

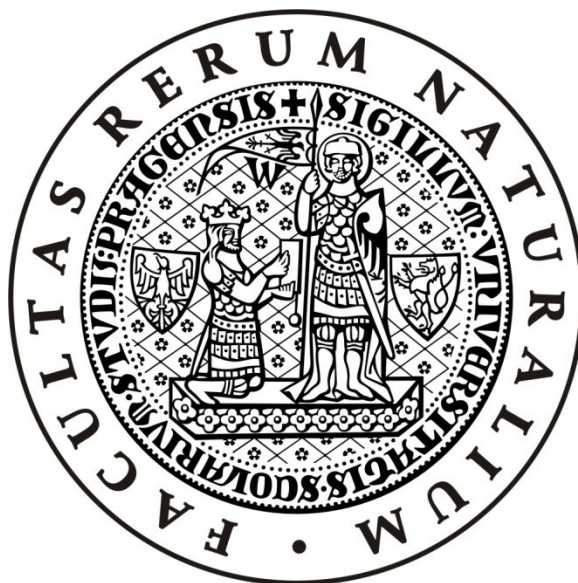
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor Antropologie a genetika člověka

Katedra Antropologie a genetika člověka



Bc. Martina Protivová

**Studie molekulárních markerů korelujících s prognózou a
výsledkem terapie kolorektálního karcinomu**

Study of molecular markers correlating with prognosis and result of
therapy colorectal carcinoma

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Pavel Souček, CSc.

Praha 2011

Prohlášení:

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

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Pavlu Součkovi, Csc. za odborné vedení mé diplomové práce, podnětné připomínky a rady. Můj velký dík patří také Ing. Ivoně Hlavaté za vedení při laboratorní činnosti, za vstřícný přístup a za velké množství cenných rad poskytnutých při sepisování této práce. Rovněž bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře Toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu za ochotu a podporu.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu z Chirurgické kliniky, LF a FN Plzeň vedeného MUDr. Václavem Liškou, PhD za sběr vzorků a klinicko-patologických dat pacientů. Dále bych ráda poděkovala za možnost měření RIN na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer kolektivu MUDr. Zdeňka Kleibla, PhD na Ústavu biochemie a experimentální onkologie, 1.LF UK. Dále děkuji všem pacientům za udělení jejich informovaného souhlasu se zařazením do studie a tedy i umožnění samotné studie. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat členům své rodiny za morální podporu při psaní této práce.

Tato práce byla podpořena granty IGA 10230-3, GAČR 310/07/1430, GAČR P304/10/1286 a GAUK 15109/2009.

OBSAH

OBSAH	1
ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE	10
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 EPIDEMIOLOGIE.....	11
3.2 DEFINICE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU	13
3.3 KLASIFIKACE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU	14
3.4 SCREENING	15
3.5 ETIOLOGIE.....	16
3.5.1 Hereditární formy	16
3.5.2 Familiární formy	18
3.5.3 Sporadické formy	18
3.5.4. Enviromentální rizikové faktory	18
3.6. LÉČBA.....	19
3.6.1 Chemoterapie	20
3.6.2 Biologická léčba	24
3.7 FARMAKOGENOMIKA	24
3.8 5-FLUOROURACIL (5-FU)	25
3.8.1 Prekurzory 5-FU	26
3.8.2 Mechanismus účinku 5-FU	27
3.8.2 Metabolismus 5-FU	28
3.8.3 Transport	37

4. MATERIÁLY A METODY	40
4.1. SOUBOR PACIENTŮ	40
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	42
4.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	42
4.4 IZOLACE RNA	42
4.5 STANOVENÍ KONCENTRACE RNA.....	43
4.6 OVĚŘENÍ KVALITY A INTEGRITY RNA.....	45
4.7 REVERZNÍ TRANSKRIPCE.....	45
4.8 OVĚŘENÍ KVALITY cDNA	45
4.9 PREAMPLIFIKACE.....	46
4.10 RT-PCR.....	47
4.11 SLEDOVANÉ GENY	47
4.12 TEST PREAMPLIFIKACE	48
4.13 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	49
5. VÝSLEDKY	50
5.1 KVALITA TESTOVANÝCH VZORKŮ	50
5.2. TEST ÚČINNOSTI PREAMPLIFIKACE	51
5.3 RT-PCR.....	53
5.4 VÝBĚR REFERENČNÍCH GENŮ	53
5.5 ANALÝZA EXPRESE NA PALIATIVNÍM SOUBORU	53
5.5.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání	53
5.5.1 Analýza odpovědi na léčbu	55
5.6 ANALÝZA EXPRESE NA NEZÁVISLÉM ADJUVANTNÍM SOUBORU.....	56
5.6.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání	56
5.6.2 Analýza odpovědi na léčbu	57
5.7. SPOLEČNÁ ANALÝZA EXPRESE PALIATIVNÍHO I ADJUVANTNÍHO	58
SOUBORU.....	58

5.7.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání	58
5.7.2 Analýza odpovědi na léčbu	59
5.8 Hodnocení vztahu expresí ke klinickým datům	60
6. DISKUZE	62
7. ZÁVĚR	68
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	70
9. PŘÍLOHY.....	90

ABSTRAKT

Kolorektální karcinom je jedním z nejčastějších onkologických onemocnění u nás i ve světě. Závažným problémem v léčbě tohoto onemocnění je interindividuální variabilita v odpovědi na léčbu, neboť velká část pacientů vykazuje rezistenci nebo závažnou toxicitu k léku. Příčinou takové variability může být genetická výbava jedince. Z tohoto hlediska stoupá potřeba nalezení molekulárních markerů prognózy průběhu onemocnění a markerů, díky kterým budeme schopni odhadnout reakci pacienta na léčbu.

Hlavním cílem této studie bylo najít rozdíly v expresi genů mezi zdravou a nádorovou tkání u pacientů dobře a špatně odpovídajících na léčbu na bázi 5-fluorouracilu a zjištěné výsledky porovnat ve vztahu ke klinickým datům. Tato studie se zaměřila na hodnocení genové exprese 14 potenciálních molekulárních markerů zapojených do drah 5-FU zahrnujících metabolismus, transport a cíle tohoto léku.

Do studie byli vybráni pacienti léčení režimy na bázi 5-FU. Expese byla hodnocena na dvou nezávislých souborech tvořených pacienty s indikovanou paliativní nebo adjuvantní chemoterapií. Od každého pacienta byla k dispozici nádorová a párová nenádorová tkáň. Genová expese v těchto vzorcích byla měřena pomocí real-time RT-PCR s relativní kvantifikací za použití preamplifikované cDNA.

V první fázi byla genová expese hodnocena na souboru pacientů indikovaných k paliativní léčbě. Významné rozdíly v genové expresi mezi nádorovou a zdravou tkání pacientů vykazovalo celkem 6 genů. Tyto geny byly následně ověřeny na nezávislém souboru pacientů léčených adjuvantní chemoterapií. Ověřovací část studie výsledky z první fáze potvrdila. Mezi geny s nižší expresí v tumoru patřily katabolické geny *DPYD* a *UPB1* a rovněž aktivační gen *UCK1*. Významně zvýšené hladiny v nádoru oproti zdravé tkáni vykazovaly geny *PPAT*, *RRM2* a *SLC29A1* zapojené v metabolických dráhách vedoucích k aktivním metabolitům 5-FU. Jednoznačně identifikovat gen s prediktivní funkcí s ohledem na výsledek terapie se v této studii bohužel nepodařilo. Jako nejvýznamnější ve vztahu ke klinickým datům byly identifikovány geny *PPAT* a *UCK2*, jejichž zvýšená expese korelovala s horší prognózou.

Tato studie poskytla pohled na expresní profil genů metabolismu a transportu 5-FU u pacientů s kolorektálním karcinomem. V této práci se podařilo identifikovat potencionální prognostické markery tohoto závažného onemocnění nikoliv však prediktivní. Výsledky této studie by tak mohly přispět k zavedení markerů pro individualizaci léčby a tím i zvýšení její efektivity

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common cancer in this country and abroad. A major problem in the treatment of this disease is interindividual variability in response to treatment, since a large proportion of patients show resistance or adverse toxicity to the drug. The cause of this variability can be an individual's genetic makeup. From this perspective a need to find molecular markers for prognosis of the disease and markers through which we can predict response to therapy is growing.

The main aim of this study was to find differences in gene expression between healthy and tumor tissue from patients well and poorly responding to treatment based on 5-fluorouracil and compare the results to clinical data. This study aimed to evaluate gene expression of 14 potential molecular markers involved in 5-FU pathways involving metabolism, transport, and objectives of the drug.

Patients selection for the study was based on 5-FU regimens treatment. Expression was evaluated in two independent sets consisting of patients with indicated palliative or adjuvant chemotherapy. For each patient malignant and paired nonmalignant tumor tissue was available. Gene expression in these samples was measured using real-time RT-PCR with relative quantification using the preamplified cDNA.

In the first phase the gene expression was evaluated by a group of patients indicated for palliative treatment. Significant differences in gene expression between tumors and healthy tissues of patients showed a total of 6 genes. These genes were subsequently validated on an independent set of patients treated with adjuvant chemotherapy. Validation study confirmed the results from the first phase. Among the genes with lower expression in the tumor were catabolic genes DPYD and UPB1 as well as activation gene UCK1. Significantly elevated levels in tumor versus healthy tissue showed PPAT, SLC29A1 and RRM2 genes involved in metabolic tracks leading to the active metabolites 5-FU. Clear identification of the gene with a predictive function of therapy in this study unfortunately failed. As the most important in relation to the clinical data PPAT and UCK2 genes were identified whose increased expression correlated with a worse prognosis.

This study provided a view at gene expression profiles of metabolism and transport of 5-FU on patients with colorectal carcinoma. In this work I have identified potential

prognostic markers of this serious illness but not predictive. The results of study could contribute to establishment of markers for individual treatment and thus increase its efficiency.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	ATP vazebná doména
APC	Adenomatózní polypóza coli
5'dFCR	5'-deoxy-5-fluorocytidin
5'dFUR	5'-deoxy-5-fluorouridin
5-FU	5-fluorouracil
CDA	cytidin deamináza
cDNA	komplementární DNA
CES	karboxylesteráza
CYP2A6	zástupce jedné z rodin cytochromu P450
DHFU	5,6-dihydrofluorouracil
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPYD	dihydropyrimidin dehydrogenáza
DPYS	dihydropyrimidináza
FBAL	fluoro-beta-alanin
FdUDP	fluoro-deoxy-uridin difosfát
FdUMP	fluoro-deoxy-uridin monofosfát
FdUTP	fluoro-deoxy-uridin trifosfát
FUDP	fluorouridin difosfát
FUDR	fluoro-deoxy-uridin
FUMP	fluorouridin monofosfát
FUPA	fluoroureido-propionová kyselina
FUR	fluorouridin
FUTP	fluorouracil trifosfát
k-RAS	homolog virového onkogenu Kirstenova potkaního sarkomu 2
KRK	kolorektální karcinom
mRNA	mediátorová RNA
MYH	homolog bakteriálního genu pro excizní opravy
OPRT	orotát-fosforybozyl transferáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPAT	fosforibozyl pyrofosfát amidotransferáza
PRPP	fosforybozyl pyrofosfát
RIN	RNA integrity number

RNA	ribonukleová kyselina
RRM1	ribonukleotid reduktáza 1
RRM2	ribonukleotid reduktáza 1
RT-PCR	PCR v reálném čase
SLC22A7	Transportér rozpuštěných látek, rodina 29, člen 1
SLC29A1	Transportér rozpuštěných látek, rodina 22, člen 7
TK1	tymidin kináza 1
TYMP	tymidin fosforyláza
TYMS	tymidylát syntetáza
UFT	uracil + tegafur
UCK1	uridin-cytidin kináza 1
UCK 2	uridin-cytidin kináza 2
UMPS	uridin monofosfát syntetáza
UPB1	beta-ureido-propionáza
UPP1	uridin fosforyláza 1
UPP2	uridin fosforyláza 2

1. ÚVOD

Kolorektální karcinom je jedním z nejčastějších onkologických onemocnění u nás i ve světě. Česká republika zaujímá ve světě přední místa jak v incidenci, tak v mortalitě. Kolorektální karcinom patří mezi ta onemocnění, která jsou dobře léčitelná, pokud se zjistí v časném stádiu. Pozdní diagnóza je však častým jevem a tedy závažným problémem.

Léčba kolorektálního karcinomu je multimodální. Základem léčby je chirurgický zákrok. Odstranění nádoru je jediným možným léčebným postupem, který může vést k trvalému vyléčení. V době diagnózy se však vyskytují až u třetiny pacientů vzdálené metastázy, které jsou u většiny již neoperabilní. U více než poloviny pacientů dochází k lokální recidivě nebo generalizaci onemocnění do okolních orgánů. V těchto případech má nepostradatelnou roli chemoterapie. Základem chemoterapie kolorektálního karcinomu je podání 5-fluorouracilu. Navzdory zavedení nových léků do léčby, zůstává odpověď na léčbu stále nízká. Důvodem je častý výskyt rezistence a toxicity k cytostatikům. Individuální vnímavost k léčbě může vznikat důsledkem odlišné genetické výbavy jedince. Bylo navrženo několik molekulárních markerů, které mohou vést k odlišné prognóze a citlivosti k léčbě. K těmto markerům patří mimo jiné například onkogeny, tumorsupresorové geny a celá řada enzymů zapojených do oprav DNA a metabolismu léku. Interindividuální variabilita aktivity těchto enzymů je způsobená například genetickými polymorfismy, odlišnou regulací mezi normální a nádorovou tkání a vlivem chemoterapie na enzymatickou expresi. Zavedení prognostických a prediktivních markerů do klinické praxe by umožnilo individualizaci léčby.

Tato práce je zaměřena na hodnocení molekulárních markerů souvisejících s léčbou obsahující 5-fluorouracil u pacientů s kolorektálním karcinomem. Hlavním záměrem je porovnání rozdílů exprese genů metabolismu, transportu a cílů 5-FU mezi zdravou a nádorovou tkání u pacientů dobře a špatně odpovídajících na léčbu. Výsledky budou hodnoceny ve vztahu k prognóze a možné predikci odpovědi. Identifikované molekulární markery budou posouzeny z hlediska využitelnosti v klinické praxi.

2. CÍLE PRÁCE

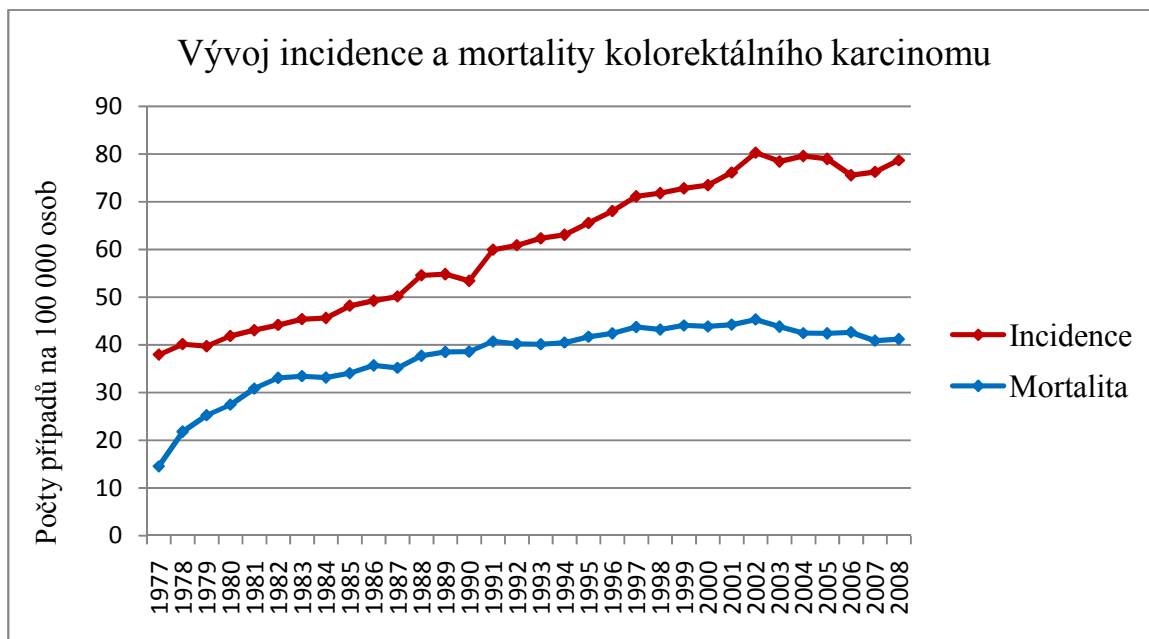
- Vybrat vhodné vzorky primárních nádorů a nepostížených tkání střeva pacientů s KRK pro expresní studii na základě kvality vyizolované RNA a dostupných klinických dat.
- Na vybraném souboru pacientů stanovit hladinu exprese 16 vybraných genů, které mohou mít vliv na účinnost chemoterapie na bázi 5-FU.
- Zhodnotit expresi kandidátních genů normalizovaných k referenčním genům v nádorové a zdravé tkáni a zjistit případnou korelaci s odpovědí na léčbu.
- Významně deregulované geny následně ověřit na nezávislém souboru.
- Zhodnotit význam zjištěných výsledků pro účely prognostické a pro možné využití v prediktivní onkologii při plánování léčby.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 EPIDEMIOLOGIE

Kolorektální karcinom (KRK) je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz ve vyspělých zemích. KRK se v České republice nachází mezi malignitami na prvním místě bez ohledu na pohlaví a bez započítání nádorů kůže. U žen se vyskytuje na druhém místě po maligních nádorech prsu. U mužů se nachází rovněž na druhém místě, kde následuje rakovinu plic.

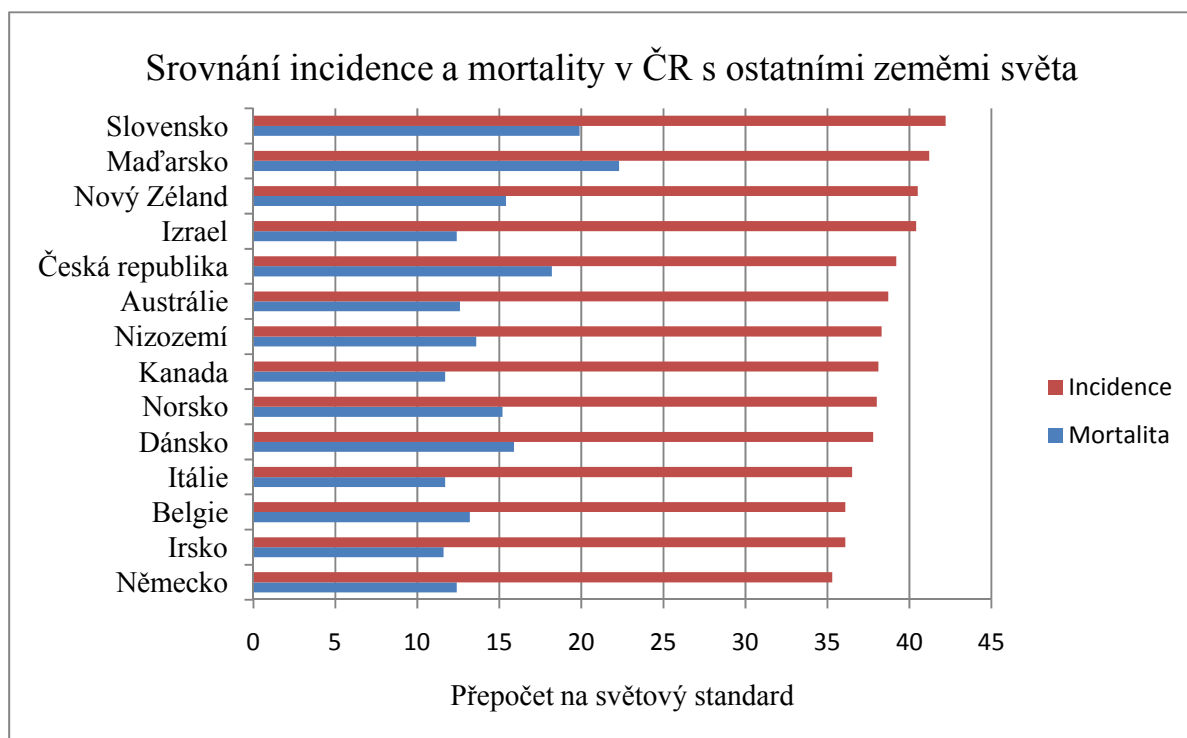
Incidence tohoto onemocnění dlouhodobě narůstá. Po delším období stagnace je patrný mírný pokles úmrtnosti. Stejně jako v minulých letech je pozorován vyšší výskyt KRK u mužů než u žen. Tyto vývojové tendence znázorňuje graf 3.1. Incidence KRK stoupá s věkem u obou pohlaví. Riziko se významně zvyšuje po 45. roce věku. Méně než čtvrtina případů KRK se vyskytuje u osob mladších 60 let. Důležitým faktorem je zachycení choroby v časných stádiích. Více než 50 % pacientů je však diagnostikováno již v pokročilém stádiu (III. a IV.) (www.svod.cz).



Graf 3.1 Časový vývoj incidence a mortality KRK v České republice (převzato z online databáze www.svod.cz.)

Česká republika se v incidenci i mortalitě KRK nachází na předních místech ve světě. Po přepočtení na světový standard rozložení věku Česká republika zaujímá páté místo. Na předních místech se drží společně se Slovenskem, Maďarskem, Novým

Zélandem a Izraelí, které se podle některých analýz nacházejí ještě před Českou republikou. Země s nejvyšší incidencí ve světě jsou zobrazeny v grafu 3.2. Nejnížší incidence v Evropě se nachází v Albánii a Řecku. Tyto výstupy vychází z epidemiologických dat projektu GLOBOCAN 2008 (<http://globocan.iarc.fr>).



Graf 3.2 Srovnání incidence a mortality v ČR s ostatními zeměmi světa. Zdroj dat: GLOBOCAN 2008 (<http://globocan.iarc.fr>)

Kromě geografické variability výskytu, je patrná i variabilita etnická. Afroameričané vykazují vyšší incidenci než ostatní populace ve Spojených státech amerických, zřejmě v důsledku mutace genů odpovědných za opravy chybného párování bází (Ashktorab et al., 2003). Židé pocházející ze střední a východní Evropy mají nejvyšší incidenci KRK mezi ostatními etnickými skupinami. Mutace I1307K genu *APC* zvyšující riziko KRK se vyskytuje u 6% těchto Židů (Laken et al., 1997).

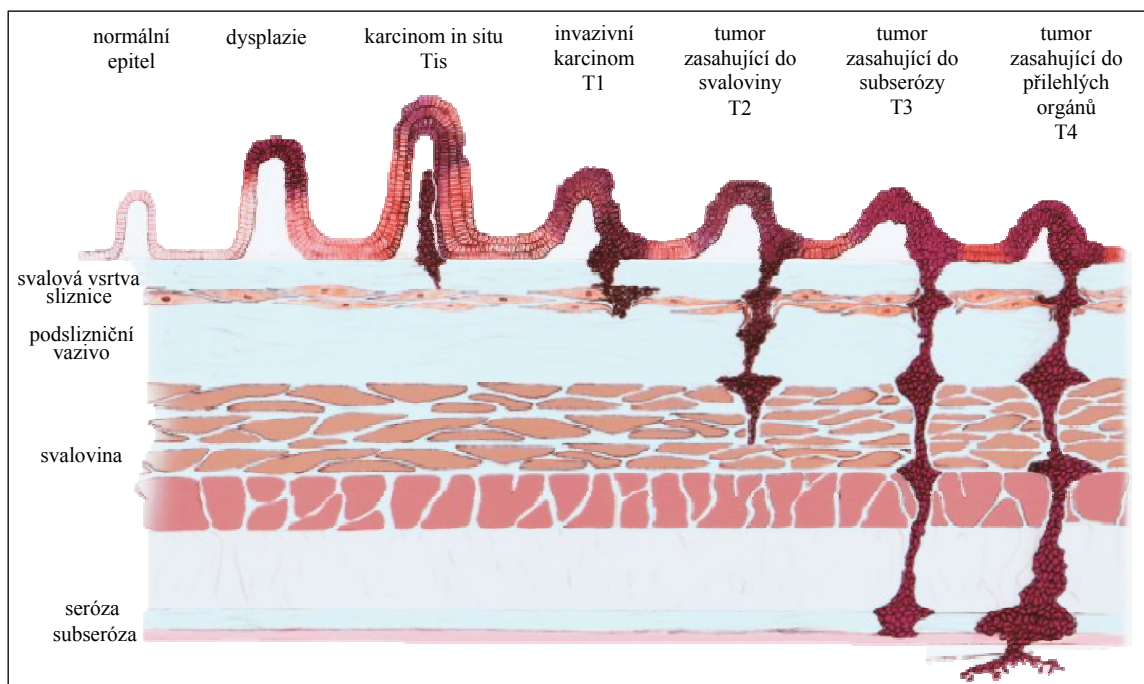
3.2 DEFINICE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

KRK je maligní nádor tlustého střeva, rektosigmoidea, konečníku a anu. V lokalizaci těchto malignit dochází k posunu výskytu karcinomu rekta ve prospěch karcinomu tlustého střeva. V případě tlustého střeva je patrná zvýšená incidence proximální části, tzn. pravé poloviny tlustého střeva (Obrand et Gordon, 1998).

Rectum je umístěno uvnitř pánve, k jejíž stěně těsně přiléhá. Tím je urychlen přestup nádorových buněk do malé pánve. Kostní ohraničení omezuje chirurgický výkon. Následkem je pak vyšší riziko recidivy a horší celková prognóza. Léčba karcinomu rekta se liší od léčby karcinomu tlustého střeva v technice chirurgického zákroku, radioterapii a rovněž v chemoterapii.

Většina KRK (až 95%) vzniká z adenomatózních polypů. K rozvoji v adenokarcinomy dochází v průběhu 10 let (Bond, 2000; Muto et al., 1975). Pouze malý podíl karcinomů vzniká *de novo* karcinogenezí bez přítomnosti tohoto stádia (Mueller et al., 2002). Adenomy vznikají ze žláznatých epitelových buněk. Většina adenomů zůstává benigní, pouze z části se vyvíjejí malignity. Riziko rozvoje rakoviny záleží na histologickém typu, velikosti a počtu adenomů. Polypy větší než 1 cm již nesou riziko rozvoje rakoviny. Polypy větší než 2 cm mají více než 40% riziko rozvoje malignity (Muto et al., 1975). Adenomy jsou klasifikovány jako tubulární, vilózní a tubulovilózní. Vilózní polypy vykazují největší maligní potenciál (O'Brien et al., 1990).

KRK vzniká jako následek akumulace genetických a epigenetických změn, které jsou doprovázeny změnami morfologickými. Výsledkem je přetváření normální epiteliální tkáně v invazivní adenokarcinomy. Adenokarcinomy se stávají invazivními, pokud maligní buňky proniknou svalovou vrstvou sliznice a dostanou se k podslizničnímu vazivu, které obsahuje bohatou síť lymfatického a krevního řečiště. Nádorové buňky se poté mohou šířit do lymfatických uzlin a metastázovat do ostatních orgánů (Fenoglio et al., 1974). Schéma rozvoje karcinomu je znázorněno v obr. 3.1.



Obr. 3.1 Přeměna normální epiteliální tkáň kolorekta v invazivní karcinom (Iyer et al., 2002).

3.3 KLASIFIKACE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Z hlediska volby léčby je důležitým prognostickým faktorem klasifikace nádoru odpovídající klinickému stádiu. Poskytuje přesný popis o rozsahu onemocnění. Nejstarším užívaným systémem je Dukesova klasifikace, která zaznamenala několik obměn (Astler & Coller, 1954; Turnbull et al., 1967). Principem tohoto systému je rozdělení pacientů podle stupně postižení na stadia A-D. V současnosti je však nejrozšířenější TNM staging, který umožňuje přesnější popis onemocnění. Podstatou TNM klasifikace je zhodnocení tří kategorií: T- stanovení rozsahu tumoru (invaze do okolních tkání), N - počet a lokalizace postižených uzlin, M - přítomnost vzdálených metastáz. Dalším prognostickým faktorem je grading, který hodnotí malignitu na základě stupně diferenciací nádorových buněk. Popis jednotlivých kategorií je uveden v příloze 1. Do klasifikace pomocí TNM však není zahrnuto hodnocení nádoru na základě molekulárních markerů (Greene et al., 2002). Rozdělení do jednotlivých stádií a míru pětiletého přežití uvádí tab. 3.1.

Tab. 3.1 Klinická stádia KRK podle TNM klasifikace s odpovídající mírou 5-letého přežití (Greene et al., 2002; O'Connell et al., 2004).

Stadium	TNM			Dukes	5-leté přežití
0	Tis	N0	M0		100%
I	T1, T2	N0	M0	A	93,2
IIA	T3	N0	M0	B	84,7
IIB	T4	N0	M0		72,2
IIIA	T1, T2	N1	M0	C	83,4
IIIB	T3, T4	N1	M0		64,1
IIIC	jakékoliv T	N2	M0		44,3
IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1	D	8,1

3.4 SCREENING

KRK je jedním z nejlépe léčitelných nádorů, pokud se zjistí v časném stádiu. Vzhledem k tomu, že většina nádorů kolorekta vzniká z benigních polypů po dobu několika let, jsou pro jejich odhalení důležité screeningové programy (Chen et al., 2003). Screening společně s dispenzarizací spadá do sekundární prevence a umožňuje včasný záchyt onemocnění. Screening je zaměřen na bezpříznakové jedince od 50 let věku. Existuje několik programů, které využívají následující metody (Zavoral et al., 2009a):

1. Testy vyšetřující stolici na přítomnost
 - a) okultního krvácení – guajakové, imunochemické
 - b) porušené nebo metylenované DNA

2. Endoskopická vyšetření
 - a) flexibilní sigmoideoskopie
 - b) kolonoskopie

3. Radiologická vyšetření
 - a) CT kolonografie
 - b) irigografie

Celostátní populační screening se v České republice provádí od roku 2000, kdy byl zahájen Národní program screeningu KRK v České republice. Základem je test na okultní krvácení ve stolici. Pacienti s pozitivním nálezem jsou indikováni ke kolonoskopii. Výsledky z let 2006 až 2008 vykazují meziroční nárůst kolonoskopií indikovaných pozitivním testem (Zavoral et al., 2009b). Přesto výsledky nejsou uspokojivé a to z důvodu nízké účasti osob z cílové skupiny, která nepřesáhla v žádném období 25%. Nedošlo tak k významnému posunu stádií, ve kterých je KRK diagnostikován. Na základě těchto zkušeností byl v roce 2009 navržen nový model screeningového programu, který mimo jiné nabízí i screeningovou kolonoskopii (s intervalem 10 let) od 55 let věku jako alternativu k testu na okultní krvácení prováděnou ve dvouletém intervalu (Seifert et al., 2010).

3.5 ETIOLOGIE

Podle původu vzniku je KRK obvykle rozlišován na sporadické, hereditární a familiární formy. Sporadická forma je nejčastější a tvoří 70% všech KRK. Méně než 10% zaujímají hereditární formy. Na rozhraní těchto dvou se vyskytují familiární formy, které mohou tvořit až 25% případů a uplatňují se zde jak faktory genetické, tak faktory zevního prostředí (Calvert & Frucht, 2002).

3.5.1 Hereditární formy

Hereditární formy umožňují chápání principů genetiky maligních chorob a tím přispívají k rozšíření poznatků týkajících se sporadických forem. Rovněž napomáhají poznání familiárních forem, které neodpovídají známým hereditárním formám. Získané informace pak mohou nacházet uplatnění jak v molekulární diagnostice, při stratifikaci rizika, tak i při cílené léčbě. Dědičné formy KRK můžeme rozdělit na polypózní a nepolypózní formy. Nejznámější vrozené formy KRK jsou Familiární adenomatózní polypóza (FAP) a Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC).

3.5.1.1 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantní onemocnění s prevalencí 1/5000 až 1/7500 v České republice (Kohoutová et al., 2006). Zodpovídá za méně než 1% všech nádorů kolorekta. Klasická forma FAP je charakterizována výskytem stovek až tisíců adenomatózních polypů v raném věku, které obvykle manifestují ve třetí

dekádě života. Penetrace této formy je téměř 100%. Až 25% případů je způsobeno mutací *de novo* (Bisgaard et al., 1994). Atenuovaná forma je charakteristická menším počtem adenomatózních polypů a pozdějším rozvojem (Lynch et al., 1995).

Příčinou familiární adenomatózní polypózy jsou mutace v tumorsupresorovém genu *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), který se nachází na 5. chromozomu. (Nishisho et al., 1991). Asi u 30% případů není mutace *APC* genu detekována (Van der Luijt et al., 1997). Tato skutečnost navrhuje účast jiného genu. Mutace vyskytující se v genu *MYH* na 1. chromozomu jsou spojeny s recesivní formou dědičnosti tohoto onemocnění. Gen *MYH* je zapojen do bazových excizních oprav DNA a jeho mutace jsou detekovány přibližně u 20% pacientů (Gismondi et al., 2004).

3.5.1.2 Hereditární nepolypózní karcinom – Lynchův syndrom

Hereditární nepolypózní karcinom, neboli Lynchův syndrom nemá charakteristický klinický fenotyp. Je rozpoznán na základě časného projevu a pozitivní rodinné anamnézy výskytu stejného karcinomu nebo jiných nádorů, které tento syndrom často doprovází, např. nádor endometria, ovaria, mozku, tenkého střeva, pankreatu a močových cest. Jako kritéria pro toto onemocnění slouží Amsterodamská kritéria I, II a kritéria Bethesda (Vasen et al., 1991; Vasen et al., 1999; Umar et al., 2004).

Lynchův syndrom tvoří 3-5% všech případů KRK (de la Chapelle, 2005). Tomuto onemocnění nepředchází mnohočetná polypóza, ačkoliv několik polypů se objevit může. K progresi dochází během krátké doby (1-2 roky). Syndrom bývá diagnostikován průměrně ve 44 letech (Lynch et al., 1993).

Hereditární nepolypózní karcinom je autozomálně dominantní onemocnění způsobené mutacemi v několika genech odpovědných za opravy chybného párování bazí. Mutace spojené se vznikem tohoto syndromu byly popsány u následujících genů: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* a *MSH6*, přičemž první dva bývají postiženy nejčastěji (Fishel et al., 1993; Papadopoulos et al., 1994; Wang et al., 1999; Akiyama et al., 1997). Mutované geny ztrácí reparační schopnost a vyskytují se replikační chyby. Mutace v těchto genech nesou 80% celoživotní riziko KRK (Vasen et al., 1996). Pro Hereditární nepolypózní karcinom je charakteristická mikrosatelitní nestabilita jako důsledek poškozených reparačních genů, která doprovází přibližně 85% případů (Aaltonen et al., 1994).

3.5.2 Familiární formy

Podíl familiárních případů není jednoznačný, neboť záleží na definici této formy KRK. Záleží na tom, zdali je charakterizována přítomností KRK u příbuzného prvního nebo až třetího stupně. Familiární výskyt KRK může být stejně tak podmíněn sdílenou predispozicí, jako být dílem náhody. Rovněž nádor považovaný za sporadický nemusí odrážet skutečnou situaci například z důvodu malého počtu členů rodiny. Neexistuje ostrá hranice mezi touto a sporadickou formou (de la Chapelle, 2004).

3.5.3 Sporadické formy

Rozvoj sporadického kolorektálního onemocnění vyžaduje několik somatických mutačních kroků v protoonkogenech a tumorsupresorových genech. Mutace onkogenu *K-ras* jsou detekovány u 40% případů (Andreyev et al., 1998). V rozvoji se mimo jiné dále uplatňuje onkogen *c-myc* (Erisman et al., 1985). Mutace genu *APC* hrají důležitou roli v časně fázi tumorigeneze a vyskytují se až u 80% sporadických KRK (Rowan et al., 2000). Tumorsupresorový gen *p53*, nejčastěji mutovaný gen u všech typů rakovin, se nachází pozměněný až u 70% KRK (Baker et al., 1990). Přibližně 15% sporadických KRK vykazuje mikrosatelitní nestabilitu (Gryfe et al., 2000; Kim et al., 1994).

Pro KRK byl navržen vícestupňový model karcinogeneze. Během časně fáze tvorby polypů dochází k mutacím genu *APC*, ve stadiu adenomatózy se připojuje mutace genu *K-ras* a malignizace polypů je provázena mutacemi genu *p53* a delecemi chromozomu 18q (Fearon & Vogelstein, 1990).

3.5.4. Enviromentální rizikové faktory

Rozvoj sporadických forem KRK významně ovlivňují faktory životního prostředí, mezi které se řadí složení stravy a životní styl. Zvýšené riziko rozvoje KRK je dáváno do souvislosti s konzumací alkoholu a kouřením (Giovannucci et al., 2001; Toriola et al., 2008). Naopak menší riziko odpovídá zvýšené tělesné aktivitě, zvýšenému příjmu vápníku, užívání hormonální substituční terapie a nesteroidních antirevmatik (Giovannucci et al., 1994; Nanda et al., 1999; White et al., 1996; Wu et al., 2002).

Konzumace stravy obsahující velké množství tuků a červeného masa byla mnohokrát spojována se zvýšeným rizikem rozvoje KRK, naopak strava bohatá na ovoce, zeleninu a vlákninu znamenala pokles tohoto rizika (Chao et al., 2005; Mathew et al., 2004; Van Duijnhoven et al., 2009). Ačkoliv, některé tyto vztahy neodpovídaly výsledkům

dalších studií a nebyly tak spolehlivě prokázány (Alexander et al., 2000; Michels et al., 2000; Williams et al., 2010).

Přesný mechanismus, kterým tyto faktory přispívají ke zvýšenému riziku, není znám. V případě dietních faktorů je předpokladem působení karcinogenních heterocyklických aminů, které vznikají během tepelné úpravy masa (Sugimura et al., 2004). Odlišná senzitivita k těmto látkám pak může být vysvětlována polymorfismy v genech kódujících enzymy, které jsou zahrnuty v metabolismu a detoxikaci (Shin & Kim, 2010).

Další studie jsou potřebné pro pochopení interakcí mezi geny a prostředím. Obecně lze říci, že častá konzumace určitých potravin a nápojů vede k nárůstu expozice genotoxickým látkám a může spouštět molekulární mechanismy důležité pro rozvoj karcinomu.

3.6. LÉČBA

Léčba KRK je multimodální a její součástí je jak chirurgický zákrok, chemoterapie tak radioterapie. Indikovaný typ léčby závisí na stadiu, v jakém se karcinom nachází. Základem léčby je chirurgická terapie. Cílem je kompletní odstranění primárního nádoru, regionálních lymfatických uzlin a odstranitelných vzdálených metastáz.

Radioterapie hraje důležitou roli v redukci rizika lokální recidivy nádorů rekta a v paliativní terapii výrazně symptomatických nebo rizikových metastatických ložisek. Preoperativní radioterapie je používána standardně v kombinaci s 5-fluorouracilem (5-FU) k léčbě karcinomu rekta (Bosset et al., 2006). Základní přehled léčebných postupů je uveden v následujícím schématu. (Zásady cytostatické léčby, 2011)

Stadium 0

- chirurgický zákrok, adjuvantní chemoterapie není indikována

Stadium I

- chirurgický zákrok, adjuvantní chemoterapie není indikována

Stadium II

- neoadjuvantní chemoterapie: rektum + radioterapie
- chirurgický zákrok
- adjuvantní chemoterapie: tlusté střevo
rektum + radioterapie

Stadium III

- neoadjuvantní chemoterapie: rektum + radioterapie
- chirurgický zákrok
- adjuvantní chemoterapie: tlusté střevo
rektum + radioterapie

Stadium IV + lokálně pokročilé inoperabilní onemocnění

- paliativní chemoterapie + biologická léčba, radioterapie

3.6.1 Chemoterapie

Více než 30 let je základem chemoterapie KRK podání 5-FU. Zavedení nových léků jako jsou oxaliplatin, irinotekan a perorální formy 5-FU (kapecitabin), rozšířilo možnosti léčby a vedlo k prodloužení doby přežití. 5-FU je pyrimidovým analogem a jeho primární funkcí je inhibice syntézy DNA. Oxaliplatin je derivátem platiny a tvoří adukty s DNA. Irinotekan, derivát kamptotecinu, působí jako inhibitor topoizomerázy I. Chemoterapie je indikována neoadjuvantně, adjuvantně a paliativně. Přehled častých kombinací cytostatik uvádí tab. 3.2.

Tab. 3.2 Přehled kombinací cytostatik používaných v léčbě KRK (Lipská & Visokai, 2009).

REŽIM	CYTOSTATIKUM
FOLFOX FLOX	5-FU leukovorin oxalipatina
FOLFIRI	5-FU irinotekan leukovorin
IROX	irinotekan oxalipatina
XELIRI	kapecitabin irinotekan
CAPOX	oxalilatina kapecitabin
De geamomt	kontinuální infuse 5-FU
FA-FU	5-FU kyselina folinová

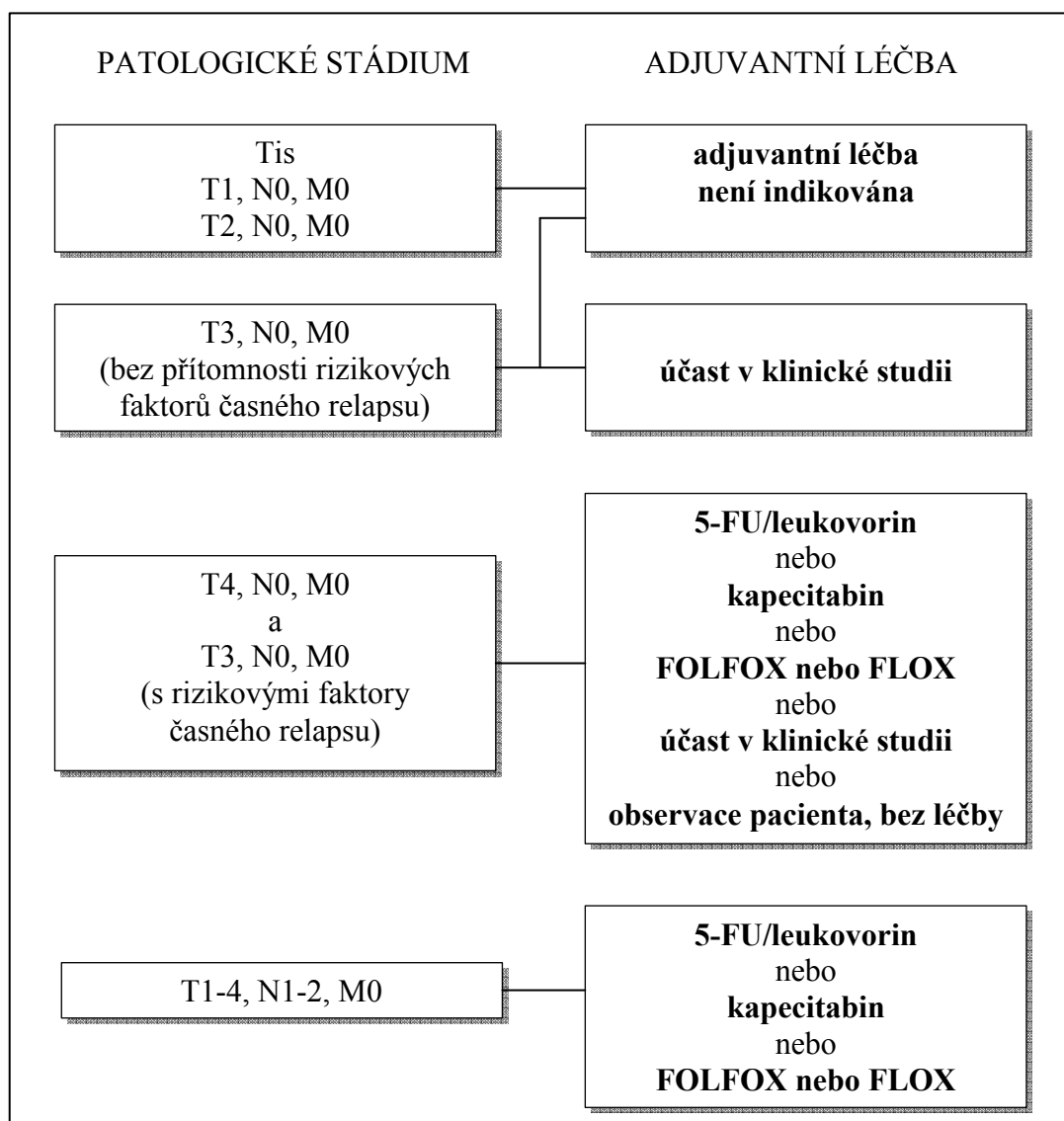
Neoadjuvantní chemoterapie

Neoadjuvantní chemoterapie je indikována předoperačně za účelem zmenšení nádoru před další léčbou. Kromě standardního užití neoadjuvantní chemoterapie společně s radioterapií u primárního karcinomu rekta je cílem této chemoterapie také zmenšení metastáz nádoru před jejich odstraněním. Nejlepších výsledků dosahovala chemoterapie obsahující oxaliplatinu. Mezi tyto kombinace se řadí FOLFOX (5-FU, LV a oxaliplatinu) a IROX (Oxaliplatinu a Irinotekan) (Delaunoit et al., 2005).

Adjuvantní chemoterapie

Adjuvantní chemoterapie následuje po úplném chirurgickém odstranění nádoru. Jejím cílem je zničení zbývajících nádorových buněk a zabránění návratu onemocnění. Adjuvantní chemoterapie je indikována u pacientů v klinickém stádiu III a II. Přičemž aplikace chemoterapie ve stádiu II zůstává sporná, neboť nebylo jednoznačně dokázáno významné zvýšení celkového přežití pacientů po této léčbě (Gill et al., 2004). Jiné studie však navrhuji chemoterapii u pacientů ve druhém stádiu s vysokými rizikovými faktory, jako jsou prorůstání nádoru přes stěnu střeva (T4) a perforace a obstrukce střeva (Benson et al., 2004). Základem adjuvantní chemoterapie je podání 5-FU s leukovorinem (LV), které snižuje mortalitu asi o 20% a procento relapsů o 35%, přičemž zvyšuje tříleté přežívání z 60% na 70% (Efficacy of adjuvant fluorouracil, 1995). Podobné výsledky

vykazuje i podání kapecitabinu. (Twelves et al., 2005). Dalším adjuvantním režimem je kombinace 5-FU/LV s oxaliplatinou, která zvyšuje rovněž procento přežívání, avšak za současného zvýšení toxicity (André et al., 2004). Schéma adjuvantní léčby je uvedeno v obr. 3.2.

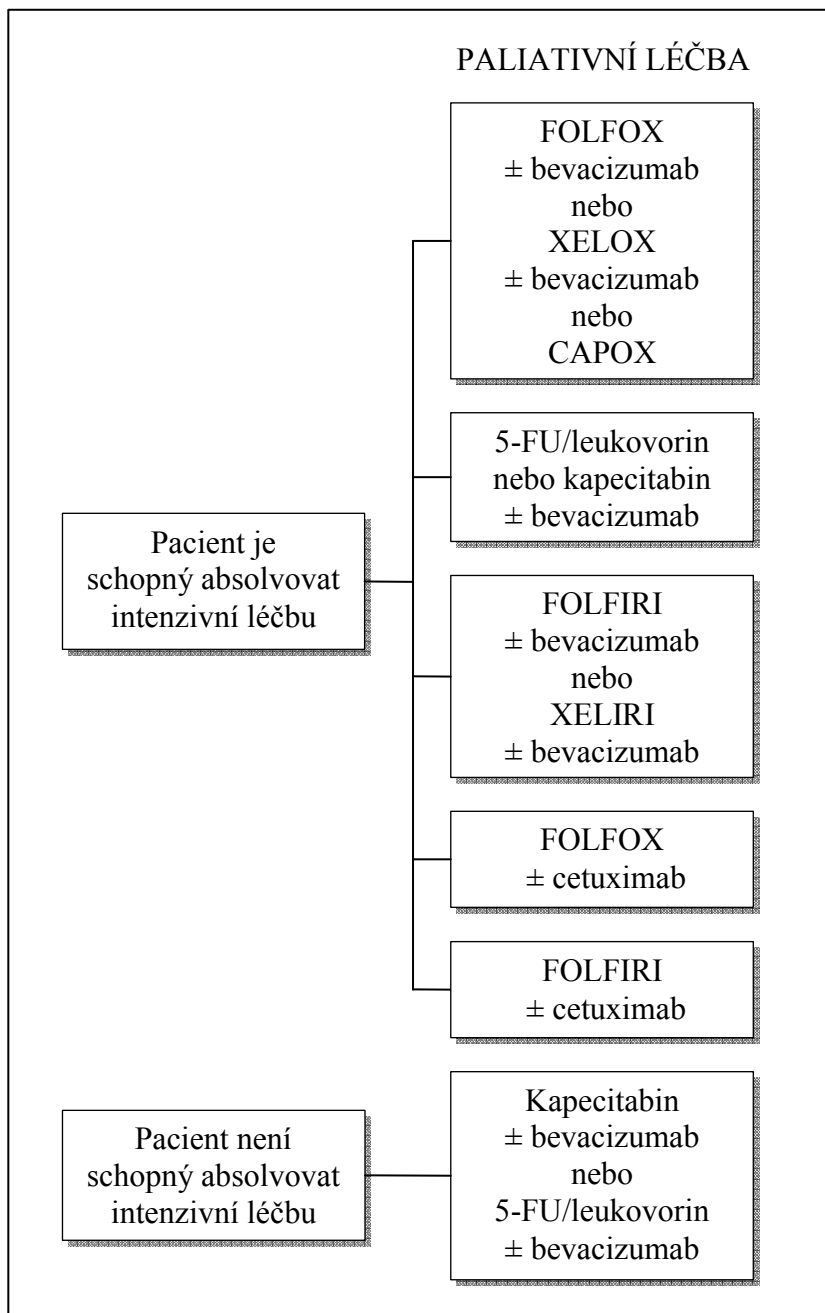


Obr. č. 3.2 Schéma systémové adjuvantní terapie pro pacienty s KRK (Zásady cytostatické léčby, 2011)

Paliativní léčba

V době diagnózy se vyskytují až u 30% pacientů vzdálené metastázy, přičemž operabilita s léčebným záměrem je možná pouze u 10-20% pacientů. U Dalších 30%

pacientů se vyvinou metastázy i po adjuvantní terapii (Clavien et al., 2007). Paliativní léčba je indikována u pacientů, u kterých již není možná kurativní léčba. Jejím cílem je prodloužení a zlepšení kvality života, ke kterému vede podávání kombinací léků 5-FU s leukovorinem a oxaliplatinou (FOLFOX) (de Gramont et al., 2000) nebo irinotekanem (FOLFIRI) (Douillard et al., 2000). V paliativní léčbě se v současné době užívají kombinace s biologickými léky. Nejčastěji používané kombinace chemoterapie v paliativní léčbě jsou uvedeny v obr. 3.3.



Obr. 3.3 Schéma paliativní chemoterapie pro pacienty s KRK (Zásady cytostatické, 2011)

3.6.2 Biologická léčba

Zavedení biologických léků přispělo ke zlepšení prognózy pacientů s metastatickým KRK. Chemoterapie je tak spolu s biologickou léčbou integrální součástí komplexní terapie relapsu KRK. V první linii paliativní léčby jsou používány režimy s bevacizumabem nebo cetuximabem. V druhé a vyšších liniích je možné použít režimy s bevacizumabem, cetuximabem nebo panitumumabem (Zásady cytostatické léčby, 2011).

Biologickým lékem první volby u metastatického KRK je bevacizumab. Bevacizumab je monoklonální protilátka proti vaskulárnímu endotelovému růstovému faktoru, která vede k inhibici angiogeneze. V monoterapii má tento lék minimální protinádorový účinek. V kombinovaných režimech však zvyšuje účinek klasických cytostatik. Předpokladem je zlepšení pronikání léku do tumoru v důsledku permeabilizace cév nádoru nebo snížení intersticiálního tlaku v nádoru (Lipská & Visokai, 2009). Existuje několik studií potvrzujících lepší terapeutický účinek, který vede k delšímu přežití pacientů s pokročilým KRK (Giantonio et al., 2007).

Cetuximab působí jako inhibitor receptoru pro epidermální růstový faktor, který je exprimován u různých malignit. Inhibice tohoto faktoru vede k přerušení růstového signálu a apoptóze nádorové buňky (Lipská & Visokai, 2009). Cetuximab je podáván jak v kombinaci s cytostatiky tak v monoterapii (Cunningham et al., 2004).

Panitumumab je dalším inhibitorem epidermálního růstového faktoru. Panitumab je indikován v monoterapii u pacientů s metastazujícím KRK vykazující expresi nemutovaného onkogenu *K-ras* (Amado et al., 2008).

3.7 FARMAKOGENOMIKA

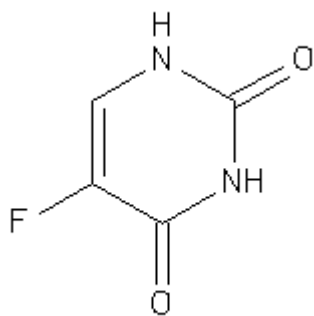
Ačkoliv adjuvantní léčba a léčba metastatického KRK přinesla významné zlepšení přežití, výsledky přesto nejsou uspokojivé. Navzdory adjuvantní chemoterapii dochází k časté recidivě, která je zaznamenána až u 30-40% pacientů ve stádiu III (André et al., 2004; Gill et al., 2004) Ve stádiu II přibližně u 20% pacientů (Efficacy of adjuvant fluorouracil, 1999). Při léčbě metastatického KRK odpovídá na léčbu stále pouze 40-50% pacientů (Giacchetti et al., 2000). Hlavním faktorem nedostatečné účinnosti léčby je rezistence k léku. Dalším častým problémem je výskyt toxicity, která může vést k ukončení, přerušení nebo změně léčby. Interindividuální variabilita v odpovědích na konkrétní terapii a v rozvoji toxických projevů může být podmíněna genetickými alteracemi.

Bylo identifikováno několik prognostických a prediktivních markerů, mezi něž patří onkogeny, tumor-supresorové geny, geny zapojené do angiogeneze, apoptotických drah a buněčné proliferace a geny kódující cíle farmak. Prognostické markery poskytují informace o vývoji onemocnění nezávislé na aplikované léčbě. Prediktivními markery jsou ty, které pomáhají stanovit účinnost léků užívaných při léčbě KRK. Velká pozornost je tak věnována enzymům zapojených do metabolismu a vychytávání cytostatik, transportérům a cílům cytostatik a obraným nástrojům jako jsou enzymy oprav DNA (Walther et al., 2009). Význam genetických polymorfismů pro individualizovanou terapii neustále narůstá. Jejich vztahy byly u KRK zatím řešeny jen okrajově. Profilování genové exprese nám umožňuje lepší pochopení cest zahrnutých do metabolismu léků.

Alterace genové exprese, exprese proteinů a polymorfní varianty genů mohou sloužit jako ukazatelé klinické odpovědi na léčbu. Integrace prognostických a prediktivních markerů do klinické praxe by pak umožnila individualizaci léčby, maximalizaci účinků terapie a minimalizaci toxických projevů. Pro cytostatikum 5-FU bylo navrženo několik molekulárních markerů. Žádný však nebyl dodnes jednoznačně prokázán.

3.8 5-FLUOROURACIL (5-FU)

5-FU je důležitým cytostatikem v léčbě u mnoha typů solidních nádorů, hlavně gastrointestinálního traktu. 5-FU je analogem uracilu s atomem fluoru v pozici C5. Chemická struktura tohoto cytostatika je zobrazena v obr. č. 3.4. Pro svůj účinek musí být přeměněn na aktivní metabolity, které působí na několika úrovních. Hlavní cestou je zablokování tvorby DNA zprostředkované inhibicí klíčového enzymu pro syntézu DNA. Vzhledem ke své struktuře dochází rovněž k začleňování aktivních metabolitů přímo do DNA a RNA.



Obr. č. 3.4 Chemická struktura 5-fluorouracilu (www.pharmgkb.com)

K odpovědi na léčbu u pokročilého KRK dochází při samotném použití 5-FU jen z 15%. Při použití dalších chemoterapeutických léků (Oxaliplatin, Irinotecan) dochází ke zvýšení odpovědi na 50% (Giacchetti et al., 2000).

5-FU je podáván intravenózně bolusově nebo kontinuálně. Kontinuální podávání potencuje účinek, neboť 5FU je velmi rychle odbouráván v játrech (de Gramont et al., 1997). Rovněž zvyšuje pravděpodobnost výskytu 5-FU v S-fázi, kdy je tento lék nejúčinnější (Yamane et al., 1999).

3.8.1 Prekurzory 5-FU

Kapecitabin je perorální formou 5-FU. K jeho absorpci dochází v gastrointestinálním traktu v nezměněné podobě. Následně je metabolizován v tříkrokové reakci vedoucí až k 5-FU. První dva kroky probíhají v játrech, kde je kapecitabin nejdříve přeměněn karboxylesterázou na 5'-deoxy-5-fluorocytidin (5'DFCR), který je následně konvertován na 5'-deoxy-5-fluorouridin (5'DFUR) cytidindeaminázou (Miwa et al., 1998). Poslední krok přeměny zprostředkovaný enzymem tymidin fosforylázou se odehrává v tumoru. Ke své přednostní aktivaci v tumorech využívá vysokých koncentrací tohoto enzymu v nádorové tkáni. Tato cesta snižuje expozici zdravé tkáně k toxickému 5-FU (Schüller et al., 2000). Účinky kapecitabinu jsou srovnatelné s 5-FU. Kapecitabin vykazuje vyšší procento léčebných odpovědí, stejný čas do progresu a celkové přežívání jako intravenózní 5-FU (Van Cutsem et al., 2004).

UFT je perorální cytostatikum, které obsahuje kombinaci uracilu s tegafurem (1:4). Tegafur je prekurzorem 5-FU, který je pomalu metabolizován v játrech enzymem CYP2A6 (Ikeda et al., 2000). Uracil přispívá k vyšším hladinám 5-FU v plazmě i v tumoru tím, že

kompetitivně blokuje jeho degradaci inhibicí DPYD, primárního katabolického enzymu pro 5-FU (Hoff et al., 1999). Účinek UFT je ekvivalentní s infusním 5-FU jak v případě odpovědi tak toxicity (Lembersky et al., 2006).

3.8.2 Mechanismus účinku 5-FU

5-FU působí na několika úrovních. Hlavním mechanismem účinku je inhibice tymidylát syntázy (TYMS) pomocí fluorodeoxyuridin monophosphátu (FdUMP) za vzniku velice stabilního komplexu složeného z TS, FdUMP a kofaktoru 5,10-metylentetrahydrofolátu (CH₂THF) (Carreras & Santi, 1995). K zesílení účinku inhibice může docházet při současném podání leukovironu (LV), jež je prekurzorem CH₂THF (Peters et al., 1994). TYMS je nezbytným enzymem při syntéze DNA. TYMS katalyzuje metylaci, během níž je deoxyuridin monofosfát konvertován na deoxytymidin monofosfát (Roberts et al., 2006). Snížení hladin deoxytymidin monofosfátu vede k vyčerpání deoxytymidin trifosfátu nutného pro syntézu a opravu DNA. Nerovnováha v nukleotidech tak vyústí v letální poškození DNA (Houghton et al., 1995).

5-FU přispívá ke zvýšené cytotoxicitě inkorporací do DNA. Inhibice TS vede k akumulaci deoxyuridin triphosphátu, který stejně jako metabolický produkt FdUTP může být začleněn do DNA. Inkorporace je následována chybnou excizní opravou uracil-DNA-glykosylázou, tvorba zlomů a spuštěním apoptózy (Dusseau et al., 2001).

5-FU může rovněž působit na úrovni RNA, kde se uplatňuje metabolit FUTP. Cytotoxicita je zde zprostředkována inkorporací do snRNA, která má za následek narušení sestavení a aktivity snRNA komplexu, což způsobuje inhibici sestřihu pre-mRNA (Lenz et al., 1994). 5-FU dále narušuje post-transkripční úpravy tRNA (Santi & Hardy, 1987) a inhibuje tvorbu rRNA (Ghoshal & Jacob, 1994).

3.8.2.1 Tymidylát syntetáza (EC 2.1.1.45)

Aktivita TS ovlivňuje účinnost 5-FU. Vyšší expresivita TYMS byla zaznamenána v mnoha typech nádorové tkáně, mezi které se řadí nádor střeva, prsu a žaludku (Fukushima et al., 2003). Tumory s vysokou aktivitou TYMS vykazují zvýšenou rezistenci, naopak s nízkou aktivitou souvisí i zvýšená vnímavost na léčbu (Salonga et al., 2000). Zvýšená exprese je spojena se zhoršenou odpovědí jak u adjuvantní, tak u metastatické paliativní léčby (Paradiso et al., 2000).

Mnoho studií naznačuje, že za tyto změny jsou odpovědné polymorfismy genu *TYMS*, který se nachází na chromozomu 18. Gen kódující *TYMS* obsahuje tandemové repetice dlouhé 28 bp nacházející se v 5'UTR promotorové enhancerové oblasti. Nejběžnějšími alelami v populaci jsou alely obsahující 2 (2R) nebo 3 repetice (3R) (Marsh et al., 1999). Počty repetic byly sledovány v souvislosti s mírou exprese. Alela 3R vedla ke zvýšené expresi *TYMS* (Pullarkat et al., 2001). V případě této alely byla rovněž pozorována zvýšená translace (Kawakami et al., 2001). Studie metastatických KRK pacientů vedla k zjištění, že jedinci s 2R/2R genotypem mají nižší hodnoty mRNA než jedinci s genotypem 2R/3R nebo 3R/3R a rovněž lépe odpovídají na léčbu (Pullarkat et al., 2001). V rozporu s těmito výsledky jsou závěry jiné studie metastatických pacientů s KRK, kde byla zjištěna lepší odpověď na léčbu naopak u genotypu 3R/3R (Jakobsen et al., 2005). Vysvětlením může být existence dalších typů polymorfismů genu *TYMS*.

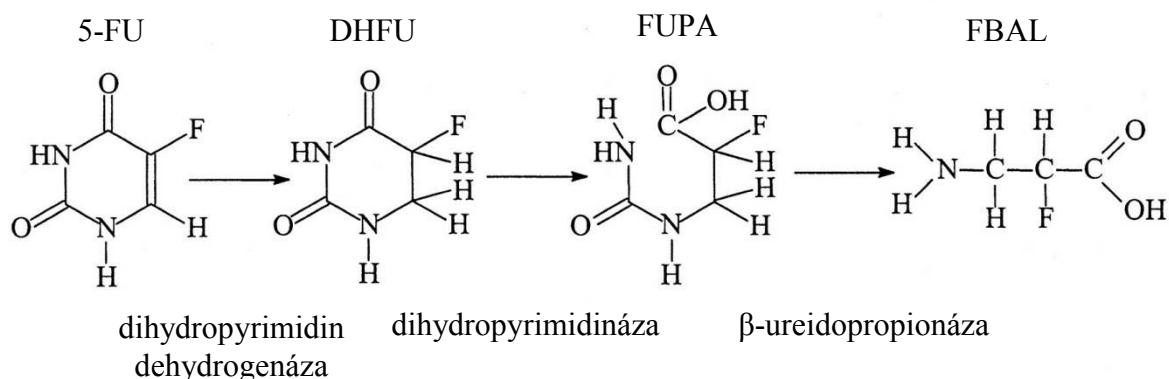
Důležitým polymorfismem se zdá být rovněž záměna G/C nacházející se v místě 12. nukleotidu druhé repetice u 3R alel. Alela 3RC vede k redukované transkripční aktivitě v důsledku přerušení promotorové oblasti vázající transkripční faktory (Mandola et al., 2003). Genotyp 3G (2R/3G, 3C/3G, 3G/3G) koreluje s vyššími hodnotami mRNA, zatímco 2R/2R, 2R/3C a 3C/3C vykazují nižší expresi (Kawakami et al., 2003). Genotyp 3G byl u kolorektálních pacientů sledován v souvislosti s horší odpovědí a kratší dobou přežití při léčbě 5-FU (Marcuello et al., 2004).

Zájem je rovněž věnován dalšímu polymorfismu nacházejícímu se v 3'UTR oblasti, kde se vyskytuje delece nebo inserce 6 basí v pozici 1494. Deleční polymorfismus vede ke snížení exprese *TYMS* u nádoru kolorekta (Mandola et al., 2004). V případě delečního polymorfismu bylo pozorováno významně delší přežití v porovnání s inserčním polymorfismem (Dotor et al., 2006).

3.8.2 Metabolismus 5-FU

Metabolismus 5-FU zahrnuje jak anabolickou tak katabolickou dráhu. Prvním krokem v cestě katabolismu je aktivita DPYD. Přes 80% 5-FU je tímto enzymem degradováno v játrech za vzniku inaktivní formy 5,6-dihydrofluorouracilu (DHFU), z kterého rozštěpením pyrimidinového kruhu vzniká 5-fluoroureido propionová kyselina (FUPA) za katalýzy dihydropyrimidinázou (DPYS). V třetím kroku vzniká aktivitou enzymu β -ureidopropionázy fluoro- β -alanin (FBAL) za současného uvolnění NH_3 a CO_2 .

Takto degradovaná forma 5-FU je následně vyloučena. (Heggie et al., 1987). Přehled dráhy odbourávání 5-FU je znázorněn v obr. 3.5.



Obr. 3.5 Dráha odbourávání 5-FU (Bocci et al., 2000)

Existuje několik cest, které vedou k aktivním metabolitům FUTP, FdUMP a FdUTP. Hlavní mechanismus aktivace zahrnuje přeměnu na fluorouridinmonofosfát (FUMP) a to dvěma možnými dráhami. První přímou variantou je přenos ribóza fosfátu z fosforibozyl pyrofosfátu (PRPP), který je katalyzován enzymem fosforibozyltransferázou (OPRT). Druhou cestou je nepřímá aktivace, kdy je v prvním kroku přenesena ribóza pomocí uridin fosforylázy (UPP) za vzniku 5-fluorouridinu (FUR), který je poté fosforylován uridin cytidin kinázou (UCK) za vzniku FUMP.

Následnou fosforylací FUMP vzniká fluorouridin difosfát (FUDP), který může být dále fosforylací přeměněn na aktivní metabolit fluorouridin trifosfát (FUTP) nebo konvertován na fluorodeoxyuridin difosfát (FdUDP) ribonukleotid reduktázou (RR). FdUDP může být fosforylován nebo defosforylován za vzniku aktivních metabolitů FdUTP nebo FdUMP.

Alternativní cesta vzniku FdUMP vede přes přeměnu 5-FU na fluorodeoxyuridine (FUDR). Tato reakce je katalyzována tymidin fosforyláзой (TYMP). Vzniklý produkt je následně fosforylován tymidin kinázou (TK) za vzniku FdUMP (Malet-Martino et al., 2002). Popsané cesty metabolismu jsou znázorněny v obr. č. 3.6.

Tento enzym je kódován genem *DPYD* obsahujícím 23 exonů s lokalizací na chromozomu 1p22. Nejčastějším polymorfismem *DPYD* je transice G/A v exonu 14, která vede ke špatnému sestřihu a k tvorbě zkráceného proteinu se sníženou aktivitou (Wei et al., 1996). Homozygotní varianta vede ke kompletní ztrátě aktivity tohoto enzymu (Van Kuilenburg et al., 2001). Částečná nebo kompletní ztráta aktivity tohoto enzymu se vyskytuje u 3-5% populace (Lu et al., 1993).

Aktivita 5-FU je zaznamenána v mnoha typech tkání, přičemž nejvyšší aktivita tohoto enzymu se nachází v játrech a periferních krevních mononukleárních buňkách (Ho et al., 1986; McMurrugh & McLeod, 1996). Vysoká variabilita aktivity tohoto enzymu se vyskytuje v nádorových tkáních (McLeod et al., 1998). Stanovení hladin exprese *DPYD* tak může být důležitým faktorem v odpovědi na léčbu na bázi 5-FU.

Zvýšené intratumorální hladiny mRNA korelují se zvýšenou rezistencí. Pacienti s KRK se sníženou hladinou *DPYD* vykazují lepší odpověď na léčbu a delší dobu přežití (Salonga et al., 2000; Soong et al., 2008). Nízké hladiny nebo absence jsou naopak spojovány s akumulací aktivních metabolitů 5-FU ve zdravé tkáni, která souvisí s těžkou toxicitou u pacientů s KRK (Van Kuilenburg et al., 2002). Mezi časté polymorfismy genu *DPYD* odpovědné za zvýšení toxicity patří např. IVS14+1G/A, 2846A/T, 1679T/G a 85T/C (Morel et al., 2006) a 464T/A (Morel et al., 2007).

3.8.2.2 Dihydropyrimidináza (EC 3.5.2.2)

Změny v genu *DPYD* působícího v prvním kroku katabolismu 5-FU vysvětlují toxicitu jen u malého procenta pacientů. Proto jsme se ve studii zaměřili na další enzymy účastnící se katabolismu 5-FU, které by mohly být zodpovědné za jeho zvýšenou toxicitu. Dihydropyrimidináza působí v druhém kroku katabolické dráhy pyrimidinů, kde působí štěpení pyrimidinového kruhu a v dráze 5-FU katalyzuje přeměnu dihydrofluorouracilu (DHFU) na kyselinu 5-fluoroureido propionovou (FUPA). Dihydropyrimidináza je kódována genem lokalizovaném na chromosomu 8q22 (Hamajima et al., 1996).

Vysoká aktivita tohoto enzymu je pozorována v ledvinách a játrech (van Kuilenburg et al., 2006). Rovněž byla vysoká aktivita pozorována u solidních nádorů na modelu lidských nádorových štěpů (Naguib et al., 1985).

Ačkoliv existují jen omezená data ohledně vlivu genetických změn *DPYS* na léčbu 5-FU, studie ukazují, že některé mutace v genu mohou mít za následek nedostatečnou aktivitu enzymu a mohou tak přispívat ke zvýšené těžké toxicitě 5-FU. Mezi takovéto

nalezené mutace se řadí např. mutace v nekódující oblasti -1C/T a IVS1-58T/C. (Fidlerova et al., 2010; van Kuilenburg et al., 2003). Výskyt deficientního enzymu DPYD vykazuje v populaci incidenci 1/10 000 osob (Sumi et al., 1998).

3.8.2.3 β -ureidopropionáza (EC 3.5.1.6)

Enzym β -ureidopropionáza je kódována genem *UPBI* nacházejícím se na chromozomu 22q11.2 (Vreken et al., 1999). K expresi genu *UPBI* dochází pouze v játrech a ledvinách (Sakamoto et al., 2001 in van Kuilenburg et al., 2004). Enzym β -ureidopropionáza katalyzuje poslední krok v degradaci pyrimidinů. V dráze katabolismu 5-FU, působí při přeměně fluoro-beta-ureidopropionátu na fluoro- β -alanin, který je následně vyloučen. V souvislosti s tímto enzymem se rovněž uvažuje o možném účinku na léčbu 5-FU. Snížená aktivita enzymu *UPBI* by mohla rovněž vysvětlovat určité procento zvýšené toxicity při léčbě 5-FU (Thomas et al., 2008). S redukovanou aktivitou tohoto enzymu je spojováno několik mutací. Řadí se mezi ně dvě „splice site“ mutace *IVS1-2A>G*, *IVS8-1G>A* a jedna „missense“ mutace *A85E* (van Kuilenburg et al., 2004.)

3.8.2.4 Tymidin fosforyláza (EC 2.4.2.4)

Gen pro tento enzym se nachází na chromozomu 22q13 (Stenman et al., 1992). *TYMP* se vyskytuje jak v cytosolu tak v jádře (Fox et al., 1995). Funkcí *TYMP* je katalýza reverzibilní přeměny tymidinu na tymin a 2-deoxyribóza-1-fosfát (Iltzsch et al., 1985). V případě 5-FU působí jako katalyzátor jeho přeměny na FUDR v prvním kroku dráhy metabolické aktivace. Tento enzym působí rovněž v aktivační dráze kapecitabinu, kde v posledním kroku fosforyluje 5'-deoxy-5-fluorouridine za vzniku 5-FU (Ishii et al., 2001). Enzym *TYMP* má rovněž angiogenní účinek, který ovlivňuje růst nádoru (Takebayashi et al., 1996a). Mimo to působí také antiapopticky a může tak stimulovat růst nádoru jiným mechanismem než je angiogeneze (Matsuura et al., 1999).

Aktivita *TYMP* je zaznamenána v mnoha typech zdravé tkáně, přičemž vysoké hladiny vykazují makrofágy (Fox et al., 1995). Vysoké exprese jsou nalézány také v mnoha typech nádorové tkáně např. v karcinomu prsu, pankreatu, jícnu, žaludku a plic (Mori et al., 2000; Takebayashi et al., 1996b; Yoshikawa et al., 1999). Vysoké hodnoty byly nalezeny rovněž i v případě KRK (Takebayashi et al., 1996b). *TYMP* exprimovaný v tumor asociovaných makrofázích (TAM) rovněž může hrát důležitou roli v růstu a invazivnosti karcinomu (Ono et al., 2008).

Ve velké většině případů jsou zvýšené hladiny exprese *TYMP* v karcinomu kolorekta spojovány s horší prognózou (Gustavsson et al., 2009; Takebayashi et al., 1996a). Existují však rovněž studie, které dosáhly opačných výsledků, kdy se zvýšenou hladinou korelovala lepší prognóza (Saito et al., 2000). Důvodem zjištěných nesrovnalostí mohou být různé typy histologické tkáně, počty pacientů a použité metody (Morita et al., 2001).

V případě hodnocení odpovědi na léčbu kapecitabinem, byla prokázána úloha *TYMP* jako prediktivního markeru. Vysoké exprese u metastatických pacientů s KRK korelovaly s delším přežitím (Meropol et al., 2006). Zvýšená intratumorální aktivita *TYMP* umožňuje přeměnu kapecitabinu na aktivní metabolit v nádorových buňkách a minimalizuje toxické účinky ve zdravé tkáni (Schüller et al., 2000).

Ačkoliv *in vitro* studie KRK potvrzuje zvýšení senzitivity 5-FU při vysoké expresi *TYMP* (Evrard et al., 1999), výsledky zjišťované *in vivo* se liší. Zvýšené exprese nekorelovaly s vyšší senzitivitou 5-FU, ale byla zde pozorována zvýšená rezistence. *TYMP* tak působí ve dvojí roli. Na jedné straně působí angiogeneticky při stimulaci růstu nádoru a chrání buňku před apoptózou, na straně druhé je zapojen do aktivační dráhy 5-fluorouracilu a jeho prekurzorů. *TYMP* jako prediktivní faktor bývá často hodnocen spolu s *DPYD* a *TS* (Metzger et al., 1998; Salonga et al., 2000; Soong et al., 2008).

3.8.2.5 Tymidin kináza (EC 2.7.1.21)

Gen *TK1* kódující cytosolický enzym tymidin kinázu 1 se nachází na chromosomu 17q23-25 (Fain et al., 1991). TK1 je důležitým enzymem v alternativní dráze syntézy pyrimidinů, kde katalyzuje fosforylaci tymidinu na tymidin monofosfát, který je poté začleněn do DNA. V metabolismu 5-FU se účastní fosforylace vedoucí k přeměně FUDR na FdUMP, který následně působí inhibicí TYMS (Fanciullino et al., 2006).

Aktivita tohoto enzymu je regulována buněčným cyklem podle syntézy DNA. Maximální aktivita je charakteristická pro syntetickou fázi S a nejnižší pro buňky v klidové fázi G₀ (Ke et al., 2004). Nejvyšší hladina je tak zaznamenána v dělicích se a tedy i maligních buňkách (Chen et al., 2010). Zvýšená aktivita je rovněž zaznamenána i v případě nádorové tkáně kolorekta v porovnání s tkání normální (Denton et al., 1982; Luccioni et al., 1994). Podobné výsledky byly zjištěny rovněž v další studii KRK, která mimo jiné hodnotila odpověď na léčbu 5-FU. V této studii ale nebyla úloha TK1 v predikci odpovědi prokázána. Pokud však byl do analýzy zařazen další enzym TYMS, společné

zhodnocení poukázalo na možnost přispění aktivity TK k predikci odpovědi (Kralovánszky et al., 2002). Výsledky *in vitro* studie ukázaly, že zvýšená exprese v tumoru vede ke zvýšené rezistenci k 5-FU. Vyšší exprese v této studii neodpovídají zvýšené inhibici TYMS a TK1 tak pravděpodobně není limitujícím krokem v produkci aktivního metabolitu FdUMP (Fanciullino et al., 2006).

3.8.1.6 Uridin monofosfát syntetáza

Uridin monofosfát syntetáza (UMPS) je bifunkční enzym, který katalyzuje poslední dva kroky v *de novo* syntéze pyrimidinů. Na N-terminálním konci se nachází doména orotát-fosforybozyl transferáza (OPRT, EC 2.4.2.10), která přeměňuje kyselinu orotovou na orotidylmonofosfát. Druhá enzymatická aktivita je realizována na C-konci pomocí orotidin-5'-fosfát dekarboxylázy (EC 4.1.1.23), která dekarboxyluje orotidylmonofosfát na uridinmonofosfát (Suttle et al., 1988). Gen kódující UMPS se nachází na chromozomu 3q13 (Qumsiyeh et al., 1989).

Enzym OPRT se nachází v jedné ze tří možných fosforylačních cest vedoucích k aktivnímu metabolitu 5-FU. Fosforylace 5-FU pomocí enzymu OPRT v přítomnosti fosforybozyl pyrofosfátu vede ke vzniku FUMP, který následně podléhá dalším přeměnám (Peters et al., 1991). Vzhledem k této skutečnosti, jsou sledovány možné účinky aktivity OPRT na vnímavost k léku 5-FU. Zvýšené hladiny enzymu OPRT v tumorech u pacientů s KRK léčených 5-FU korelovaly s lepší prognózou (Ochiai et al., 2006).

V rámci genu *UMPS* se vyskytuje několik polymorfismů. Jedním z nich je i 638G/C. Tento polymorfismus bývá spojován se zvýšenou expresí a se zvýšenou toxicitou během léčby 5-FU u KRK pacientů (Ichikawa et al., 2006). Tento polymorfismus byl zaznamenán jako prediktivní faktor toxicity rovněž v další studii KRK pacientů při indikované léčbě UFT+ LV (Tsunoda et al., 2011).

3.8.1.7 Fosforibozyl pyrofosfát amidotransferáza (EC 2.4.2.14)

Fosforibozyl pyrofosfát amidotransferáza je enzym kódovaný genem *PPAT* nacházejícím se na chromosomu 4q12 (Brayton et al., 1994). PPAT katalyzuje první krok v *de novo* syntéze purinů. Katalyzuje přenos aminoskupiny glutaminu na fosforybozyl pyrofosfátu za vzniku fosforibosylaminu, pyrofosfátu a glutamátu. Tento enzym byl studován na modelu T-lymfocytů jako cíl metotrexát. Metotrexát je antifolátový inhibitor dihydrofolát reduktázy. Ve studii byl pozorován i jeho další účinek, kterým je inhibice

enzymu PPAT. Ta vedla ke zvýšení hladin fosforybozyl pyrofosfátu, který je kofaktorem důležitým při přeměně 5-FU na FUMP (Fairbanks et al., 1999). Zvýšená dostupnost fosforybozyl pyrofosfátu měla za následek zvýšení hladin metabolitu FUMP a buněčné smrti (Cadman et al., 1981). Tento účinek byl potvrzen i klinickou studií, kdy pacienti při podání 5-FU v kombinaci s metrotexátem vykazovali lepší odpověď (Meta-analysis of randomized trials, 1994).

3.8.1.8 Ribonukleotid reductáza (EC 1.17.4.1)

Enzym ribonukleotid reductáza je složen ze dvou podjednotek (RRM1 a RRM2). Tato reductáza katalyzuje *de novo* syntézu deoxyribonukleotidů nezbytných pro syntézu DNA (Eriksson & Martin, 1981). Gen kódující RRM1 se nachází na chromosomu 11p15.5 (Pitterle et al., 1999). RRM2 je kódován genem s lokalizací na chromosomu 2p25-p24 (Zhou et al., 2001).

V metabolismu 5-FU je ribonukleotid reductáza odpovědná za přeměnu FUDP na FdUDP, který je následně přeměněn na FdUTP a inkorporován do DNA. Snížená aktivita tohoto enzymu byla pozorována u lidských nádorových kolorektálních štěpů rezistentních vůči 5-FU. Žádné významné rozdíly v expresi genů *RRM1* a *RRM2* však mezi senzitivními a rezistentními modely nebyly nalezeny. Chybějící rozdíly v expresi byly vysvětlovány možnou postranskripční regulací (Fukushima et al., 2001). Podobných závěrů bylo dosaženo i u pacientů s KRK, kde snížená aktivita ribonukleotid reductázy korelovala se zvýšenou rezistencí k léčbě 5-FU (Kubota et al., 2002). Zvýšená exprese *RRM2*, nikoliv však *RRM1*, byla zjištěna u nádorové tkáně kolorekta oproti zdravé tkáni (Kidd et al., 2005). Vysoké exprese pouze jedné z podjednotek enzymu, *RRM1*, byly v další studii zjištěny u pacientů s KRK léčených 5-FU, kde korelovaly s kratší dobou přežití bez příznaků onemocnění (Nobili et al., 2011).

3.8.1.9 Uridin fosforyláza EC (2.4.2.3 Uridine phosphorylase)

Lidská uridin fosforyláza (UPP) se vyskytuje ve dvou isoformách UPP1 a UPP2. Lépe charakterizován a exprimován ve větší míře je enzym UPP1, jehož gen se nachází na chromosomu 7p12.3. Tento enzym katalyzuje reverzibilní fosforylaci uridinu na uracil a ribóza-1-fosfát. Vykazuje rovněž nízkou aktivitu při fosforylaci tymidinu (Watanabe & Uchida, 1995). Mnoho typů solidních nádorů včetně karcinomu tlustého střeva vykazuje zvýšenou enzymatickou aktivitu (Liu et al., 1998).

Později byl popsán enzym UPP2, který je kódován genem lokalizovaným na jiném chromozomu 2q24.1. Tento enzym vykazuje širší substrátovou specifitu. Exprimován je převážně v ledvinách (Johansson et al., 2003).

Uridin fosforyláza byla jako možný prognostický faktor nalezena u karcinomu prsu, kolorekta a skvamózního karcinomu ústní dutiny, kde zvýšená exprese korelovala s horší prognózou (Kanzaki et al., 2002; Miyashita et al., 2002; Uetake et al., 2001 in Pizzorno et al., 2002).

Uridin fosforyláza kromě uridinu, deoxyuridinu a v menší míře tymidinu, také využívá jako substrát 5-fluorouracil a 5'-deoxy-5-fluorouridine a hraje tak důležitou roli v aktivační dráze 5-FU a jeho prekurzorů jako je kapecitabin (Cao et al., 2002). Zvýšené hladiny tohoto enzymu v tumoru by tak měly vést ke zvýšení senzitivity pacientů k 5-FU. Tento závěr byl potvrzen v případě rakoviny žaludku, kde pacienti se zvýšenou expresí lépe odpovídali na léčbu 5-FU (Kawamura et al., 2006). Pozitivní vztah mezi expresí a citlivostí na léčbu 5-FU byl rovněž pozorován na myším modelu (Cao et al., 2002).

3.8.1.10 Uridin-cytidin kináza (EC 2.7.1.48 Uridine kinase)

Uridin-cytidin kináza katalyzuje fosforylaci uridinu a cytidinu na uridin monofosfát a cytidin monofosfát. Tento enzym se rovněž účastní aktivace ribonukleosidových analogů jako je 5-FU. Navázání ribózy enzymem uridin fosforylázou je následováno fosforylací enzymem uridin-cytidin kinázou za vzniku FUMP, který dále podléhá další fosforylaci. V lidských buňkách byly identifikovány 2 enzymy uridin-cytidin kinázy (UCK1 a UCK2) s lokalizací na chromozomech 9q34.2-9q34.3 a 1q22-1q23.2 (Van Rompay et al., 2001). Gen UCK1 je exprimován v mnoha typech tkáních s vysokými hladinami v játrech a ledvinách. Zatímco u genu UCK2 byla exprese potvrzena v případě zdravé tkáně pouze v placentě a ve varlatech (Ozaki et al., 1996; Van Rompay et al., 2001). Vyšší fosforylační účinnost vykazuje enzym UCK1 (Van Rompay et al., 2001).

Ve studii využívající model potkana, byla zvýšená aktivita UCK pozorována v různých nádorových tkáních ve srovnání s tkání normální, např. v nádorové tkáni pankreatu a ledvin (Herzfeld & Raper, 1979). Zvýšená aktivita enzymu byla rovněž potvrzena i v případě lidské nádorové tkáně vaječníků (Shen et al., 1998). Stejné výsledky byly zjištěny i v případě aktivity enzymu v nádorových tkáních střeva (Denton et al., 1982). Exprese genu UCK2 byla pozorována na mnoha buněčných liniích, kde nádorová tkáň vykazovala vyšší hladiny exprese oproti tkáni zdravé (Shimamoto et al., 2002).

Snížené hladiny exprese uridin-cytidin kinázy byly zjištěny u jaterních metastáz KRK, kde byla sledována i odpověď na léčbu během režimu na bázi floxuridinu (deoxynukleosid fluorouracilu) v kombinaci s irinotekanem. Výsledky však neprokázaly prediktivní roli (Lassmann et al., 2007).

3.8.3 Transport

K transportu některých cytostatik dochází v lidských buňkách prostřednictvím nukleosidových transportérů, které jsou rozdělovány do dvou rodin na základě mechanismu transportu na ekvilibrativní a koncentrativní nukleosidové transportéry. Další významnou skupinu z hlediska přenosu cytostatik představují transportéry pro organické anionty a kationty. Z výše zmíněných se pro vstup 5-FU do buňky zdá být významný člen ekvilibrativních transportérů SLC29A a zástupce transportérů organických aniontů SLC22A7. Rovněž může docházet k úniku cytostatik ven z buňky pomocí ABC transportérů. Změny v expresi transportérů se mohou podílet na zvýšené rezistenci k léčivu.

3.8.3.1 SLC29A1

SLC29A1 je transmembránový ekvilibrativní nukleosidový transportér, který umožňuje obousměrný transport purinových i pyrimidinových nukleosidů po koncentračním gradientu (Gray et al., 2004; Baldwin et al., 2004). SLC29A1 je senzitivní k inhibicikoronárními vazodilatačními léky jako je dipyridamol (Ward et al., 2000). Gen pro tento transportér se nachází na chromozomu 6p21.1- p21.2 (Coe et al., 1997).

SLC29A1 se vyskytuje ve všech tkáních, přičemž míra exprese se mezi jednotlivými typy tkání liší. Vysoké hladiny byly nalezeny například v tkáni nadledvin. Změny v expresi tohoto genu jsou pozorovány rovněž mezi tkání zdravou a tkání nádorovou. Výsledky se liší mezi jednotlivými typy testovaných nádorových tkání (Pennycooke et al., 2001).

Pomocí tohoto transportéru je rovněž zajišťován příjem nukleosidových chemoterapeutik do buňky. Tento transportér je hlavní cestou pro vstup do buňky i pro gemcitabin, který se užívá jako standard v léčbě karcinomu pankreatu (Mackey et al., 1998).

Míra exprese genu *SLC29A1* tak může hrát důležitou roli v rezistenci k chemoterapii. Zvýšené exprese genu *SLC29A1* korelovaly s větší senzitivitou ke gemcitabinu v případě nádorů pankreatu. Celková doba přežívání byla delší u pacientů s vyšší expresí oproti pacientům s nižší expresí (Giovannetti et al., 2006). Podobná závislost byla sledována i u nemalobuněčného karcinomu plic, kde nízké hladiny byly pozorovány u pacientů neodpovídajících na léčbu obsahující gemcitabin (Oguri et al., 2007).

SLC29A1 má rovněž důležitou roli v transportu kapecitabinu, orálního prekurzoru 5-FU. K přenosu samotného kapecitabinu do buňky pomocí tohoto transportéru nedochází. Nejdříve je kapecitabin přeměn na 5'-deoxy-5-fluorouridin, který je poté transportován do buňky pomocí *SLC29A1*. In vitro studie na buněčných liniích nádoru prsu prokazují, že inhibice *SLC29A1* snižuje cytotoxický efekt kapecitabinu (Mackey et al., 2002; Molina-Arcas et al., 2006).

Shodné výsledky však nejsou nalezeny u všech léků. V případě léčby karcinomu pankreatu pomocí 5-FU, zvýšené exprese neodpovídají zvýšené senzitivitě. Naopak zvýšené exprese genu *SLC29A1* indikují rezistenci k tomuto léku (Tsujie et al., 2007). Zjištěná data však nejsou kompatibilní s výsledky jiné studie, kde u léčby karcinomu pankreatu 5-FU nebyla zaznamenána žádná souvislost míry expresivity a odpovědi na léčbu (Farrell et al., 2009). Vysoké exprese genu *SLC29A1* korelovaly s nízkou senzitivitou k 5-FU ve studii hodnotící odpověď na léčbu 5-FU u pacientů s pokročilým KRK. Zvýšená rezistence tak může vznikat důsledkem zvýšeného transportu aktivních metabolitů 5-FU ven z buňky těmito transportéry. Tento transportér může mít rovněž vliv na zvýšený příjem tymidinu z důvodu ochrany buňky před buněčnou smrtí způsobenou inhibicí tymidilát syntetázy. Na základě těchto studií je zvýšená exprese genu *SLC29A1* spojována s rezistenčním mechanismem v případě 5-FU a se senzitivním v případě gemcitabinu a kapecitabinu. (Yoshinare et al., 2003).

SLC29A1 vykazuje velmi nízkou mutabilitu, dokonce i v nekódující oblasti. Byly sledovány 2 nesynonymní varianty transportérů, u kterých však nebyly nalezeny rozdíly v příjmu nukleosidů a jejich analogů. Genetické varianty v kódující oblasti tak pravděpodobně nepřispívají k interindividuálním rozdílům v odpovědi na léčbu (Osato et al., 2003).

K odlišné expresi tak mohou přispívat jednonukleotidové polymorfismy v jiných oblastech. Následující studie identifikovala 3 takové polymorfismy v promotorové oblasti (G706C, G1050A, C1345G). Polymorfismy G1050A a C1345G vykazují zvýšenou expresi

vedoucí k vyšší aktivitě in vitro. Jednotlivé haplotypy těchto polymorfismů (CGG, CAG, CGC a GAG) však neodpovídají hodnotám exprese v mononukleárních buňkách periferní krve. Pouze haplotyp CGG/CGC vykazoval mírně zvýšenou expresi transportéru. Polymorfismy v promotorové oblasti by tedy mohly mít vliv na míru exprese genu *SLC29A1* a tedy i na senzitivitu k léčbě (Myers et al., 2006).

3.8.3.2 SLC22A7

SLC22A7 se vyskytuje jako Na⁺ independentní transportér, který patří do rodiny transportérů organických aniontů. Tyto transportéry přenáší extracelulární anionty do buňky výměnou za intracelulární anionty (dykarboxylové kyseliny) při využití jejich gradientu (Kobayashi et al., 2005).

Gen *SLC22A7* je mapován na chromozomu 6q21 (Kok et al., 2000). Exprimován je hlavně v játrech a ledvinách (Sun et al., 2001). V ledvinách je lokalizován v basolaterální membráně v proximálních tubulech. Toto umístění je důležité vzhledem k příjmu organických aniontů z krve v prvním kroku sekrece (Enomoto et al., 2002).

Transportér SLC22A7 vykazuje širokou substrátovou specifitu, jak pro endogenní, tak pro exogenní látky včetně cytostatik. Rovněž vykazuje vysokou afinitu k 5-FU a může tak hrát důležitou roli v jeho příjmu (Kobayashi et al., 2005).

4. MATERIÁLY A METODY

4.1. SOUBOR PACIENTŮ

Do studie byly vybrány dva soubory pacientů s KRK, kteří podstoupili paliativní nebo adjuvantní chemoterapii založenou na 5-FU. Oba soubory byly rozděleny do dvou skupin na základě reakce na léčbu. Odpovídající pacienti reagovali na léčbu dobře a vykazovali remisi. U neodpovídajících pacientů došlo i přes indikovanou léčbu k progresi onemocnění.

Pacienti se známými klinicko-patologickými údaji byli léčeni ve Fakultní nemocnici Plzeň. Všichni pacienti ve studii poskytli informovaný souhlas s odběrem vzorků a se zařazením do studie. Těmto pacientům byla odebrána nádorová a zdravá tkáň kolorekta pro následné stanovení expresních profilů. Zisolovány byly vzorky od 30 pacientů léčených paliativně a 32 pacientů léčených adjuvantně. Na základě kvality RNA bylo do expresní studie následně vybráno 19 pacientů z paliativního souboru a 16 pacientů z adjuvantního souboru. Klinické údaje těchto pacientů jsou uvedeny v tab. 4.1.

Tab 4.1 Klinická charakteristika pacientů paliativní a adjuvantního souboru zařazených do expresní studie

	PALIATIVNÍ SOUBOR		ADJUVANTNÍ SOUBOR	
	Odpovídající	Neodpovídající	Odpovídající	Neodpovídající
Počet pacientů	9	10	12	4
Věk				
medián	62	67	63,5	65,5
rozsah	39-69	54-77	49-74	62-76
Pohlaví				
žena	5	1	4	1
muž	4	9	8	3
T klasifikace				
T2	1	-	-	-
T3	7	9	11	3
T4	1	1	1	1
N klasifikace				
Nx	1	1	-	-
N0	1	1	5	-
N1	4	3	3	3
N2	3	5	4	1
M klasifikace				
Mx	-	-	1	-
M0	-	1	11	3
M1	9	9	-	1
Grading				
G1	0	4	1	-
G2	8	5	8	3
G3	1	1	3	1
Lokalizace primárního tumoru				
Tlusté střevo	3	3	7	2
Rektosigmoideum	1	2	4	1
Rektum	5	5	-	1
Jiné	-	-	1	-
CHT režim				
De Gramonte	1	4	-	1
FOLFOX	8	6	8	1
XELODA	-	-	3	2
FA-FU	-	-	1	-

4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Combi PPP Master mix (Top Bio, Praha, Česká Republika)

Ethanol 75%

Ethidium bromidem

Chloroform

Isopropanol

Phi X174 DNA-HaeIII digest (New England Biolabs, Ipswich, USA)

Primery přímé a zpětné (Sigma Genosys, Steinheim, Německo)

Quant-iT™ Ribogreen® RNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, (MBI Fermentas, Vilnius, Litva)

Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)

TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA)

TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)

4.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)

ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Fotoaparát KODAK DC290 Zoom Digital Camera (KODAK, Rochester, USA)

Centrifuga Hermle Z513K (Hermle Labortechnik, Wehingen, Německo)

Termoblok (Labnet, Edison, USA)

Transluminátor (UVP, Upland, USA)

4.4 IZOLACE RNA

Izolace byla prováděna metodou fenol-chloroformové extrakce využívající TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), který je směsí guanidin thiokyanátu a fenolu. Tkáň byla homogenizována v třecí misce v tekutém dusíku a následně přenesena do předem připravené zkumavky s 1 ml TRIzol reagent. Takto připravená tkáň byla následně dále

izolována nebo uskladněna při -80 °C do druhého dne. RNA je v TRIzol reagent chráněna před degradací nukleázami guanidin thiokyanátem, který inhibuje jejich aktivitu.

K lyzátu bylo dále přidáno 200 μ l chloroformu. Roztok byl poté důkladně zvortexován a inkubován při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Centrifugací při 12000 otáčkách, 4 °C po dobu 15 minut byla suspenze rozdělena do tří fází. V horní vodné fázi se nacházela RNA, v interfázi DNA a v dolní organické fázi proteiny. Spodní fáze je možné využít pro izolaci DNA.

Vrchní fáze obsahující RNA byla opatrně odebrána a přenesena do čisté zkumavky. Po přidání stejného objemu isopropanolu následovala precipitace RNA. Obsah zkumavky byl protřepán, inkubován po dobu 10 minut při pokojové teplotě a následně centrifugován opět při 12000 otáčkách a 4 °C po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla na dně zkumavky patrná peleta, kde se nacházela vysrážená RNA. Supernatan byl opatrně slit. Po jeho odstranění byla peleta RNA promyta přidáním 500 μ l 75% etanolu. Následovala centrifugace při 12000 otáčkách a 4 °C po dobu 5 minut. Po odebrání supernatanu byla peleta krátce vysušena v termobloku při 60 °C a poté rozpuštěna ve vodě prosté nukleáz. Podle velikosti pelety bylo použito 20 až 100 μ l sterilní destilované vody. Následovala inkubace v termobloku při 60 °C po dobu 15 minut. Na závěr byl 1 μ l RNA odebrán do zkumavky s předem připraveným roztokem 199 μ l 1 \times TE pufru pro fluometrické stanovení koncentrace a zbylé množství bylo rozděleno do alikvotů po 20 μ l a následně zamrzáno při -80 °C.

4.5 STANOVENÍ KONCENTRACE RNA

Koncentrace RNA byla měřena fluorometricky pomocí fluorescenčního barviva RiboGreen. Pro měření byl použit kit Quant-iT™ Ribogreen® RNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) obsahující RiboGreen RNA quantitation reagent, 20 \times TE pufr a Ribosomal RNA Standard. Vzorky byly již před měřením připraveny naředěním v 1 \times TE pufru. Roztoky TE pufru a fluorescenčního barviva RiboGreen byly připraveny několik hodin před započítím měření pro ustálení fluorescence. Standardy RNA o známé koncentraci byly naředěny přímo před samotným měřením. Přehled přípravy těchto roztoků je uveden v tab. 4.2.

Tab. 4.2 Příprava roztoků pro měření koncentrace RNA

	1× TE	Quant-iT RiboGreen	Standardy RNA
Ředění	20×	200×	50×
Použitá látka	voda prostá nukleáz	1× TE	1× TE

Standardy RNA byly poté rozpipetovány v různém ředění, které uvádí tab. 4.3. Roztoky měřených vzorků o neznámé koncentraci a objemu 10 µl spolu s 1× TE buffer o objemu 90 µl byly rozpipetovány do jamek na destičce. Vzorky byly měřeny v duplikátech. Na závěr byl ke všem vzorkům přidán RiboGreen o objemu 100 µl. Takto připravená destička se nechala třepat bez přístupu světla 5 minut. Následně proběhlo měření na přístroji INFINITE 200 Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Fluorescence byla měřena při excitaci 480 nm a emisi 520 nm.

Tab. 4.3 Ředění RNA standardů použité k sestavení kalibrační křivky

1x TE (µl)	Standard RNA 2,0 µg/ml (µl)	Koncentrace RNA (ng/ml)
0	100	1000
50	50	500
90	10	100
98	2	20
100	0	0

Z naměřených hodnot fluorescence standardů RNA o známé koncentraci ředěných podle tab. 4.3 byla sestrojena kalibrační křivka. Neznámé koncentrace vzorků byly stanoveny metodou lineární regrese z kalibrační křivky. Rovnice popisující přímku lineární regrese je dána vztahem $Y = AX + B$, kde Y odpovídá hodnotám fluorescence a X je hledaná koncentrace. Přímka lineární regrese charakterizuje lineární závislost fluorescenčního signálu na koncentraci.

Vhodnost použití této metody byla hodnocena koeficientem determinace R^2 . Koeficient determinace nabývá hodnot menších nebo rovné 1. Čím více se koeficient blíží jedné, tím blíže leží body regresní přímce a tím lépe jsou tímto modelem vysvětlovány.

4.6 OVĚŘENÍ KVALITY A INTEGRITY RNA

Kvalita RNA byla ověřena metodou pro stanovení „RNA integrity number“ (RIN). Měření proběhlo na spolupracujícím pracovišti Ústavu biochemie a experimentální onkologie, 1.LF UK, kde byly změřeny hodnoty RIN na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) za použití kitu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Tato metoda byla provedena cestou kapilární gelové elektroforézy. Výsledkem tohoto měření jsou hodnoty od 0 do 10, kde hodnota 10 odpovídá nejvyšší kvalitě RNA. Hodnota je vypočítána na základě poměru úrovně signálu ribozomálních podjednotek 28S:18S a úrovně signálu před markerem v 5S oblasti.

4.7 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Připravená RNA byla následně přepsána na cDNA pomocí kitu RevertAidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litva). Pro přepis bylo v reakci použito 0,5 µg RNA. V prvním kroku byl k 0,5 µg přidán 1 µl primerů složených z náhodných hexamerů (0,2 µg/µl), reakční směs byla doplněna vodou prostou nukláz do celkového objemu 14 µl. Následně byla směs inkubována v termobloku při 70 °C po dobu 5 minut z důvodu denaturace nežádoucích sekundárních struktur RNA. Po ochlazení směsi na ledu byl ke každému vzorku přidán mix obsahující 4 µl 5× reakčního pufru, 2 µl 10 mM dNTP a 1 µl inhibitoru ribonukleáz (20 µg/µl). Následná inkubace směsi při pokojové teplotě po dobu 5 minut umožnila nasednutí primerů. Poté byly odebrány 2 µl z každého vzorku bez reverzní transkriptázy do čisté zkumavky jako negativní kontrola (pro posouzení kontaminace genomovou DNA. Kromě této kontroly byla použita i kontrola obsahující reverzní transkriptázu bez přítomnosti RNA, která sloužila k hodnocení kontaminace reakčních činidel. Ke vzorkům byl následně přidán 1 µl reverzní transkriptázy (200 µg/µl). Po inkubaci při pokojové teplotě po dobu 10 minut byla směs přenesena opět do termobloku, kde byla ponechána při 42 °C po dobu 60 minut, kdy probíhala samotná reverzní transkripcí. Reverzní transkriptáza byla poté inaktivována inkubací v termobloku při 70 °C po dobu 10 minut. Připravená cDNA byla poté ochlazená na ledu a uskladněna při -20 °C.

4.8 OVĚŘENÍ KVALITY cDNA

Kvalita cDNA byla ověřena amplifikací fragmentu kontrolního genu ubikvitinu C pomocí PCR. Reakční směs byla tvořena smícháním 0,5 µl cDNA a reakčního mixu, který

obsahoval 3,7 μ l vody prosté nukleáz, 0,4 μ l 10nM přímých primerů, 0,4 μ l 10nM zpětných primerů a 5 μ l Combi PPP Master mixu (Top Bio, Praha, Česká Republika). Složení tohoto mixu bylo následující: Taq Purple DNA polymeráza 100 μ g/ml, 5 mM $MgCl_2$ a 400 μ M každého dNTP. Konečný objem reakční směsi obsahující cDNA a reakční mix činil 10 μ l. Mezi analyzované vzorky byly rovněž přidány negativní kontroly s RNA bez reverzní transkriptázy, kontrola s reakční směsí bez RNA a kontrola PCR s reakčním mixem a vodou.

PCR byla provedena na termocykleru GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR byla provedena při nastavení následujících parametrů: počáteční denaturace 5 minut při 94 °C, 38 cyklů: denaturace 30 sekund při 94 °C, nasedání primerů 30 sekund při 64 °C, prodlužování DNA řetězce 30 sekund při 72 °C, konečné prodlužování 5 minut při 72 °C.

Produkty PCR reakce byly hodnoceny elektroforézou v 3% agarózovém gelu při napětí 100 V. Na gel byl nanesen celý objem PCR reakce (10 μ l). Jako marker bylo použito 10 μ l Phi X174 DNA-HaeIII digest (New England Biolabs, Ipswich, USA). Gel byl poté barven v lázni obsahující ethidium bromidu po dobu 10 min, následně osvětlen UV transluminátorem a vyfocen fotoaparátem KODAK DC290 Zoom Digital Camera (KODAK, Rochester, USA). Přítomnost proužku o 190 bp signalizovala, že syntéza cDNA proběhla úspěšně. Přítomnost proužku 1009 bp v negativní kontrole pak ukazovala na kontaminaci genomovou DNA. Kontaminované vzorky nebyly zařazeny do studie.

4.9 PREAMPLIFIKACE

Ověřené vzorky cDNA byly dále preamplifikovány. Preamplifikace poskytla dostatečné množství cDNA pro studium exprese většího počtu genů a zvýšila její citlivost. Do preamplifikace byly zařazeny primery amplifikující sledované kandidátní geny a použité referenční geny.

V prvním kroku preamplifikace bylo nezbytné připravit tzv. TaqMan PreAmp Pool smícháním vždy 10 μ l 20 \times TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA) každého ze sledovaných genů do celkového objemu 1000 μ l. Z tohoto objemu bylo odebráno 12,5 μ l a smícháno s 25 μ l 2 \times Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). Takto připravený reakční mix o objemu 37,5 μ l byl přidán ke každému vzorku cDNA. Pro reakci bylo použito 12,5 μ l předem naředěné cDNA. Pro ředění bylo použito 5 μ l cDNA a 7,5 μ l vody prosté nukleáz. Konečná reakční směs

o objemu 50 μ l byla vložena do termocykleru GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Podmínky pro preamplifikaci byly následující: počáteční denaturace 10 minut při 95°C, 14 cyklů: denaturace 15 sekund při 95°C, nasedání primerů, prodlužování 4 minuty při 60°C. Po dokončení reakce byly vzorky okamžitě zamrazeny při -20°C. Výsledný naamplifikovaný produkt byl pro další analýzy 20 \times naředěn.

4.10 RT-PCR

Míra exprese genů byla měřena metodou kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR). Byl sledován relativní poměr exprese kandidátních genů k expresi referenčních genů. Reakční mix byl připraven z následujícího množství reagensů (Applied Biosystems): 5 μ l 2 \times TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 2 μ l vody prosté nukleáz a 20 \times 0,5 μ l TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA), obsahující specifické primery a sondy značené FAM barvivem pro příslušný gen. Po přidání 2,5 μ l preamplifikované cDNA byl celkový objem 10 μ l připraven pro reakci. Měření paliativního souboru vzorků bylo provedeno na přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Vzorky adjuvantního souboru byly měřeny pomocí přístroje ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Podmínky pro RT-PCR byly následující: aktivace uracil-N-glykosylázy 2 minuty při 50°C, aktivace Hot Start Taq polymerázy 10 minut při 95°C, 50 cyklů: denaturace 15 sekund při 95°C, nasedání primerů, prodlužování 60 sekund při 60°C. V každém setu vzorků byla pro testování každého genu přítomna kalibrační křivka a negativní kontrola. Jeden ze vzorků sloužil jako kalibrátor. Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech. Pro analýzu výsledků byly použity programy 7500 System a ViiA 7 System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Výsledkem byly hodnoty (cycle threshold neboli Ct), které odpovídají cyklu, kdy fluorescence dosáhne prahové hodnoty (threshold). Tento cyklus odpovídá exponenciálnímu růstu produktu.

4.11 SLEDOVANÉ GENY

Do studie byly vybrány geny nacházejících se v dráhách 5-FU. Pro jejich detekci byly použity specifické primery a sondy TaqMan Gene Expression Assay. Jejich přehled je uveden v tab. 4.4

Tab. 4.4 Přehled vybraných genů a odpovídajících sond a primerů použitých pro RT-PCR

Označení genu	Název genu	Assay číslo	Rozsah exonu	Velikost ampliconu
DPYD	Dihydropyrimidin dehydrogenáza	Hs00559279_m1	1 - 2	74
DPYS	Dihydropyrimidináza	Hs00154808_m1	1 - 2	77
PPAT	Fosforibozyl pyrofosfát amidotransferáza	Hs00601264_m1	1 - 2	68
RRM1	Ribonukletid reduktáza M1	Hs00168784_m1	1 - 2	78
RRM2	Ribonukletid reduktáza M1	Hs01072069_g1	9 - 10	128
SLC22A7	Transportér rozpuštěných látek, rodina 22, člen 7	Hs00198527_m1	4 - 5	69
SLC29A1	Transportér rozpuštěných látek, rodina 29, člen 1	Hs01085706_m1	2 - 3	75
TK1	Tymidin kináza 1	Hs00177406_m1	3 - 4	118
TYMP	Tymidin fosforyláza	Hs00157317_m1	3 - 4	95
TYMS	Tymidylát syntetáza	Hs00426591_m1	6 - 7	87
UCK1	Uridin-cytidin kináza	Hs01075618_m1	2 - 3	72
UCK2	Uridin-cytidin kináza	Hs00367072_m1	3 - 4	72
UMPS	Uridin monofosfát syntetáza	Hs00165978_m1	1 - 2	109
UPB1	Beta-ureidopropionáza	Hs00255472_m1	1 - 2	59
UPP1	Uridin fosforyláza 1	Hs00427695_m1	3 - 4	108
UPP2	Uridin fosforyláza 2	Hs00542792_m1	6 - 7	66

V tabulce je uvedeno značení a název příslušného genu, číslo označení assay, rozsahu exonu a velikosti ampliconu.

4.12 TEST PREAMPLIFIKACE

Účinnost preamplifikace byla hodnocena na základě porovnání exprese referenčních genů preamplifikované a neamplifikované cDNA. V prvním kroku byla neamplifikovaná cDNA naředěna v $1 \times$ TE pufru na výslednou koncentraci odpovídající 0,3 ng RNA/ μ l. Neamplifikovaná cDNA o objemu 2,5 μ l a preamplifikovaná cDNA rovněž o objemu 2,5 μ l byly smíchány s reakčním mixem o objemu 7,5 μ l. Konečný objem reakční směsi, který tvořil 10 μ l, byl následně použit pro RT-PCR. Složení reakčního mixu a podmínky této reakce byly stejné jako u výše popsané RT-PCR. Vzorky byly měřeny v duplikátech.

Uniformita preamplifikace byla stanovena na základě hodnoty $\Delta\Delta C_T$ (rovnice 3). Po vypočtení průměrného C_t pro duplikáty bylo vypočteno ΔC_t pro neamplifikovanou i preamplifikovanou cDNA (rovnice 1 a 2). Od průměrného C_t sledovaného genu bylo odečteno průměrné C_t referenčního genu.

ΔC_t (preamplifikovaná cDNA) = C_t cílový gen - C_t referenční gen (rovnice 1)

ΔC_t (neamplifikované cDNA) = C_t cílový gen - C_t referenční gen (rovnice 2)

$\Delta\Delta C_T$ bylo vypočteno podle následujícího vztahu:

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (preamplifikovaná cDNA) – ΔC_T (neamplifikovaná cDNA) (rovnice 3)

Hodnoty $\Delta\Delta C_T$ blízké 0 (± 1.5) signalizovaly dostatečnou uniformitu preamplifikace.

4.13 STATISTICKÁ ANALÝZA

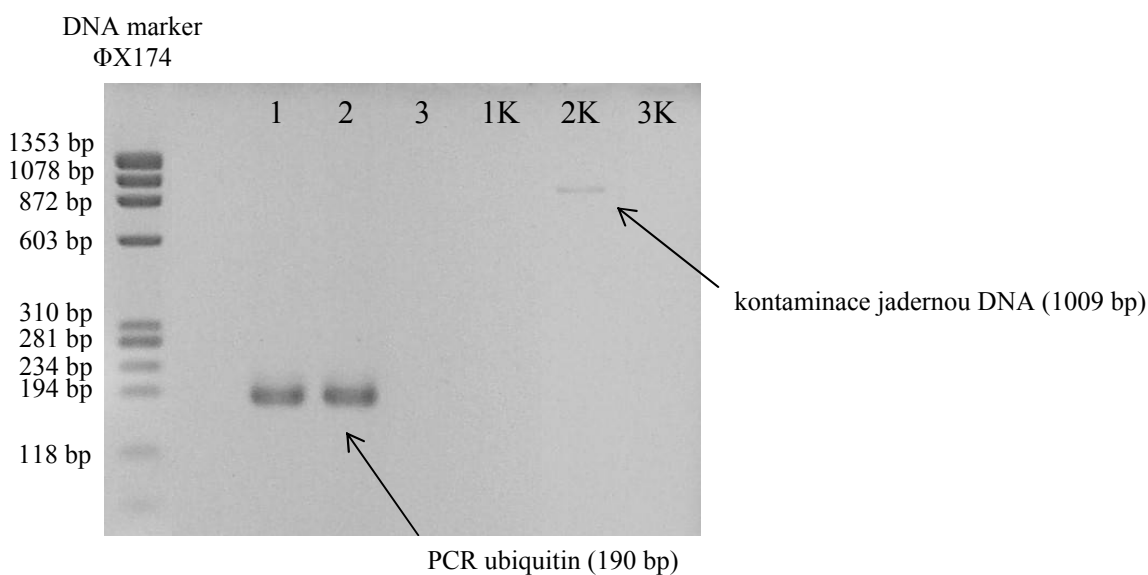
Statistická analýza zjištěných dat byla provedena pomocí programu REST 2009 (Relative Expression Software Tool) (www.gene-quantification.de/rest.html). Expresní hodnoty kandidátních genů byly porovnány mezi dvěma skupinami, které představují buď tumor a zdravou tkáň nebo odpovídající a neodpovídající pacienty a normalizovány na více referenčních genů. Tento program bere v úvahu při svém hodnocení rovněž účinnost RT-PCR (Pfaffl et al., 2002). Výsledky s p-hodnotou, udanou programem REST 2009, menší než 0,05 signalizovaly statisticky významné rozdíly zjištěné mezi uvedenými skupinami. Na hranici významnosti se nacházely výsledky s p-hodnotou do 0,1.

Vztahy expresních hladin ke klinickým datům byly hodnoceny statistickým programem SPSS v15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Pro analýzy vztahů mezi faktoriálními klinickými daty pacientů (pohlaví, klinická diagnóza, TNM, grading, typ chemoterapie a odpověď) byl použit Fisherův exaktní test. Pro analýzy vztahů kontinuálních hodnot genových expresí k faktoriálním veličinám byly použity neparametrické testy Mann-Whitney nebo Kruskal-Wallis, protože expresní data byla rozložena nenormálně podle testu Kolmogorova-Smirnova. Spojité veličiny, např.: věk při diagnóze vs. exprese byly korelovány pomocí neparametrického Spearmanova testu. Rozdíly a vztahy dosahující $p < 0.05$ pro oboustranný test byly považovány jako statisticky významné a prezentovány ve výsledkové části.

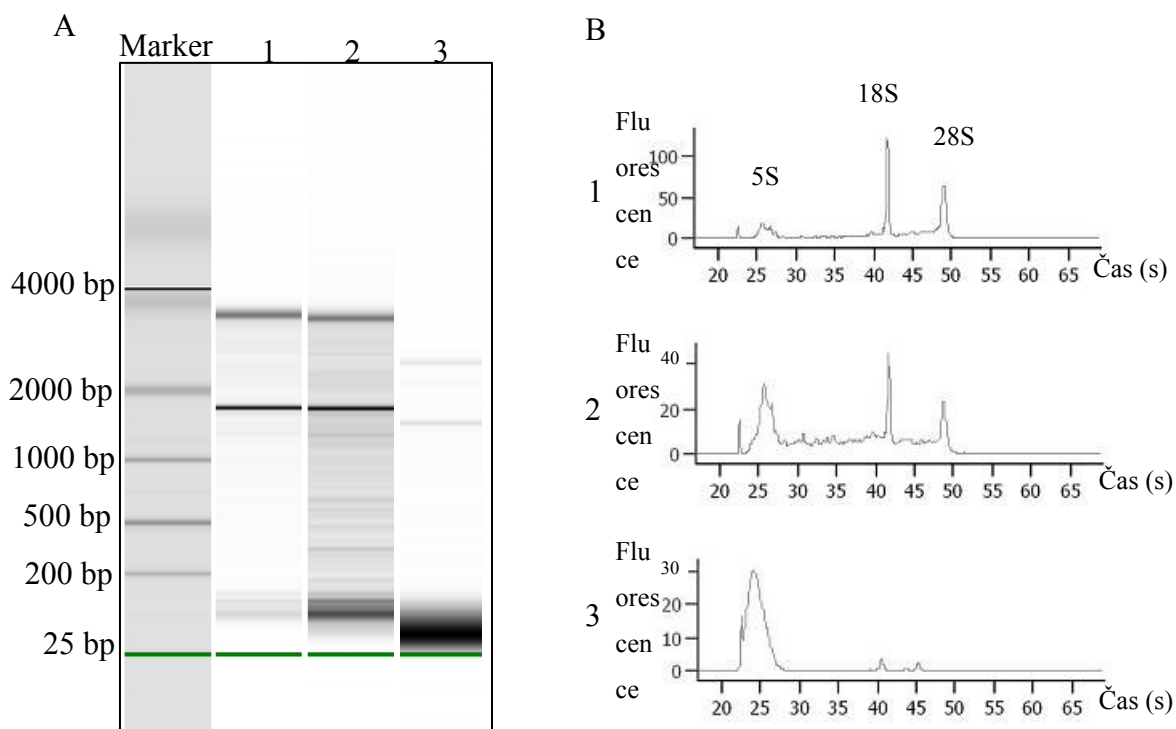
5. VÝSLEDKY

5.1 KVALITA TESTOVANÝCH VZORKŮ

Do studie byly zařazeny pouze vzorky, které vykazovaly kvantitu i kvalitu RNA dostatečnou pro provedení RT-PCR. Celkový výtěžek RNA byl u většiny vzorků nad 5 µg. Kvalita byla hodnocena na základě čistoty a integrity RNA. Ze studie byly vyřazeny ty vzorky, u kterých nebyl nalezen žádný produkt PCR reakce ubiquitinu C a které byly kontaminovány jadernou DNA. Ukázka vzorků s různou kvalitou cDNA je zobrazena v obr. 5.1. Na základě hodnocení integrity RNA pomocí RIN byly vyřazeny vzorky, které vykazovaly silně degradovanou RNA. Výstupy této metody nabývaly hodnot od 2,6 do 9,1. Průměrná hodnota RIN byla 6,4. Do studie vstoupily pouze ty vzorky s hodnotou RIN větší než 3. Vzorky s posuny bez udání RIN nebyly analyzovány. Odlišné stupně kvality RNA zjištění metodou RIN jsou zobrazeny na obr. 5.2. Zisolováno bylo 30 párů paliativních vzorků a 32 párů adjuvantních vzorků. K preamplifikaci a následné expresní studii byly použity vzorky 19 pacientů z paliativního souboru a 16 pacientů z adjuvantního souboru.



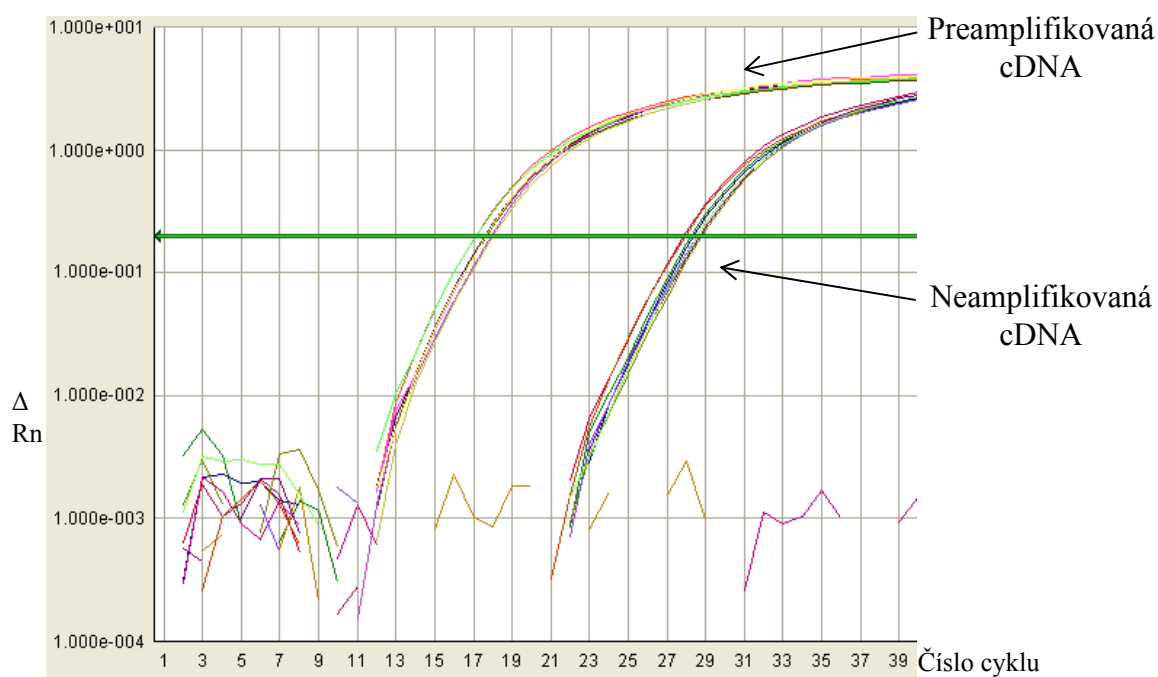
Obr. 5.1. Gel zobrazující výsledky PCR reakce ubiquitinu C vypovídající o kvalitě cDNA. Zobrazení odlišné kvality na 3 vzorcích (1,2,3) a jejich negativních kontrolách (1K, 2K, 3K): vzorek č. 1 - ověřena kvalitní cDNA, vzorek č. 2 – kontaminace jadernou DNA, vzorek č. 3 – chybí produkt PCR reakce.



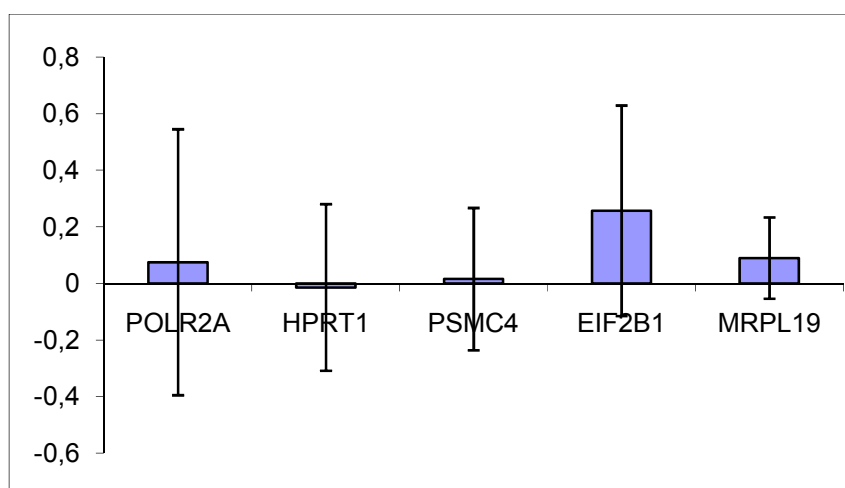
Obr. 5.2 Výsledky kontroly kvality RNA metodou RIN zobrazené pomocí gelu (A) a elektroforogramu (B). Hodnoty RIN odpovídají stupni degradace; přičemž nejvyšší míru integrity vykazují vzorek č. 1 (RIN: 8), dále vzorek č. 2 (RIN: 5,5), nejvíce degradovaná RNA se nachází u vzorku č. 3 (RIN: 2,8).

5.2. TEST ÚČINNOSTI PREAMPLIFIKACE

Preamplifikovaná cDNA vedla ke snížení Ct vhodného pro detekci nízkých hladin exprese. Amplifikační křivky neamplifikované a preamplifikované cDNA jsou zobrazeny v obr. 5.3. Ověření preamplifikace bylo provedeno testem účinnosti preamplifikace na referenčních genech. Uniformita preamplifikace byla výsledky testu potvrzena. Hodnoty $\Delta\Delta C_T$ se pohybovaly v rozmezí od -1,5 do 1,5. Výsledné hodnoty svědčící o uniformitě preamplifikace jsou zobrazeny pomocí grafu 5.1.



Obr. 5.3 Amplifikační křivky preamplifikované a neamplifikované cDNA



Graf 5.1 Zobrazení výsledných hodnot testu účinnosti preamplifikace poukazující na uniformitu preamplifikace. Znáznorněn medián $\Delta\Delta C_T$ referenčních genů.

5.3 RT-PCR

V případě 2 genů *SLC22A7* a *UPPI* byla ve studovaném souboru vzorků míra exprese příliš nízká a nebylo tak možné tyto geny metodou RT-PCR hodnotit. Ostatní geny byly zařazeny do expresní analýzy.

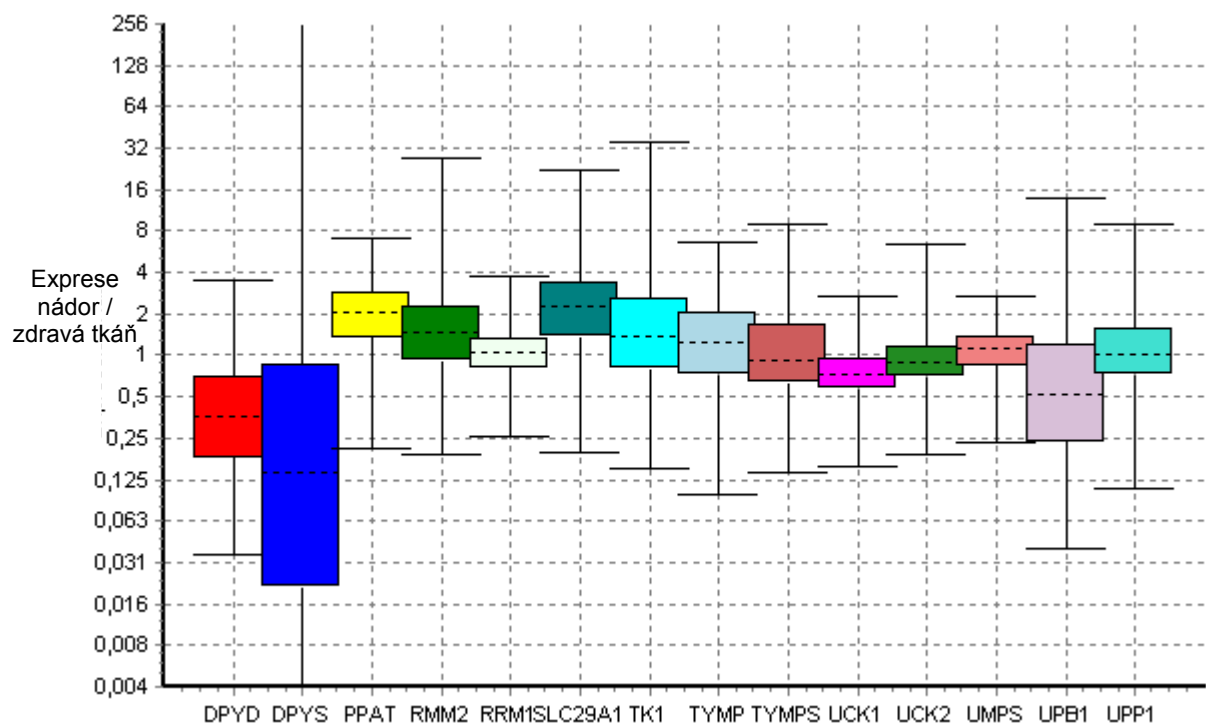
5.4 VÝBĚR REFERENČNÍCH GENŮ

Pro zhodnocení míry exprese je důležitý správný výběr endogenních kontrol, tzv. referenčních genů. Exprese ideálního referenčního genu je konstantní ve všech studovaných tkáních a neměla by být ovlivnitelná podmínkami pokusu. Proto se obvykle volí tzv. housekeeping geny zajišťující životně důležité biochemické procesy buňky. Referenční geny byly vybírány na základě předchozí studie Laboratoří toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu za použití TaqMan Array Plates na přístroji 7500 Real-Time PCR System, kde byla porovnáвана stabilita celkem 24 různých možných referenčních genů na souboru 10 vzorků zdravých a 10 vzorků nádorových tkání. Nejvhodnějšími referenčními geny byly zvoleny *POLR2A*, *HPRT1*, *EIF2B1*, *PPIA*, *MRPL19* a *HPRT1*. Tyto geny byly vybírány na základě hodnocení stability v rámci celého souboru sledovaných vzorků a zároveň i dle variability mezi nádorovou a zdravou tkání.

5.5 ANALÝZA EXPRESE NA PALIATIVNÍM SOUBORU

5.5.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání

Variabilita exprese genů v tumoru paliativního souboru je znázorněna v grafu 5.1. Ze 14 testovaných genů jich 7 vykazovalo významné rozdíly v expresi mezi zdravou a nádorovou tkání. Geny spojené s katabolismem 5-FU - *DPYD*, *DPYS*, *UPBI* - vykazovaly sníženou expresi v tumoru oproti zdravé tkání. U genů zapojených do aktivačních drah je situace komplikovanější. Snížená exprese byla zaznamenána u genu *UCK1*. Naopak u genů *PPAT*, *RRM2*, *SLC29A*, které se účastní odlišných cest aktivace 5-FU, byla exprese zvýšena. Všechny tyto geny vykazovaly deregulaci s p-hodnotou menší než 0.05. Přehled výsledných hodnot pro všechny sledované geny uvádí tab 5.1.



Graf 5.1 Variabilita exprese sledovaných genů paliativního souboru

Tab. 5.1 Přehled výsledků hodnocení exprese sledovaných genů mezi zdravou a nádorovou tkání.

Gen	Exprese nádor/zdravá tkáň	95% konfidenční interval	P-hodnota	Exprese nádor
DPYD	0,37	0,07 - 2,14	0,001	snížení
DPYS	0,11	0,00 - 19,27	0,005	snížení
PPAT	1,88	0,49 - 5,99	<0,001	zvýšení
RRM1	1,05	0,44 - 2,62	0,656	
RRM2	1,57	0,36 - 12,67	0,027	zvýšení
SLC29A1	2,09	0,35 - 9,13	0,002	zvýšení
TK1	1,49	0,29 - 11,87	0,079	
TYMP	1,14	0,17 - 4,41	0,508	
TYMS	1,03	0,28 - 4,74	0,861	
UCK1	0,71	0,27 - 1,58	0,004	snížení
UCK2	0,91	0,35 - 3,93	0,502	
UMPS	1,07	0,44 - 2,08	0,500	
UPB1	0,54	0,07 - 5,10	0,043	snížení
UPP1	1,01	0,22 - 4,03	0,942	

V tabulce je uveden podíl exprese mezi nádorovou a zdravou tkání, konfidenční interval, p-hodnota a výsledné hodnocení hladiny exprese v nádorové tkáni.

5.5.1 Analýza odpovědi na léčbu

V rámci analýzy exprese mezi pacienty odpovídajícími a neodpovídajícími na léčbu byly zjištěny slabší vztahy. V případě nádorové tkáně nebyl nalezen žádný vztah mezi těmito skupinami. Ve zdravé tkáni byl u odpovídajících pacientů na léčbu významně deregulován gen *RRM1*, který se nachází v aktivační dráze 5-FU. Tento gen vykazoval zvýšenou expresi. Nevýznamné rozdíly v podobě zvýšené exprese byly pozorovány u genů *RRM2*, *TYMP*, *UMPS*, jejichž p-hodnoty se pohybovaly na hranici významnosti. Přehled výsledných hodnot exprese zmíněných genů ve zdravé tkáni uvádí tab. 5.2. Vysvětlením nalezených slabších vztahů je zřejmě malý počet hodnocených vzorků. Proto byl navržen druhý nezávislý soubor pacientů pro rozšíření počtu vzorků, kde byly následně ověřeny signifikantních rozdíly.

Tab. 5.2 Výsledné hodnoty expresní analýzy odpovědi na léčbu pro zdravou tkáň.

Zdravá tkáň				
Gen	Expese odpovídající/ neodpovídající	95% konfidenční interval	P-hodnota	Expese odpovídající
RRM1	1,37	0,90 - 2,51	0,003	zvýšení
RRM2	1,85	0,39 - 13,65	0,058	nevýznamné zvýšení
TYMP	1,74	0,32 - 9,47	0,082	nevýznamné zvýšení
UMPS	1,23	0,74 - 2,97	0,077	nevýznamné zvýšení

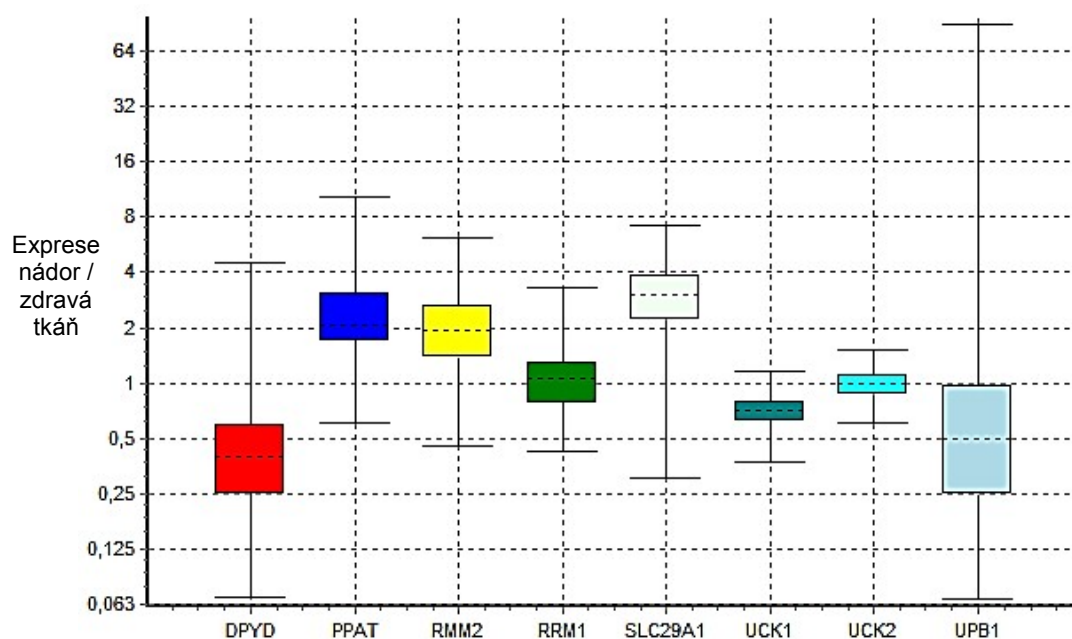
V tabulce je uveden podíl hladin exprese ve zdravé tkáni pacientů odpovídajících a neodpovídajících na léčbu, konfidenční interval, p-hodnota a výsledné hodnocení hladiny exprese u odpovídajících pacientů na léčbu.

5.6 ANALÝZA EXPRESE NA NEZÁVISLÉM ADJUVANTNÍM SOUBORU

Na nezávislém souboru byly následně provedeny analýzy exprese významně deregulovaných genů z předchozího měření. Mezi tyto byly zařazeny geny *DPYD*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *SLC29A1*, *UCK1*, *UCK2* a *UPBI*. Do další analýzy nebyl zařazen gen *DPYS*. Míra exprese genu *DPYS* byla na sledovaném souboru příliš nízká a za daných podmínek tak nebylo možné výstupy z analýzy metodou qPCR s relativní kvantifikací vyhodnotit. Míra exprese tohoto genu se však v rámci sledované skupiny vzorků značně lišila. Z tohoto důvodu by byla vhodná další studie, kde by tento gen byl sledován metodou qPCR s absolutní kvantifikací.

5.6.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání

Variabilita exprese genů v tumoru na adjuvantním souboru je znázorněna v grafu 5.2. V případě adjuvantního souboru bylo dosaženo podobných výsledků jako u paliativního souboru. Byly zjištěny téměř stejné rozdíly v expresi genů mezi nádorovou a zdravou tkání. Opět byla v nádorové tkáni snížena exprese genu *DPYD*, nacházejícího se v katabolické dráze 5-FU. V tomto souboru však nebyla potvrzena snížená exprese dalšího katabolického genu *UPBI*. Nízkou expresi v tumoru oproti zdravé tkáni vykazoval opět gen *UCK1*, aktivační faktor pro 5-FU. Ostatní aktivační geny 5-FU identifikované jako geny se zvýšenou expresí v předchozím setu, vykazovaly i v tomto souboru vyšší hladinu mRNA v tumoru. Přehled výsledných hodnot exprese uvádí tab. 5.3



Graf 5.2 Variabilita exprese sledovaných genů adjuvantního souboru

Tab. č. 5.3 Výsledky analýzy exprese mezi zdravou a nádorovou tkání významně deregulovaných genů z předchozího setu vzorků

Gen	Expese nádor/zdravá tkáň	95% konfidenční interval	P-hodnota	Expese nádor
DPYD	0,41	0,11 - 3,24	<0,001	snížení
PPAT	2,23	0,76 - 6,56	<0,001	zvýšení
RMM2	1,90	0,70 - 5,03	<0,001	zvýšení
SLC29A1	2,74	0,78 - 5,86	<0,001	zvýšení
UCK1	0,71	0,47 - 1,05	<0,001	snížení
UPB1	0,60	0,08 - 31,18	0,153	

V tabulce je uveden podíl exprese mezi nádorovou a zdravou tkání, konfidenční interval, p-hodnota a výsledné hodnocení hladiny exprese v nádorové tkáni.

5.6.2 Analýza odpovědi na léčbu

Nádorová tkáň odpovídajících pacientů vykazovala vyšší exprese genů *PPAT* a *SLC29A1*, zahrnutých v aktivaci 5-FU. Výsledné hodnoty pro tyto dva geny jsou uvedeny v tab. 5.4. V případě zdravé tkáně nebyl nalezen žádný vztah ani na hranici

významnosti. Geny v nádorové tkáni byly regulovány významně, avšak pro malý soubor pacientů nelze tyto vztahy potvrdit. Pro rozšíření počtu vzorků byly následně zhodnoceny oba soubory společně.

Tab. 5.4 Výsledné hodnoty expresní analýzy odpovědi na léčbu pro nádorovou tkáň.

Nádorová tkáň				
Gen	Exprese odpovídající/neodpovídající	95% konfidenční interval	P-hodnota	Exprese odpovídající
PPAT	1,84	0,69 - 6,07	0,035	zvýšení
SLC29A1	1,58	0,73 - 4,35	0,039	zvýšení

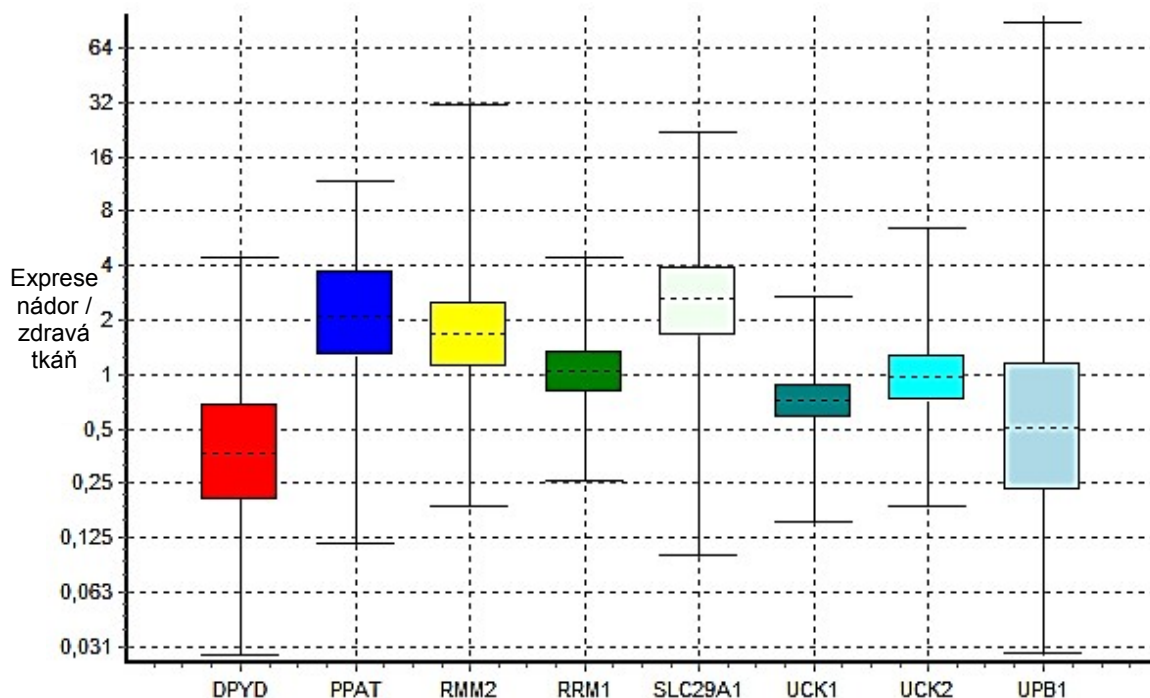
V tabulce je uveden podíl hladin exprese v nádorové tkáni pacientů odpovídajících a neodpovídajících na léčbu, konfidenční interval, p-hodnota a výsledné hodnocení hladiny exprese u odpovídajících pacientů na léčbu.

5.7. SPOLEČNÁ ANALÝZA EXPRESE PALIATIVNÍHO I ADJUVANTNÍHO SOUBORU

5.7.1 Hodnocení rozdílů exprese mezi nádorovou a zdravou tkání

Variabilita exprese genů v tumoru v obou hodnocených souborech je znázorněna v grafu 5.3. Významné rozdíly byly zjištěny i v případě společného zhodnocení souborů při porovnání hladin mRNA v nádorové a zdravé tkáni. Snížené exprese v tumoru byly zaznamenány opět u genů *DPYD* a *UPBI* zapojených do katabolické cesty 5-FU. Aktivační gen *UCK1* vykazoval rovněž nízkou míru exprese. Naopak zvýšená exprese byla pozorována u aktivačních genů *PPAT*, *RRM2* a *SLC29A1*.

Touto analýzou byly potvrzeny výsledky z přechozích měření. Výsledky poukazují na velmi silné vztahy, neboť p-hodnoty u téměř všech významně regulovaných genů dosahují hodnot menších než 0,001. Přehled výsledných hodnot je shrnut v tab. 5.5.



Graf 5.3 Variabilita exprese sledovaných genů na obou hodnocených souborech (paliativní a adjuvantní)

Tab. 5.5 Výsledné hodnoty analýzy exprese mezi zdravou a nádorovou tkání pro oba soubory.

Gen	Exprese nádor/zdravá tkáň	95% konfidenční interval	P-hodnota	Exprese nádor
DPYD	0,39	0,08 - 2,73	<0,001	snížení
PPAT	2,06	0,38 - 7,29	<0,001	zvýšení
RRM2	1,71	0,46 - 8,71	<0,001	zvýšení
SLC29A1	2,38	0,35 - 9,30	<0,001	zvýšení
UCK1	0,71	0,30 - 1,57	<0,001	snížení
UPB1	0,57	0,07 - 13,75	0,011	snížení

V tabulce je uveden podíl exprese mezi nádorovou a zdravou tkání, konfidenční interval, p-hodnota a výsledné hodnocení hladin exprese v nádorové tkáni.

5.7.2 Analýza odpovědi na léčbu

V rámci porovnání exprese odpovídajících vůči neodpovídajícím pacientům nebyl u nádorové tkáně nalezen žádný významný vztah i přes rozšíření souboru pacientů. Žádná ze zjištěných hodnot se nepohybovala na hranici významnosti. V případě zdravé tkáně byla

u odpovídajících pacientů zjištěna deregulace genu *RRM1*, která však byla na hranici významnosti. Hladina mRNA tohoto genu ve zdravé tkáni u odpovídajících pacientů poukazovala na snížení exprese. Výsledné charakteristiky pro tento gen uvádí tab. 5.6.

Tab. 5.6 Výsledné hodnoty analýzy exprese odpovědi pro jediný deregulovaný gen ve zdravé tkáni.

Zdravá tkáň				
Gen	Exprese odpovídá/neodpovídá	95% konfidenční interval	P-hodnota	exprese odpovídající
RRM2	1,42	0,441 - 9,598	0,074	nevýznamné zvýšení

Pro tento gen je zde uveden podíl hladin exprese mezi odpovídajícími a neodpovídajícími pacienty na léčbu, konfidenční interval, p-hodnota a výsledné hodnocení exprese u odpovídajících pacientů na léčbu.

5.8 Hodnocení vztahu expresí ke klinickým datům

Při analýze klinických dat byly zjištěny významné rozdíly mezi paliativním a adjuvantním souborem v případě lokalizace nádoru a přítomnosti metastáz (M). V paliativním souboru převládali pacienti s metastatickým onemocněním. V tomto souboru rovněž převládali pacienti s diagnózou karcinomu rekta (C20), kdežto v adjuvantním souboru bylo postiženo spíše tlusté střevo (C18) a rektosigmoideum (C19). Velikost tumoru (T), počet regionálních uzlin (N), stupeň diferenciacie nádoru (G), typu chemoterapie a odpověď na ni se mezi adjuvantním a paliativním souborem významně nelišily.

PPAT a UCK2 byly nejvýznamnějšími geny korelujícími s prognózou pacientů. Exprese obou genů byla významně vyšší u pacientů léčených paliativní léčbou (tj. u pacientů s horší prognózou) ve srovnání s léčbou adjuvantní. V tomto případě byla zjištěna i vyšší exprese *SLC29A1*. Ve vztahu exprese k lokalizaci nádoru byla zaznamenána vyšší hladina exprese *UCK2* u pacientů s karcinomem rekta. Gen *PPAT* vykazoval vyšší hladiny exprese u pacientů léčených režimem FOLFOX oproti ostatním léčebným režimům. Potvrzením těchto závěrů je nalezení stejných vztahů v tumoru i zdravé tkáni. Přehled zjištěných vztahů je uveden v tab. 5.7.

Tab. 5.7 Přehled významných vztahů mezi klinickými daty a hladinou exprese genů

Gen	Charakteristika	Hladiny exprese v nádoru			Hladiny exprese ve zdravé tkáni		
		hodnota	SD	P	hodnota	SD	P
PPAT	Paliativní soubor	1,08	0,03	<0,001	1,14	0,02	<0,001
	Adjuvantní soubor	1,15	0,05		1,21	0,02	
SLC29A1	Paliativní soubor	1,04	0,04	0,003	1,13	0,05	0,004
	Adjuvantní soubor	1,09	0,04		1,17	0,03	
UCK2	Paliativní soubor	1,04	0,02	<0,001	1,03	0,02	<0,001
	Adjuvantní soubor	1,08	0,01		1,07	0,01	
	klinická diagnóza						
UCK2	střevo	1,07	0,03	0,019	1,06	0,02	0,022
	rektosigmoideum	1,07	0,02		1,05	0,03	
	rektum	1,04	0,02		1,03	0,02	
	terapeutický režim						
PPAT	5-FU	1,16	0,04	0,009	1,20	0,03	0,018
	FOLFOX	1,1	0,05		1,16	0,04	

V tabulce je uvedena průměrná hodnota exprese genu se směrodatnou odchylkou a p-hodnotou pro zdravou i nádorovou tkáň.

6. DISKUZE

Variabilita odpovědi na léčbu cytostatiky je z velké části vysvětlována genetickou výbavou pacientů. Rozdíly v hladinách expresí některých genů mohou přispět k vysvětlení odlišných reakcí pacientů na léčbu a odlišného průběhu onemocnění.

Cílem této studie bylo zhodnotit expresi genů, u kterých je předpokládán možný vliv na léčbu na bázi 5-FU u pacientů s KRK. Porovnány byly hladiny expresí mezi primárním nádorem kolorekta a zdravou tkání a rovněž mezi skupinami pacientů odpovídajících a neodpovídajících na léčbu 5-FU za účelem možného nalezení prognostických nebo prediktivních markerů.

Do studie bylo vybráno 16 genů zapojených do metabolismu, transportu a rovněž patřících mezi cíle cytostatika 5-FU. Z těchto genů se 14 ukázalo jako vhodných pro expresní analýzu, dva zbylé geny (*SLC22A7* a *UPPI*) byly exprimovány pod limitem detekce RT-PCR. V následné studii bylo nalezeno 6 genů, které vykazovaly významné rozdíly mezi zdravou a nádorovou tkání u pacientů léčených paliativní chemoterapií (u nichž byly během léčby nalezeny vzdálené metastázy. Nalezené výsledky byly potvrzeny použitím dalšího nezávislého souboru pacientů léčených adjuvantně (po operaci při níž došlo k úplnému odstranění nádoru). V tomto setu vzorků byly významné rozdíly nalezeny u 5 ze 6 genů významně deregulovaných v paliativním souboru. Při společném zhodnocení obou souborů potvrzeny všechny významně deregulované geny z obou souborů.

Sníženou expresi v nádoru vykazovaly geny *DPYD* a *UPBI* zapojené do katabolismu 5-FU. Gen *UPBI* však nevykazoval významné rozdíly v případě adjuvantního souboru. Rovněž nízké hladiny v nádorové tkáni byly sledovány u genu *UCK1* zahrnutém v jedné z aktivačních drah 5-FU. Naopak vysoké hladiny expresí byly zjištěny u genů *PPAT*, *RRM2*, *SLC29A1*, vyskytujících se v cestách vedoucích k aktivním metabolitům 5-FU.

Rozdíly v expresi některých námi studovaných genů mezi zdravou a nádorovou tkání u pacientů s KRK byly nalezeny v mnoha studiích. Ne vždy se však výsledky shodovaly. Tato studie je unikátní v tom, že srovnávala výsledky ve dvou prognosticky odlišných skupinách pacientů. Některé z nalezených vztahů tak lze zobecnit na léčbu KRK

v lokálním i pokročilém stádiu. Jiné výsledky naopak mohou naznačit prognosticky významné odlišnosti.

Mezi významně deregulované geny zjištěné v této studii patří gen *DPYD* nacházející se v katabolické dráze 5-FU. Aktivita tohoto enzymu je velmi variabilní v nádorové tkáni (McLeod et al., 1998). A proto stanovení hladin exprese *DPYD* může být důležitým faktorem v léčbě KRK. Nízká exprese *DPYD* v primárním nádoru kolorekta i v metastázách oproti tkáni zdravé byla pozorována v řadě studií (Johnston et al., 1999; Tanaka-Nozaki 2001; Uetake et al., 1999). S těmito závěry souhlasí i výsledky naší studie, kde *DPYD* vykazoval významně sníženou expresi v primárním nádoru kolorekta oproti tkáni normální v obou souborech. U pacientů s nízkými hladinami v nádorech existuje předpoklad lepší odpovědi na léčbu v důsledku sníženého odbourávání a většího využití účinku léku 5-FU.

Gen *UPBI*, se účastní konečné fáze katabolismu 5-FU, vykazoval v této studii nižší expresi v nádorové tkáni v paliativním souboru a také při společném hodnocení obou souborů. V samostatném hodnocení tkání pacientů léčených adjuvantně se však exprese v tumoru významně nelišila od zdravé tkáně. Ačkoliv je tento gen studován z hlediska genetického polymorfismu a jeho vlivu na funkci UPB1 proteinu, o jeho roli v léčbě KRK pomocí 5-FU je známo málo. V jediné studii hodnotící míru exprese *UPBI* v nádorové a zdravé tkáni pacientů s KRK léčených adjuvantní chemoterapií na bázi 5-FU, nenalezla žádný rozdíl mezi sledovanými typy tkání (Kidd et al., 2005).

Dalším významně deregulovaným genem v obou souborech byl gen *UCK1*. Enzym UCK1 je jednou ze dvou lidských uridin kináz působících ve druhém kroku (jedné ze tří) fosforylačních cest 5-FU vedoucích k aktivním metabolitům. V literatuře byla zaznamenána zvýšená aktivita uridin kinázy v nádorových tkáních (Denton et al., 1982). Není však dostatek informací o rozdílech v genové expresi mezi tkání normální a tkání nádorovou. Vyšší exprese *UCK2* byla zaznamenána v mnoha buněčných nádorových liniích oproti zdravým tkáním (Shimamoto et al., 2002). O genu *UCK1* a jeho enzymovém produktu však informace zcela chybí. V této studii vykazoval gen *UCK1* sníženou expresi v nádorové tkáni. Nízké hladiny by pak mohly vést ke snížené dostupnosti aktivních metabolitů 5-FU a tedy i k horší odpovědi na léčbu.

Významně zvýšená hladina exprese v tumoru byla pozorována u genu *SLC29A1*, který je transportérem nukleosidů a jejich analogů, působících jako cytostatika. S těmito závěry souhlasí i výsledky většiny studií, které rovněž našly zvýšené exprese jak genu, tak proteinu SLC29A1 v nádorové tkáni kolorekta oproti tkáni zdravé (Goh et al., 1995;

Kitahara et al., 2001; Pennycooke et al., 2001). Funkce tohoto genu z hlediska 5-FU však není zcela jasná. Otázkou zůstává, zdali zvýšené hladiny tohoto transportéru v nádorech mohou přispívat k lepší odpovědi na léčbu v důsledku vyššího transportu 5-FU do buňky. V případě prekursoru 5-FU kapecitabinu byl takový efekt zaznamenán na nádorových buňkách prsu (Maceky et al., 2002). V případě léčby 5-FU však takový vztah zaznamenán nebyl nebo dokonce tkáně s vyšší expresí vykazovaly sníženou citlivost k 5-FU (Farrell et al., 2009; Yoshinare et al., 2003). Vysvětlením opačných vztahů by mohl být vyšší transport tymidinu do buňky z důvodu ochrany nádorové buňky před buněčnou smrtí (Yoshinare et al., 2003). Výsledky naší studie však nejsou v souladu se závěry zmíněných studií. Zvýšená hladina exprese tohoto transportéru byla zaznamenána v nádorové tkáni u pacientů z adjuvantního souboru, kteří odpovídali na léčbu. Tedy takové výsledky hovoří pro opačný vztah, který dosud nebyl prokázán. Zvýšená exprese by mohla být prediktorem lepší odpovědi. Vzhledem k nejasným vztahům mezi *SLC29A1* a léčbou využívající 5-FU jsou potřeba další studie hodnotící vztah hladin mRNA tohoto transportéru v tkáních kolorekta a zejména jejich vztah k výsledku léčby a prognóze pacientů.

Dalším významně deregulovaným genem nalezeným v této studii byl gen pro ribonukleotid reduktázu *RRM2*. Tento enzym se nachází v jedné z cest 5-FU vedoucích k aktivním metabolitům. Tato studie našla významně zvýšenou expresi genu *RRM2* v nádorové tkáni v obou souborech. S takovým závěrem souhlasí i výsledky studie, kde byly rovněž nalezeny vysoké hladiny exprese *RRM2* v nádorové tkáni u pacientů s KRK (Kidd et al., 2005).

Zvýšené hladiny exprese tohoto genu by měly vést k lepší odpovědi na léčbu 5-FU v důsledku vyšší dostupnosti aktivních metabolitů. Na základě aktivity *RRM2* enzymu byl takový vztah nalezen (Fukushima et al., 2001). Údaje o vlivu hladin mRNA *RRM2* na účinnost léčby pomocí 5-FU jsou však méně kompletní. Studie hodnotící odpověď na adjuvantní léčbu obsahující 5-FU nenalezla žádný vztah (Nobili et al., 2011). Naše studie tyto výsledky potvrdila

Významná deregulace byla nalezena i v případě genu *PPAT*, který vykazoval rovněž zvýšenou expresi v nádorové tkáni v obou souborech. Ohledně exprese *PPAT* a jejího vlivu na léčbu cytostatiky v nádorových tkáních existují pouze omezená data. Při inhibici tohoto enzymu byla zaznamenána lepší odpověď na léčbu 5-FU (Meta-analysis of randomized trials, 1994). Výsledky naší studie jsou však s takovými závěry v rozporu. Vysoké hladiny exprese *PPAT* byly nalezeny v nádorové tkáni u pacientů z adjuvantního souboru, kteří lépe odpovídali na léčbu. Lze tedy uvažovat o nově nalezeném vztahu, kdy

zvýšená exprese *PPAT* vede k lepší odpovědi na léčbu. Vzhledem ke konfliktním datům a malému množství informací o jejich možném efektu na léčbu 5-FU je tento gen rovněž vhodným kandidátem pro další studie.

Hlavními geny, na které je v poslední době výzkum zaměřen jako na potencionální markery v predikci odpovědi na léčbu 5-FU u KRK, jsou *DPYD*, *TYMP* a *TYMS*. Tyto geny bývají hodnoceny společně a v mnoha studiích byla popsána významná korelace jak s prognózou, tak s odpovědí na léčbu (Salonga et al., 2000; Soong et al., 2008)

V této studii však nebyla prediktivní role žádného z těchto genů potvrzena. V případě posouzení odpovědi na léčbu nebyl jednoznačně identifikován žádný gen, který by mohl sloužit jako prediktivní marker odpovědi na léčbu 5-FU. V paliativním souboru vykazoval gen *RRM1* zvýšenou expresi ve zdravé tkáni u pacientů lépe odpovídajících na léčbu. U adjuvantně léčených pacientů byla nalezena významně zvýšená exprese *PPAT* a *SLC29A1* v nádorové tkáni u pacientů dobře odpovídajících na léčbu oproti pacientům, u nichž léčba selhala. Společná analýza obou souborů ukázala jako možného kandidáta pro predikci odpovědi pouze gen *RRM2*. Jeho zvýšené hodnoty exprese ve zdravé tkáni poukazovaly na lepší odpověď na léčbu. Ačkoliv v tomto případě se možný vztah pohyboval pouze na hranici významnosti.

O vlivu exprese podjednotek ribonukleotid reduktázy na účinnost léčby 5-FU u pacientů s KRK existuje pouze velmi málo informací. Zvýšená enzymatická aktivita ribonukleotid reduktázy v nádorové tkáni byla spojována se zvýšenou citlivostí k 5-FU (Fukushima et al., 2001, Kubota et al., 2002). Opačné výsledky však byly nalezeny v případě hodnocení genové exprese, kde zvýšené hladiny *RRM1* v tumoru korelovaly s horší odpovědí na adjuvantní léčbu (Nobili et al., 2011). Žádná z těchto studií však nehodnotila hladiny exprese ve zdravé tkáni ve vztahu k odpovědi na léčbu 5-FU.

Analýza exprese ve vztahu ke klinickým datům našla několik významných genů. Nejvýznamnějšími se zdají být *PPAT* a *UCK2*, jejichž zvýšené exprese významně korelovaly s nepříznivou prognózou onemocnění. Vyšší exprese těchto enzymů byly nalezeny u pacientů s metastatickým postižením (M1) léčených paliativně v porovnání s pacienty léčenými adjuvantně (M0). Významně zvýšená exprese byla zaznamenána rovněž u genu *SLC29A1*. Ve vztahu k lokalizaci nádoru vykazoval vysoké hladiny *UCK2* v případě karcinomu rekta. Při porovnání léčebných režimů vykazoval vyšší hladiny exprese *PPAT* u pacientů léčených režimem FOLFOX. Tyto vztahy opět korelují

s prognózou pacientů, protože metastaticky postižení pacienti měli významně častěji karcinom rekta a dostávali nevýznamně častěji agresivnější chemoterapii FOLFOX (a logicky byli léčeni paliativně).

Ohledně genu *PPAT* existuje omezené množství informací. Vztahy k prognóze pacientů s KRK nebyly dosud popsány. Korelace tohoto genu s horší prognózou může být důsledkem primární funkce tohoto enzymu. Tento enzym je prvním enzymem v de novo syntéze purinů. Zvýšení jeho aktivity může vést ke zvýšené dostupnosti purinových nukleotidů a poskytovat tak výhody pro růst nádoru. Takových závěrů bylo dosaženo i ve studii hodnotící aktivitu enzymu na nádorových tkáních ledvin na myším modelu (Prajda et al., 1979).

V podobné situaci je i gen *UCK2*, který rovněž koreluje s horší prognózou. Dostupné informace o tomto genu a jeho možné prognostické roli jsou minimální. Existující studie, které hodnotí aktivitu enzymu uridin-cytidin kinázy ve vztahu ke klinickým datům u kolorekta nejsou v souladu s výsledky této studie. Nebyly totiž nalezeny žádné vztahy mezi hladinou enzymu a stádiem nemoci nebo lokalizací primárního nádoru (Ahmed et al., 1981; Finan et al., 1984). Tento enzym se nachází v cestě vedoucí k syntéze pyrimidinů. Zvýšená syntéza by pak mohla poskytnout podmínky vhodné pro růst nádoru a přispívat k horší prognóze.

Na druhou stranu, jak *PPAT* tak i *UCK2* aktivují kromě klasických pyrimidinů i 5-FU čímž mohou paradoxně přispívat k poškození nádorových buněk. Role zvýšené exprese těchto genů tak může hrát v nádorovém procesu ambivalentní roli, kterou je třeba dalším výzkumem jasně definovat. Další studie by měly být zaměřeny na tyto dva geny *PPAT* a *UCK2* pro vyjasnění jejich prognostické role.

Tato studie byla součástí komplexního projektu sledujícího expresi desítek genů metabolismu, transportu a cílů nejčastěji používaných cytostatik v léčbě KRK. V rámci této části studie bylo pozorováno několik významných vztahů. Většina z nich byla objevena u genů, jejichž prognostické nebo prediktivní role nebyly v literatuře dosud popsány nebo potvrzeny. V tomto ohledu jsou výsledky studie unikátní a přináší nový pohled na genetický profil pacientů s KRK s léčebným režimem na bázi 5-FU. Rovněž soubor vybraných pacientů byl unikátní, neboť nepodléhal vlivu žádné předchozí chemoterapie a pacienti byli léčeni jednotnými režimy na bázi 5-FU. Přestože v prognostické i prediktivní roli se mohou uplatňovat i další geny, tato studie poskytla širší pohled na dráhy cytostatika 5-FU vzhledem k tomu, že byla zaměřena, na rozdíl od

existující literatury, na hodnocení většího množství genů. Vzhledem k dosaženým výsledkům lze doporučit pro další sledování geny *PPAT*, *SLC29A1*, *UCK2* a *RRM1/2* ve vztahu k prognóze onemocnění a pro analýzu predikce účinnosti terapie režimy obsahujícími 5-FU.

7. ZÁVĚR

Pacienti s kolorektálním karcinomem vykazují velkou interindividuální variabilitu v odpovědi na léčbu 5-FU. Projevem selhání chemoterapie je rezistence k lékům nebo naopak závažná toxicita, která může vést k přerušení léčby. Takovéto rozdíly jsou, mimo jiné, vysvětlovány odlišnou genetickou výbavou jedince. V současné době stoupá potřeba zavedení molekulárních markerů, které by byly schopné vypovídat o prognóze průběhu onemocnění a předpovídat reakci na léčbu.

Tato studie byla zaměřena na hodnocení genové exprese 14 potenciálních molekulárních markerů zapojených do drah 5-FU zahrnujících metabolismus, transport a cíle tohoto léku. Do studie byli vybráni pacienti léčení režimy na bázi 5-FU. Byly definovány dva soubory pacientů, kteří byli léčení paliativní nebo adjuvantní chemoterapií, tj. pacienti s odlišnou prognózou.

Pro zhodnocení exprese genů byla použita metoda RT-PCR. Porovnány byly hladiny exprese mezi zdravou a nádorovou tkání a mezi pacienty odpovídajícími a neodpovídajícími na léčbu. Zjištěná data byla následně vztažena ke klinickým datům.

Paliativní soubor pacientů vykazoval 6 významně deregulovaných genů. Výsledky byly ověřeny na nezávislém souboru pacientů léčených adjuvantní chemoterapií.

Mezi geny s nízkou expresí v tumoru patřily katabolické geny DPYD a UPB1 a rovněž aktivační gen UCK1. Významně vysoké hladiny v nádoru oproti tkáni zdravé vykazovaly geny PPAT, RRM2 a SLC29A1, zahrnuté v dráhách vedoucích k aktivním metabolitům 5-FU. V této studii se nepodařilo jednoznačně identifikovat gen s prediktivní funkcí s ohledem na výsledek terapie. V případě paliativního souboru byly nalezeny vysoké hladiny exprese aktivačního genu RRM1 ve zdravé tkáni u pacientů odpovídajících na léčbu. Při společném zhodnocení se takovému vztahu blížil rovněž aktivační gen RRM2. V adjuvantním souboru byly nalezeny naopak významně zvýšené hladiny exprese genů PPAT a SLC29A1 v nádorové tkáni u pacientů lépe odpovídajících na léčbu.

Ve vztahu ke klinickým datům byly jako nejvýznamnější identifikovány geny PPAT a UCK2, jejichž zvýšená exprese korelovala s horší prognózou. Rovněž vysoké hladiny transportéru SLC29A1 vykazovaly korelaci s nepříznivou prognózu onemocnění.

Tato studie poskytla pohled na expresní profil pacientů s kolorektálním karcinomem. Podařilo se identifikovat potencionální prognostické markery nikoliv však prediktivní. Nalezené významně deregulované geny by měly být předmětem dalších ověřovacích studií, kde by měl být zkoumán mechanismus nalezených vztahů pomocí

analýzy genotypu, epigenetických faktorů (např. methylace) a proteinových produktů identifikovaných markerů. Výsledky této studie by tak mohly přispět k zacílení klinických stádií a zavedení markerů pro individualizaci léčby, která by maximalizovala účinky chemoterapie a minimalizovala její toxické projevy.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin J-P, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, Sistonen P, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. 1994. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Research* 54: 1645-1648

Ahmed NK, Haggitt RC, Welch AD. 1981. Preliminary studies of the uridine kinase activity of human colorectal adenocarcinomas. *Cancer* 48: 1200-1206

Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. 1997. Germline mutation of the hMSH6/GTBP in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Research* 57: 3920-3923

Alexander DD, Miller AJ, Cushing CA, Lowe KA. 2010. Processed meat and colorectal cancer: a quantitative review of prospective epidemiologic studies. *European Journal of Cancer Prevention* 19: 328-341

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. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26: 1626-1634

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 350: 2343-2351

Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter “RASCAL” study. *Journal of the National Cancer Institute* 90: 675–684

Ashktorab H, Smoot DT, Carethers JM, Rahmanian M, Kittles R, Vosgian G, Doura M, Nidhiry E, Naab T, Momen B, Shakhani S, Giardiello FM. 2003. High incidence of microsatellite instability in colorectal cancer from African Americans. *Clinical Cancer Research* 9: 1112-1117

Astler VB, Coller FA. 1954. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Annals of Surgery* 139: 846-852

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. 1990. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Research* 50: 7717–7722

Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 447: 735-743

Benson AB III, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG. 2004. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22: 3408-3419

Bisgaard ML, Fenger K, Bülow S, Niebuhr E, Mohr J. 1994. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Human Mutation* 3: 121-125

Bocci G, Danesi R, Di Paolo AD, Innocenti F, Allegrini G, Falcone A, Melosi A, Battistoni M, Barsanti G, Conte PF, Del Tacca M. 2000. Comparative pharmacokinetic analysis of 5-fluorouracil and its major metabolite 5-fluoro-5,6-dihydrouracil after conventional and reduced test dose in cancer patients. *Clinical Cancer Research* 6:3032-3037

Bond JH. 2000. Clinical evidence for the adenoma-carcinoma sequence, and the management of patients with colorectal adenomas. *Seminars in Gastrointestinal Disease* 11: 176-184

Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC. 2006. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 355: 1114-1123

Brayton KA, Chen Z, Zhou G, Nagy PL, Gavalas A, Trent JM, Deaven LL, Dixon JE, Zalkin H. 1994. Two genes for de novo purine nucleotide synthesis on human chromosome 4 are closely linked and divergently transcribed. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 5313-5321

Cadman E, Heimer R, Benz C. 1981. The influence of methotrexate pretreatment on 5-fluorouracil metabolism in L1210 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 1695-1704

Calvert PM, Frucht H. 2002. The genetics of colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine* 137: 603-612

Cao D, Russell RL, Zhang D, Leffert JJ, Pizzorno G. 2002. Uridine phosphorylase (-/-) murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of fluoropyrimidines. *Cancer Research* 62: 2313-2317

Carreras CW, Santi DV. 1995. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annual Review of Biochemistry* 64: 721-762

Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE. 2005. Meat Consumption And Risk Of Colorectal Cancer. *The Journal of the American Medical Association* 293: 172-182

Chen CD, Yen MF, Wang WM, Wong JM, Chen TH. 2003. A case-cohort study for the disease natural history of adenoma-carcinoma and de novo carcinoma and surveillance of

colon and rectum after polypectomy: implication for efficacy of colonoscopy. *British Journal of Cancer* 88: 1866-1873

Chen Y, Ying M, Chen Y, Hu M, Lin Y, Chen D, Li X, Zhang M, Yun X, Zhou J, He E, Skog S. 2010. Serum thymidine kinase 1 correlates to clinical stages and clinical reactions and monitors the outcome of therapy of 1,247 cancer patients in routine clinical settings. *International Journal of Clinical Oncology* 15: 359-368

Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. 2007. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *The New England Journal of Medicine* 356: 1545-1559

Coe IR, Griffiths M, Young JD, Baldwin SA, Cass CE. 1997. Assignment of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) to 6p21.1-p21.2. *Genomics* 45: 459-460

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. 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 351: 337-345

de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouché O, Etienne PL, Morvan F, Louvet C, Guillot T, François E, Bedenne L. 1997. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *Journal of Clinical Oncology* 15: 808-815

de Gramont A, Figier A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 18: 2938-2947

de la Chapelle A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 4: 769-780

de la Chapelle A. 2005. The incidence of Lynch syndrome. *Familial Cancer* 4: 233-237

Delaunoy T, Alberts SR, Sargent DJ, Green E, Goldberg RM, Krook J, Fuchs C, Ramanathan RK, Williamson SK, Morton RF, Findlay BP. 2005. Chemotherapy permits resection of metastatic colorectal cancer: experience from Intergroup N9741. *Annals of Oncology* 16: 425-429

Denton JE, Lui MS, Aoki T, Sebolt J, Takeda E, Eble JN, Glover JL, Weber G. 1982. Enzymology of pyrimidine and carbohydrate metabolism in human colon carcinomas. *Cancer Research* 42: 1176-1183

Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guinó E, Pareja L, Figueras A, Molleví DG, Serrano T, de Oca J, Peinado MA, Moreno V, Germà JR, Capellá G, Villanueva A. 2006. Tumor thymidylate synthase 1494del6

genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *Journal of Clinical Oncology* 24: 1603–1611

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041-1047

Dusseau C, Murray GI, Keenan RA, O'Kelly T, Krokan HE, McLeod HL. 2001. Analysis of uracil DNA glycosylase in human colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 18: 393-399

Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. 1995. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT). *Lancet* 345: 939-944

Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. 1999. *Journal of Clinical Oncology* 17: 1356-1363

Enomoto A, Takeda M, Shimoda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T, Endou H. 2002. Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301: 797-802

Eriksson S, Martin DW Jr. 1981. Ribonucleotide reductase in cultured mouse lymphoma cells. Cell cycle-dependent variation in the activity of subunit protein M2. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 9436-9440

Erisman MD, Rothberg PG, Diehl RE, Morse CC, Spandorfer JM, Astrin SM. 1985. Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Molecular and Cellular Biology* 5: 1969-1976

Evrard A, Cuq P, Ciccolini J, Vian L, Cano JP. 1999. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *British Journal of Cancer* 80: 1726-1733

Fairbanks LD, Rückemann K, Qiu Y, Hawrylowicz CM, Richards DF, Swaminathan R, Kirschbaum B, Simmonds HA. 1999. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? *The Biochemical Journal* 342: 143-152

Fain PR, Solomon E, Ledbetter DH. 1991. Second international workshop on human chromosome 17. *Cytogenetics and Cell Genetics* 57: 66-77

Fanciullino R, Evrard A, Cuq P, Giacometti S, Peillard L, Mercier C, Aubert C, Milano G, Ciccolini J. 2006. Genetic and biochemical modulation of 5-fluorouracil through the overexpression of thymidine kinase: an in-vitro study. *Anticancer Drugs* 17: 463-470

Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, Abrams R, Benson AB, Macdonald J, Cass CE, Dicker AP, Mackey JR. 2009. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 136: 187-195

Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767

Fidlerova J, Kleiblova P, Bilek M, Kormunda S, Formankova Z, Novotny J, Kleibl Z. 2010. Contribution of dihydropyrimidinase gene alterations to the development of serious toxicity in fluoropyrimidine-treated cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 65: 661-669

Finan PJ, Koklitis PA, Chisholm EM, Giles GR. 1984. Comparative levels of tissue enzymes concerned in the early metabolism of 5-fluorouracil in normal and malignant human colorectal tissue. *British Journal of Cancer* 50: 711-715

Fenoglio CM, Lane N. 1974. The anatomical precursor of colorectal carcinoma. *Cancer* 34: 819-823

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038

Fox SB, Moghaddam A, Westwood M, Turley H, Bicknell R, Gatter KC, Harris AL. 1995. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *The Journal of Pathology* 176: 183-190

Fukushima M, Fujioka A, Uchida J, Nakagawa F, Takechi T. 2001. Thymidylate synthase (TS) and ribonucleotide reductase (RNR) may be involved in acquired resistance to 5-fluorouracil (5-FU) in human cancer xenografts in vivo. *European Journal of Cancer* 37: 1681-1687

Fukushima M, Morita M, Ikeda K, Nagayama S. 2003. Population study of expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in patients with solid tumors. *International Journal of Molecular Medicine* 12: 839-844

Ghoshal K, Jacob ST. 1994. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Research* 54: 632-636

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Letourneau Y, Coudert B, Bertheaut-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam R, Misset JL, Lévi F. 2000. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 18: 136-147

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB. 2007. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal

cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology* 25: 1539-1544

Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, Benedetti J, Francini G, Shepherd LE, Francois Seitz J, Labianca R, Chen W, Cha SS, Heldebrant MP, Goldberg RM. 2004. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *Journal of Clinical Oncology* 22: 1797-1806

Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, Funel N, Nannizzi S, Ricci S, Orlandini C, Boggi U, Campani D, Del Chiaro M, Iannopollo M, Bevilacqua G, Mosca F, Danesi R. 2006. Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Research* 66: 3928-3935

Giovannucci E. 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 10: 725-731

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. 1994. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Annals of Internal Medicine* 121: 241-246

Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M, Ponz de Leon M, Anselmi L, Mareni C, Bruzzi P, Varesco L. 2004. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *International Journal of Cancer* 109: 680-684

Goh LB, Mack P, Lee CW. 1995. Nitrobenzylthioinosine-binding protein overexpression in human breast, liver, stomach and colorectal tumour tissues. *Anticancer Research* 15: 2575-2579

Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. 2004. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 447: 728-734

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. 2002. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. 2000. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 342: 69-77

Gustavsson B, Kaiser C, Carlsson G, Wettergren Y, Odin E, Lindskog EB, Niyikiza C, Ma D. 2009. Molecular determinants of efficacy for 5-FU-based treatments in advanced colorectal cancer: mRNA expression for 18 chemotherapy-related genes. *International Journal of Cancer* 124: 1220-1226

Hamajima N, Matsuda K, Sakata S, Tamaki N, Sasaki M, Nonaka M. 1996. A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution. *Gene* 180: 157-163

- Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. 1987.** Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Research* 47: 2203-2206
- Herzfeld A, Raper SM. 1979.** Uridine kinase activities in developing, adult and neoplastic rat tissues. *The Biochemical Journal* 182: 771-778
- Ho DH, Townsend L, Luna MA, Bodey GP. 1986.** Distribution and inhibition of dihydrouracil dehydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as a substrate. *Anticancer Research* 6: 781-784
- Hoff PM, Lassere Y, Pazdur R. 1999.** Tegafur/uracil + calcium folinate in colorectal cancer: double modulation of fluorouracil. *Drugs* 58: 77-83
- Houghton JA, Tillman DM, Harwood FG. 1995.** Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clinical Cancer Research* 1: 723-30
- Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, Sasaki Y, Hirayama R. 2006.** Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clinical Cancer Research* 12: 3928-3934
- Ishii R, Takiguchi N, Oda K, Koda K, Miyazaki M. 2001.** Thymidine phosphorylase expression is useful in selecting adjuvant chemotherapy for stage III gastric cancer. *International Journal of Oncology* 19: 717-722
- Ikeda K, Yoshisue K, Matsushima E, Nagayama S, Kobayashi K, Tyson CA, Chiba K, Kawaguchi Y. 2000.** Bioactivation of tegafur to 5-fluorouracil is catalyzed by cytochrome P-450 2A6 in human. *Clinical Cancer Research* 6: 4409-4415
- Iltzsch MH, el Kouni MH, Cha S. 1985.** Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry* 24: 6799-6807
- Iyer RB, Silverman PM, DuBrow RA, Charnsangavej C. 2002.** Imaging in the diagnosis, staging, and follow-up of colorectal cancer. *American Journal of Roentgenology* 179: 3-13
- Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. 2005.** Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *Journal of Clinical Oncology* 23: 1365-9
- Johansson M. 2003.** Identification of a novel human uridine phosphorylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 41-46
- Johnston SJ, Ridge SA, Cassidy J, McLeod HL. 1999.** Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 5: 2566-2570

Kanzaki A, Takebayashi Y, Bando H, Eliason JF, Watanabe Si S, Miyashita H, Fukumoto M, Toi M, Uchida T. 2002. Expression of uridine and thymidine phosphorylase genes in human breast carcinoma. *International Journal of Cancer* 97: 631-635

Kawakami K, Salonga D, Park JM, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. 2001 Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clinical Cancer Research* 7: 4096-4101

Kawakami K, Watanabe G. 2003. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Research* 63: 6004–6007

Kawamura K, Takiguchi N, Wada A, Takenobu H, Kimura H, Soda H, Nagata M, Asano T, Tagawa M. 2006. Up-regulated expression of the uridine phosphorylase gene in human gastric tumors is correlated with a favorable prognosis. *Anticancer Research* 26: 4647-4651

Ke PY, Chang ZF. 2004. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24: 514-526

Kidd EA , Yu J, Li X, Shannon WD, Watson MA, McLeod HL. 2005. Variance in the expression of 5-Fluorouracil pathway genes in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 2612-2619

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. 1994. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *The American Journal of Pathology* 145: 148-156

Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Tsunoda T. 2001. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Research* 61: 3544-3549

Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. 2005. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 573-578

Kohoutová M, Štekrová J, Šulová M, Zídková K, Kleibl Z, Vandrovcová J, Kebrdlová V, Kotlas J, Jirásek V. 2006. Hereditary Colorectal Adenomatous Polyposis Syndromes. *Časopis lékařů českých* 145: 475-479

Kok LD, Siu SS, Fung KP, Tsui SK, Lee CY, Waye MM. 2000. Assignment of liver-specific organic anion transporter (SLC22A7) to human chromosome 6 bands p21.2-->p21.1 using radiation hybrids. *Cytogenetics and Cell Genetics* 88: 76-77

Kralovánszky J, Köves I, Orosz Z, Katona C, Tóth K, Rahóty P, Czeglédi F, Kovács T, Budai B, Hullán L, Jeney A. 2002. Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 62: 167-174

Kubota T, Watanabe M, Otani Y, Kitajima M, Fukushima M. 2002. Different pathways of 5-fluorouracil metabolism after continuous venous or bolus injection in patients with colon carcinoma: possible predictive value of thymidylate synthetase mRNA and ribonucleotide reductase for 5-fluorouracil sensitivity. *Anticancer Research* 22: 3537-3540

Laken SJ, Petersen GME, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nature Genetics* 17: 79-83

Lassmann S, Tang L, Capanu M, Brabletz T, Schöpflin A, Zur Hausen A, Gonen M, Kemeny N, Shia J, Klimstra D, Werner M. 2007. Predictive molecular markers for colorectal cancer patients with resected liver metastasis and adjuvant chemotherapy. *Gastroenterology* 133: 1831-1839

Lembersky BC, Wieand HS, Petrelli NJ, O'Connell MJ, Colangelo LH, Smith RE, Seay TE, Giguere JK, Marshall ME, Jacobs AD, Colman LK, Soran A, Yothers G, Wolmark N. 2006. Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *Journal of Clinical Oncology* 24: 2059-2064

Lenz HJ, Manno DJ, Danenberg KD, Danenberg PV. 1994. Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursor splicing. *The Journal of biological Chemistry* 269: 31962–31968

Lipská L, Visokai V. 2009. *Recidiva kolorektálního karcinomu. Komplexní přístup z pohledu chirurga.* Praha: Grada

Liu M, Cao D, Russell R, Handschumacher RE, Pizzorno G. 1998. Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorylase activity in selected human tumors. *Cancer Research* 58: 5418-5424

Lu Z, Zhang R, Diasio R. 1993. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research* 53: 5433-5438

Luccioni C, Beaumatin J, Bardot V, Lefrançois D. 1994. Pyrimidine nucleotide metabolism in human colon carcinomas: comparison of normal tissues, primary tumors and xenografts. *International Journal of Cancer* 58: 517-522

Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, Lanspa S, Cavalieri J, Lynch J, Slominski-Castor S, Cayouette MC, Priluck I, Luce MC. 1995. Attenuated familial adenomatous polyposis

- (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 76: 2427-2433
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. 1993.** Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104: 1535-1549
- Mackey JR, Jennings LL, Clarke ML, Santos CL, Dabbagh L, Vsianska M, Koski SL, Coupland RW, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. 2002.** Immunohistochemical variation of human equilibrative nucleoside transporter 1 protein in primary breast cancers. *Clinical Cancer Research* 8: 110-116
- Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE. 1998.** Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Research* 58: 4349-4357
- Malet-Martino M, Jolimaitre P, Martino R. 2002.** The prodrugs of 5-fluorouracil. *Current Medicinal Chemistry. Anti-cancer Agents* 2: 267-310
- Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, Ladner RD. 2003.** A novel single nucleotide polymorphism within the 50 tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Research* 63: 2898-2904
- Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, Lenz HJ, Ladner RD. 2004.** A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 14: 319-327
- Marcuello E, Altes A, Del RE, César A, Menoyo A, Baiget M. 2004.** Single nucleotide polymorphism in the 50 tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* 112: 733-737
- Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL. 1999.** Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 58: 310-312
- Mathew A, Peters U, Chatterjee N, Kulldorff M, Sinha R. 2004.** Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. *International Journal of Cancer* 108: 287-292
- Matsuura T, Kuratate I, Teramachi K, Osaki M, Fukuda Y, Ito H. 1999.** Thymidine phosphorylase expression is associated with both increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human colorectal carcinomas. *Cancer Research* 59: 5037-5040
- McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K, Koruth M, Cassidy J. 1998.** Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *British Journal of Cancer* 77: 461-465

McMurrugh J, McLeod HL. 1996. Analysis of the dihydropyrimidine dehydrogenase polymorphism in a British population. *British Journal of Clinical Pharmacology* 41: 425-427

Meropol NJ, Gold PJ, Diasio RB, Andria M, Dhami M, Godfrey T, Kovatich AJ, Lund KA, Mitchell E, Schwarting R. 2006. Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 24: 4069-4077

Meta-analysis of randomized trials testing the biochemical modulation of fluorouracil by methotrexate in metastatic colorectal cancer. 1994. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. *Journal of Clinical Oncology* 12: 960-969

Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, Lenz HJ, Groshen S, Leichman L, Danenberg PV. 1998. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clinical Cancer Research* 4: 2371-2376

Michels KB, Giovannucci E, Joshipura KJ, Rosner BA, Stampfer MJ, Fuchs CS, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. 2000. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1740-1752

Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. 1998. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *European Journal of Cancer* 34: 1274-1281

Miyashita H, Takebayashi Y, Eliason JF, Fujimori F, Nitta Y, Sato A, Morikawa H, Ohashi A, Motegi K, Fukumoto M, Mori S, Uchida T. 2002. Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 94: 2959-2966

Molina-Arcas M, Moreno-Bueno G, Cano-Soldado P, Hernández-Vargas H, Casado FJ, Palacios J, Pastor-Anglada M. 2006. Human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) is required for the transcriptomic response of the nucleoside-derived drug 5'-DFUR in breast cancer MCF7 cells. *Biochemical Pharmacology* 72: 1646-1656

Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Laine-Cessac P, Gamelin E. 2007. Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a patient with a lethal outcome following 5-fluorouracil administration and the determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. *Clinical Biochemistry* 40: 11-17

Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S., Gamelin E. 2006. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 2895-2904

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. 2000. Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. *International Journal of Oncology* 17: 33-38

Morita T, Matsuzaki A, Suzuki K, Tokue A. 2001. Role of thymidine phosphorylase in biomodulation of fluoropyrimidines. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2: 257-267

Mueller JD, Bethke B, Stolte M. 2002. Colorectal de novo carcinoma: a review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Archiv* 440: 453-460

Muto T, Bussey HJ, Morson BC. 1975. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36: 2251-2270

Myers SN, Goyal RK, Roy JD, Fairfull LD, Wilson JW, Ferrell RE. 2006. Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenetics and Genomics* 16: 315-320

Naguib FN, el Kouni MH, Cha S. 1985. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Research* 45: 5405-5412

Nanda K, Bastian LA, Hasselblad V, Simel DL. 1999. Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology* 93: 880-888

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P, Markham A, Krush AJ, Petersen G, Hamilton SR, Nilbert MC, Levy DB, Bryan TM, Preisinger AC, Smith KJ, Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665-669

Nobili S, Napoli C, Landini I, Morganti M, Cianchi F, Valanzano R, Tonelli F, Cortesini C, Mazzei T, Mini E. 2011. Identification of potential pharmacogenomic markers of clinical efficacy of 5-fluorouracil in colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 128: 1935-1945

O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, Dickersin GR, Ewing S, Geller S, Kasimian D. 1990. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 98: 371-379

Obrand DI, Gordon PH. 1998. Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. *The British Journal of Surgery* 85: 246-248

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. 2004. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute* 96: 1420-1425

Ochiai T, Nishimura K, Noguchi H, Kitajima M, Tsuruoka Y, Takahashi Y, Tsukada A, Watanabe E, Nagaoka I, Futagawa S. 2006. Prognostic impact of orotate phosphoribosyl transferase activity in resectable colorectal cancers treated by 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Journal of Surgical Oncology* 94: 45-50

Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H, Ozasa H, Sato S, Shimizu S, Yamazaki H, Eimoto T, Ueda R. 2007. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* 256: 112-119

Ono M. 2008. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Science* 99: 1501-1506

Osato DH, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Wang J, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM 2003. Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics* 13: 297-301

Ozaki K, Kuroki T, Hayashi S, Nakamura Y. 1996. Isolation of three testis-specific genes (TSA303, TSA806, TSA903) by a differential mRNA display method. *Genomics* 36: 316-319

Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Hamilton SR, Petersen GM, Watson P, Lynch HT, Peltomaki P, Mecklin JP, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. 1994. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263: 1625-1629

Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J, Romero A, Machiavelli M, De Lena M, Allegra CJ, Johnston PG. 2000. Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer* 82: 560-567

Peters GJ, van Groeningen CJ, Laurensse EJ, Pinedo HM. 1991. A comparison of 5-fluorouracil metabolism in human colorectal cancer and colon mucosa. *Cancer* 68: 1903-1909

Peters GJ, van der Wilt CL, van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM. 1994. Thymidilate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *Journal of Clinical Oncology* 12: 2035-2042

Pennycooke M, Chaudary N, Shuralyova I, Zhang Y, Coe IR. 2001. Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 951-959

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10

Pitterle DM, Kim YC, Jolicoeur EM, Cao Y, O'Briant KC, Bepler G. 1999. Lung cancer and the human gene for ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1). *Mammalian Genome* 10: 916-922

Prajda N, Morris HP, Weber G. 1979. Glutamine-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (amidophosphoribosyltransferase, EC 2.4.2.14) activity in normal, differentiating, and neoplastic kidney. *Cancer Research* 39: 3909-3914

Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. 2001. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *The Pharmacogenomics Journal* 1: 65-70

Qumsiyeh MB, Valentine MB, Suttle DP. 1989. Localization of the gene for uridine monophosphate synthase to human chromosome region 3q13 by in situ hybridisation. *Genomics* 5: 160-162

Roberts SA, Hyatt DC, Honts JE, Changchien L, Maley GF, Maley F, Montfort WR. 2006. Structure of the Y94F mutant of Escherichia coli thymidylate synthase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Bioogy and Crystallization Communications* 62: 840-843

Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP. 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3352-3357

Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T. 2000. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 88: 42-49

Sakamoto T, Fujimoto Sakata S, Matsuda K, Horikawa Y, Tamaki, N. 2001. Expression and properties of human liver β -ureidopropionase. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 47: 132-138 in van Kuilenburg AB, Meinsma R, Beke E, Assmann B, Ribes A, Lorente I, Busch R, Mayatepek E, Abeling NG, van Cruchten A, Stroomer AE, van Lenthe H, Zoetekouw L, Kulik W, Hoffmann GF, Voit T, Wevers RA, Rutsch F, van Gennip AH. 2004. beta-Ureidopropionase deficiency: an inborn error of pyrimidine degradation associated with neurological abnormalities. *Human Molecular Genetics* 13: 2793-2801

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

Santi DV, Hardy LW. 1987. Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-) methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26: 8599-8606

Schüller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. 2000. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 45: 291-297

Seifert B, Král N, Dušek L, Suchánek Š, Zavoral M. 2009. Screening kolorektálního karcinomu v roce 2009. *Practicus* 3: 42-45

Shen F, Look KY, Yeh YA, Weber G. 1998. Increased uridine kinase (ATP: uridine 5'-phosphotransferase; EC 2.7.1.48) activity in human and rat tumors. *Cancer Biochemistry Biophysics* 16: 1-15

Shin A, Kim J. 2010. Effect modification of meat intake by genetic polymorphisms on colorectal neoplasia susceptibility. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 11: 281-287

Shimamoto Y, Koizumi K, Okabe H, Kazuno H, Murakami Y, Nakagawa F, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M. 2002. Sensitivity of human cancer cells to the new anticancer ribo-nucleoside TAS-106 is correlated with expression of uridine-cytidine kinase 2. *Japanese Journal of Cancer Research* 93: 825-833

Sobin LH, Wittekind Ch. 2004. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů, 6. vydání.* Česká verze. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Praha

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. 2008. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Annals of Oncology* 19: 915-919

Stenman G, Sahlin P, Dumanski JP, Hagiwara K, Ishikawa F, Miyazono K, Collins VP, Heldin CH. 1992. Regional localization of the human platelet-derived endothelial cell growth factor (ECGF1) gene to chromosome 22q13. *Cytogenetics and Cell Genetics* 59: 22-23

Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science* 95: 290-299

Sumi S, Imaeda M, Kidouchi K, Ohba S, Hamajima N, Kodama K, Togari H, Wada Y. 1998. Population and family studies of dihydropyrimidinuria: prevalence, inheritance mode, and risk of fluorouracil toxicity. *American Journal of Medical Genetics* 78: 336-340

Sun W, Wu RR, van Poelje PD, Erion MD. 2001. Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283: 417-422

Suttle DP, Bugg BY, Winkler JK, Kanalas JJ. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 1754-1758

Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. 1996a. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 88: 1110-1117

Takebayashi Y, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Furukawa T, Kinoshita F, Aoki D, Okumura H, Yamada Y, Akiyama S, Aikou T. 1996b. The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumours. *European Journal of Cancer* 32: 1227-1232

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

Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB. 2008. Genetic regulation of beta-ureidopropionase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenetics and Genomics* 2008 18: 25-35

Toriola AT, Kurl S, Laukanen JA, Mazengo C, Kauhanen J. 2008. Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study. *European Journal of Epidemiology* 23: 395-401

Tsujie M, Nakamori S, Nakahira S, Takahashi Y, Hayashi N, Okami J, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. 2007. Human equilibrative nucleoside transporter 1, as a predictor of 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer. *Anticancer Research* 27: 2241-2249

Tsunoda A, Nakao K, Watanabe M, Matsui N, Ooyama A, Kusano M. 2011. Associations of various gene polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients receiving oral uracil and tegafur plus leucovorin: a prospective study. *Annals of Oncology* 22: 355-361

Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. 1967. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Annals of Surgery* 166: 420-427

Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H III, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kröning H, Maroun J, Marschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schüller J, Seitz JF, Stabuc B, Tujakowski J, Van Hazel G, Zaluski J, Scheithauer W. 2005. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 352: 2696-2704

Uetake H, Ichikawa W, Kirihara M, Tajima M, Nihei Z, Sugihara K. 2001. Relationship between gene expression level of phosphorylating enzymes for 5-FU and

chemosensitivity by drug response assay in human colorectal carcinoma. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 42: 3327 in **Pizzorno G, Cao D, Leffert JJ, Russell RL, Zhang D, Handschumacher RE. 2002.** Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587: 133-144

Uetake H, Ichikawa W, Takechi T, Fukushima M, Nihei Z, Sugihara K. 1999. Relationship between intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity and gene expression in human colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 5: 2836-2839

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* 96: 261-268

Van Cutsem E, Hoff PM, Harper P, Bukowski RM, Cunningham D, Dufour P, Graeven U, Lokich J, Madajewicz S, Maroun JA, Marshall JL, Mitchell EP, Perez-Manga G, Rougier P, Schmiegel W, Schoelmerich J, Sobrero A, Schilsky RL. 2004. Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials. *British Journal of Cancer* 90: 1190-1197

Van der Luijt RB, Khan PM, Vasen HF, Tops CM, van Leeuwe-Cornelisse IS, Wijnen JT, van der Klift HM, Plug RJ, Griffioen G, Fodde R. 1997. Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT and Southern analysis. *Human Mutation* 9: 7-16

Van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, Jenab M, Boshuizen HC, Ros MM, Casagrande C, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Thorlacius-Ussing O, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nöthlings U, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Misirli G, Palli D, Sieri S, Panico S, Tumino R, Vineis P, Peeters PH, Van Gils CH, Ocké MC, Lund E, Engeset D, Skeie G, Suárez LR, González CA, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Navarro C, Barricarte A, Berglund G, Manjer J, Hallmans G, Palmqvist R, Bingham SA, Khaw KT, Key TJ, Allen NE, Boffetta P, Slimani N, Rinaldi S, Gallo V, Norat T, Riboli E. 2009. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the european prospective investigation into cancer and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89: 1441-1452

van Kuilenburg AB. 2004. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer* 40: 939-950

van Kuilenburg AB, Meinsma R, Beke E, Assmann B, Ribes A, Lorente I, Busch R, Mayatepek E, Abeling NG, van Cruchten A, Stroomer AE, van Lenthe H, Zoetekouw L, Kulik W, Hoffmann GF, Voit T, Wevers RA, Rutsch F, van Gennip AH. 2004. Beta-Ureidopropionase deficiency: an inborn error of pyrimidine degradation associated with neurological abnormalities. *Human Molecular Genetics* 13: 2793-2801

- Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip A. H. 2002.** High prevalence of the IVS14 + 1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5- fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 12: 555-558
- van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zonnenberg BA, Zoetekouw L, Baas F, Matsuda K., Tamaki N, van Gennip AH. 2003.** Dihydropyrimidinase deficiency and severe 5- fluorouracil toxicity. *Clinical Cancer Research* 9: 4363-4367
- Van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, Baas F, Richel DJ, van Gennip AH. 2001.** Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5- fluorouracil: frequency of the common IVS14 p1G > A mutation causing DPD deficiency. *Clinical Cancer Research* 7: 1149-1153
- van Kuilenburg AB, van Lenthe H, van Gennip AH. 2006.** Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 25: 1211-1214
- Van Rompay AR, Norda A, Lindén K, Johansson M, Karlsson A. 2001.** Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Molecular Pharmacology* 59: 1181-1186
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. 1991.** The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICGHNPC). *Diseases of the Colon & Rectum* 34: 424-425.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. 1999.** New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 116: 1453-1456
- Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM. 1996.** Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 110: 1020-1027
- Vreken P, van Kuilenburg AB, Hamajima N, Meinsma R, van Lenthe H, Göhlich-Ratmann G, Assmann BE, Wevers RA, van Gennip AH. 1999.** cDNA cloning, genomic structure and chromosomal localization of the human BUP-1 gene encoding beta-ureidopropionase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1447: 251-257
- Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Saurin JC, Maugard C, Navarro C, Ruano E, Descos L, Trillet-Lenoir V, Bosset JF, Puisieux A. 1999.** Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, and hMSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. *Human Genetics* 105: 79-85
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. 2009.** Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 9: 489-499

- Ward JL, Sherali A, Mo ZP, Tse CM. 2000.** Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 8375-8381
- Watanabe S, Uchida T. 1995.** Cloning and expression of human uridine phosphorylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 265-272
- Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. 1996.** Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *The Journal of Clinical Investigation* 98: 610-615
- White E, Jacobs EJ, Daling JR. 1996.** Physical activity in relation to colon cancer in middle-aged men and women. *American Journal of Epidemiology* 144: 42-50
- Williams CD, Satia JA, Adair LS, Stevens J, Galanko J, Keku TO, Sandler RS. 2010.** Associations of red meat, fat, and protein intake with distal colorectal cancer risk. *Nutrition and Cancer* 62: 701-709
- Wu K, Willett WC, Fuchs CS, Colditz GA, Giovannucci EL. 2002.** Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 437-446
- Yamane N, Makino M, Kaibara N. 1999.** S-phase accumulation precedes apoptosis induced by preoperative treatment with 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cells. *Cancer* 85: 309-317
- Yoshikawa T, Suzuki K, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Tsuburaya A, Nakamura Y, Shimizu A, Yanoma S, Noguchi Y. 1999.** Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor is upregulated in advanced solid types of gastric cancer. *British Journal of Cancer* 79: 1145-1150
- Yoshinore K, Kubota T, Watanabe M, Wada N, Nishibori H, Hasegawa H, Kitajima M, Takechi T, Fukushima M. 2003.** Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. *Cancer Science* 94: 633-638
- Zásady cytostatické léčby maligních onemocnění. 2011.** 12. Vydání., Česká onkologická společnost ČLS JEP, Brno
- Zavoral M, Suchánek Š, Závada F, Májek O, Dušek L, Frič P. 2009b.** Současný stav a perspektivy screeningového programu kolorektálního karcinomu v České republice. *Postgraduální medicína* 6: 625-636
- Zavoral M, Suchánek Š, Závada F, Májek O, Dušek L, Frič P. 2009a.** Screening Kolorektálního Karcinomu V České Republice. *Farmakoterapie* 5: 24-26
- Zhou B, Mo X, Liu X, Qiu W, Yen Y. 2001.** Human ribonucleotide reductase M2 subunit gene amplification and transcriptional regulation in a homogeneous staining chromosome

region responsible for the mechanism of drug resistance. *Cytogenetics and Cell Genetics*
95: 34-42

9. PŘÍLOHY

Příloha 1. TNM klinická klasifikace a histopatologický grading nádoru kolorekta (Sobin & Wittekind, 2004).

T – Primární nádor	
Tx	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
Tis	karcinom in situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae
T1	nádor postihuje submukózu
T2	nádor postihuje tunica muscularis propria
T3	nádor prorůstá přes muscularis propria do subserózy
T4	nádor přímo porušuje jiné orgány či struktury
N - Regionální mízní uzliny	
Nx	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy v 1 až 3 regionálních mízních uzlinách
N2	metastázy ve 4 nebo více regionálních mízních uzlinách
M - Vzdálené metastázy	
Mx	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	nejsou vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy
G - Histopatologický stupeň diferenciac	
Gx	stupeň diferenciac nelze hodnotit
G1	dobře diferencovaný
G2	středně diferencovaný
G3	špatně diferencovaný
G4	nediferencovaný