rytmu, který je inverzní k cirkadiánnímu rytmu 5-fluorouracilu. Exprese DPD je u žen asi o 15% nižší než u mužů. Metaanalýza 12 klinických studií s 2448 pacienty léčenými pro diagnózu kolorektálního karcinomu bolusovým podáváním 5-FU prokázala vyšší incidenci nežádoucích účinků léčby u žen (stomatitida, leukopenie, alopecie, nauzea, zvracení a průjem) (Sloan et al., 2002).

Defekty aktivity DPD jsou způsobeny 2 typy poruch:

1. Mutace v genu DPD mohou způsobit změnu aminokyselinového složení proteinu DPD, jejímž důsledkem je snížení jeho katalytické aktivity. Četnost nosičů heterozygotních mutací v genu DPD je v běžné populaci popisována mezi 1-5,8% (Van Kuilenburg et al., 2000). Doposud bylo identifikováno 20 odlišných funkčních mutací v DPD genu vedoucích ke snížené aktivitě enzymu DPD (Innocenti and Ratain, 2002). Nejčastější kauzální mutací je G>A transpozice v exonu 14 (IVS 14 +1G>A), která vede ke ztrátě enzymové aktivity DPD (Wei et al., 1996, Van Kuilenburg et al., 2000) a ke vzniku závažné toxicity při léčbě 5-fluorouracilem (Johnson et al., 1999).

2. Snížená exprese fyziologické varianty DPD genu je zjištěna vzácně u osob s autozomálně recesivním onemocněním s projevy neurologického defektu (Kouwaki et al., 1998).

Z pohledu klinického onkologa by bylo vhodné, aby pacienti s plánovanou léčbou fluoropyrimidiny podstoupili vyšetření polymorfismů genu DPD. V současnosti není standardní testování zavedeno, je však dostupný kit PGX-5FU StripAssay, umožňující rychlou identifikaci nosičů homozygotní a heterozygotní alelické varianty DPYD 2A.

### 3.3. METODY STANOVENÍ EXPRESE PREDIKTORŮ TS, TP, DPD

V laboratorní praxi bylo zavedeno několik metod stanovení exprese sledovaných molekul TS, TP, DPD v nádorové tkáni. Každá z metod má své výhody a nevýhody (**Tab. 8**).

**Tabulka 8. Srovnání metod stanovení exprese prediktorů**

Metoda vyšetření	Enzymová aktivita	IHC	RT-PCR	ELISA	QIF
Aktivita enzymu	ano	ne	ne	ne	ne
Standartizace	ano	ne	ano	ano	ano
Velikost vzorku	>500mg	<10mg	100mg	>100mg	<10mg
Zpracování vzorku	Čerstvý/ zmražený vzorek	Fixovaný vzorek	Čerstvý/ zmražený vzorek	Čerstvý/ zmražený vzorek	Fixovaný vzorek
Lokalizace vzorku	ne	ano	ne	ne	ano
Kvantifikace	ano	ne	ano	ano	ano

#### Biochemické metody (enzymové, ligand–vázající)

Stanovení katalytické aktivity enzymu TS je založeno na měření množství tritia, uvolněného z (3H)-deoxyuridinu při přeměně (3H)-deoxyuridinmonofosfátu na deoxythymidinmonofosfát (Roberts D, 1966).



Další metoda stanovující aktivitu enzymu TS je metoda ligand-vázající, která stanovuje vazebnou kapacitu aktivního metabolitu 5-fluorouracilu - FdUMP po radioaktivní expozici (3H)-FdUMP (Moran et al., 1979)

#### Molekulárně genetické metody (semikvantitativní PCR, RT-PCR, PET-PCR)

Technika RT-PCR vychází z izolace mRNA v malém vzorku čerstvé (event. fixované) tkáně, následuje reverzní transkripce do cDNA a amplifikace pomocí PCR. Výsledná kvantifikace se udává poměrem sledovaného (TS, TP, DPD) genu a referenčního genu. Jako referenční geny se využívají tzv. housekeeping geny, nejčastěji gen pro glycerinaldehydfosfát dehydrogenázu (GAPDH) nebo  $\beta$ -aktin, které slouží jako endogenní kontrola se známým počtem kopií. Výhodou je vysoká senzitivita stanovení; metoda však nezachytí postranskripční a postranlační regulace, není detekována přímo aktivita proteinu v dané tkáni (Bustin SA, 2002).

#### Imunohistochemické metody (IHC)

Jsou založeny na semikvantitativním stanovení exprese enzymu pomocí anti-TS/ TP protilátky (monoklonální antiTS 106 či polyklonální protilátky). Procenta pozitivních buněk jsou vyhodnocena dle skóre 0-3, hodnoty 0-1 charakterizují nízkou expresi enzymu, hodnoty 2-3 vysokou expresi enzymu (Johnson et al., 1991). Někteří autoři také uvádějí, zda se jedná o expresi fokální či difuzní, a expresi jadernou a cytoplazmatickou.

#### ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Metoda sloužící ke zjišťování přítomnosti protilátek proti určitému antigenu. Umožňuje stanovení enzymu za využití protilátek proti němu. V případě stanovení

např. DPD lze využít tzv. sendvičovou modifikaci. Vzorek, obsahující zjišťovaný antigen, se aplikuje na destičku, na kterou je vázána protilátka proti DPD. Druhá protilátka je značená enzymem a reaguje s jinými determinanty na povrchu molekuly zjišťovaného antigenu (v tomto případě enzymu DPD). Po přidání chromogenního substrátu je možné detekovat fotometricky barevnou změnu substrátu.

### Kvantitativní imunofluorescence (QIF - Quantitative immunofluorescence)

Jedná se o moderní mnohobarevnou kvantitativní imunofluorescenční metodu, která v sobě spojuje výhody IHC a možnost kvantitativního vyhodnocení ve fixovaných vzorcích nádorové tkáně. QIF může stanovit poměr mezi imunoreaktivními proteiny (TS/DPD, TP/DPD), které hrají důležitou roli v metabolismu fluoropyrimidinů. Poměr v expresi těchto proteinů může predikovat léčebnou odpověď (Eliason and Megyeri, 2004).

### Nové laboratorní technologie

#### **Periferní cirkulující nádorové buňky**

Stanovení cirkulujících nádorových buněk (CTC) v krvi pacientů, kteří podstoupili kurativní resekci kolorektálního karcinomu, by mohlo určit pravděpodobnost návratu onemocnění. Nádorové buňky před založením metastatických ložisek musí vstoupit do cirkulace a uniknout imunitnímu dozoru. Přítomnost těchto buněk v periferní krvi je možné stanovit pomocí RT-PCR.

Hlavní výhodou této molekulární techniky je vysoká senzitivita detekce cirkulujících nádorových buněk. K detekci a amplifikaci specifické mRNA stačí pouze 5 nádorových buněk/1ml krve. Doposud byly studovány tyto nádorové markery na periferních nádorových buňkách kolorektálního karcinomu: CEA mRNA, cytokeratin

CK 19, 20, REG-4, uPA, TIAM 1. Tyto markery by mohly být užitečné při rozhodování o adjuvantní léčbě II. klinického stadia onemocnění.

### **Mikroarray technologie**

Technologie DNA mikroarray umožňují stanovit expresi stovek až tisíců genů současně v jednom testování. Metoda je založena na extrakci RNA ze vzorku nádoru (tissue microarray TMA) či periferních nádorových buněk, následně reverzní transkripci do cDNA, označení fluorochromy a hybridizaci s příslušnými DNA próbami. Stupeň fluorescence odpovídá velikosti exprese u sledovaného genu. (Aitman TJ, 2001). Exprese genů je vyjádřena jako molekulární podpis, který umožňuje vyjádřit stupeň rizika recidivy onemocnění a pomoci při volbě léčebné strategie u pacientů s nádorovým onemocněním. Genový podpis 14ti genů (regulátorů transkripce, buněčné adheze (galactin-8), buněčné diferenciaci, signální transdukce a transportu iontů) byl studován u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem, léčených chemoterapií FOLFIRI (Del Rio et al., 2007). Genový podpis předpovídal léčebnou odpověď na režim FOLFIRI s 95% pravděpodobností. Obdobně byl genový podpis s 23 geny studován v práci (Wang et al., 2004) u pacientů s kolorektálním karcinomem II. klinického stadia. Pravděpodobnost rozvoje recidivy onemocnění byla stanovena se senzitivitou 72% a specificitou 83%. V současnosti probíhají další klinické studie s mikroarray technologiemi, zkoumajícími senzitivitu či rezistenci na většinu cytostatik používaných v léčbě kolorektálního karcinomu (oxalipatina, irinotekan, bevacizumab, kapecitabin – studie MACCO), a studie sledující změny genového profilu u pacientů s rektálním karcinomem II. a III. klinického stadia před a po chemoradioterapii (5-FU, bortezomib, RT – studie NCT00280176).

# VLASTNÍ PRÁCE

## 4. CÍLE PRÁCE

Cílem výzkumu, jenž byl součástí postgraduálního doktorandského studia, bylo posouzení využitelnosti stanovení exprese thymidylátsyntázy (TS), thymidinfosforylázy (TP) a dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) jako faktorů, které by mohly zpřesnit informace o charakteru a závažnosti nádorového onemocnění a ovlivnit léčebné rozhodování.

K dosažení tohoto cíle bylo navrženo několik na sebe navazujících experimentů.

- ❖ Srovnání genové exprese thymidylátsyntázy (TS), thymidinfosforylázy (TP) a dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) na základě stanovení množství jejich příslušných mRNA ve vzorcích kolorektálního karcinomu a v okolní střešní sliznici pomocí RT-PCR.
- ❖ Srovnání proteinové exprese thymidylátsyntázy a thymidinfosforylázy na základě stanovení stupně jejich exprese ve vzorcích kolorektálního karcinomu a v okolní střešní sliznici imunohistochemickou analýzou.
- ❖ Korelace exprese enzymů thymidylátsyntázy a thymidinfosforylázy na úrovni proteinů a na úrovni jejich mRNA v nádorové a zdravé tkáni
- ❖ Stanovení prognostického a prediktivního významu exprese enzymů thymidylátsyntázy, thymidinfosforylázy a dihydropyrimidindehydrogenázy u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Konečným cílem bylo přispět k posouzení možnosti individualizaci léčby tak heterogenního onemocnění, jakým je kolorektální karcinom, na základě studia prognostických a prediktivních faktorů.

## 5. ZÁKLADNÍ SOUBOR

Do studovaného souboru bylo zařazeno 66 pacientů v období let 2002 až 2003, kteří byli diagnostikováni a léčeni pro karcinom tlustého střeva a konečníku na Onkologické klinice VFN v Praze a onkologických odděleních nemocnic Atlas Zlín, Opava, Jihlava a UVN v Praze. Odběr vzorků byl proveden na základě písemného souhlasu pacienta a podepsání „Informovaného souhlasu“ schváleného Etickou komisí dané nemocnice. Pacienti byli řádně seznámeni s použitím odebraných vzorků.

Vzorky nádorové tkáně byly získány při peroperační biopsii nebo při endoskopických výkonech na střevě u pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu. Vzorek nádorové tkáně každého pacienta byl rozdělen na dvě části. Před následným zpracováním byly odděleny všechny nekrotické části nádorové tkáně. Jedna část nádorové tkáně byla neprodleně vložena do roztoku RNA later (Ambion, Inc. USA) a skladována při teplotě 4°C po dobu maximálně 1 týdne. Vzorky byly následně zmrazeny na teplotu -20°C až do doby izolace RNA. Druhá část vzorku nádorové tkáně byla zalita do parafínu pro standardní histologické vyšetření a imunohistochemickou analýzu.

Vzorky zdravé sliznice byly získány z okolí (cca 1cm) od ložiska primárního nádoru při peroperační biopsii či endoskopických výkonech na střevě. Vzorek zdravé tkáně každého pacienta byl také rozdělen na 2 části. Před následným zpracováním byly odděleny všechny nekrotické části sliznice. Molekulárně genetické i imunohistochemické stanovení exprese prediktorů ve zdravé sliznici bylo provedeno stejným postupem jako ve v případě vzorků nádorů.

## 6. SROVNÁVACÍ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE TS, TP A DPD mRNA VE VZORCÍCH KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU A V OKOLNÍ STŘEVNÍ SLIZNICI

### 6.1.METODIKA

Všechny použité kity a enzymy byly určeny pro práci v laboratoři molekulární biologie. Jejich výrobci jsou uvedeni v textu v závorkách. Použitá H<sub>2</sub>O byla redestilována – ddH<sub>2</sub>O (GORO) a sterilizována autoklávováním (CertoClave). Při přípravě roztoků a při obecných laboratorních postupech byly použity protokoly vycházející z obecně respektované referenční laboratorní příručky (Sambrook et al., 1989). Při práci byla zachována pravidla správné laboratorní praxe.

Zmražené vzorky nádorové tkáně a zdravé sliznice v RNA lateru byly rozmrazeny a zváženy. Cca 50 mg tkáně bylo vloženo do homogenizátoru s roztokem 350 µl detergentního roztoku obsahujícího guanidiniothiocyanát pro lýzu buněčných membrán a rychlou inaktivaci buněčných RNáz. Vzorky byly homogenizovány po dobu 2 minut pomocí speciálních homogenizátorů za sterilních podmínek v digestoři.

Pro izolaci RNA byl použit Perfect RNA minikit (Eppendorf Scientific, Mc. Germany, Quagen). Izolace byla zahájena centrifugací zhomogenizované tkáně po dobu 5 minut. Přepipetovaný supernatant byl překlápním promíchán s 350 µl 70% etanolu. Poté bylo k lyzátu přidáno 200 µl RNA binding matrix a promícháno překlápním. V kolonce (RNA spine column) došlo k navázání izolované RNA na RNA binding matrix. Následně probíhala opakovaná centrifugace s promýváním za

pomocí Wash Solution (WS) 1, 2 tak, aby došlo k odstranění možné kontaminace. V dalším kroku byla chromatografická kolonka přemístěna do RNA – free collection tube a bylo do ní připipetováno 50 µl Molecular Biology Grade Water (MBGW). Po inkubaci, 5 minut v termostatu při 50°C, byla provedena centrifugace po dobu 2 minut při 16 000 g. Čistá RNA byla posledním odstředěním vymyta z membrány kolonky, rozpuštěna ve vodě a připravena k dalšímu zpracování, event. zamražená na teplotu - 80°C až do doby použití. Před zahájením RT-PCR pomocí komerčně dostupných kitů pro jednotlivé geny TS, TP, DPD jsme provedli rozmražení RNA a rozdělení na požadované alikvoty. Kontrola izolované RNA byla provedena elektroforetickou separací na agarózovém gelu.

Kvantifikace cílových genů TS, TP, DPD mRNA probíhala jako dvoustupňový proces za pomoci komerčně dostupných kitů pro kvantitativní RT-PCR: LightCycler - TS mRNA Quantification Kit plus, LightCycler - TP mRNA Quantification Kit plus a LightCycler - DPD mRNA Quantification Kit plus (všechny kity Roche Diagnostics GmbH Germany).

V prvním kroku jsme provedli reverzní transkripci z RNA na cDNA pomocí reverzní transkriptázy a TS (TP, DPD) specifických primerů. Dále byla provedena druhá transkripce z RNA na cDNA pomocí reverzní transkriptázy a glukozo–6-fosfát dehydrogenázy (G6PDH) specifických primerů. Produkt G6PDH reakce sloužil jako referenční gen pro kvantifikaci a také jako kontrola RNA stability a integrity. Dále jsme provedli transkripci pozitivní kontroly TS (TP, DPD) kalibrátorové RNA a negativní kontroly (vzorek nuclease free H<sub>2</sub>O) pro následnou relativní kvantifikaci a kontrolu možné přenesené kontaminace.

V druhém kroku byly fragmenty mRNA amplifikovány z cDNA za pomoci PCR v LightCycleru při využití specifických primerů. PCR byla zahájena

opakovanými cykly denaturace při 95°C po dobu 5 minut. Následně probíhala amplifikace za těchto podmínek: 10 sekund při 95°C, 10 sekund při 62°C a 10 sekund při 72°C v průběhu 45 cyklů.

Třetím krokem PCR reakce v LightCycleru bylo chlazení při 40°C po dobu 30 sekund. Výsledné amplikony byly detekovány fluorescenčně za pomoci specifických hybridizačních sond.

Vyhodnocení výsledků pomocí LightCycler relative Quantification Software probíhalo ve dvou krocích. V prvním kroku jsme celkové množství sledovaného genu vyjádřili jako poměr množství cílového a referenčního genu (T:R). V druhém kroku byl tento poměr (T:R) vztažen k poměru (T:R) kalibrační RNA (v použitém kitu měla kalibrační RNA hodnotu 1). Tento krok kompenzoval rozdíly jednotlivých PCR reakcí. Konečné výsledky byly vyjádřeny jako poměr (T:R) ve vzorku k poměru (T:R) v kalibrátoru.

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru CRAN 2.4.0.a programu Statistica 98 Edition. Pro měřené parametry v souboru byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum, frekvence a ostatní statistické ukazatele. Vybrané statistické údaje byly zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot diagramů a histogramů. Párová pozorování byla hodnocena užitím neparametrického párového znaménkového testu (Sign test).



## 6.2. VÝSLEDKY

Izolace RNA byla provedena úspěšně ve 132 vzorcích od 66 pacientů. Analýza exprese TP mRNA ve vzorku kolorektálního karcinomu a okolní zdravé sliznici byla vyhodnocena u všech 66 pacientů, analýza exprese TS mRNA u 28 pacientů a analýza DPD mRNA u 23 pacientů. Výsledky kvantitativní exprese TS, TP, DPD mRNA vyjádřené poměrem k referenčnímu genu G6PDH jsou znázorněny v (Tab. 9).

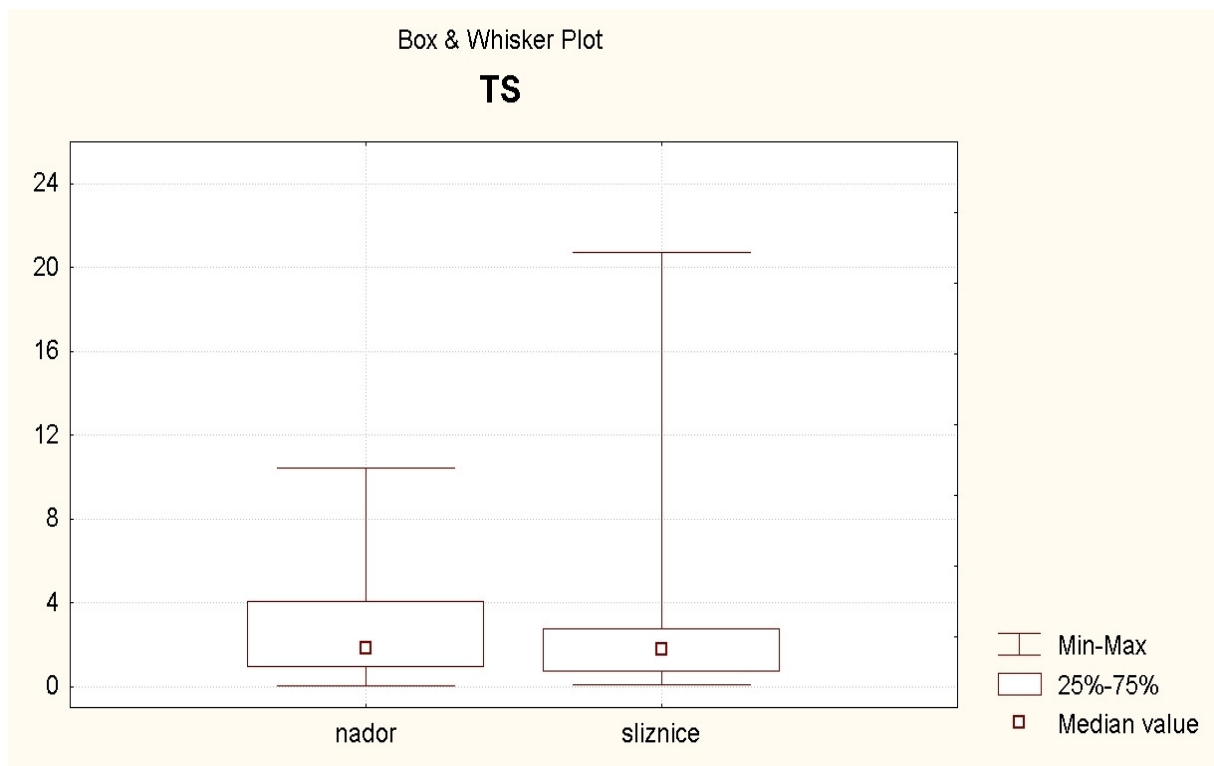
**Tabulka 9. Výsledky kvantitativní genové exprese TS, TP a DPD mRNA ve vzorcích kolorektálního karcinomu a okolní zdravé sliznici**

GEN	počet	vzorek	průměr	±SD	medián	minimum	maximum	p
TS	28	nádor	2,69	2,49	1,82	0,03	10,41	p=0,34
	28	sliznice	2,9	4,14	1,8	0,01	20,7	
TP	66	nádor	3,68	4,87	2,23	0,05	31,43	p=1,0
	66	sliznice	3,74	4,63	2,56	0,05	29,94	
DPD	23	nádor	11,34	13,35	5,29	0,51	53,7	p=0,034
	23	sliznice	24,1	19,23	19,27	0,01	60,35	

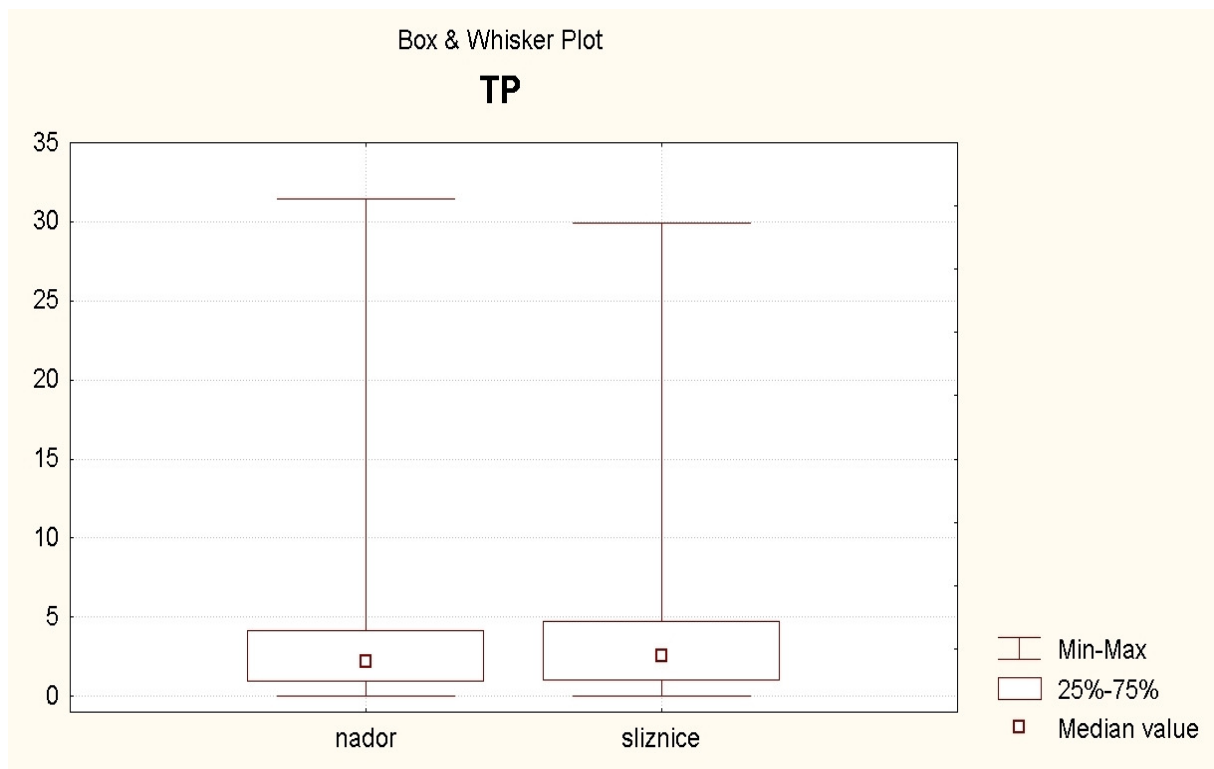
SD - směrodatná odchylka, p - párový Sign test, výsledné hodnoty jsou uvedeny jako poměr exprese cílového genu k expresi referenčního genu G6PDH

Rozdíly v expresi TS mRNA a TP mRNA v nádorové tkáni a ve zdravé sliznici jsou graficky znázorněny (**Graf 1**), (**Graf 2**) a nejsou statisticky signifikantní (TS mRNA Sign test p=0,344, TP mRNA Sign test p=1,0).

**Graf 1. TS mRNA exprese v nádorové tkáni a v okolní sliznici**

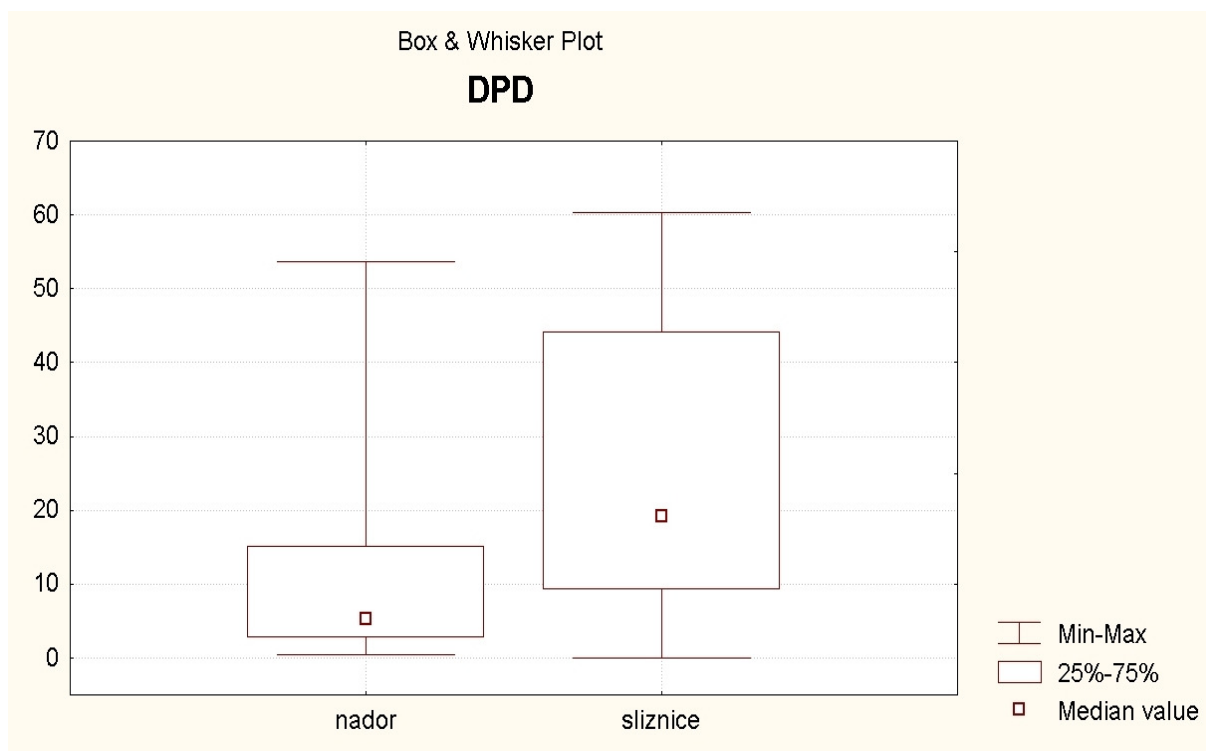


**Graf 2. TP mRNA exprese v nádorové tkáni a v okolní sliznici**



V kontrastu s těmito výsledky byla zjištěna 2x vyšší exprese DPD mRNA ve zdravé sliznici (DPD mRNA 24,1) ve srovnání s expresí DPD mRNA ve vlastní nádorové tkáni (DPD mRNA 11,34) a rozdíly mezi expresemi v nádorové a zdravé tkáni graficky znázorněné (**Graf 3**) jsou statisticky signifikantní (Sign test  $p=0,0347$ ).

**Graf 3. DPD mRNA exprese v nádorové tkáni a v okolní sliznici**



### 6.3. DISKUZE

Cílem této studie bylo provést srovnávací analýzu exprese TS, TP, DPD mRNA pomocí kvantitativní RT-PCR ve vzorcích čerstvě zmražené tkáně kolorektálního karcinomu a ve vzorcích okolní střevní sliznice. Izolace RNA z čerstvě zmražené tkáně vyžaduje přesné dodržení pravidel odběru a skladování vzorků, což

může být náročné při zavádění této metody do standardní klinické praxe. V naší práci byla úspěšná izolace RNA provedena ve 132 vzorcích čerstvě zmražené tkáně - obdobně (Salonga et al., 2000, Ichikawa W et al., 2003). V posledních letech bylo publikováno několik prací, které prokazují pomocí techniky RT-PCR úspěšné stanovení TS, TP, DPD mRNA z fixovaných parafinových vzorků tkáně (Kornmann et al., 2003, Lassmann et al., 2006, Kinoshita et al., 2007, Yamada et al., 2008). Tento přístup umožňuje (při použití mikrodisekční laserové techniky) kontrolu morfologie vzorků nádorů a je s výhodou použitelný v laboratorní praxi, zvláště při retrospektivním zpracování.

Enzymy TS, TP hrají klíčovou roli v mechanismu účinku fluoropyrimidinů, enzym DPD má nejdůležitější úlohu v katabolismu fluoropyrimidinů a s tím související vliv na toxicitu léčby ve zdravých tkáních.

Proto jsme si kladli otázku: „Je genová exprese klíčových enzymů TS, TP, DPD v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu a v okolní střevní sliznici odlišná?“

Vyhodnocení bylo provedeno pro jednotlivé exprese TS, TP, DPD mRNA samostatně.

V naší práci u 28 pacientů s kolorektálním karcinomem nebyla nalezena statisticky významně rozdílná TS mRNA exprese v nádorové tkáni a zdravé sliznici (Sign test  $p=0,34$ ). Exprese TS mRNA byla již opakovaně studována v tkáňových vzorcích kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, prsu, plic a nádorů hlavy a krku. Výsledky publikovaných studií přinášejí rozdílné závěry. Ve studii (Odin et al., 2003) za pomoci RT-PCR byla nalezena u 102 pacientů s kolorektálním karcinomem vyšší exprese TS mRNA v nádorové tkáni oproti zdravé sliznici. Ve studii (Miyamoto et al., 2001) bylo několika metodami (stanovení mRNA pomocí RT-PCR, stanovení proteinové exprese pomocí IHC a enzymatické aktivity biochemickou analýzou)

studována exprese enzymu TS v nádorové tkáni a zdravé sliznici u 43 pacientů s gastrointestinálními nádory. Byla zjištěna signifikantně vyšší TS mRNA exprese v nádorové tkáni žaludku i střeva oproti zdravé tkáni. Ve shodě s výsledky naší práce jsou závěry nedávno publikovaných studií (Lassmann et al., 2006, Amatori et al., 2006) u 102 resp. 53 pacientů s kolorektálním karcinomem. TS mRNA stanovená pomocí RT-PCR nevykazovala odlišnou expresi v nádorové tkáni a zdravé sliznici.

Dále jsme si kladli otázku, zda se liší exprese TP mRNA v nádorové a zdravé tkáni pacientů s kolorektálním karcinomem. TP je enzymem, který umožňuje přeměnu necytotoxického 5-deoxy-5-fluorouridinu na aktivní 5-fluorouracil. V naší práci na souboru 66 dvojic vzorků (nádorová tkáň versus zdravá sliznice) nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi TP mRNA v nádorové a zdravé tkáni (Sign test  $p=1,0$ ). Výsledky dalších publikovaných studií opět přinášejí nejednoznačné závěry. V práci (Amatori et al, 2006) u 53 nemocných s kolorektálním karcinomem byla nalezena statisticky významně vyšší exprese TP mRNA v nádorové tkáni oproti okolní sliznici. Bez statisticky signifikantních rozdílů byla ve studii Lassmanna (Lassmann et al., 2006) stanovena exprese TP mRNA v nádorové tkáni a zdravé sliznici u 102 pacientů, ačkoli zde byly popsány velké rozdíly v expresi mezi jednotlivými vzorky. V této zmíněné studii a také v naší práci se nepotvrdila preferenční exprese thymidinfosforylázy v nádorové tkáni. Tyto výsledky jsou v kontrastu s předpokládaným mechanismem účinku kapecitabinu v nádorové tkáni.

Obdobně jsme hledali rozdíly v expresi DPD mRNA ve vzorcích kolorektálního karcinomu a okolní zdravé sliznici. DPD je klíčový enzym katabolické přeměny 5-FU na nefunkční metabolity. Vysoká exprese DPD v nádorové tkáni vede k rychlé degradaci aktivního 5-FU, nízká exprese v okolní zdravé střevní sliznici pak vyvolává vysokou toxicitu při léčbě fluoropyrimidiny. Na rozdíl od stanovení genových

expresí TS, TP mRNA se nám podařilo prokázat na souboru 23 dvojic vzorků (nádorová tkáň versus zdravá sliznice) statisticky významnou vyšší expresi DPD mRNA ve vzorcích zdravé sliznice než v nádorové tkáni (Sign test  $p=0,034$ ). Také výsledky dalších studií genové exprese DPD mRNA pomocí RT-PCR (Miyamoto et al., 2001, Lassmann et al., 2006, Amatori et al., 2006) prokazují významně vyšší expresi DPD mRNA ve vzorcích zdravé sliznice oproti nádorové tkáni.

Provedené analýzy enzymů TS, TP a DPD v nádorové tkáni a přilehlé zdravé sliznici jsou charakteristické širokým rozmezím exprese mRNA. Výsledky podporují teorii heterogenity uvnitř studované tkáně, mezi jednotlivými vzorky nádorů i mezi pacienty s kolorektálním karcinomem. Důležitými aspekty jsou také limitace použité metody ve smyslu okamžitého zpracování čerstvé tkáně, nemožnosti kontroly morfologie vzorků a zachycení postranskripčních regulací, jak již bylo uvedeno v dalších studiích (Mori et al., 2000, Kornmann et al., 2002, Metzger et al., 1998).

## 7. SROVNÁVACÍ ANALÝZA PROTEINOVÉ EXPRESE TS, TP VE VZORCÍCH KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU A V OKOLNÍ STŘEVNÍ SLIZNICI

### 7.1. METODIKA

Histologické vyšetření vedoucí k určení tkáně a ke stanovení základní diagnózy bylo provedeno ze standardních řezů o tloušťce 4 $\mu$ m barvených hematoxylinem-eosinem. Způsob odběrů a skladování vzorků tkáně před zahájením imunohistochemického zpracování byl popsán v kapitole 6.1.

Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno s protilátkami proti thymidylátsyntáze (TS) a thymidinfosforyláze (TP). Přehled použitých protilátek je uveden ( **Tab. 10**).

**Tabulka 10. Přehled použitých monoklonálních primárních protilátek .**

PROTILÁTKA	Výrobce	Klon	Ředění
Anti-Thymidylátsyntáza(TS)	DakoCytomation	TS 106	1:10
Anti-Thymidinfosforyláza (TP)	NeoMarkers	PGF 44C	1:10

Z každého vzorku byly imunohistochemicky vyšetřeny většinou dva bločky, aby byla zajištěna reprezentativnost materiálu. Řezy 4 $\mu$ m silné byly nejprve odparafínovány v xylenu a rehydratovány v sestupné řadě alkoholů. Přesné postupy u jednotlivých antigenů byly prováděny dle doporučení výrobce standardním imunohistochemickým postupem. Při průkazu všech antigenů byla uplatněna nepřímá peroxidázová imunohistochemická metoda s použitím supersenzitivního

streptavidin-biotinového vizualizačního systému Novostain ABC (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Demaskování epitopu TS bylo prováděno v citrátovém pufru ve vodní lázni při teplotě 95-99°C. Průkaz TP nevyžadoval předchozí demaskování. Jako chromogen byl ve všech případech použit 3,3-diaminobenzidin-tetrachlorid (DAB, Fluka). Výsledná pozitivní reakce dávala hnědou pozitivitu cytoplazmatickou, perinukleární a nukleární. Pro lepší orientaci, resp. kvantifikaci podílu pozitivních buněk byly řezy dobarveny Gillovým hematoxylinem. Jako externí pozitivní kontroly pro protilátku proti TS byla použita tonzila, pro protilátku proti TP Kupferovy buňky jater. Negativní kontrola imunohistochemického vyšetření byla provedena na příslušných řezech z nádoru vynecháním primární protilátky a jejím nahrazením neimunním sérem.

Základní imunohistochemický postup pro použité protilátky je shrnut (**Tab.11**). Expresy enzymů TS a TP byly hodnoceny semikvantitativně v mikroskopu Olympus BX-40 vybaveném speciálním okulárem s vestavěnou mřížkou 10x10, která usnadňuje počítání pozitivních a negativních buněk.

Imunohistochemická analýza proteinové exprese TS a TP byla hodnocena ve vlastních nádorových buňkách, ve stromálních buňkách nádoru a ve zdravé střešní sliznici. Ve všech buněčných typech bylo vyhodnoceno procento pozitivních buněk (pozitivita nukleární i cytoplazmatická) a intenzita barvení. Hodnocení preparátů bylo provedeno zkušeným patologem z několika náhodně vybraných oblastí histologického řezu (nádorové i nenádorové tkáně) při zvětšeních 200x a 400x. Zjištěné výsledky byly zaznamenány dle používaného skórovacího systému (**Tab.12**). Nízká exprese sledovaných enzymů byla hodnocena stupni 0, 1+, vysoká exprese stupni 2+, 3+.



Vliv subjektivního faktoru v průběhu studie byl zčásti eliminován nezávislým posouzením některých vzorků dvěma pozorovateli.

### **Tabulka 11. Sumarizace postupu při imunohistochemickém vyšetření antigenů TS a TP**

1. Odparafínování řezů (xylol, sestupná alkoholová řada)
2. Demaskování antigenů (TP) v 0,01 M citrátovém pufru pH 6.0 (vodní lázeň- cca 40 min. při teplotě 95-99°C )
3. Ochlazení řezů v citrátovém pufru na pokojovou teplotu (20 °C)
4. Oplach v destilované vodě a vložení do PBS
5. Deaktivace endogenní peroxidázy 3% roztokem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 min. při pokojové teplotě)
6. Oplach v destilované vodě (3x5 min.)
7. Aplikace náhrady neimunního séra – 5% roztoku odtučněného sušeného kravského mléka (30 min. při pokojové teplotě nebo přes noc v lednici)
8. Slití roztoku a oplach v destilované vodě
9. Inkubace s primární protilátkou přes noc v lednici (5 °C)
10. Oplach PBS puftrem 3x5 min.
11. Inkubace se spojovací (sekundární) protilátkou 45 min. při pokojové teplotě
12. Oplach PBS puftrem (3x5 min.)
13. Aplikace SABC komplexu 45 min. při teplotě 37 °C
14. Oplach PBS puftrem (3x5 min.)
15. Aplikace substrátu a chromogenu (DAB+dimethylformamid+PBS+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-10 min. při pokojové teplotě
16. Oplach v destilované vodě
17. Kontrastování 1% roztokem CuSO<sub>4</sub> (5min.)
18. Oplach v destilované vodě
19. Dobarvení Gillovým hematoxylinem 30 s a montování do solakrylu

**Tabulka 12. Skorovací schéma k vyhodnocení exprese a intenzity TP, TS**

<b>Pozitivita TS, TP v nádorových/stromálních buňkách</b>	<b>Skóre</b>
žádná pozitivita buněk	0
pozitivita 1-10% buněk	1+
pozitivita 10-25% buněk	2+
pozitivita $\geq$ 25% buněk	3+
<b>Intenzita barvení TS, TP v nádorových/stromálních buňkách</b>	<b>Skóre</b>
žádná barvení buněk	0
slabá intenzita barvení	1+
střední intenzita barvení	2+
silná intenzita barvení	3+

Statistické vyhodnocení IHC exprese enzymů v jednotlivých tkáních bylo provedeno pomocí Chi-kvadrát testu. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do tzv. Stacked plot diagramů. Pro zjištění závislostí zkoumaných znaků, vzhledem k neggausovskému rozdělení proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Párová pozorování byla hodnocena užitím neparametrického párového testu (Sign test).

## 7.2. VÝSLEDKY

### **Imunohistochemická analýza stupně exprese TS**

Úspěšné imunohistochemické stanovení exprese enzymu thymidylátsyntázy (TS) bylo provedeno v 63 vzorcích vlastní nádorové tkáně, v 66 vzorcích nádorového stromatu a ve 28 vzorcích okolní zdravé sliznice. U 94% pacientů jsme provedli vyhodnocení v obou částech nádorové tkáně, 17% pacientů mělo vyhodnocenu expresi současně v obou částech nádorové tkáně a ve zdravé sliznici. Statistické

vyhodnocení imunohistochemické exprese a intenzity TS v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a zdravé sliznici pomocí Chi-kvadrát testu je znázorněno (**Tab.13, 14**). Rozložení IHC exprese enzymu v TS v jednotlivých částech nádoru je graficky znázorněno (**Graf 4**).

**Tabulka 13. Vyhodnocení IHC exprese thymidylátsyntázy (TS) v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a ve zdravé sliznici**

EXPRESE TS	Nádorové buňky N = 63		Nádorové stroma N = 66		Zdravá sliznice N = 28	
	N	%	N	%	N	%
<b>0</b>	29	46%	53	80%	21	75%
<b>1</b>	17	27%	8	12%	2	7%
<b>≥ 2</b>	17	27%	5	8%	5	18%

Chi- kvadrát test            nádorové buňky versus nádorové stroma            **p<0,001**

Chi- kvadrát test            nádorové buňky versus zdravá sliznice            **p=0,026**

Z uvedené tabulky a vyplývá, že ve vlastních nádorových buňkách byla nízká exprese TS nalezena ve 46 vzorcích (73%) a vysoká exprese TS v 17 vzorcích (27%). Dále byla stanovena nízká TS exprese v 61 vzorcích nádorového stromatu (92%) a vysoká TS exprese pouze v 5 vzorcích nádorového stromatu (8%). Nízká exprese TS ve sliznici byla stanovena ve 23 vzorcích (82%), vysoká exprese TS byla zjištěna v 5 vzorcích zdravé sliznice (18%).

Expresse thymidylátsyntázy stanovená imunohistochemickou analýzou byla statisticky signifikantně vyšší (Chi-kvadrát test  $p<0,001$ ) v tkáni nádorových buněk

než v nádorovém stromatu. Expres TS stanovená imunohistochemickou analýzou byla statisticky významně vyšší v nádorové tkáni než ve zdravé sliznici (Chi-kvadrát test  $p=0,026$ ) (**Obr.7**).

**Tabulka 16. Vyhodnocení IHC intenzity thymidylátsyntázy (TS) v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a ve zdravé sliznici**

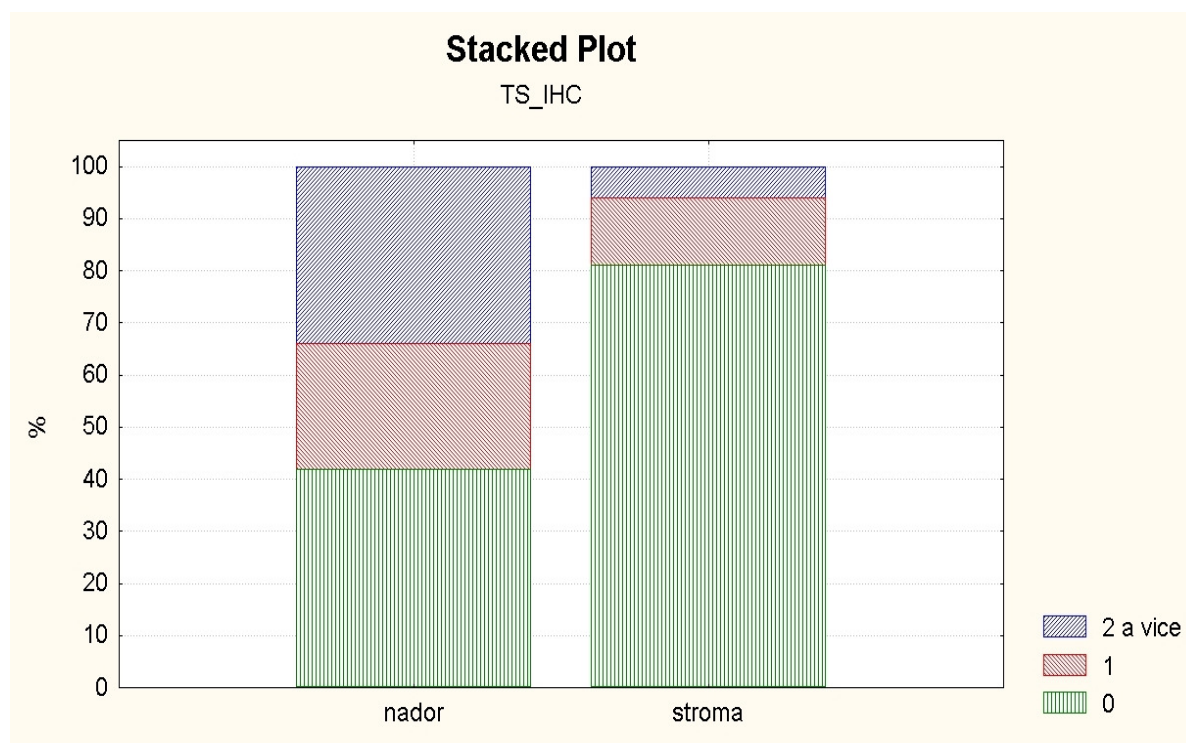
INTENZITA TS	Nádorové buňky N = 63		Nádorové stroma N = 66		Zdravá sliznice N = 28	
	N	%	N	%	N	%
<b>0</b>	29	46%	53	80%	21	75%
<b>1</b>	21	33%	7	11%	5	18%
<b>≥ 2</b>	13	21%	6	9%	2	7%

Chi- kvadrát test            nádorové buňky versus nádorové stroma            **p<0,001**  
 Chi- kvadrát test            nádorové buňky versus zdravá sliznice                    **p=0,035**

Z uvedené tabulky vyplývá, že nízká TS intenzita byla obdobně jako TS exprese stanovena v 79% vzorků vlastní nádorové tkáně, v 91% nádorového stromatu a v 93% okolní střešní sliznice.

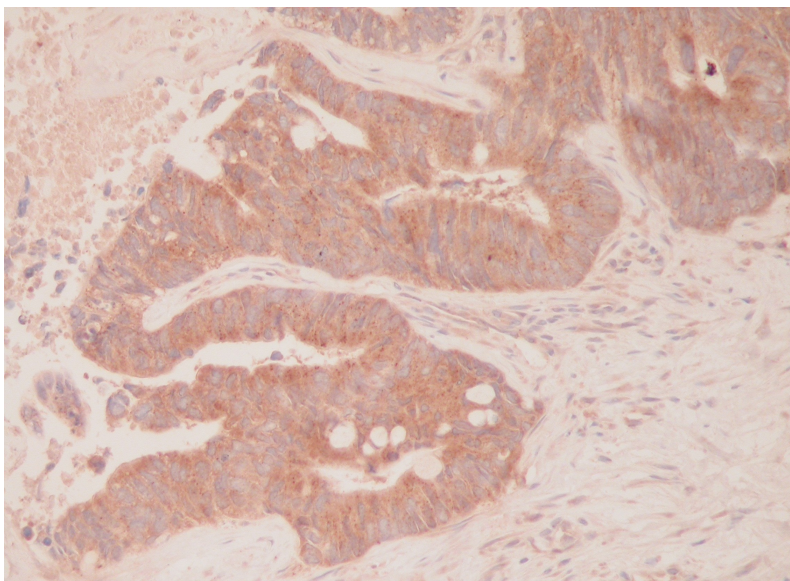
V každé ze studovaných tkání (nádorové buňky, nádorové stroma, zdravá sliznice) korelovala vzájemně exprese a intenzita imunohistochemického stanovení enzymu TS (Spearmanův korelační koeficient 0,93, 0,99, 0,98, vždy  $p<0,001$ ).

**Graf 4. Znáznornění stupňů IHC exprese enzymu v TS v nádorové tkáni.**



Osa x – tkáň nádoru, (vlastní nádorové buňky, nádorové stroma), osa y - % buněk exprimující TS, legenda - stupně exprese

**Obrázek 7. Imunohistochemická TS pozitivita v nádorové tkáni**



## Imunohistochemická analýza stupně exprese TP

Úspěšné imunohistochemické stanovení exprese enzymu TP bylo provedeno v 60 vzorcích vlastní nádorové tkáně, v 64 vzorcích nádorového stromatu a ve 24 vzorcích okolní zdravé sliznice. U 90% pacientů jsme provedli vyhodnocení zároveň v obou částech nádorové tkáně (vlastní nádorové buňky + nádorové stroma) (**Obr.8**), 26% pacientů mělo vyhodnocenu expresi současně v obou částech nádorové tkáně a ve zdravé sliznici.

Vyhodnocení imunohistochemické exprese a intenzity TP enzymu je znázorněno (**Tab. 15, 16**). Rozložení IHC exprese enzymu v TP jednotlivých částech nádoru je graficky znázorněno (**Graf 5**).

**Tabulka 15. Vyhodnocení IHC exprese thymidinfosforylázy (TP) v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a ve zdravé sliznici**

EXPRESE TP	Nádorové buňky N = 60		Nádorové stroma N = 64		Zdravá sliznice N = 24	
	N	%	N	%	N	%
0	46	77%	14	22%	14	58%
1	9	15%	26	40%	9	38%
≥ 2	5	8%	24	38%	1	4%

Chi-kvadrát test	nádorové buňky versus nádorové stroma	<b>p&lt;0,001</b>
Chi-kvadrát test	nádorové buňky versus zdravá sliznice	p=0,072
Chi-kvadrát test	nádorové stroma versus zdravá sliznice	<b>p&lt;0,001</b>

Z uvedené tabulky vyplývá, že nízká TP exprese byla stanovena v 55 vzorcích vlastní nádorové tkáně (92%), vysoká TP exprese pouze v 5 vzorcích vlastní nádorové tkáně (8%). V kontrastu s těmito výsledky je stanovení exprese TP

v nádorovém stromatu - nízká TP exprese byla zjištěna ve 40 vzorcích (62%) a vysoká TP exprese ve 24 vzorcích (38%).

Imunohistochemicky stanovená exprese enzymu TP byla statisticky významně vyšší v nádorovém stromatu než ve vlastních nádorových buňkách (Chi-kvadrát test  $p < 0,001$ ). Nízká exprese TP ve sliznici byla zjištěna ve všech 24 stanovených vzorcích zdravé tkáně (100%). Imunohistochemicky stanovená exprese TP ve vlastních nádorových buňkách nebyla statisticky významně vyšší než v okolní zdravé sliznici (Chi-kvadrát test  $p = 0,07$ ), na rozdíl od statisticky významně vyšší exprese TP v nádorovém stromatu ve srovnání se zdravou sliznicí (Chi-kvadrát test  $p < 0,001$ ).

**Tabulka 16. Vyhodnocení IHC intenzity thymidinfosforylázy (TP) v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a ve zdravé sliznici**

INTENZITA TP	Nádorové buňky N = 60		Nádorové stroma N = 64		Zdravá sliznice N = 24	
	N	%	N	%	N	%
0	46	77%	14	22%	14	58%
1	8	13%	27	42%	9	38%
≥ 2	6	10%	23	36%	1	4%

Chi - kvadrát test      nádorové buňky versus nádorové stroma      **p < 0,001**

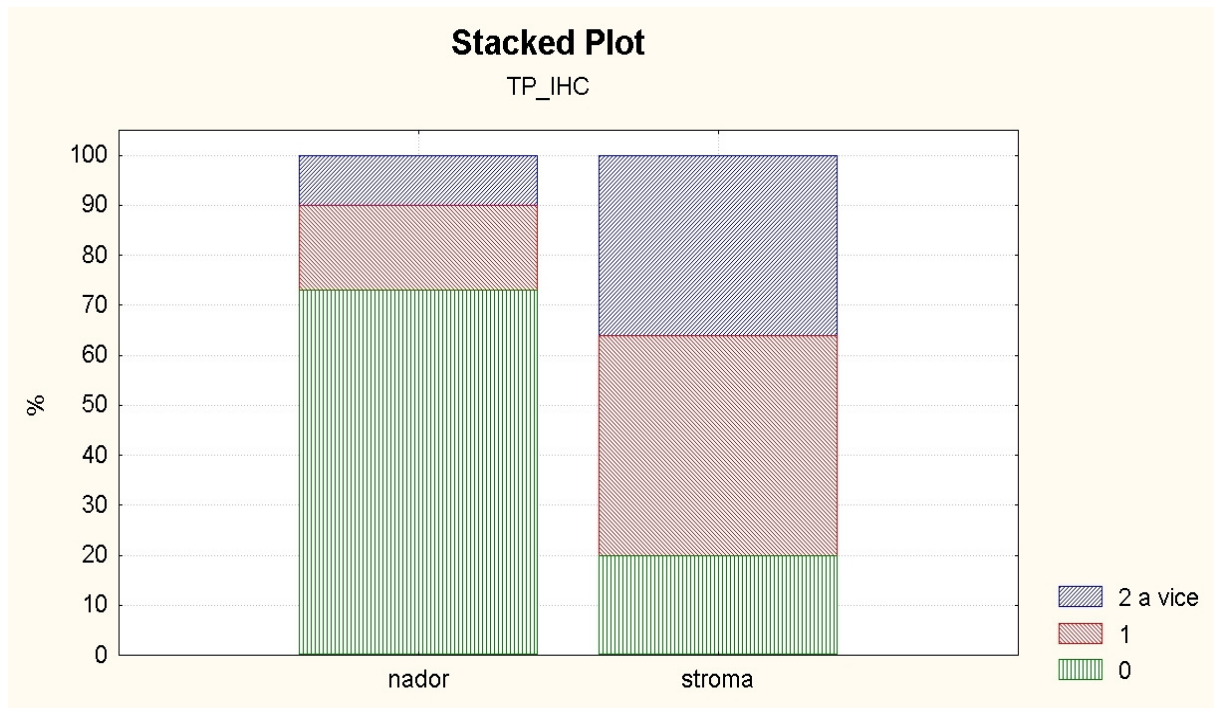
Chi - kvadrát test      nádorové buňky versus zdravá sliznice      **p = 0,039**

Chi - kvadrát test      nádorové stroma versus zdravá sliznice      **p < 0,001**

Z uvedené tabulky vyplývá, že nízká TP intenzita byla obdobně jako TP exprese stanovena v 90% vzorků vlastní nádorové tkáně, v 64% nádorového stromatu a v 96% okolní střešní sliznice.



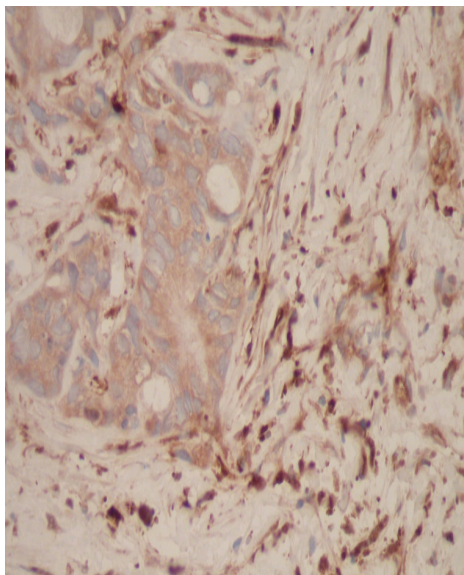
**Graf 5. Znázornění stupňů IHC exprese enzymu TP v nádorové tkáni.**



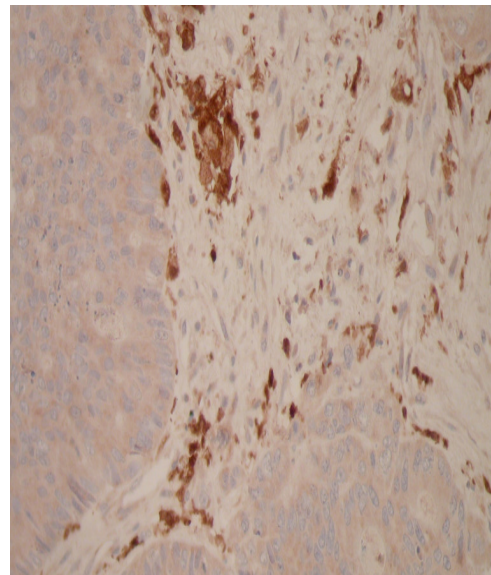
Osa x – tkáň nádoru (vlastní nádorové buňky, nádorové stroma), osa y - % buněk exprimující TP, legenda - stupně exprese

**Obrázek 8. TP pozitivita nádorové buňky a stroma (A), pouze stroma (B)**

**A**



**B**





Získané výsledky imunohistochemické analýzy byly podrobeny následnému statistickému vyhodnocení za pomoci Spearmanova korelačního koeficientu, který dále charakterizuje vztahy mezi expresí prediktorů (TS nebo TP) ve vybraných typech tkání.

Hledali jsme vzájemný vztah mezi stupni proteinové exprese enzymu TS ve studovaných tkáních (**Tab. 17**).

**Tabulka 17. Korelace exprese TS mezi jednotlivými tkáněmi**

ENZYM TS	Počet korelací	Spearmanův koeficient	p
Nádorové buňky versus nádorové stroma	62	0,32	p=0,011
Nádorová buňky versus zdravá sliznice	21	0,29	p=0,208

Byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace v expresi enzymu TS v nádorových buňkách a nádorovém stromatu ( $p=0,01$ ); ve vztahu nádorové buňky versus zdravá sliznice tato korelace nalezena nebyla ( $p=0,208$ ).

Obdobně jsme studovali vzájemný vztah mezi stupni proteinové exprese enzymu TP v nádorové a zdravé tkáni (**Tab. 18**).

**Tabulka 18. Korelace exprese TP mezi jednotlivými tkáněmi**

ENZYM TP	Počet korelací	Spearmanův koeficient	p
Nádorové buňky versus nádorové stroma	60	0,24	p=0,066
Nádorová buňky versus zdravá sliznice	18	0,24	p=0,332

Nebyla nalezena statisticky významná pozitivní korelace v expresi enzymu TP ve studovaných tkáních ( $p=0,066$  resp.  $p=0,332$ )

Dále jsme pomocí Spearmanova korelačního koeficientu hodnotili, zda je možné prokázat mezi expresí enzymů TS a TP v jednotlivých tkáních vzájemný vztah či nikoliv (**Tab. 19**).

**Tabulka 19. Vzájemná korelace exprese enzymů TS a TP v jednotlivých tkáních**

<b>TS versus TP</b>	<b>Počet korelací</b>	<b>Spearmanův koeficient</b>	<b>p</b>
<b>Nádorové buňky</b>	59	0,08	p=0,530
<b>Nádorové stroma</b>	63	0,19	p=0,132
<b>Zdravá sliznice</b>	24	0,01	p=0,947

Mezi studovanými enzymy TS a TP nebyla nalezena vzájemná statisticky významná pozitivní korelace v expresi v jednotlivých testovaných tkáních. Expese každého jednotlivého enzymu se jeví být nezávislou na expresi druhého ve všech studovaných tkáních.

### 7.3. DISKUZE

Imunohistochemická analýza exprese enzymů thymidinsyntázy a thymidinfosforylázy patří k nejčastěji používaným metodám testování u pacientů s kolorektálním karcinomem i jinými malignitami, kteří jsou léčeni chemoterapií s 5-FU. Popatova metaanalýza (Popat et al., 2004) hodnotila prognostický význam exprese TS u pacientů s kolorektálním karcinomem ve 22 klinických studiích, z toho v 16 publikovaných pracích byla k vyhodnocení exprese TS použita právě imunohistochemie. Výhodou imunohistochemické analýzy, ve srovnání s dalšími metodami, je možnost odlišení vlastních nádorových buněk od buněk nádorového stromatu a okolní sliznice na standardně fixovaných parafinových vzorcích.

V této práci jsme se zabývali imunohistochemickou expresí enzymů TS a TP v nádorové a zdravé tkáni pacientů s kolorektálním karcinomem. U většiny našich pacientů (>90%) se nám podařilo korelovat expresi těchto prediktorů vzájemně ve vlastních nádorových buňkách a nádorovém stromatu, zatímco imunohistochemické srovnání exprese v obou částech nádorové tkáně a zdravé tkáně bylo možno provést u ~25% pacientů (nebyla zachycena či získána zdravá střevní sliznice).

Thymidylátsyntáza je klíčovým enzymem metabolismu 5-FU a nejdůležitějším cílem při léčbě nádorů gastrointestinálního traktu fluoropyrimidiny. V souladu se studií (Miyamoto et al., 2001) byla také v naší práci při imunohistochemickém stanovení prokázána statisticky významně vyšší exprese TS enzymu v nádorových buňkách než v okolní sliznici (Chi-kvadrát test  $p=0,026$ ). Vysoká exprese TS enzymu je vyjádřena především ve vlastních nádorových buňkách (28%), v nádorovém stromatu byla stanovena vysoká exprese TS stanovena pouze u 8% vzorků. Některé práce upozorňují na odlišnou expresi TS v cytoplazmě a jádrech nádorových buněk, v naší práci byla exprese stanovena v obou částech buňky bez rozlišení. Zároveň jsme provedli imunohistochemické vyhodnocení intenzity enzymu TS, které korelovalo imunohistochemickým vyhodnocením stupně exprese TS (Spearmanův koeficient  $p<0,0001$ ). Hodnocení intenzity má daleko nižší výpovědní hodnotu než stupeň exprese, neboť je značně ovlivnitelné subjektivitou hodnotitele, a může být závislé na mnoha dalších okolnostech (délka fixace, doba inkubace, ředění protilátky).

V kontrastu s preferenční expresí TS v nádorových buňkách uvádí několik studií odlišnou expresi enzymu TP ve vlastních nádorových buňkách a nádorovém stromatu. V práci (Zhang et al., 2004) byla pomocí IHC zjištěna exprese TP ve stromálních buňkách nádoru, které obkopují hnízda vlastních nádorových buněk,

nebo se vyskytují podél invazivních okrajů nádoru. Na podkladě vyšetření s CD 68 monoklonální protilátkou a dalších morfologických charakteristik byly identifikovány tzv. TAM-makrofágy (tumor asociované makrofágy), které byly hlavním zdrojem exprese TP v nádoru. V práci (Ogawa et al., 2005) byla pomocí ELISA vyšetření prokázána významná exprese TP ve stromálních buňkách na okraji nádoru. V naší práci byla prokázána statisticky významně vyšší exprese TP ve stromálních buňkách nádoru oproti vlastním nádorovým buňkám (vysoká exprese TP 38% versus nízká exprese TP 8%, Chi-kvadrát test  $p < 0,001$ ). Neproklázali jsme statisticky významně vyšší expresi TP ve vlastních nádorových buňkách ve srovnání se zdravou sliznicí (Chi-kvadrát test  $p = 0,07$ ), ale exprese TP v nádorovém stromatu byla statisticky významně vyšší než v okolní sliznici (Chi-kvadrát test  $p < 0,001$ ). Z těchto výsledků vyplývá, že nádorové stroma je tou tkání nádoru, ve které je enzym thymidinfosforyláza preferenčně exprimován. S cílem posoudit možnost vzájemných vztahů v expresi enzymů TS a TP jsme provedli korelaci pomocí Spearmanova koeficientu. Nebylo prokázáno, že by se exprese sledovaných enzymů TP, TS ve studovaných tkáních vzájemně ovlivňovala. Také nebyl (u každého ze sledovaných enzymů TS, TP) prokázán vzájemný statisticky významný vztah v expresi v tkáni nádorových buněk, v nádorovém stromatu a v okolní zdravé sliznici.

Pomocí imunohistochemické analýzy jsme tedy prokázali významně vyšší expresi TS i TP v nádorové tkáni oproti zdravé sliznici. Toto vyhodnocení je v kontrastu s naším stanovením exprese TS mRNA a TP mRNA pomocí RT-PCR, které neprokazuje rozdíly v nádorové a zdravé tkáni pacientů s CRC. Tyto diskrepance naznačují, že vyhodnocení exprese klíčových enzymů metabolismu 5-FU je odlišné v důsledku metody, která je k analýze použita. Tato hypotéza bude testována v další části předkládané práce.

## 8. KORELACE ANALÝZ GENOVÉ A PROTEINOVÉ EXPRESE TS A TP V NÁDOROVÉ A ZDRAVÉ TKÁNI

### 8.1. METODIKA

Metodika zpracování a vyhodnocení TS mRNA a TP mRNA v nádorové tkáni a ve zdravé sliznici pomocí RT-PCR byla popsána v kapitole 6.1, imunohistochemická analýza exprese TS a TP v kapitole 7.1.

Pro zjištění vzájemného vztahu mezi stupněm exprese TS mRNA a TP mRNA a imunohistochemickým stanovením stupně exprese TS a TP v nádorové a zdravé tkáni byl použit Spearmanův koeficient korelace. Vybrané statistické údaje byly zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot diagramů a histogramů.

### 8.2. VÝSLEDKY

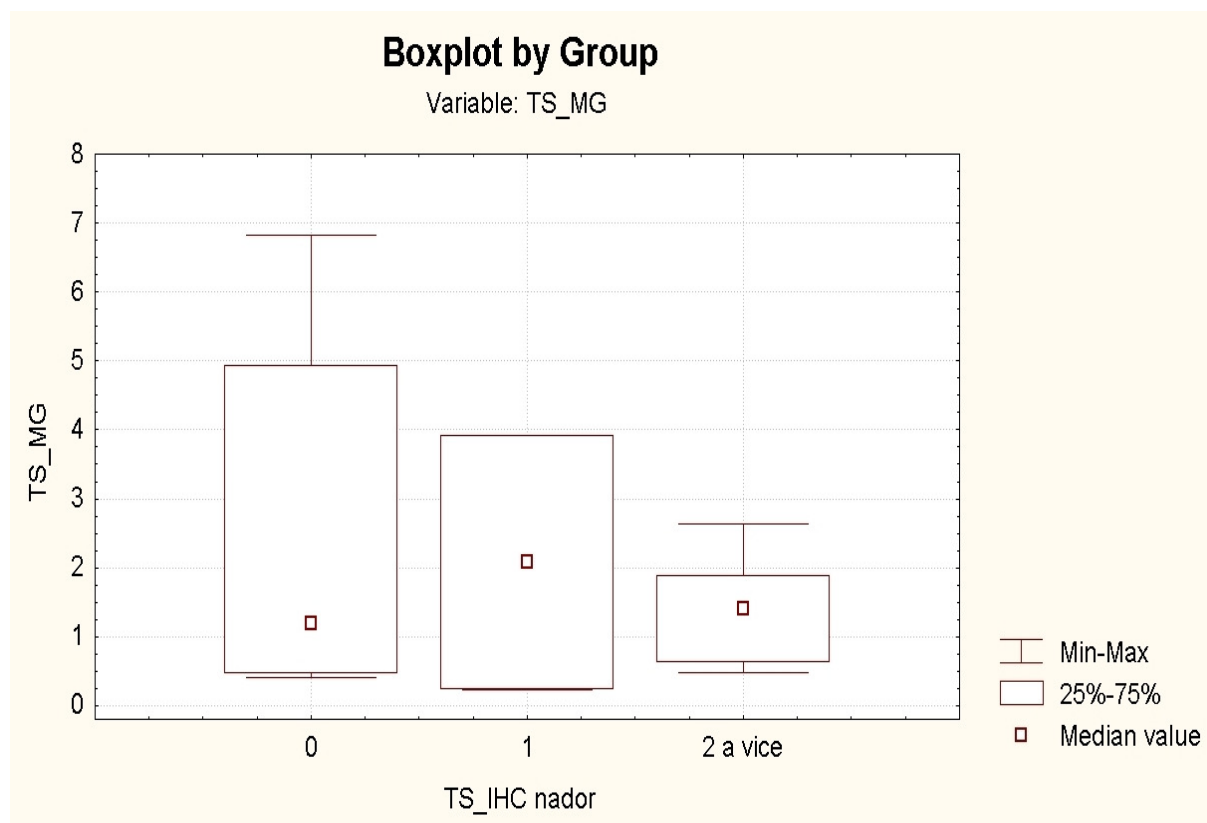
Korelace výsledků při studiu exprese TS pomocí metody RT-PCR a IHC byla provedena ve vzorcích 44 pacientů s kolorektálním karcinomem. V (**Tab. 20**) byla vyhodnocena kvantitativně a kvalitativně exprese TS pomocí obou metod v nádorové a zdravé tkáni. Vyhodnocení stupňů IHC exprese a kvantitativních hodnot TS mRNA je graficky zobrazeno (**Graf 6**). Vzájemný vztah exprese thymidylátsyntázy pomocí obou metod stanovení v nádorové a zdravé tkáni byl vyhodnocen pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (**Tab. 21**).

**Tabulka 20. Expres TS stanovená metodou RT-PCR a IHC**

Studovaná tkáň	TS mRNA (průměr ± SD)	IHC exprese TS%		
		0	1	≥ 2
Nádorová tkáň	2,69 ± (2,49)	46%	27%	27%
Zdravá sliznice	2,90 ± (4,14)	75%	7%	18%

TS mRNA vyjádřena jako poměr TS: GAPDH metodou RT-PCR, SD – směrodatná odchylka, IHC exprese TS vyjádřena dle stupňů exprese v %.

**Graf 6. Hodnoty exprese enzymu TS metodou IHC a molekulárně-genetickou**



Expres enzymu TS v nádorové tkáni: osa x: stupeň IHC exprese, osa y: hodnota TS mRNA pomocí RT-PCR.

**Tabulka 21. Korelace metod stanovení exprese TS pomocí RT-PCR a IHC**

RT-PCR versus IHC TS	Počet korelací	Spearmanův koeficient	p
Nádorová tkáň	44	-0,16	p=0,280
Zdravá sliznice	7	-0,61	p=0,139

Pomocí Spearmanova koeficientu nebyla zjištěna statisticky významná korelace mezi hodnotami proteinové exprese TS a hodnotami TS mRNA v nádorové tkáni (Spearmanův koeficient -0,16, p=0,28) či ve zdravé sliznici (Spearmanův koeficient -0,61, p=0,139). Obě metody stanovují odlišné hodnoty exprese thymidylátsyntázy, výsledky nejsou porovnatelné.

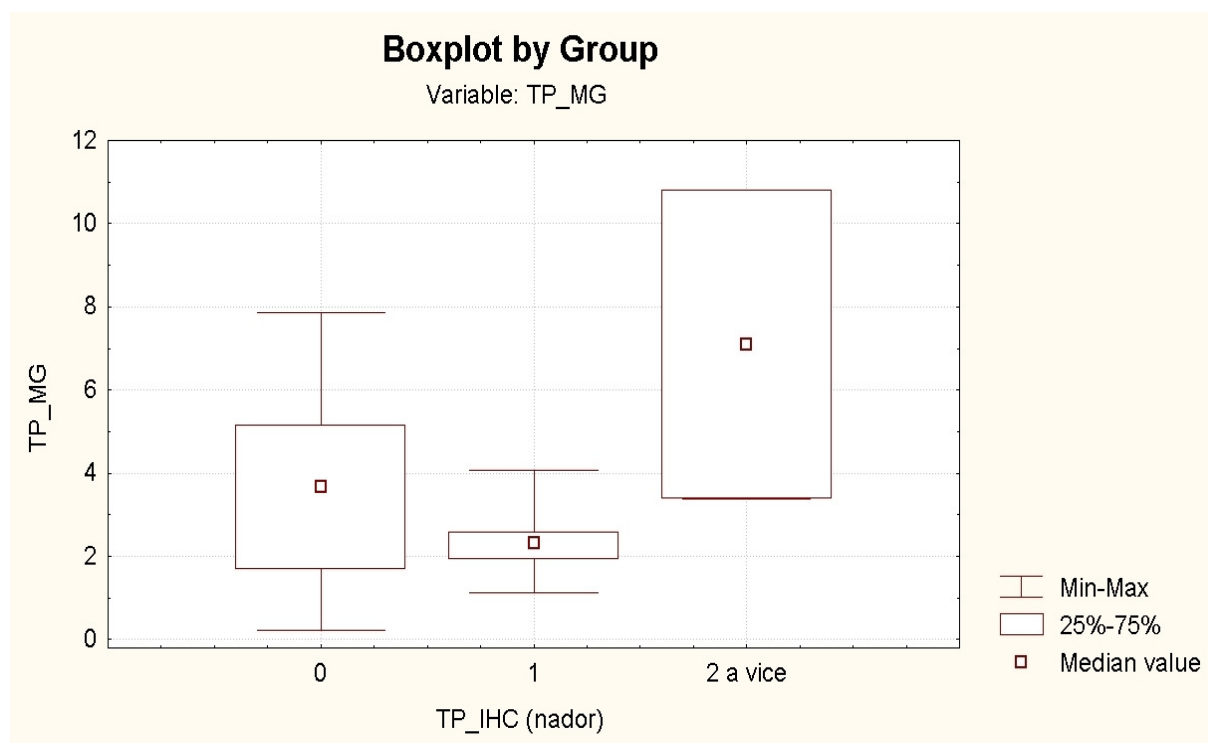
Korelace při studiu exprese enzymu TP pomocí metody RT-PCR a IHC byla provedena ve vzorcích 39 pacientů s kolorektálním karcinomem. V (**Tab.22**) je vyjádřena exprese enzymu TP pomocí obou metod. Vyhodnocení stupňů IHC exprese TP a kvantitativních hodnot TP mRNA je graficky zobrazeno (**Graf 7**).

**Tabulka 22. TP exprese stanovená metodou RT-PCR a IHC**

Studovaná tkáň	TP mRNA (průměr ± SD)	IHC exprese TP%		
		0	1	≥ 2
Nádorová tkáň	3,68 ± (4,87)	77%	15%	8%
Zdravá sliznice	3,74 ± (4,63)	58%	38%	4%

TP mRNA vyjádřena jako poměr TP: GAPDH RT-PCR, SD – směrodatná odchylka, IHC exprese TP vyjádřena dle stupňů exprese v %

**Graf 7. Hodnoty exprese enzymu TP v nádorové tkáni stanovené metodou IHC a molekulárně-genetickou**



Expresse enzymu TP v nádorové tkáni: osa x: stupeň IHC exprese, osa y: hodnota TP mRNA pomocí RT-PCR.

Vzájemný vztah exprese thymidinfosforylázy pomocí obou metod stanovení v nádorové tkáni (tkáň vlastních nádorových buněk a nádorové stroma) a ve zdravé tkáni byl vyhodnocen pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (**Tab. 23**).

**Tabulka 23. Korelace metod stanovení exprese TP pomocí RT-PCR a IHC**

RT-PCR versus IHC TP	Počet korelací	Spearmanův koeficient	p
Nádorová tkáň	39	0,15	p=0,36
Zdravá sliznice	16	-0,22	p=0,42



Pomocí Spearmanova koeficientu nebyla zjištěna statisticky významná korelace mezi hodnotami proteinové exprese TP a hodnotami TP mRNA v nádorové tkáni (Spearmanův koeficient 0,15,  $p=0,36$ ) či v okolní sliznici (Spearmanův koeficient -0,22,  $p=0,42$ ). Obě metody stanovují odlišné hodnoty exprese thymidinfosforylázy, výsledky nejsou na sobě závislé a porovnatelné.

### 8.3. DISKUZE

Otázka korelace imunohistochemického vyšetření proteinové exprese a genové exprese mRNA klíčových enzymů metabolismu fluoropyrimidinů byla opakovaně studována a výsledky těchto studií přinášejí odlišné závěry.

V naší práci jsme při použití Spearmanova koeficientu korelace nenalezli žádný statisticky významný vztah mezi hodnotami TS, TP mRNA stanovenými pomocí RT-PCR a stupni IHC exprese proteinů TS, TP v nádorové ( $p=0,28$  resp.  $p=0,39$ ) ani ve zdravé tkáni ( $p=0,13$  resp.  $p=0,41$ ). V práci (Kornmann et al., 2003) exprese TS mRNA korelovala se stupněm proteinové exprese TS pomocí imunohistochemie a imunoblotingu u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU. Naopak podobně jako v naší analýze byly prezentovány výsledky práce (Miyamoto et al, 2001), kde v souboru 43 pacientů s nádory gastrointestinálního traktu bylo provedeno stanovení TS a DPD exprese pomocí 3 metodik (RT-PCR, IHC a stanovení enzymatické aktivity pomocí biochemické analýzy) v nádorové tkáni a ve zdravé sliznici. Nebyla nalezena žádná vzájemná korelace mezi imunohistochemií a RT-PCR a stanovením enzymatické aktivity TS a DPD. Ve studii (Farrugia et al., 2003) také nebyla nalezena přímá korelace mezi IHC expresí TS a TS mRNA u 20 pacientů s pokročilým kolorektálním

karcinomem léčených raltitrexedem. Ve studii Miyoshi (Miyoshi et al., 2005) byla exprese TS a DPD vyhodnocena pomocí RT-PCR a stanovení enzymatické aktivity v nádorové a zdravé tkáni u pacientů s karcinomem plic léčených chemoterapií UFT (derivát fluoropyrimidinu- tegafur+uracil). TS mRNA pouze slabě odpovídala TS aktivitě stanovené pomocí FdUMP binding assay, zatímco DPD mRNA korelovala s DPD aktivitou. Nedávno publikovaná práce srovnávající metody RT-PCR a ELISA u pacientů s nádory žaludku také neprokázala žádnou vzájemnou korelaci mezi TS, DPD mRNA a proteinovou expresí sledovaných genů (Akamoto et al., 2008).

Mechanismy zodpovědné za uvedené rozdíly v proteinové expresi a genové mRNA expresi klíčových enzymů metabolismu fluoropyrimidinů jsou předmětem výzkumu. Možným vysvětlením by mohla být komplikovaná transkripce TS genu; také polymorfismy TS genu mohou mít vliv na jeho proteinovou expresi a enzymatickou aktivitu v nádorech gastrointestinálního traktu (Paré et al, 2008). Naše výsledky v souladu s většinou dalších uvedených studií prokazují, že stanovení hodnot exprese klíčových enzymů TS, TP je odlišné v závislosti na metodě, která je v dané práci použita. Vyhodnocení mRNA TS, TP, DPD nezachytí postranskripční regulace, nestanoví množství funkčního proteinu. Tyto závěry bychom měli zvažovat i při interpretaci různých klinických studií, zabývajících se prognostickým a prediktivním významem exprese TS, TP, a DPD u pacientů s kolorektálním karcinomem.

## 9. PROGNOŠTICKÝ A PREDIKTIVNÍ VÝZNAM EXPRESE ENZYMŮ TS, TP, DPD

### 9.1. METODIKA

Studium a vyhodnocení klinických dat bylo provedeno u 55 nemocných s kolorektálním karcinomem. Základní informace: věk a pohlaví pacientů, rozsah onemocnění (TNM) a histopatologické charakteristiky nádoru byly získány ze zdravotnické dokumentace každého nemocného. Lokalizace nádoru byla rozdělena do podskupiny nádorů tlustého stěva (C18 + C19) a nádorů konečníku (C20).

Vyhodnocení klinické odpovědi bylo provedeno zvlášť ve skupině pacientů nemocných léčených pro lokalizovaný kolorektální karcinom a zvlášť ve skupině pacientů s generalizovaným onemocněním. Klinická data byla hodnocena ve vztahu k věku a pohlaví pacientů, TNM a UICC stadiu, lokalizaci nádoru a typu léčby. U pacientů s lokalizovaným onemocněním byl stanoven počet recidiv onemocnění, procenta pacientů přežívajících bez známek onemocnění (DFS) a celkové přežití (OS) metodou dle Kaplan-Meiera. Pro zjištění vlivu daných proměnných na klinický průběh onemocnění byl počítán Log-rank test. Pomocí Coxova regresního modelu byla stanovena výše rizika (HR) pro jednotlivé zkoumané skupiny pacientů. U pacientů s generalizovaným kolorektálním karcinomem byla pomocí Log-rank testu vyhodnocena doba do progresu (TTP) a celkové přežití (OS) ve vztahu k typu léčby - skupiny „chemo+“ (paliativní systémová chemoterapie) a „chemo -“, (pouze chirurgická léčba) (Kaplan-Meier křivka).

Klinická data pacientů byla dále hodnocena ve vztahu ke stupni exprese enzymů TS, TP a DPD v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu. Vzorky nádorové tkáně byly vyhodnoceny metodou imunohistochemickou (enzymy TS a TP) a metodou RT-PCR (TS, TP, DPD mRNA). Podrobná metodika testování těmito postupy byla popsána v kapitolách 6.1. a 7.1. Kvantitativní hodnoty (TS, TP, DPD mRNA) byly popsány v parametrech: průměr, medián, minimum, maximum. Kvalitativní hodnoty (imunohistochemické stanovení exprese TS a TP) byly charakterizovány jako nízká exprese 0-1, a vysoká exprese  $\geq 2$ .

Vyhodnocení prognostického významu exprese TS, TP, DPD mRNA jsme provedli u všech pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem, a dále u těch, kteří byli léčeni pouze chirurgickým výkonem (bez podávání adjuvantní chemoterapie - „chemo-“). Optimální mezní hodnoty TS, TP a DPD mRNA jsme stanovili dle mediánu rozložení daných proměnných. Ke stanovení prognostického významu sledovaných expresí TS, TP a DPD byl využit Log-rank test. Dále jsme použili Coxovu regresní analýzu k výpočtu výše rizika (HR) (95%CI) pro zkoumané hodnoty prognostických faktorů. Obdobně jsme postupovali při vyhodnocení prognostického významu stupně exprese TS a TP (nízká versus vysoká) v nádorové tkáni pacientů s lokalizovaným CRC.

Při hodnocení prediktivního významu sledovaných enzymů byl zkoumán vztah exprese (TS, TP a DPD mRNA a stupeň IHC exprese enzymů TS a TP) a výskytu recidivy onemocnění, počtu pacientů bez známek onemocnění (DFS) a celkového přežití (OS) ve skupině „chemo+“ u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem léčených 5-fluorouracilem.

## 9.2. VÝSLEDKY

### 9.2.1. Klinický průběh onemocnění u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem.

Studium a vyhodnocení základních klinických dat bylo provedeno u 41 pacientů léčených pro lokalizovaný kolorektální karcinom. Průměrný věk pacientů v době diagnózy byl 65 let (medián 68 let, rozmezí 40–79 let). 17 pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem bylo léčeno pouze chirurgickým výkonem (41%), u 24 pacientů (59%) byla dále podávána adjuvantní chemoterapie v režimech FUFA (Mayo režim, režim dle de Gramonta) či kapecitabin po dobu 6 měsíců (**Tab.24**). Medián doby sledování byl 60 měsíců (rozmezí 4-72 měsíců).

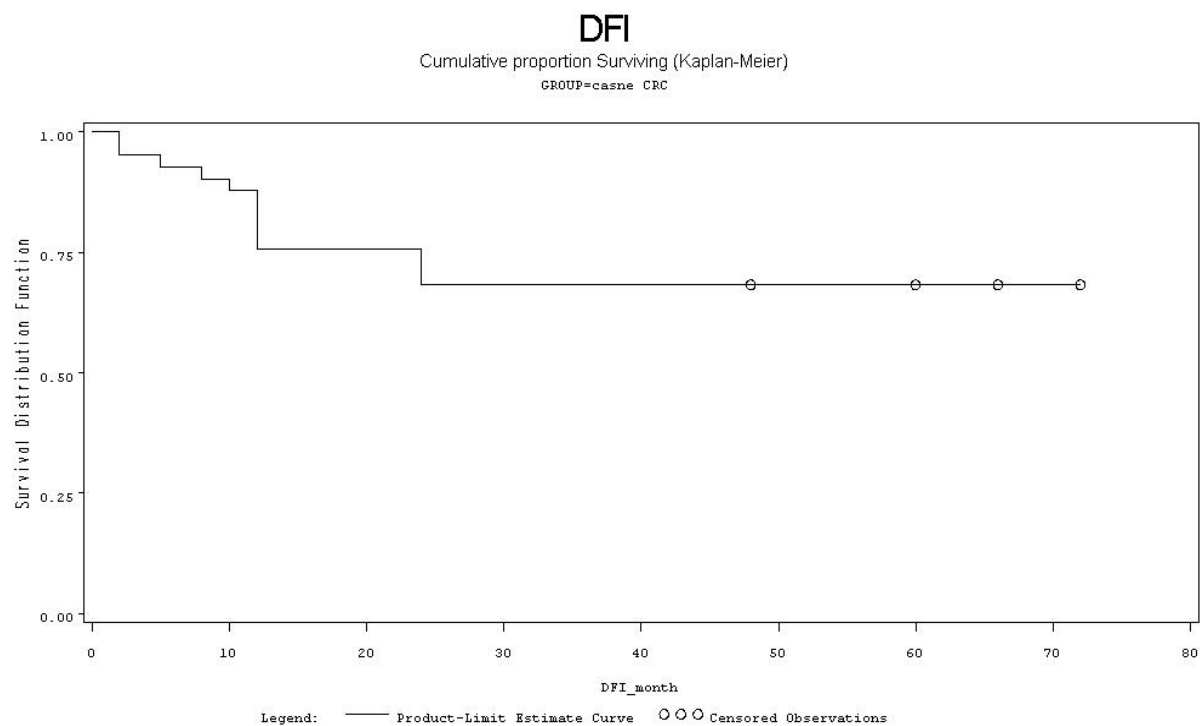
Ve skupině 41 pacientů s lokalizovaným CRC došlo v průběhu doby sledování ke vzniku recidivy u 13 nemocných (32%), 28 pacientů (DFS 68%) je v současnosti bez známek onemocnění (**Graf 8**). Recidiva onemocnění byla u všech pacientů diagnostikována do 2 let od zahájení léčby. Ve skupině 24 pacientů léčených adjuvantní chemoterapií byla zjištěna recidiva kolorektálního karcinomu u 6 nemocných (25%). Ve skupině 17 pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem bez podání zajišťující chemoterapie došlo ke vzniku recidivy u 7 nemocných (41%). Nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ve výskytu recidivy onemocnění v závislosti na pohlaví (ženy 44% versus muži 24%), v závislosti na postižení lymfatických uzlin (N0 37% versus N+ 21%) ani v závislosti na klinickém stadiu UICC (I 0%, II 42%, III 21%). Byl zaznamenán kratší DFS u pacientů s nádory konečníku ve srovnání s nádory tlustého střeva (C20 57% versus C18+19 18%, Log-rank test  $p=0,015$ , HR 3,5). Kratší DFS byl zjištěn u pacientů s nádory  $\geq T3$ , ve srovnání s nádory  $\leq T2$  (39% versus 0%, Log-rank test  $p=0,045$ ) (**Tab.25**). Během doby

sledování zemřelo 13 ze 41 pacientů (32%) léčených pro časný kolorektální karcinom, v současnosti přežívá 68% pacientů (**Graf 9**). Medián DFS a medián OS zatím nebyl dosažen.

**Tabulka 24. Základní charakteristiky pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem**

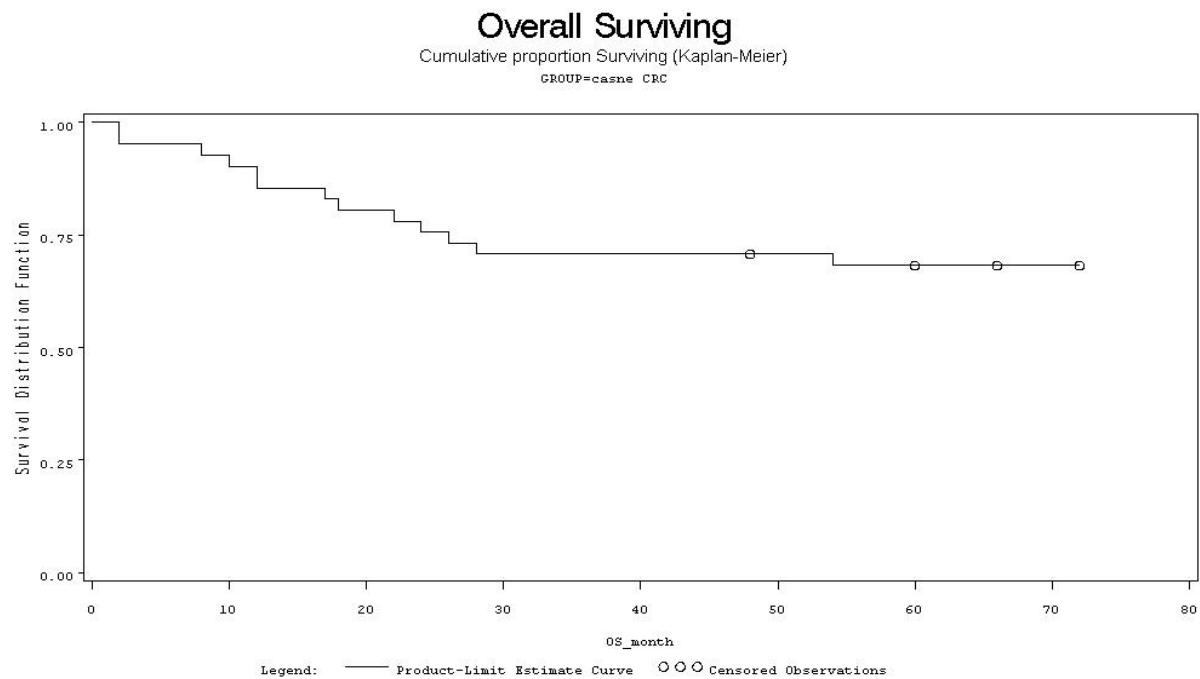
Sledované parametry	Pacienti celkem N=41		Pacienti chemo + N=24		Pacienti chemo - N=17	
<b>Věk (průměr)</b>	65 let		63 let		67 let	
muži	25	61%	16	67%	9	53%
ženy	16	39%	8	33%	8	47%
<b>Lokalizace nádoru</b>						
C18+ C19	27	66%	16	67%	11	65%
C20	14	34%	8	33%	6	35%
<b>T klasifikace</b>						
T1	3	7%	1	4%	2	12%
T2	5	12%	2	8%	3	18%
T3	31	76%	19	80%	12	70%
T4	2	5%	2	8%	0	0%
<b>N klasifikace</b>						
N0	27	66%	11	46%	16	94%
N1	9	22%	8	33%	1	6%
N2	5	12%	5	21%	0	0%
<b>UICC stadium</b>						
I	3	7%	0	0%	3	18%
II	24	59%	11	46%	13	76%
III	14	34%	13	54%	1	6%

**Graf 8. Období bez známek onemocnění u pacientů s časným CRC**



Osa x: DFI - období bez známek onemocnění (měsíce), osa y: SDF -% přežívajících pacientů

**Graf 9. Celkové přežití u pacientů s časným CRC**



Osa x: OS – celkové přežití (měsíce), osa y: SDF -% přežívajících pacientů

**Tabulka 25. Souhrn statistického vyhodnocení klinického průběhu onemocnění**

<b>Parametry</b>	<b>Pacienti N</b>	<b>Recidiva N</b>	<b>DFS %</b>	<b>P</b>
Věk < 65 let	16	5	69%	p=0,94
Věk ≥ 65 let	25	8	68%	
muži	25	6	76%	p=0,13
ženy	16	7	56%	
C18 + C19	27	5	82%	<b>p=0,025</b> <b>HR=3,5</b> CI (1,14-10,71)
C20	14	8	43%	
T1+T2	8	0	100%	<b>p=0,045</b> <b>HR N/A</b>
T3+T4	33	13	61%	
N0	27	10	63%	p=0,36
N+	14	3	79%	
UICC I	3	0	100%	p=0,24
UICC II	24	10	58%	
UICC III	14	3	88%	
Chemo +	24	6	75%	p=0,35
Chemo -	17	7	59%	

DFS -procenta pacientů přežívajících bez známek onemocnění, p-Log-rank test, Coxova regresní analýza, HR-výše rizika, 95%CI-interval spolehlivosti



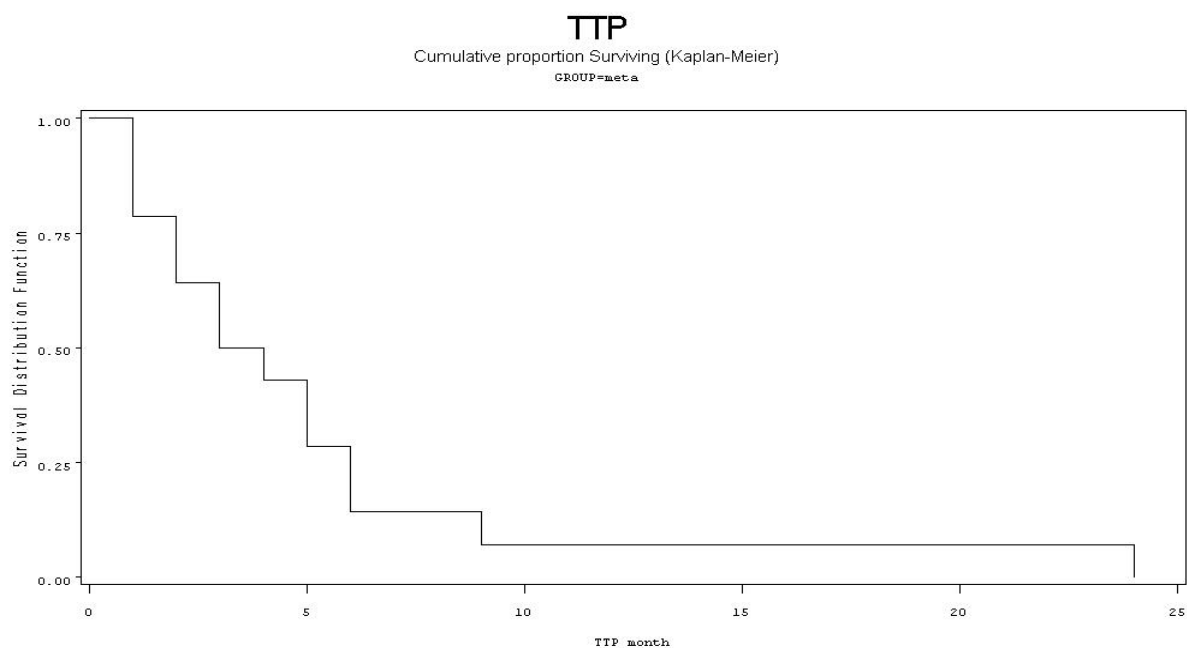
### 9.2.2. Klinický průběh onemocnění u pacientů s metastazujícím CRC

Primárně generalizovaný kolorektální karcinom byl zjištěn u 14 pacientů (25%) (**Tab. 26**). Osm nemocných (57%) s metastazujícím onemocněním (mCRC) bylo léčeno paliativní chemoterapií v režimech FUFA dle de Gramonta, FOLFOX, FOLFIRI, kapecitabin a raltitrexed (1-3 linie léčby). U šesti pacientů, vzhledem k celkovému stavu, věku a komorbiditám, byla podávána nejlepší podpůrná léčba (BSC – best supportive care). Medián doby sledování byl 8 měsíců (rozmezí 4 - 28 měsíců). K progresi onemocnění a následně k úmrtí došlo u všech 14 pacientů (100%) do 28 měsíců. Medián doby do progresu byl 3,5 měsíce (**Graf 10**) a medián celkového přežití 7,5 měsíce (**Graf 11**).

**Tabulka 26. Základní charakteristiky pacientů s metastatickým CRC**

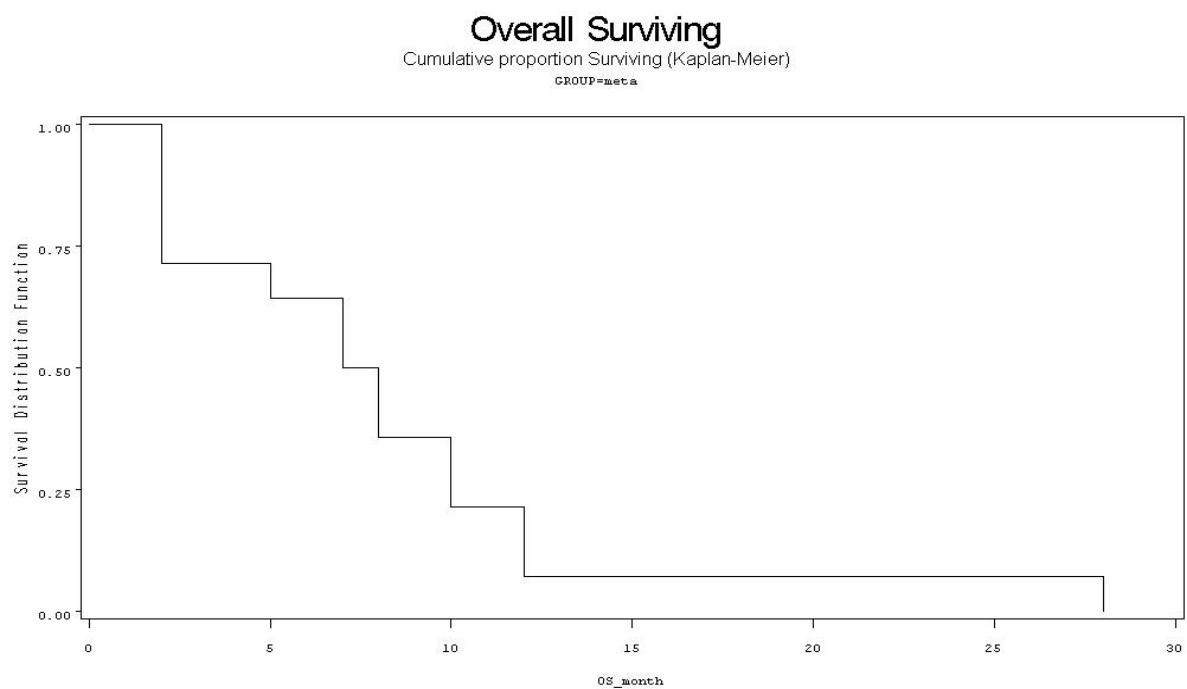
Sledované parametry	Pacienti celkem N= 14		Pacienti chemo + N=8		Pacienti chemo - N=6	
Věk průměr	65 let		64 let		67 let	
muži	8	57%	6	75%	2	33%
ženy	6	43%	2	25%	4	67%
C18 + C19	12	86%	7	88%	5	83%
C20	2	14%	1	12%	1	17%

### Graf 10. Vyhodnocení doby do progrese u pacientů s mCRC



Osa x: doba do progrese onemocnění (měsíce), osa y: SDF -% přežívajících pacientů

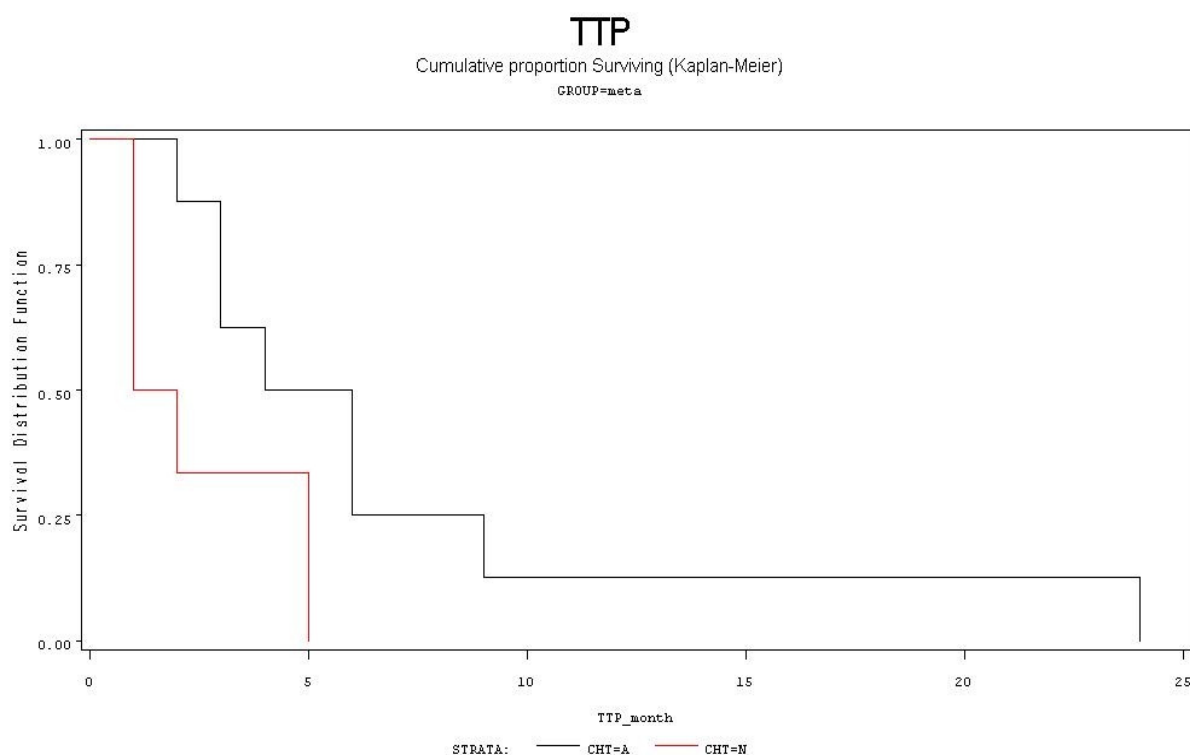
### Graf 11. Vyhodnocení celkového přežití u pacientů s mCRC



Osa x : celkové přežití (měsíce), osa y: SDF - % přežívajících pacientů

Léčba paliativní chemoterapií prodloužila dobu do progresu (TTP) na 5 měsíců oproti skupině pacientů s nejlepší podpůrnou léčbou (BSC) (TTP 1,5 měsíce), (Log-rank test  $p=0,041$ ) (**Graf 12**). Podávání chemoterapie prodloužilo celkové přežití pacientů s primárně generalizovaným kolorektálním karcinomem na 9 měsíců oproti BSC (OS 2 měsíce) (Log-rank test  $p=0,021$ ).

**Graf 12. Vyhodnocení doby do progresu onemocnění v závislosti na typu léčby**



Osa x : doba do progresu onemocnění (měsíce), osa y: % přežívajících pacientů,  
legenda: — chemoterapie ano, — chemoterapie ne

Vzhledem k malému počtu pacientů ve skupině s generalizovaným kolorektálním karcinomem nebylo možné vyhodnotit prognostický a prediktivní význam exprese enzymů TS, TP a DPD.

### 9.2.3. Prognostický význam stanovení exprese TS, TP, DPD

V naší práci jsme provedli vyhodnocení prognostického významu genové exprese TS, TP, DPD mRNA a proteinové IHC exprese TS, TP u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem. V (**Tab. 27**) jsou vyjádřeny kvantitativní hodnoty exprese TS, TP a DPD mRNA. (**Tab. 28**) zobrazuje kvalitativní IHC expresi enzymů TS a TP ve vlastních nádorových buňkách a expresi TP též v nádorovém stromatu. V (**Tab. 29**) je znázorněno statistické vyhodnocení prognostického významu exprese TS, TP, DPD pro DFS u pacientů s lokalizovaným CRC.

**Tabulka 27. Hodnoty exprese TS, TP, DPD mRNA stanovené pomocí RT-PCR**

GEN	Počet stanovení	průměr	minimum	median	maximum
TS	27	1,1	0,04	1,07	7,31
TP	29	2,6	0,05	2,58	10,81
DPD	12	3,8	0,51	3,83	28,35

**Tabulka 28. Stupně exprese TS, TP stanovené pomocí imunohistochemie**

Enzym Studovaná tkáň	Počet stanovení N	Exprese			
		nízká		vysoká	
		N	%	N	%
TS nádorové buňky	29	19	66%	10	33%
TP nádorové buňky	29	26	90%	3	10%
TP nádorové stroma	30	19	63%	11	37%

**Tabulka 29. Prognostický význam stanovení exprese TS ,TP a DPD v nádorové tkáni pro DFS u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem**

<b>Metoda RT-PCR</b>	<b>Expresie (nízká v vysoká)</b>	<b>HR</b>	<b>95%CI</b>	<b>p</b>
Nízká TS versus vysoká TS	14 v 13	1,00	0,25-4,01	p=0,99
Nízká TP versus vysoká TP	15 v 14	4,08	0,8-20,3	<b>p=0,05</b>
Nízká DPD versus vysoká DPD	6 v 6	1,67	0,27-10,04	p=0,59
<b>Metoda IHC</b>				
studovaná tkáň				
nízká TS versus vysoká TS nádorové buňky	19 v 10	0,20	0,25-1,6	<u>p=0,08</u>
nízká TP versus vysoká TP nádorové buňky	26 v 3	1,56	0,19-12,7	p=0,67
nízká TP versus vysoká TP nádorové stroma	19 v 11	3,15	0,75-13,2	<u>p=0,08</u>

RT-PCR: mezní hodnoty: pro TS mRNA 1,1, pro TP mRNA 2,6, pro DPD mRNA 3,8 ,

IHC: nízká exprese TS, TP stupně 0+1, vysoká exprese TS, TP stupně 2+3

p-Coxova regresní analýza HR–poměr rizik, 95% CI interval spolehlivosti

V naší práci byl vyhodnocen kratší DFS u pacientů s vysokou genovou expresí TP mRNA (TP mRNA  $\geq 2,6$ ) v nádorové tkáni (Cox model p=0,05, HR 4,08). Na hranici statistické významnosti byl zjištěn kratší DFS u pacientů s nízkou IHC expresí TS v nádoru (Cox model p=0,08, HR 0,2) a s vysokou IHC expresí TP v nádorovém stromatu (Cox model p=0,08, HR 3,15).

Nebyl prokázán prognostický význam exprese TS mRNA, DPD mRNA v nádorových buňkách pro DFS u pacientů s lokalizovaným CRC.

## Prognostický význam exprese TS a TP ve skupině pacientů bez adjuvantní chemoterapie

Dále jsme v této práci provedli vyhodnocení prognostického významu stupně exprese TS, TP u skupiny 17 pacientů s časným kolorektálním karcinomem léčených pouze chirurgickým výkonem („chemo –“, 16 ze 17 pacientů UICC I nebo II). V (Tab. 30) jsou zobrazeny kvantitativní hodnoty exprese TS, TP mRNA. (Tab.31) zobrazuje kvalitativní IHC expresi enzymů TS a TP ve studovaném souboru pacientů.

**Tabulka 30. Hodnoty exprese TS, TP mRNA stanovené pomocí RT- PCR**

Gen	Počet stanovení	průměr	minimum	median	maximum
TS	15	1,09	0,04	0,59	5,1
TP	8	3,15	0,23	2,31	10,81

**Tabulka 31. Stupně exprese TS, TP stanovené pomocí imunohistochemie**

Enzym Studovaná tkáň	Počet stanovení N	Expres			
		Nizká		Vysoká	
		N	%	N	%
TS nádorové buňky	14	8	57%	6	43%
TP nádorové buňky	14	13	93%	1	7%
TP nádorové stroma	14	11	76%	3	24%

Statistické vyhodnocení prognostického významu prediktorů u pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem pro lokalizovaný kolorektální karcinom je znázorněno v (Tab.32).

**Tabulka 32. Prognostický význam stanovení exprese TS ,TP a DPD v nádorové tkáni pro DFS u pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem**

<b>Metoda RT-PCR</b>	<b>Expresie (nízká v vysoká)</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
Nízká TS versus vysoká TS	7 v 8	1,18	0,19-7,1	p=0,85
Nízká TP versus vysoká TP	4 v 4	N/A	N/A	p=0,13
<b>Metoda IHC</b>				
studovaná tkáň				
nízká TS versus vysoká TS nádorové buňky	8 v 6	0,27	0,03-2,4	p=0,27
nízká TP versus vysoká TP nádorové buňky	13 v 1	N/A	N/A	p=0,48
nízká TP versus vysoká TP nádorové stroma	11 v 3	2,8	0,4-17,3	p=0,24

RT-PCR :mezní hodnoty pro TS mRNA 1,4, pro TP mRNA 3,5

IHC: nízká exprese stupně 0+1, vysoká exprese stupně 2+3

p - Coxova regresní analýza HR–poměr rizik, 95% CI interval spolehlivosti

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ve DFS v závislosti na stupni exprese TS a TP (stanovenými metodou RT-PCR a IHC). U pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem bez adjuvantní chemoterapie neměla exprese enzymů TS a TP prognostický význam.

#### 9.2.4. Prediktivní význam stanovení exprese TS, TP, DPD stanovených metodikou RT-PCR a IHC

Dalším z cílů této práce bylo vyhodnocení prediktivního významu exprese sledovaných enzymů TS a TP ve vztahu k léčbě fluoropyrimidiny (při použití obou metod stanovení). Vyhodnotili jsme klinická data 21 pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-fluorouracilem pro lokalizovaný kolorektální karcinom ve vztahu k expresi prediktorů TS a TP. V (**Tab. 33**) jsou zobrazeny kvantitativní hodnoty exprese TS, TP mRNA. V (**Tab. 34**) jsou zobrazeny stupně IHC exprese enzymů TS a TP.

Kladli jsme si otázku: „Existuje vztah mezi stupněm exprese daného prediktoru a obdobím bez známek onemocnění (DFS resp. OS) u pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-fluorouracilem?“ V (**Tab. 35**) je vyhodnocen prediktivní význam enzymů TS a TP u pacientů s adjuvantní terapií s fluoropyrimidiny.

**Tabulka 33. Stanovení exprese TS mRNA a TP mRNA u pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5- fluorouracilem.**

Gen	počet	průměr	minimum	median	maximum
TS	12	1,09	0,04	0,59	5,1
TP	21	3,15	0,23	2,31	10,81



**Tabulka 34. Stanovení proteinové exprese TS a TP u pacientů s léčbou 5-FU**

Enzym Studovaná tkáň	Počet N	Expresse			
		Nízká		vysoká	
		N	%	N	%
TS nádorové buňky	15	11	73%	4	27%
TP nádorové buňky	15	13	87%	2	13%
TP nádorové stroma	16	8	50%	8	50%

**Tabulka 35. Prediktivní význam stupně exprese TS a TP pro DFS u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem léčených chemoterapií s 5-FU**

Metoda RT-PCR	Expresse (nízká v vysoká)	HR	95%CI	p
Nízká TS versus vysoká TS	6 v 6	0,53	0,04-5,86	p=0,67
Nízká TP versus vysoká TP	10 v 11	2,25	0,41-12,3	p=0,34
<b>Metoda IHC</b> studovaná tkáň				
nízká TS versus vysoká TS nádorové buňky	11 v 4	N/A	N/A	p=0,19
nízká TP versus vysoká TP nádorové buňky	13 v 2	5,07	0,44-57,7	p=0,19
nízká TP versus vysoká TP nádorové stroma	8 v 8	N/A	N/A	<u>p=0,06</u>

RT-PCR: mezní hodnoty pro TS mRNA 0,6, pro TP mRNA 2,3

IHC: nízká exprese stupně 0+1, vysoká exprese stupně 2+3

p-Coxova regresní analýza HR–poměr rizik, 95% CI- interval spolehlivosti

V naší práci nebyl prokázán jednoznačný statisticky signifikantní prediktivní význam stupně exprese TS a TP ve vztahu ke klinickému průběhu onemocnění (DFS) u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených adjuvantní chemoterapií s 5-fluorouracilem. Na hranici statistické významnosti ve smyslu kratšího DFS byl zjištěn jako negativní prediktivní faktor vysoký stupeň imunohistochemické exprese TP v nádorovém stromatu (Cox model  $p = 0,06$ ). Expres TS mRNA, TP mRNA, ani na IHC exprese TS, TP v nádorových buňkách neměla prediktivní význam (Cox model  $p=0,67$ ,  $p=0,34$ ,  $p=0,19$ ,  $p=0,19$ ).

### 9.3. DISKUZE

V předkládané práci byl vyhodnocen klinický průběh onemocnění u 55 pacientů s kolorektálním karcinomem. Pacienty jsme pro přehlednost vyhodnocení léčebného efektu (DFI, TTP, OS) rozdělili do skupiny nemocných s lokalizovaným (N=41) a generalizovaným onemocněním (N=14). Při studiu morfologických a histopatologických charakteristik nádorů pacientů s lokalizovaným onemocněním jsme zaznamenali statisticky významně kratší DFS u pacientů s nádory konečníku oproti nádorům tlustého střeva (Log-rank test  $p=0,01$ , HR 3,5) a kratší DFS u pacientů s nádory s pokročilejším rozsahem onemocnění ve smyslu primárního tumoru T3, T4 ve srovnání s nádory T1, T2 (Log-rank test  $p=0,04$ ). V souladu s publikovanými výsledky dalších studií (Lasmann et al., 2006) došlo v našem souboru pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem ke vzniku recidivy celkově u 32% nemocných. Ve skupině pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem byla prokázána recidiva onemocnění ve 41%, ve skupině s adjuvantní chemoterapií fluoropyrimidiny byla zjištěna recidiva onemocnění u 25% nemocných.

Vyhodnocení klinického průběhu 14 pacientů s primárně generalizovaným kolorektálním karcinomem přineslo neuspokojivé léčebné výsledky (medián doby do progresu 3,5 měsíce a medián celkového přežití 7,5 měsíce). Je pravděpodobné, že při současném standardu kombinované biochemoterapie generalizovaného kolorektálního karcinomu, bychom dosáhli lepších klinických výsledků.

V další části této práce byl studován prognostický a prediktivní význam exprese klíčových enzymů TS a TP, které hrají důležitou roli v metabolismu 5-fluorouracilu. Enzymy TS, TP a DPD jsou považovány za potenciální molekulární markery u kolorektálního karcinomu, ale v důsledku řady odlišných závěrů studií (pomocí různých metod stanovení exprese prediktorů) zůstává jejich prognostická a prediktivní úloha nejednoznačná.

V předchozích kapitolách 6, 7 jsme studovali rozdíly v expresi TS, TP a DPD v nádorové a zdravé tkáni za použití metody imunohistochemické a molekulárně genetické. Jak vyplývá z našich závěrů v kapitole 8, je nutné předpokládat, že obě metody vyšetření přinášejí odlišné výsledky při stanovení stupně exprese studovaných molekulárních markerů TS a TP. Nelze tedy považovat obě metody za rovnocenné a jejich výsledky vzájemně korelovat, proto jsme také použili k vyhodnocení prognostického a prediktivního významu stanovení stupňů exprese jak metodu imunohistochemickou, tak metodu molekulárně genetickou (RT-PCR). V důsledku odlišné imunohistochemické exprese TP v jednotlivých nádorových tkáních (vlastní nádorové buňky versus podpůrné nádorové stroma) jsme TP expresi vyhodnotili v obou tkáňových podskupinách zvlášť, při hledání prognostického a prediktivního významu TP v našem souboru.

Vysoké exprese TS je obecně považována za negativní prognostický faktor u pacientů s kolorektálním karcinomem. V Popatově metaanalýze (Popat et al.,2004) u

2610 pacientů s lokalizovaným CRC byla Coxovou statistickou analýzou stanovena výše rizika (HR) 1,35 pro vysokou expresi enzymu TS. V Soongově práci (Soong et al., 2008) u 967 nemocných byla naopak nízká exprese TS negativním prognostickým faktorem u pacientů II. a III. klinického stadia CRC léčených pouze chirurgickým výkonem, zatímco u pacientů s adjuvantní chemoterapií 5-FU měla exprese nízká TS pozitivní prediktivní význam. Také v naší práci u pacientů s lokalizovaným CRC jsme na hranici statistické významnosti našli jako negativní prognostický faktor nízkou expresi TS stanovenou imunohistochemickým vyšetřením (Cox model  $p=0,08$ , HR 0,2), prediktivní význam TS exprese se nám nepodařilo prokázat.

Dalšími studovanými potenciálními prognostickými faktory byla exprese DPD v nádorové tkáni. V naší práci u časného CRC nebyl nalezen signifikantní vztah mezi expresí DPD mRNA a prognózou pacientů.

Otázka prognostického významu exprese TP byla v literatuře opakovaně studována a předpokládá se, že vysoká TP exprese je spojena s horší prognózou u pacientů s nádory gastrointestinálního traktu (Soong et Diasio, 2005), i když některé další studie přinášejí odlišné výsledky.

V této práci měla vysoká exprese TP mRNA negativní prognostický význam (Cox model  $p=0,05$ , HR 4,08); obdobně negativní prognostický význam (na hranici statistické významnosti) byl zjištěn u vysoké exprese TP v nádorovém stromatu při imunohistochemickém stanovení (Cox model  $p=0,08$ , HR 3,15). Negativní prediktivní význam (na hranici statistické významnosti) byl nalezen u vysoké exprese TP v nádorovém stromatu při imunohistochemické analýze u pacientů léčených chemoterapií s 5-FU (Cox model  $p=0,06$ ). Hodnocení genové exprese TS, DPD mRNA neprokázalo prediktivní význam (také Meropol et al, 2006). V práci Meropola

však naopak byla vysoká exprese TP v nádorových buňkách CRC (stanovená metodou RT-PCR a IHC) pozitivním prediktivním faktorem při léčbě kombinovanou chemoterapií kapecitabin+irinotekan.

Otázka prognostického a prediktivního významu exprese klíčových enzymů metabolismu 5-FU zůstává nejednoznačná a komplikovaná. Vzhledem k heterogennímu charakteru kolorektálního karcinomu je nutno dále studovat tyto a další potencionální prediktivní markery, nejspíše pomocí tkáňových microarrays, které umožňují stanovení molekulárního podpisu desítek až stovek genů.

## 10. SOUHRN ZÁVĚRŮ

Kolorektální karcinom, jedno z nejčastějších nádorových onemocnění, je intenzivně studován z mnoha aspektů, včetně příčin jeho vzniku a celkové patogeneze na molekulární úrovni. V posledním desetiletí byly výsledky preklinického výzkumu patogeneze kolorektálního karcinomu převedeny do klinické praxe zavedením nových cytostatik a moderní biologické léčby zasahující cílené molekulární struktury. Studium farmakogenetiky cytostatik, užívaných k léčbě kolorektálního karcinomu, je součástí úsilí o dosažení optimálního léčebného působení. K mnoha studovaným prognostickým a prediktivním faktorům, které by mohly pomoci individualizovat a optimalizovat cytostatickou léčbu kolorektálního karcinomu, patří také klíčové enzymy metabolismu 5-fluorouracilu - TS, TP a DPD, jejichž problematice je věnována předkládaná práce.

Z výsledků předkládané práce vyplývá:

- 1) Expze TS a TP posuzovaná podle množství jejich mRNA, stanovené pomocí RT-PCR, se neliší v nádorové tkáni a v okolní střevní sliznici.
- 2) Expze DPD mRNA stanovená pomocí RT-PCR je vyšší ve fyziologické střevní sliznici než ve vlastní nádorové tkáni.
- 3) Proteinová expze TS stanovená pomocí imunohistochemické analýzy je vyšší v nádorové tkáni než v okolní střevní sliznici.
- 4) Proteinová expze TP stanovená pomocí imunohistochemické analýzy je vyšší v tkáni nádorového stromatu než ve vlastních nádorových buňkách a vyšší než v okolní střevní sliznici.
- 5) Metody RT-PCR a IHC stanovují odlišné hodnoty expze prediktorů TS a TP. Výsledky genové a proteinové expze spolu nekorelují, nelze srovnávat hodnoty expze stanovené těmito metodami.

- 6) Prognostický význam u pacientů s časným kolorektálním karcinomem v naší studii vykazuje anatomická lokalizace nádoru a histopatologická klasifikace rozsahu primárního nádoru (stadium T).
- 7) Vysoká exprese TP mRNA stanovená pomocí RT-PCR je negativním prognostickým faktorem u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem; exprese DPD mRNA a TS mRNA nemají prognostický význam.
- 8) Vysoká proteinová exprese TP v nádorovém stromatu a nízká exprese TS v nádorových buňkách stanovené pomocí imunohistochemické analýzy jsou negativními prognostickými faktory (na hranici statistické významnosti) u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem.
- 9) Vysoká proteinová exprese TP v nádorovém stromatu stanovená pomocí imunohistochemické analýzy je negativním prediktivním faktorem u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem léčených chemoterapií s 5-fluorouracilem (hraniční statistická významnost).
- 10) Exprese TS (stanovená metodou RT-PCR a IHC) nemá prediktivní význam u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem léčených chemoterapií s 5-fluorouracilem.

Tato experimentálně - klinická studie je příspěvkem k úsilí o individualizaci léčby pacientů s nádorovým onemocněním na základě poznání a stanovení možných prediktivních a prognostických faktorů u kolorektálního karcinomu. Jedná se o velmi komplexní problematiku, což odráží i naše jednotlivé výsledky týkající se specifických cílů, které byly předmětem našeho výzkumu. Jsou tedy dílčím příspěvkem k celkovému úsilí o poznání patogeneze kolorektálního karcinomu s cílem správné péče o nemocné, zvýšení úspěšnosti jejich léčby s minimalizací jejich nežádoucích účinků.

## LITERATURA

Aitman TJ. DNA microarrays in medical practice. *BMJ* 2001; 323: 611-615

Akamoto S, Usuki H, Haba R, Kakinoki K, Okamo K, Izuishi K, Wakabayashi H, Suzuki Y. The discrepancy in thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression depending on measurement methodologies in stage 4 gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2008; 55 (86-87): 1882-6

Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P, Klein P, Behan K, O'Connell MJ, Levitt R, Kugler JW, Tria Tirona M, Goldberg RM. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J.Clin Oncol*. 2002; 17: 1735-1743

Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnson PG. Prognostic Value of Thymidylate Synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C Colon Cancer: A national cancer Institute - National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol*. 2003; 21(2): 241-250

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-Type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 1626-34

Amatori F, Di Paolo A, Del Tacca M, Fontanini G, Vannozzi F, Boldrini L, Bocci G, Lastella M, Danesi R. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer and normal mucosa in patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Nov; 16(11): 809-16

Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunwsi G, Baldo C, Lionetto R, Maley F, Sobrero A. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999; 17(6): 1760-1770

Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, Dickman PW, Steineck G. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population - based study. *Lancet* 1999; 353, 703-719.

Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Frankl H, Pearson L, Bond JH, Greenberg ER. Calcium supplements and colorectal adenomas. *Polyp Prevention Study Group Am N Y Acad Sci* 1999; 889: 138-5

Bathe OF, Franceschi D, Livingstone AS, Moffat FL, Tian E, Ardlan B. Increased thymidylate synthase gene expression in liver metastasis from colorectal carcinoma: implications for chemotherapeutic options and survival. *Cancer J Sci Am*.1999; 5(1): 34-40



Bingham SA, Day Ne, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E; European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition(EPIC): an observational study. *Lancet*. 2003; 361: 1496-15

Bishop JM. The discovery of proto-oncogenes. *Faseb J*. 1996; 10(2): 362-4

Blanquicett C, Gillespie Y, Nabors LB, Miller CR, Bharara S, Buchsbaum DJ, Diasio RB, Johnson MR. Induction of Thymidine Phosphorylase in both irradiated and shielded, contralateral human U87MG glioma xenografts: Implications for a dual modality treatment using capecitabine and irradiation. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002; 10(1): 1139-1145

Bustin SA. Quantitation of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002; 29: 23-39

Buyts Ch. Telomeres, telomerase and cancer. *N Engl J Med*. 2000 Apr 27; 342(17): 1282-1283

Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G, Catalano V, Staccioli MP, Brenna A, Muretto P, Catalano G: Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin modulated bolus 5-FU. *Clin Cancer Res*. 1999; 5(8): 1996-1999

Cascinu S, Graziano F, Valentini M, Catalano V, Giordani P, Staccioli MP, Rossi C, Baldelli AM, Grianti C, Muretto P, Catalano G. Vascular endothelial growth factor expression, S-phase fraction and thymidylate synthase quantitation in node positive colon cancer: relationships with tumor recurrence and resistance to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2001;12(2): 239-244

Ciccolini J, Evrard A, Cuq P. Thymidine phosphorylase and fluoropyrimidines efficacy: a Jekyll and Hyde story. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004; 4(2): 71-81

Cocconi G, Cunningham D, van Cutsem E, Francois E, Gustavsson B, van Hazel G, Kerr D, Possinger K, Heitschold SM. Open, randomized, multicenter trial of raltitrexed versus fluorouracil plus high-dose leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. Tomudex Colorectal Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol*. 1998;16: 2943–2952

Cochrane Review: Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. In: *The Cochrane Library*, Issue 3, 2002. Oxford: Update Software

Corsi DC, Ciaparrone M, Zannoni G, Mancini M, Cassano A, Specchia M, Pozzo C, Martini M, Barone C. Predictive value of thymidylate synthase expression in resected metastases of colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002; 38(4): 527-534

Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003; 22: 8590-8607

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New Eng J Med* 2004; 351(4): 337

de Gramont A, Louvet C, Andre T, Tournigand C, Krulik M. A review of GERCOD trials of bimonthly leukovorin plus 5-fluorouracil 48-h infusion in advanced colorectal cancer: evolution of the regimen. *Groupe d'Etude et de Recherche sur les Cancers de l'Ovaire et Digestifs. Eur J Cancer*. 1998; 34: 619-626

Del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevis C, Copois V, Bibeau F, Chabos P, Bareil C, Kramar A, Salvétat N, Fraslou C, Conseiller E, Granci V, Leblanc B, Pau B, Martineau P, Ychou M. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leukovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 773-780

Deng G, Kakar S, Tanaka H, Matsuzaki K, Miura S, Sleisenger MH, Kim YS. Proximal and distal colorectal cancers show distinct gene-specific methylation profiles and clinical and molecular characteristics. *Eur J Cancer*. 2008; 44(9): 1290-1301

Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2002; 20(7): 1711-1713

Eliason JF, Megyeri A. Potential for predicting toxicity and response of fluoropyrimidines in patients. *Curr Drug Targets*. 2004; 5: 383-388

Emmanouilides C, Sfakiotaki G, Androulakis N, Kalbakis K, Christophylakis C, Kalykaki A, Vamvakas L, Kotsakis A, Agelaki S, Diamandidou E, Touroutoglou N, Chatzidakis A, Georgoulas V, Mavroudis D, Souglakos J. Front-line bevacizumab in combination with oxaliplatin, leucovorin and 5-fluorouracil (FOLFOX) in patients with metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II study. *BMC Cancer*. 2007; 5: 91

Etienne-Grimaldi MC, Formento JI, Francoual M, François E, Formento P, Renée N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Seitz JF, Milano G. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(15): 4830-5

Farrugia DC, Ford HER, Cunningham D, Danenberg KD, Danenberg PV, Brabender J, McVicar AD, Aherne GW, Hardcastle A, McCarthy K, Jackman AL: Thymidylate

synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to Raltitrexed. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 792-01

Fearon, ER. Tumor suppressor genes. In: Vogelstein, B, Kinzler, K.W. *The genetic basis of human cancer.* McGraw-Hill, New York, 1998

Friedenreich CM. Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(4): 287-301

Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D. Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 1993; 363: 88

Goldgar DE, Easton DF, Canon-Abright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(21): 1600-8

Gonen M, Hummer A, Zervoudakis A, Sullivan D, Fong Y, Banerjee D, Klimstra D, Cordon-Cardo C, Bertino J, Kemeny N. Thymidylate synthase expression in hepatic tumors is a predictor of survival and progression in patients with resectable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21(3): 395-396

Gorlick R, Bertino JR. Drug resistance in colon cancer. *Seminars in Oncology.* 1999; 26 (6): 606-611

Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: A review and meta-analysis. *Am J Med.* 1999; 106: 574-82

Gusella M, Padriani R. G>C SNP of thymidylate synthase with respect to colorectal cancer. *Pharmacogenomics.* 2007 Aug; 8(8): 985-986

Haaz MC, Fischer JL, Formento P, Renée N, Etienne Mc, Milano G. Impact of different fluorouracil biochemical modulators on cellular dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996; 38(1) : 52-58

Haba A, Monden T, Sekimoto M, Ikeda K, Izawa H, Kanou T, Amano M, Kan'yama H, Monden. PyNPase expression in human colon cancer. *Cancer Lett* 1998; 122: 85-92

Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist.* 2009; 14(1): 22-28

Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, Sugihara K, Hirayama R. Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 786-791

Iltz MH, El-Kouni MH, Cha S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry*. 1985; 24: 6799-6807

Innocenti F, Ratain M. Correspondence re: Raida M et al., prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res*. 2002; 5: 1314, autor reply 1315-1316

Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1; 14 (19): 5939-5940

Jackman AL, Taylor GA, Gibson W, Kimbell R, Brown M, Calvert AH, Judson IR, Hughes LR. ICI D 1694, a quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitor that is a potent inhibitor of L 1210 tumor cell growth in vitro and in vivo: a new agent for clinical study. *Cancer Res*. 1991; 51: 5579-5586

Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB et al. Prognostic Value of Histologic Tumor Regression, Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase, and Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Rectal Cancer UICC Stage II/III After Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol*. 2006 Sep; 30(9): 1169-1174

Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB. Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 2006-2011

Johnston PG, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ. Production and characterization of monoclonal antibodies that localise human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res*. 1991; 51: 6668-6676

Johnston SJ, Ridge SA, Cassidy J, McLeod HL. Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 2566-2570

Kinoshita M, Kodera Y, Hibi K, Nakayama G, Inoue T, Ohashi N, Ito Y, Koike M, Fujiwara M, Nakao A. Gene expression profile of 5-fluorouracil metabolic enzymes in primary colorectal cancer: potential as predictive parameters for response to fluorouracil-based chemotherapy. *Anticancer Res*. 2007; 27(2): 851-856

Klener P. a autorský kolektiv: Nádory tlustého střeva a konečníku. *Klinická onkologie. Galén* 2002; 406-413

Kobayashi H, Sugihara K, Uetake H, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Iida S, Azuma M, Mori R, Omori A, Lenz HJ, Danenberg KD, Danenberg PV. Messenger RNA expression of TS and ERCC in colorectal cancer and matched liver metastasis. *Int J Oncol*. 2008 Dec;33(6):1257-62

Kocakova I, Svoboda M, Kubosova K, Chrenko V et al. Preoperative radiotherapy and concomitant capecitabine treatment induce thymidylate synthase and thymidine phosphorylase mRNA in rectal carcinoma. *Neoplasma*. 2007; 54(5):447-53

Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*. 1992 Aug 15; 80: 879-886

Kornmann M, Link KH, Lenz HJ, Pillasch J, Metzger R, Butzer U, Leder GH, Weindel M, Safi F, Danenberg KD, Beger HG, Danenberg PV. Thymidylate synthase is a predictor for response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy. *Cancer Lett*. 1997; 118(1): 29-35

Kornmann M, Link KH, Galuba I, Ott K, Schwabe W, Häusler P, Scholz P, Sträter J, Polat S, Leibl B, Kettner E, Schlichting C, Baumann W, Schramm H, Hecker U, Ridwelski K, Vogt JH, Zerbian KU, Schütze F, Kreuser ED, Behnke D, Beger HG. Association of time to recurrence with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression in stage II and III colorectal cancer. *J Gastrointest Surg*. 2002; 6: 331-337

Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Sträter J, Polat S, Kettner E, Weiser HF, Baumann W, Schramm H, Häusler P, Ott K, Behnke D, Staib L, Beger HG, Link KH. et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 4116–4124

Kouwaki M, Hamajima N, Sumi S, Nonaka M, Sasaki M, Dobashi K, Kidouchi K, Togari H, Wada Y. Identification of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a Japanese patient with 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res*. 1998 Dec;4(12):2999-3004

Kuhn JD. Fluorouracil and the new fluorinated pyrimidines. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2001; 35: 217-226

Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K, Miatura S, Shimizu D, Vallbohmer D, Park S, Danenberg KD, Takasaki K, Danenberg PV. 5-fluorouracil-related gene expression levels in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. *Int J Cancer*. 2006 Aug 1; 119: 522-526

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; Jul 2, 358:15

Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer : a meta-analysis of prospective studies *Int J Cancer*. 2006 Dec 1;119(11):2657-64.

Lassmann S, Henning M, Rosenberg R, Nährig J, Schreglmann J, Krause F, Poignee-Heger M, Nekarda H, Höfler H, Werner M. Thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase mRNA expression in primary colorectal tumors - correlation to tumor histopathology and clinical follow-up. *Int J Colorectal Dis*. 2006; 21: 238-247

Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumour markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 5313-5327

Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 1990; 1(1): 59-68

Maeda K, Chung Y-S, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Onoda N, Kato Y, Sowa M. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 1996; 73: 884-888

Malet-Martino M, Martino R. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A review. *The Oncologist*. 2002; 7: 288-323

Marchesa P, Lashner BA, Lavery IC, Milsom J, Hull TL, Strong SA, Church JM, Navarro G, Fazio VW. The risk of cancer and dysplasia among ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 1997; 92(8):1285-8.

Matsuura T, Kuratate I, Teramachi K, Osaki M, Fukuda Y, Ito H. Thymidine phosphorylase expression is associated with both increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 1999; 59(19): 5037-40

Mayer RJ. Oral versus intravenous fluoropyrimidines for advanced colorectal cancer: By either route, it's all the same. *J Clin Oncol*. 2001;19: 4093-4096

Meropol NJ, Gold PJ, Diasio RB, Andria M, Dhami M, Godfrey T, Kovatich AJ, Lund KA, Mitchell E, Schwarting R. Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(25): 4069-77

Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, Lenz HJ, Groshen S, Leichman L, Danenberg PV. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to fluorouracil. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(10): 2371-6

Milano GT, McLeod HL. Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil based treatment? *Eur J Cancer*. 2000; 36: 37-42

Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, Akiyama S. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res*. 1995; 55: 1687 – 1690

Miyamoto Y, Ochiai A, Boku N, Ohtsu A, Tahara M, Yoshida S, Okabe H, Takechi T, Fukushima M. Discrepancies between the gene expression, protein expression, and enzymatic activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa. *Int J Oncol*. 2001; 18: 705-713

Miyoshi T, Kondo K, Fujino H, Takahashi Y, Sawada N, Sakiyama S, Tsuyuguchi M, Kimura S, Sumitomo M, Monden Y. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer: relationship between mRNA expression and activity. *Anticancer Res.* 2005; 25(2A): 92-30

Moran RG, Spears CP, Heidelberger C. Biochemical determinants of tumor sensitivity to 5-fluorouracil: ultrasensitive methods for the determination of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate, 2'-deoxyuridylate, and thymidylate synthetase *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Mar;76(3):1456-60

Mori K, Hasegawa M, Nishida M, Toma H, Fukuda M, Kubota T, Nagasue N, Yamana H, Hirakawa-YS Chung K, Ikeda T, Takasaki K, Oka M, Kameyama M, Toi M, Fujii H, Kitamura M, Murai M, Sasaki H, Ozono S, Makuuchi H, Shimada Y, Onishi Y, Aoyagi S, Mizutani K, Ogawa M, Nakao A, Kinoshita H, Tono T, Imamoto H, Nakashima Y, Manabe T. Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tissues. *Int J Oncol.* 2000; 17(1): 33-38

Nishida M, Hino A, Mori K, Matsumoto T, Yoshikubo T, Ishitsuka H. Preparation of anti-human thymidine phosphorylase monoclonal antibody useful for detecting the enzyme levels in tumor tissues. *Biol Pharm Bull.* 1996; 11: 1407-1411

Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Willén R, Carlsson G, Spears CP, Larsson L, Gustavsson B. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003; Dec 1; 9: 6012-9

Ogawa M, Ikeuchi K, Takao Y, Kobayashi T, Eto K, Ushigome T, Watanabe M, Anazawa S, Yamazaki Y, Yanaga K. The activities of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer depend on where the sample is taken. *Oncol Rep.* 2005 Aug;14(2): 331-5

Ohrling K, Edler D, Hallström M, Ragnhammar P, Blomgren H. Detection of thymidylate synthase expression in lymph node metastases of colorectal cancer can improve the prognostic information. *J Clin Oncol.* 2005; 23(24): 5628-34

Palmer G, Martling A, Blomquist L, Cedermark B, Holm T. Outcome after the introduction of a multimodality treatment program for locally advanced rectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2005; Sep; 31(7): 727-34.

Paré L, Marcuello E, Altés A, del Rio E, Sedano L, Barnadas A, Baiget M. Transcription factor- binding sites in the thymidylate synthase gene: predictor of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin? *Pharmacogenomics J.* 2008 Oct; 8(5): 315-20.

Perkins AS, Vande S, Woude GF. Principles of molecular cell biology of cancer: Oncogenes. In: De Vita, VT, Hellman, S, Rosenberg SA.: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Fourth edition, JB. Lippincott Co., Philadelphia, 1993

Pfeiffer P, Ovortrup C, Eriksen JG. Current role of antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer, *Oncogene*. 2007; 28, 26 (25): 3661-78

Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer. A systematic Review and meta – analysis. *J Clin Oncol*. 2004; 22(3): 529-536

Popat S, Chen Z, Zhao D, Pan H, Hearle N, Chandler I, Shao Y, Aherne W, Houlston R. A prospective, blinded analysis of thymidylate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2006; 17: 1810 - 1817

Roberts D. An isotopic assay for thymidylate synthetase. *Biochemistry*. 1966 Nov; 15/11: 3546-3548

Saleem A, Yap J, Osman S, Brady F, Suttle B, Lucas SV, Jones T, Price PM, Aboagye EO. Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil: in -vivo imaging of drug action. *Lancet*. 2000; 355: 2125-2131

Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1322-1327

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2, CSHL Press, 1989.

Saw RP, Koorey D, Painter D, Gallagher PJ, Solomon MJ. p53, DCC and thymidylate synthase as predictors of survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2002; 89(11): 1409-1415

Shomori K, Sakatani T, Goto A, Matsuura T, Kiyonari H, Ito H. Thymidine phosphorylase expression in human colorectal mucosa, adenoma and carcinoma: Role of p53 expression. *Pathology International*. 1999; 49: 491-499

Schuller J, Cassidy J, Etienne D, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000; 45: 291-297

Sirvent JJ, Aguilar MC, Olona M, Pelegri A, Blazquez S, Gutierrez C. Prognostic value of apoptosis in cancer : p53, bcl-2, bag-1 and Bax immunohistochemical study. *Histol Histopathol*. 2004; 19: 759-770

Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, Novotny J, Poon MA, O'Connell MJ, Loprinzi L: Women experience greater toxicity with fluorouracil – based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20(6): 1491-1498



Sobrero A, Aschele C, Bertino J: Fluorouracil in colorectal cancer-a tale of two drugs: implication for biochemical modulation. *J Clin Oncol.* 1997;15: 368-381

Soong R, Diasio RB. Advances and challenges in fluoropyrimidine pharmacogenomics and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics.* 2005; 6: 835 - 847

Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, Tai BC, Soo RA, Han HC, Ng SS, Tan WL, Zeps N, Joseph D, Diasio RB, Iacopetta B. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann of Oncol.* 2008; 19: 915-919

Sturmer T, Glynn RJ, Lee IM. Lifetime cigarette smoking and colorectal cancer incidence in the Physicians Health Study I, *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92, 1178-81

Sumizawa T, Furukawa T, Haraguchi M, Yoshimura A, Takeyasu A, Ishizawa M, Yamada Y, Akiyama S. Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biochem.* 1993 Jul, 114(1): 9-14

Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. Clinicopathological and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Nat Cancer Inst.* 1996; 88: 1110 - 1117

Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, Hokita S, Yamada K, Akiba S, Yamada Y, Sumizawa T, Aikou T. Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 1996; 87: 288-295

Tanaka-Nozaki M, Onda M, Tanaka N, Kato S. Variation in 5-fluorouracil concentrations of colorectal tissues as compared with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme activities and DPD messenger RNA levels. *Clin.Cancer Res.* 2001; 7: 2783-2787

Toi M, Hoshina S, Taniguchi T, Yamamoto Y, Ishitsuka H, Tominaga T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer.* 1995; 64: 79-82

UZIS ČR, Novotvary 2006 ČR, Zdravotnická statistika 2006, Cancer incidence 2006 in the Czech Republic 51-60

Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, Maring JG, Vreken P, van Gennip AH. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in the DPD gene, *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4705-4712

Van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA, Smid K, Hoekman K, Hoitsma HF, Peters GJ. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor,

and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(3): 1063-1072

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC Gastroenterology. 1999; 116(6):1453-6.

Vasen HF, Moslein G, Alfonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Møller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet.* 2007; 44: 353-362

Wang Y, Jatko T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol.* Vol 22(9), 2004; 1564-1571

Waters J, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F, Cotter FE. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkins lymphoma. *J Clin Oncol.* 2000;18(9): 1812-1823

Waters J, Cunningham D. The changing face of chemotherapy in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2001 Jan 5; 84(1): 1-7

Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. 1996; *J Clin Incest.* 1: 610-615

Westra JL, Hollema H, Schaapveld M, Platteel I, Oien KA, Keith WN, Mauritz R, Peters GJ, Buys CH, Hofstra RM, Plukker JT. Predictive value of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase protein expression on survival in adjuvantly treated stage III colon cancer patients. *Ann Oncol.* 2005; 16: 1646-1653

Yamada H, Iinuma H, Watanabe T. Prognostic value of 5-fluorouracil metabolite enzyme genes in Dukes' stage B and C colorectal cancer patients treated with oral 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Oncology Reports* 2008; 19: 729-735

Yasuno M, Mori T, Koike M, Takahashi K, Toi M, Takizawa T, Shimizu S, Yamaguchi T, Matsumoto H. Importance of thymidine phosphorylase expression in tumor stroma as prognostic factor in patients with advanced colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2005;13(3): 405-12

Zhang JM, Mizoi T, Shiiba K, Sasaki I, Matsuno S. Expression of thymidine phosphorylase by macrophages in colorectal cancer tissues. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(4): 545-9

## LITERATURA AUTORKY

### 1. Původní články v časopisech s impaktovaným faktorem (IF)

1. **Zimovjanová M**, Sýkora V, Novotný J, Gatěk J, Petruželka L, Holubec L Jr, Pecen L. Comparative analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphohorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in colorectal cancer and surrounding normal tissue. *Neoplazma* 2005; 52, 3: 208-210, **IF** 1,2, cit. 2

2. Krásná L, Netíková I, Chaloupková A, Taišlová E, **Zimovjanová M**, Veselý P, Daneš J, Petruželka L, Matoušková E. Assesment of in vitro drug resistance of human breast cancer cell subcultured from biopsy specimens. *Anticancer Res* 2003; 23( 3B): 2593- 2599, **IF** 1,41, cit. 5

3. Janků F, Příbylová O, **Zimovjanová M**, Pazdrová G, Šafanda M, Petruželka L. 4-years results of weekly trastuzumab and paclitaxel in the treatment with women with HER2/neu overexpressing advanced breast cancer: single prospective study. *Bull Cancer* 2004; 91,10: 279-283, **IF** 0,89, cit 1

### 2. Publikace v odborných časopisech s recenzním řízením

1. Kleiblová P, Kleibl Z, **Zimovjanová M**, Sýkora V. Detekce mutací a genové exprese dihydropyrimidindehydrogenasy (DPD) - laboratorní výsledky a klinické využití. *The Lancet Oncology*, české vydání, 2004; 3, 2.

2. Novotný J, Kleibl Z, **Zimovjanová M**, Petruželka L. Projekt ´DPD online´: možnost predikce toxicity 5- fluorouracilu a jeho derivátů. *Klinická onkologie* 2003; 16, 6: 276-278

3. Janků F, Petruželka L, Příbylová O, Vedralová J, Honová H, Pecen L, **Zimovjanová M**, Pazdrová G, Šafanda M, Konopásek B a kol. Efficacy of weekly trastuzumab and paclitaxel in the treatment of women with HER-2/neu overexpressing metastatic breast cancer. The impact of taxane free interval on treatment outcomes. *Radiology and Oncology* 2002; 36,2, 121-129

### 3. Publikace v domácích odborných časopisech

1. **Zimovjanová M**. Program ´DPD online´- možnosti predikce toxicity protinádorové léčby. *Zdravotnické noviny* 2004; 53, (34), příloha Lékařské Listy

2. **Zimovjanová M**, Chroust K. Megestrolacetát v léčbě anorexie a kachexie u pacientů s nádorovým onemocněním. *Medicina po promoci* 2005; 6 (10): 74- 76

3. **Zimovjanová M**, Genetické poradenství v onkologii. *Eva 35 info* 2006; 1, (1) 10-11

#### **4. Abstrakta prezentací na zahraničních kongresech publikovaných v časopisech s IF**

1. **Zimovjanová M**, Kleibl Z, Sýkora V, Novotný J, Petrželka L. DPD mutations and expression in patients with serious toxicity during therapy with 5FU based regimens: National project. The ASCO 2004 Proc Am Soc Clin Oncol 2004; 25, abstrakt 3118

2. **Zimovjanová M**, Tesařová P, Novotný J, Petruželka L, Konopásek B, Příbylová O, Mužík J. EVA35- project of cancer care for young women in the Czech Republic. Meeting poster. Annals of Oncology 2008, 19, Suppl.5, 137-138, **IF** 4,87

3. Petruželka L, **Zimovjanová M**. Fulvestrant in postmenopausal women with metastatic breast cancer progressing on prior endocrine therapy- results from compassionate use program. The ASCO 2004 Proc Am Soc Clin Oncol 2004; 25, abstrakt 730

4. Netíková I, Brožová M, Janků F, **Zimovjanová M**, Skřičilová G, Spěváková K, Krásná L, Matoušková E. Assessment of in vitro drug resistance from malignant effusions cells as a possibility for the individualisation of the chemotherapy for patients with advanced cancer. Meeting poster. The Ninth International Symposium on Oncology- Pharmacy Practice 2004

5. Petruželka L, Janků F, Příbylová O, Honová H, **Zimovjanová M**. et al. Weekly administration of Trastuzumab and Paclitaxel. Journal of Tumor marker Oncology 2001, abstrakt 348-349

#### **5. Abstrakta ve sbornících z domácích konferencí**

1. **Zimovjanová M**, Novotný J, Konopásek B. Genetické poradenství u mladých žen s rizikem karcinomu prsu. 14. onkologicko-urologické sympozium a 10. mammologické sympozium 2006, abstrakt 25

2. Novotný J, **Zimovjanová M**, Sýkora V, Gatěk J, Petruželka L, Holubec L, Pecen L. Rozdílná exprese thymidinfosforylázy ve střevní sliznici a v primárním kolorektálním nádoru, racionální základ pro selektivní aktivaci kapecitabinu v nádoru. XXIX. Brněnské onkologické dny 2005, abstrakt 101

3. Petruželka L, **Zimovjanová M**, Aschermannová A. Nové možnosti hormonální léčby postmenopauzálních žen s karcinomem prsu. XXVIII. Brněnské onkologické dny 2004, abstrakt 79

4. Petruželka L, **Zimovjanová M**. Kontroverze v adjuvantní léčbě postmenopauzálních žen s karcinomem prsu. 9. ročník odborného sympozia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii 2004, abstrakt 20

5. Tesařová P, Barkmanová J, **Zimovjanová M**, Příbylová O, Konopásek B, Petruželka L. Neoadjuvantní chemoterapie a patologická kompletní remise u pacientek do 35 let. XXXII. Brněnské onkologické dny 2008, abstrakt 173

6. Janků F, Konopásek B, **Zimovjanová M**, Petruželka L. Léčba kožních metastáz karcinomu prsu. VII. Jihočeské onkologické dny 2000, abstrakt 32
7. Novotný J, Kleibl Z, Kleiblová P, **Zimovjanová M**, Sýkora V. Program DPD online-program predikce toxicity způsobené fluoropyrimidiny. XXVIII. Brněnské onkologické dny 2004, abstrakt 79
8. Petruželka L, Tesařová P, Příbylová O, **Zimovjanová M**. Adjuvantní terapie u žen s karcinomem prsu ve věkové skupině pod 35 let. 9. ročník odborného sympozia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii 2004, abstrakt 52
9. Netíková I, Vašutová P, Havrilová P, Krásná L, **Zimovjanová M** a kol. Léčba palmární-plantární erytrodysesthesie po podávání fluoropyrimidinů 10% uridinovou masťou. 13. dny profesora Vladimíra Staška 2008, sborník 94-95
10. Petruželka L, Konopásek B, Příbylová O, Tesařová P, **Zimovjanová M**. Léčba metastazujícího karcinomu prsu ve světle nových možností chemoterapie, hormonální léčby a bioterapie. 13. ročník odborného sympozia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii 2008, abstrakt 15.
11. Petruželka L, Konopásek B, Novotný J, Příbylová O, Tesařová P, **Zimovjanová M**. Projekt integrované péče o ženy mladší věkové skupiny s karcinomem prsu. 13. dny profesora Vladimíra Staška 2008, sborník 86- 88