

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Změny mitózy a apoptózy u kolorektálních neoplázií

Habilitační práce

MUDr. Darina Kohoutová, Ph.D.

leden 2017

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem habilitační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

MUDr. Darina Kohoutová, Ph.D.



Hradec Králové, leden 2017

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. MUDr. Janu Burešovi, CSc., FCMA za navržení výzkumného tématu stanovení mitózy a apoptózy epiteliálních buněk kolorektální sliznice. Toto téma se stalo podkladem pro žádost o grant IGA MZ 13413-4/2012, v rámci něhož byl výzkum realizován a financován. Za laskavých průběžných podnětů prof. Bureše jsme byli schopni dosáhnout publikovatelných výsledků a výborného hodnocení grantu.

Velký dík patří doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D., který řídil laboratorní zpracování vzorků. Oceňuji promptní zpětnou vazbu z laboratorního prostředí, díky níž byly provedeny žádoucí změny v metodice výzkumu. Vysoce hodnotím, že i přes časovou náročnost hodnocení vzorků bylo dosaženo konzistentních výsledků.

Poděkování patří i dalším kolegům z pracoviště II. interní gastroenterologické kliniky LFUK a FN Hradec Králové: prof. MUDr. Stanislavu Rejchrtovi, Ph.D. (vedoucímu pracoviště endoskopii), as. MUDr. Paule Morávkové a as. MUDr. Jiřímu Cyranymu, Ph.D., kteří se na odběrech vzorků v rámci grantu podíleli.

Za pomoc s úvodním statistickým zpracováním dat patří poděkování RNDr. Michalu Čihákovi, Ph.D.

Děkuji svým blízkým za jejich stálou pomoc a podporu.

Darina Kohoutová

Projekt vznikl v rámci řešení výzkumného grantu IGA MZ 13413 a byl z tohoto výzkumného grantu podpořen.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	2
1. Literární přehled současné problematiky.....	4
1.1. Kolorektální karcinom.....	4
1.2. Hereditární syndromy a familiární formy kolorektálního karcinomu	7
1.3. Vývoj sporadického kolorektálního karcinomu.....	12
1.4. Fyziologie kolorektální sliznice.....	17
1.5. Mitóza a mitotická aktivita buněk v kolorektu.....	18
1.6. Apoptóza a apoptotická aktivita.....	20
2. Cíle práce.....	29
3. Stanovení míry mitotické a apoptotické aktivity epiteliálních buněk sliznice tlustého střeva u pacientů s kolorektálními neopláziemi	30
3.1. Metodika.....	30
3.2. Výsledky.....	44
3.3. Diskuse.....	64
4. Závěry.....	71
5. Literatura.....	72
6. Přílohy.....	93

Seznam zkratek

CRC: kolorektální karcinom

TNM: tumour, node, metastasis

SNP: single nucleotide polymorphism

DNA: deoxyribonukleová kyselina

FAP: familiární adenomatózní polypóza

APC: adenomatous polyposis coli

GAPPS: gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach

DCC: deleted in colorectal carcinoma

CIN: chromosomal instability

MSI: microsatellite instability

LOH: loss of heterozygosity

RNA: ribonukleotidová kyselina

IL: interleukin

5-ASA: 5-aminosalicylová kyselina

COX: cyklooxygenáza

PG: prostaglandin

BCL: B-cell lymphoma

Apaf-1: apoptotic protease activating factor-1

DR: death receptor

DD: death domain

DL: death ligand

DISC: death-inducing signaling komplex

FADD: Fasn Associated Death Domain

FLICE: prokaspáza-8

c-FLIP: cellular FLICE inhibitory proteins

ATP: adenosin trifosfát

NF- κ B: nukleární faktor κ B

PKC: protein kináza C

LST: laterally spreading type tumor

TUNEL reakce: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labelling

1. Literární přehled současné problematiky

1.1. Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) je v současné době třetím nejčastějším karcinomem celosvětově, incidence v roce 2012 činila 1,36 milionu. Mortalita na toto onemocnění zůstává vysoká: v roce 2012 byla 694 000 (1).

Česká Republika se dlouhodobě řadí ke státům s nejvyšším výskytem tohoto onemocnění. Incidence CRC v České Republice v roce 2014 čítala 79 na 100 000 obyvatel; přes veškerou snahu a pokroky moderní medicíny dosahovala mortalita na tuto malignitu 38 na 100 000 obyvatel (2).

Nejdůležitějším prognostickým faktorem pro 5-leté přežití pacienta v souvislosti s nádorem je stadium, ve kterém je onemocnění diagnostikováno. V případě, že je pacientovi zjištěn lokalizovaný kolorektální karcinom, pak je předpokládáno 5-leté přežití v 90 %. Pokud je karcinom diagnostikován v lokálně pokročilém stádiu, pak je 5-leté přežití 69 %. V případě, že je onemocnění diagnostikováno ve stádiu s přítomností vzdálených metastáz, pak je 5-leté přežití 12 % (3).

Ke stagingu kolorektálního karcinomu je v současné době nejčastěji používána TNM klasifikace (**Tabulka 1.1.1.**; 4), která je základem pro navržení optimální terapie pacienta.

Etiopatogeneze sporadického kolorektálního karcinomu je multifaktoriální a díky extenzivnímu výzkumu již bylo identifikováno mnoho rizikových faktorů. Mezi nepochybné rizikové faktory patří: mužské pohlaví, věk (5), idiopatické střevní záněty (6), „západní styl stravy“, související s vysokým příjmem červeného a „předpřipraveného“ masa (7, 8), nedostatečným příjmem vlákniny (9), zvýšenou konzumací alkoholu (zejména piva), kouřením (10), diabetes mellitus 2. typu (11), obezitou (12) a (nejen) s ní související alterací střevního mikrobiomu (13).

Je známo, že u 25-35 % kolorektálních karcinomů existuje familiární komponenta (14-16), byť „klasické“ hereditární syndromy, zahrnující především familiární adenomatózní polypózu a hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom), jsou zodpovědné pouze za méně než 5 % karcinomů tlustého střeva (17). Vysvětlením alespoň části dalších familiárně se vyskytujících kolorektálních karcinomů je přítomnost polymorfismů v jednotlivých

nukleotidech („single nucleotide polymorphisms“; „SNPs“), které se asociují s kolorektálním karcinomem (18); Kapitola 1.2.

Většina kolorektálních karcinomů vzniká sporadicky (19), většina z nich pak na podkladě kolorektálních adenomů (5, 20); Kapitola 1.3.

Zhruba 15 % sporadických kolorektálních adenomů se vyvíjí z pilovitých neoplázií, kdy typickou lokalizací je proximální část tračníku a častější výskyt těchto typů nádoru je pozorován u žen (21).

Při vývoji kolorektálního adenomu a posléze karcinomu hraje velmi důležitou roli úroveň proliferace, diferenciací a apoptózy buněk (22). Regulace / dysregulace těchto dějů je složitá a je intenzivně zkoumána v posledních letech nejen s cílem objasnit patogenezi kolorektálního karcinomu, ale především s cílem moci terapeuticky intervenovat a ovlivnit tak prognózu nemocného.

Míra mitózy a apoptózy je ovlivňována mnoha faktory; Kapitola 1.5. a 1.6., mimo jiné střevními mikrobioty, jejichž složení je u pacienta s kolorektální neoplázií odlišné od jedince bez kolorektální neoplázie (23, 24). Střevní mikrobiota svojí metabolickou aktivitou produkuje mastné kyseliny s krátkým řetězcem, především z fermentovatelné vlákniny. Právě tyto mastné kyseliny (především butyrát) zásadním způsobem ovlivňují míru proliferace a apoptózy epitelálních buněk v tlustém střevě; Kapitola 1.6.7.

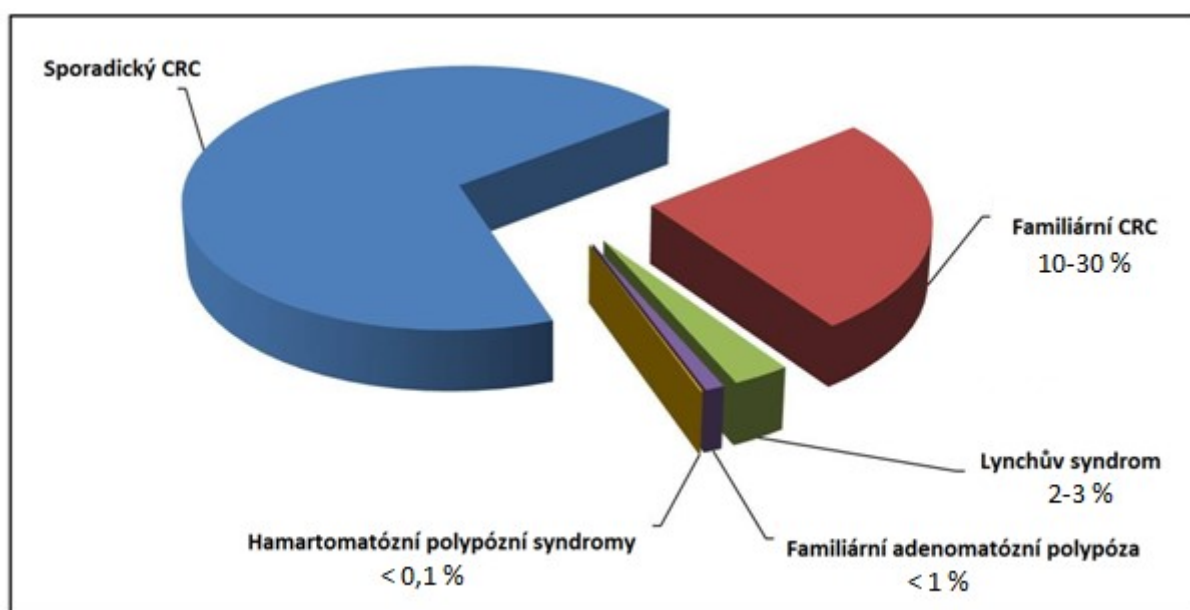
Tabulka 1.1.1. Převzato ze Sobin et al. (4)

Stádium	T	N	M
Stádium 0	Tis	N0	M0
Stádium I	T1, T2	N0	M0
Stádium IIa	T3	N0	M0
Stádium IIb	T4a	N0	M0
Stádium IIc	T4b	N0	M0
Stádium IIIa	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stádium IIIb	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stádium IIIc	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stádium IVa	jakékoli T	jakékoli N	M1a
Stádium IVb	jakékoli T	jakékoli N	M1b

- **T = tumor** (Tis = karcinom in situ, T1 = tumor omezen na submukózu, T2 = tumor postihuje lamina muscularis propria, T3 = tumor dosahující serózu nebo se šíří do perikolické či perirektální tkáně, T4a = tumor postihuje viscerální peritoneum, T4b = tumor přímo postihuje jiné orgány či struktury)
- **N = regionální lymfatické uzliny** (N0 = bez postižení, N1a = 1 regionální uzlina, N1b = 2–3 regionální uzliny, N1c = satelity (ložiska nádoru) v subseróze či neperitonealizované perikolické / perirektální měkké tkáni bez postižení regionálních uzlin, N2a = 4–6 regionálních lymfatických uzlin, N2b = 7 a více regionálních lymfatických uzlin, Nx = nezjištěné množství postižených uzlin – vyšetřeno méně než 12 lymfatických uzlin z resektátu střeva)
- **M = vzdálené metastázy** (M0 = bez vzdálených metastáz, M1a = 1 orgán, M1b = více než 1 orgán nebo peritoneum)

1.2. Hereditární syndromy a familiární formy kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom vzniká „sporadicky“ zhruba v 70 % případů (5), podrobně Kapitola 1.3. Na vzniku ostatních karcinomů v kolorektu se v menší části podílejí dobře definované hereditární syndromy: Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní karcinom tlustého střeva), familiární adenomatózní polypóza, a hamartomatózní polypózní syndromy (25). Za další familiární formy kolorektálního karcinomu jsou zodpovědny polymorfismy jednotlivých nukleotidů (SNP's: single nucleotide polymorphisms), **Graf 1.2.1.** Tyto chromozomální aberace jsou přítomné již ve stádiu kolorektálního adenomu (26). Polymorfismy mohou být použity v praxi jako biomarkery, například k predikci odpovědi na neoadjuvantní chemoradioterapii u pacientů s karcinomem rektu (27).



Graf 1.2.1. Sporadické a familiární formy kolorektálního karcinomu; převzato z National Cancer Institute (28)

1.2.1. Lynchův syndrom

Lynchův syndrom je nejčastější příčinou hereditárního kolorektálního karcinomu. Je asociován s mnoha typy karcinomů, nejčastěji však karcinomem žaludku a endometria (29). Prvním, kdo pozoroval kumulovaný výskyt nádorů mezi příbuznými a kdo toto poprvé popsal, byl patolog na Univerzitě v Michiganu, Warthin, v roce 1895 (30). Lynchův syndrom je způsoben mutací v jednom nebo více tzv. DNA mismatch repair genů (geny zajišťující systém oprav náhodných chyb vzniklých při standardní DNA replikaci), rezultující v mikrosatelitní nestabilitu (alteraci délky opakujících se tandemů v mikrosatelitních oblastech). Mezi čtyři klíčové mismatch repair geny asociované s Lynchovým syndromem jsou řazeny MLH1, MSH2, MSH6, a PMS2 (29).

Kolorektální karcinom se v případě Lynchova syndromu typicky vyskytuje v proximální části tračníku a nevyrostá na rozdíl od familiární adenomatózní polypózy z polypů (31, 32). Výskyt karcinomů je pozorován v časném dospělém věku života, fenotyp pacienta však závisí na mutaci / mutacích DNA mismatch repair genů (29).

K diagnostice Lynchova syndromu slouží klinická „Amsterdamská kritéria“ publikovaná v roce 1991 (33), revidovaná v roce 1999 (34). Po zjištění důležitosti testování mikrosatelitní nestability byla v roce 1996 vydána Bethesda doporučení (35), která byla v roce 2004 revidována s cílem zpřesnit selekci pacientů při suspekci na Lynchův syndrom a správně analyzovat kolorektální karcinom pomocí molekulárních metod (36).

1.2.2. Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění. Klasická forma nemoci je charakterizovaná přítomností stovek až tisíc adenomů v tlustém střevě (**Obrázek 1.2.1, 1.2.2.**), které se objevují od adolescentního věku a dávají vznik kolorektálnímu karcinomu. Průměrný věk, kdy bývá kolorektální karcinom u neléčeného pacienta diagnostikován, je 39 let (37). Atenuovaná forma familiární adenomatózní polypózy se vyznačuje menším množstvím (< 100) a pozdějším vznikem a vývojem adenomatózních polypů, a také nižším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu, který bývá častěji proximálně lokalizovaný. Mezi další neoplázie asociované s familiární adenomatózní polypózou patří duodenální adenomy a karcinomy, karcinom žaludku, pankreatu a štítné žlázy, hepatoblastom a meduloblastom (37-39). Z nemaligních onemocnění asociovaných s FAP, která jsou přesto

svým průběhem závažná, a jsou spojena s vysokou morbiditou a mortalitou (obzvláště při intraabdominální lokalizaci), je nutné jmenovat desmoidní léze (40).

Příčinou onemocnění je mutace v APC (adenomatous polyposis coli) genu lokalizovaném na chromozomu 5q. Většina pacientů má v rodinné anamnéze výskyt kolorektálního karcinomu, u 25-30 % nemocných se však polypóza / kolorektální karcinom manifestuje „de novo“ (38).

Vzhledem k frekventnímu výskytu fundic cystic gland polypů žaludku u familiární adenomatózní polypózy je nutné vždy vyloučit GAPPS (gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach), jehož genetickou podstatou je bodová mutace / bodové mutace v oblasti promotoru 1B APC genu (41, 42).

Stěžejní pro familiární adenomatózní polypózu je správná diagnostika (v trávicím traktu pomocí endoskopických metod), a správně načasovaná a provedená léčba chirurgická při zohlednění věku a fertillního období postižených jedinců (39, 43, 44).

1.2.3. Hamartomatózní polypózní syndromy

Mezi hamartomatózní polypózní syndromy patří Peutzův Jeghersův syndrom (**Obrázek 1.2.3., 1.2.4.**), autozomálně dominantně dědičné onemocnění, způsobené mutací v genu pro serin threonin kinázu. Důsledkem je častý výskyt kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, tenkého střeva, pankreatu, prsu, plic, gynekologických karcinomů a nádorů testikulárních (45).

V současné době je v rámci správného managementu pacienta s Peutzovým Jeghersovým syndromem cílem jednak vyhnout se komplikacím spojeným s hamartomy – tzn. intususcepci, obstrukci a krvácení a dále detekovat časné stádium karcinomu (nejen karcinomu trávicího traktu). K prvnímu slouží v současné době pokročilé endoskopické techniky včetně dvojbalónové enteroskopie s polypektomií; k dosažení druhého cíle slouží správná surveillance pacienta s Peutzovým Jeghersovým syndrom za použití endoskopických, zobrazovacích a laboratorních metod (46, 47).



Obr. 1.2.1.

Endoskopický obraz: Familiární adenomatózní polypóza: mnohočetné adenomy v detailu



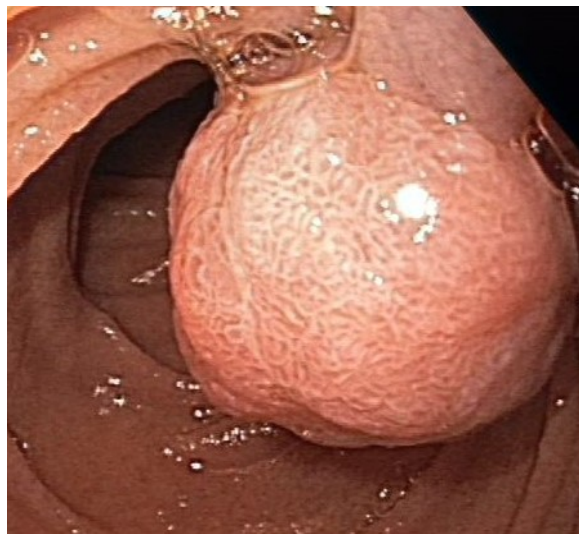
Obr. 1.2.2.

Endoskopický obraz: Familiární adenomatózní polypóza: mnohočetné adenomy tlustého střeva



Obr. 1.2.3.

Endoskopický obraz: Peutzův Jeghersův syndrom: hamartomy v žaludku



Obr. 1.2.4.

Endoskopický obraz: Peutzův Jeghersův syndrom: hamartom v tenkém střevě

1.3. Vývoj sporadického kolorektálního karcinomu

Sporadický kolorektální karcinom se ve většině případů vyvíjí přes sekvenci kolorektální adenom - karcinom. V roce 1990 byl Fearonem a Vogelsteinem představen model kolorektální karcinogeneze, který předpokládá přítomnost mnohočetných na sebe navazujících genetických změn. Jako první nastává obvykle inaktivace APC (adenomatous polyposis coli) tumor supresorového genu, která je ve stadiu nepokročilého adenomu následována aktivací mutace KRAS onkogenu. Na úrovni pokročilého kolorektálního adenomu pak dochází k dalším mutacím včetně mutace v p53 genu (48, 49); **Obrázek 1.3.1.** Pokročilý kolorektální adenom je definován jako neoplázie velikosti >10 mm a/nebo obsahující vilózní komponentu a/nebo přítomnost vysokého stupně dysplázie (24).

Mutace v APC genu (na 5q chromozomu) je nejčasněji pozorovanou mutací v kolorektální karcinogenezi (50) a je přítomna již i ve fokusech aberantních krypt (51). Je detekována u 30-70 % sporadických kolorektálních adenomů a u 72 % sporadických karcinomů (49, 52). Produktem APC genu je protein, který reguluje vývoj, diferenciaci, migraci, apoptózu a adhezivitu buněk. Významnou funkcí proteinu APC genu je jeho interakce s glykogen syntázou kinázou-3 β a β -kateninem, esenciálními komponentami Wnt signální dráhy; inaktivace APC genu vede k aktivaci Wnt signální dráhy cestou zvýšení cytoplazmatických hodnot β -kateninu, což má za následek jeho translokaci do jádra buňky a spuštění transkripce genů účastnících se růstu a invaze nádoru (53, 54).

Mutace KRAS onkogenu (na 12. chromozomu) je přítomna u 30-50 % kolorektálních karcinomů (49), a studie Santini et al. prokázala, že detekce KRAS mutace je v primárním i metastatickém nádoru pacientů s CRC konkordantní (55). Aktivovaný RAS zasahuje do regulace mnohočetných buněčných dějů prostřednictvím různých efektorů: ovlivňuje růst, proliferaci a přežívání buněk. Do apoptózy zasahuje inaktivací vícečetných pro-apoptotických proteinů (49).

Tumor-supresorový gen p53, „strážce genomu“, je lokalizován na krátkém raménku 17. chromozomu. Jeho funkce spočívá v regulaci a kontrole transkripce stovek genů účastnících se diferenciaci, motility, migrace, apoptózy a senescence buněk. Ovlivňuje i angiogenezu a imunitní odpověď (49, 56, 57). Alterace funkce p53 byla popsána u 4-26 % adenomů, 50 % adenomů s invazivními rysy a v 50-75 % adenokarcinomů (58).

Ztráta alely na chromozomu 18q byla identifikována v 70 % kolorektálních karcinomů, typicky v jejich pokročilých stádiích. Zprvu se myslelo, že gen „Deleted in Colorectal Carcinoma“ (DCC) kóduje tumor supresorový gen, avšak pravým produktem DCC genu je receptor pro neuronální protein a mutace DCC genu jsou nalézány v lidském kolorektálním karcinomu vzácně (49).

V patogeneze kolorektálního karcinomu je dále přítomna tzv. genomická nestabilita, která je vyjádřena buď chromozomální nestabilitou (CIN; chromosomal instability), mikrosatelitní nestabilitou (MSI, microsatellite instability) nebo přítomností aktivace dráhy metylátorového fenotypu (49). Chromozomální nestabilita je pozorována u 70 % sporadických kolorektálních karcinomů a vyjadřuje přítomnost akcelerovaných ztrát nebo obdržení velkých částí nebo dokonce celých chromozomů, což rezultuje ve značnou intercelulární karyotypickou variabilitu (59). Důsledkem chromozomální nestability je přítomnost aneuploidie a ztráta heterozygoty (LOH, loss of heterozygoty). Přítomnost mikrosatelitní nestability je dána mutacemi v DNA mismatch repair genech (49). Třetí typ genomické instability spočívá v aberantní metylaci promotorových oblastí tzv. CpG ostrůvků, což je asociováno s inaktivací tumor supresorových genů v neoplázii (60).

Střevní mikrobiota hraje významnou roli v etiopatogenezi sporadického kolorektálního karcinomu. Přímým důkazem je přítomnost mutagenních a genotoxických substancí bakteriálního původu ve stolici člověka (61-63).

Bakterie jsou schopny navodit nebo se účastnit karcinogeneze více mechanismy: mohou se spoluúčastnit vzniku chronického tlustostřevního zánětu, v jehož terénu karcinom vzniká snadněji; mohou se účastnit vzniku adenomů, aniž by navodily zánět (64-67); třetím mechanismem je navození karcinogeneze bakteriemi za určitých podmínek – např. infekcí *Helicobacter hepaticus* za přítomnosti dalších druhů střevních bakterií (68). Dalším mechanismem je aktivace prokarcinogenů nebo produkce toxinů, karcinogenů a mutagenů (např. fekapentaenů nebo volných kyslíkových radikálů) (69). Intestinální mikrobiota jsou schopny navozením změny pH aktivovat nežádoucí enzymatické procesy v tlustém střevě (např. aktivace β -glukuronidázy vede k nežádoucí nadprodukcí genotoxických a karcinogenních sekundárních žlučových kyselin) (70-72).

Vzhledem k obtížím při kultivaci nebyl doposud identifikován vzorec mikroorganismů, který by se vyskytoval u pacientů s kolorektálním karcinomem. Metodami detekce bakteriální 16S RNA bylo zjištěno, že u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou přímo v tumorózní tkáni

(na rozdíl od nádorem nepostižené sliznice) více zastoupeny *Bacteroides* a méně *Firmicutes*, dále byly v tumorózní tkáni detegovány ve větším množství *Coriobacteridae* a naopak podstatně méně *Enterobacteriaceae*. Je známo, že patogenní bakterie *Citrobacter* nebo *Salmonella* nejsou v tlustém střevě zdravých jedinců přítomny vůbec nebo jsou zastoupeny velmi málo; tyto mikroorganismy jsou však detekovány v nádorem nepostižené sliznici pacientů s kolorektálním karcinomem a také ve sliznici pacientů s kolorektálním adenomem. Spoluúčast bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* na vývoji kolorektálního karcinomu je pak vysvětlována navozením asymptomatické, ale chronické zánětlivé odpovědi v tlustostřevní sliznici, a také produkcí genotoxinů, které zasahují DNA (což vede k akumulaci mutací, které charakterizují sekvenci adenom-karcinom). Analogická situace je pozorována i u bakterie *Helicobacter pylori* během procesu karcinogeneze v žaludku (73-81).

V mnoha studiích byl zkoumán vliv jednotlivých bakterií na vývoj kolorektálního karcinomu. S tímto nádorem jsou spojovány především druhy *Bacteroides* (82, 83), v poslední době pak zvláště *Bacteroides fragilis*, který u pacientů s kolorektálním karcinomem na rozdíl od kontrol produkuje metaloproteinázu (84). U pacientů s kolorektálním karcinomem (a zvýšeným zastoupením bakterií rodu *Bacteroides*) byla také potvrzena infiltrace nádorových vzorků, ale i lamina propria zdravé mukózy buňkami produkujícími interleukin-17 (IL-17). Dále je s kolorektálním karcinomem spojován rod *Prevotella* (85), *Clostridium* (především *lecitinas* *negativní*, které přeměňují primární žlučové kyseliny na sekundární) (86), některé rody *Lactobacillus* (87) a *Streptococcus bovis* (indukuje tvorbu hyperproliferativních aberantních kolonických krypt, zvyšuje expresi proliferačních markerů a zvyšuje produkci IL-8 tlustostřevní sliznicí) (61, 88). Infekce *Clostridium septicum* je vzácná, ale v 81 % je spojená s latentní malignitou, ve 34 % s kolorektálním karcinomem (89). Ve studii Marchesi et al. nebyly pomocí metody detekce 16S rRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem nalezeny téměř žádné sekvence bakteriální RNA *Streptococcus bovis* a *Clostridium septicum* (90). Lze však předpokládat, že takoví oportunističtí patogeni jsou přítomni především v adenomatózní tkáni a účastní se vzniku karcinomu; v samotné nádorové tkáni již pak přítomni být nemusí (91). Nežádoucí bakterií je také *Enterococcus faecalis*, protože produkuje kyslíkové radikály. Ve studii na myších byla potvrzena asociace bakterií *Helicobacter hepaticus* a *Citrobacter rodentium* s vývojem kolorektálního karcinomu (92, 93). U pacientů s kolorektálním karcinomem je také předpokládáno vyšší zastoupení intraepiteliálních *Escherichia coli* (94). Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* včetně *Escherichia coli* produkují bakteriociny – koliciny a mikrociny. Tyto působky se díky svým vlastnostem podílejí na vzniku a vývoji kolorektální

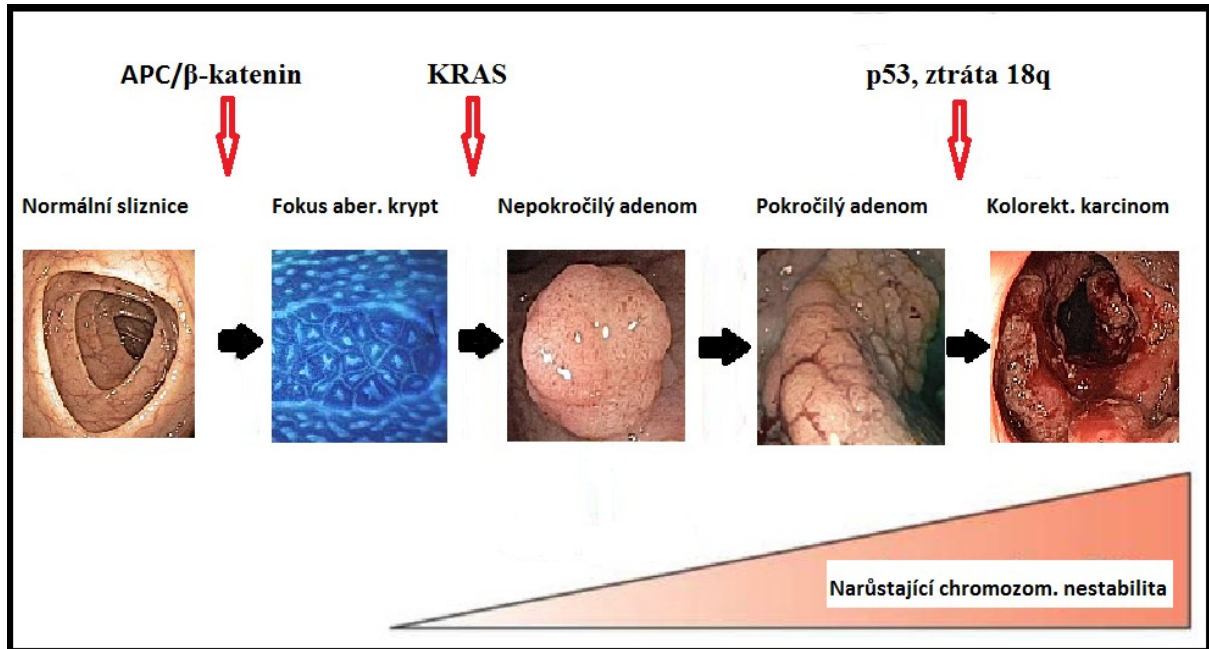
neoplázie (24, 95-98). Naopak za protektivní bakterie můžeme považovat některé druhy *Lactobacillus* (*L. acidophilus*), *Bifidobacterium* (*B. longum*) (99, 100) a *Eubacterium aerofaciens* (101) či *Eubacterium lentum* – syntetizuje 21-dehydroxylázu, která konvertuje karcinogenní žlučový tetrahydrodeoxykortikosteron na nekarcinogenní pregnanolon (pacienti s kolorektálním karcinomem mají fekální aktivitu tohoto enzymu sniženou až o 99 % ve srovnání se zdravými osobami) (102).

V kolorektální karcinogenezi hraje významnou roli rodina S100 proteinů. Jejich cílovými proteiny jsou například NF- κ B, p53 a β -catenin (103, 104). Zvláštní roli v oblasti kolorektální karcinogeneze má S100A4 protein (metastatin-1, calvasculin), který hraje významnou úlohu ve zprostředkování metastatického procesu. S100A4 se stal ale i biomarkerem, sloužícím k identifikaci pacientů, u kterých jsou metastázy již přítomny nebo u kterých je riziko vývoje metachronních metastáz vysoké (105, 106). S100A6 protein má podobné uplatnění jako S100A4: spoluzodpovídá za progresi karcinomu a jeho metastazování. Komatsu et al. ve své studii prokázali, že pozitivita protilátek proti S100A6 byla přítomná v 5 % vzorků zdravé sliznice, 46 % kolorektálních adenomů, 55 % adenokarcinomů kolorekta a 100 % metastatických buněk v játrech (107). Zdá se, že v blízké budoucnosti by se některé z S100 proteinů mohly stát terapeutickým cílem a ovlivnění jejich exprese by tak mohlo být součástí komplexní antitumorózní léčby pacientů s kolorektálním karcinomem (103).

Krevně skupinové antigeny jsou glykokonjugáty přítomné na povrchu epiteliálních buněk tlustého střeva. Antigeny A, B, O (H), Lewis (b) jsou u dospělého člověka normálně exprimovány v proximální části tlustého střeva, avšak při procesu karcinogeneze může dojít k jejich expresi u distálních karcinomů tlustého střeva nebo naopak ztrátě jejich exprese u proximálních karcinomů tlustého střeva. Obdobné alterace lze pozorovat (buď ve snížené frekvenci) i u adenomózních polypů (108, 109). Krevně skupinové antigeny tak mohou sloužit jako biomarker maligní transformace (110).

Zvláštní roli během karcinogeneze sporadického kolorektálního karcinomu hraje gen COX-2. Jsou známy dvě izoformy COX enzymů: COX-1, který je konstitutivní, přítomný fyziologicky v mnoha tkáních, mimo jiné reguluje průtok ledvinami a zajišťuje integritu sliznic (111). Naproti tomu COX-2 enzym, produkt COX-2 genu, je inducibilní. COX-2 gen časně odpovídá na neoplastické a zánětlivé stimuly (včetně cytokinů, růstových faktorů či mitogenů) a uplatňuje se při vývoji karcinomu (112, 113). COX-2 izoenzym katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové v prostaglandin PGH₂, který je prekurzorem prostaglandinu PGE₂. PGE₂ je

důležitým mediátorem zánětlivých a karcinogenních procesů (114-116). Zvýšená exprese COX-2 byla identifikována v 86 % kolorektálních karcinomů a 43 % adenomů (117).



Obrázek 1.3.1. Mnohastupňový genetický model kolorektální karcinogeneze

V úvodu kolorektální karcinogeneze dochází ke vzniku fokusů aberantních krypt. V tomto stádiu může dojít v důsledku mutace APC (adenomatous polyposis coli) genu k aktivaci Wnt signální dráhy. K progresi neoplázie je potřebná aktivace mutace KRAS protoonkogenu, mutace v genu p53 a ztráta heterozygoty na chromozomu 18q. Chromozomální nestabilitu lze identifikovat u benigních adenomů a její incidence narůstá s progresí neoplázie.

Z části převzato z Pino et al. (49); obrázky z archivu II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

1.4. Fyziologie kolorektální sliznice

Kolorektální sliznice je tvořena jednovrstevně uspořádanými, rychle se dělicími a obnovujícími cylindrickými buňkami. Základní funkcí kolorektální sliznice je absorpce vody a iontů. Sliznice kolorekta rovněž zajišťuje úzký kontakt a možnost interakce s buňkami imunitního systému (118, 119).

Plocha tlustého střeva je mnohonásobně zvětšena uspořádáním buněk sliznice tlustého střeva do Lieberkühnových krypt. Z výzkumu na zvířatech vyplývá fakt, že počet těchto krypt se od narození do dospělosti mnohonásobně zvyšuje (120). Na dně každé z krypt je přítomno 4-6 kmenových buněk, které dávají vznik novým kolorektálním epiteliálním buňkám (118). K úplné výměně všech cylindrických epiteliálních buněk v tlustém střevě člověka dochází v intervalu 3-5 dní (119); za den je vyprodukováno 3-10 bilionů buněk sliznice tlustého střeva, což činí sliznici kolorekta nejrychleji prolifерující orgánem savců (118, 121). Proto produkce epiteliálních buněk, jejich diferenciacе, migrace a apoptóza musejí být velmi důsledně regulovány (119). Současně je pochopitelné, že při takovéto enormní obnově kolorektálních epiteliálních buněk je přítomen potenciál akumulace genetických a epigenetických změn (122).

1.5. Mitóza a mitotická aktivita buněk v kolorektu

Jednotlivé buňky sliznice tlustého střeva se dělí pomocí mitózy, podobně jako ostatní somatické buňky. Buněčný cyklus se skládá se čtyř fází: G1 fáze (růst buňky, množení organel, syntéza enzymů), S fáze (replikace chromozomů jako příprava na rozdělení buňky), G2 fáze (další růst a příprava buňky na samotnou mitózu; zahrnuje biosyntézu především mikrotubulů), M fáze (distribuce replikovaných chromozomů do dvou jader, což je následováno cytokinezou – oddělením jader, organel, cytoplazmy a buněčných membrán do dvou buněk). G1, S a G2 fáze se souhrnně nazývají interfází.

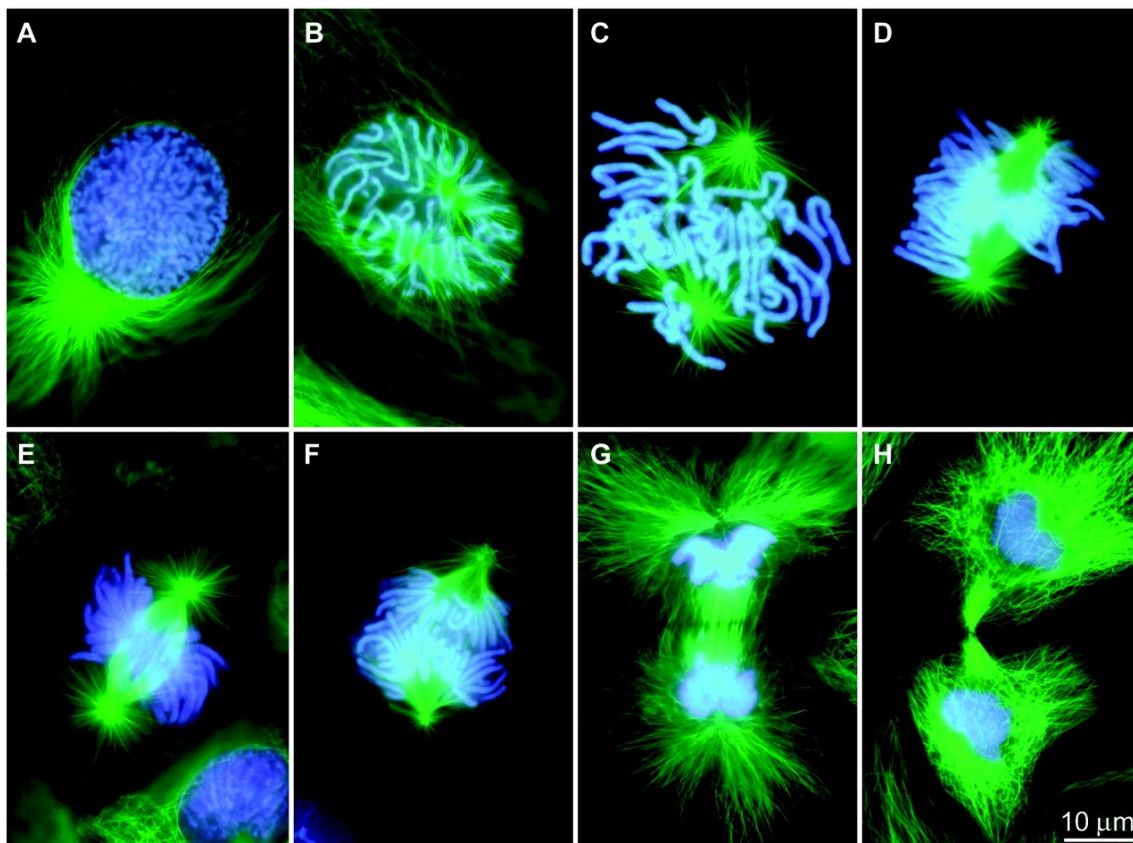
Samotná M fáze se dělí do 5 fází: profáze (kondenzace chromatinu), prometafáze (vazba chromozomů na mikrotubuly), metafáze (kondenzované chromozomy jsou „seřazeny“ uprostřed dělicí se buňky), anafáze (separace chromozomů a oddálení k protějším pólům buňky) a telofáze (relaxace chromozomů) (123-125), **Obrázek 1.5.1.**

Deregulovaná a nekontrolovaná proliferace / mitóza je typická pro proces vzniku a vývoje sporadického kolorektálního karcinomu (CRC), a to cestou klasického adenomu, ale i sesilního pilovitého adenomu (126, 127). Leiszter et al. prokázali, že na rozdíl od zdravé sliznice kolorekta dospělého jedince bez CRC je v bioptických vzorcích odebraných z kolorektálního karcinomu proliferace zvýšená a apoptóza snižena, což je podobné výsledkům získaným z biopsií v kolorektu v dětské populaci. Mimo jiné i pro tuto skutečnost lze označit věk za nezávislý rizikový faktor vzniku sporadického CRC (126).

Je zřejmé, že mitózu během karcinogeneze v kolorektu ovlivňují různé mechanismy: Jaiswal a Narayan ve své studii dokumentovali, že zinek stabilizuje APC (adenomatous polyposis coli) protein a navozuje tak zastavení buněčného cyklu buněk kolorektálního karcinomu v G2/M fázi (128). APC gen/protein přitom hraje klíčovou roli v oblasti regulace uspořádání mikrotubulů a aktinu a je zásadním regulátorem mitotického cytoskeletonu (129). Koelink et al. dokumentovali, že preparáty 5-aminosalicylové kyseliny (5-ASA) interferují s buněčným cyklem ve třech rovinách: navozují zastavení buněčného cyklu v S fázi a G2/M fázi (což je závislé na dávce a koncentraci 5-ASA); indukují apoptózu prodlouženým zastavením buněčného cyklu (což lze navodit opakovaným podáním 5-ASA) a vedou k abnormálnímu uspořádání mitotického (dělicího) vřetenka, což má za následek „mitotickou katastrofu“, jednu z forem buněčné smrti. Proto jsou preparáty 5-ASA, používané v léčbě idiopatických střevních zánětů, považovány zároveň za léčiva, která snižují riziko vzniku kolorektálního karcinomu u těchto pacientů (130).

Intestinální mikrobiota se účastní vzniku sporadického kolorektálního karcinomu, mimo jiné i ovlivněním mitózy: například *Enterococcus faecalis* indukuje aneuploidii a tetraploidii v buňkách sliznice tlustého střeva vede k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi (131).

V současné době jsou známé studie potvrzující možnost prevence a úspěšné terapie kolorektálního karcinomu na podkladě ovlivnění mitózy a jejích jednotlivých složek: Yao et al. se zabývali proliferací aberantních intestinálních kmenových buněk, ke které dochází inaktivací APC genu. K mitóze těchto aberantních kmenových buněk je nutná přítomnost „Tacc3“ proteinu, nezbytného pro funkci dělicího se vřeténka. Inaktivací tohoto „Tacc3“ proteinu došlo při pokusech *in vitro*, následně ale i v podmínkách *in vivo* k významnému snížení počtu nádorů a prodloužení přežití (132). V onkologické terapii kolorektálního karcinomu běžně užívané léčivo 5-fluorouracil působí výrazně antimitoticky, a to především tak, že pozastavuje cyklus v G(2)/M fázi (133).



Obrázek 1.5.1.

Elektronová mikroskopie. Mitóza. Zeleně znázorněny mikrotubuly, modře chromozomy. Převzato z Rieder et al. (125).

1.6. Apoptóza a apoptotická aktivita

Apoptóza, „programovaná sebevražda buňky“, je regulována velmi složitými mechanismy, při jejichž dysbalanci dojde k absenci eliminace nepotřebných a/nebo škodlivých buněk. Důsledkem je narušení homeostázy jednotlivých orgánů i celého organismu. V případě absence apoptózy, základního obranného mechanismu, dochází k aberantní proliferaci buněk, akumulaci genetických defektů, což nevyhnutelně vede ke karcinogenezi, a také k v praxi důležité rezistenci nádorových buněk vůči onkologickým modalitám terapie (134). Apoptóza se zásadně liší od neprogramované buněčné smrti, nekrózy (Kapitola 1.6.1.). Programovaná smrt buňky je regulována třemi základními mechanismy: BCL-2 rodinou (Kapitola 1.6.2.), inhibitory proteinů apoptózy (Kapitola 1.6.3.) a FLICE (prokaspasu-8 inhibujícími proteiny). Apoptóza může být indukována buď signály pocházejícími ze samotné buňky (Kapitola 1.6.4.), nebo signály vzniklými mimo buňku (Kapitola 1.6.5.). Apoptózu ovlivňují mnohočetné mechanismy včetně přirozených induktorů (Kapitola 1.6.6.), mezi které se řadí především butyrát (Kapitola 1.6.7.). Naopak žlučové kyseliny působí především antiapoptoticky (Kapitola 1.6.8.). Stejně jako v samotné realizaci apoptózy mají kaspázy, které jsou produkovány ve formě inaktivních zymogenů, prokaspáz. Následně podléhají proteolytické přeměně, čímž dochází k jejich aktivaci (135-137).

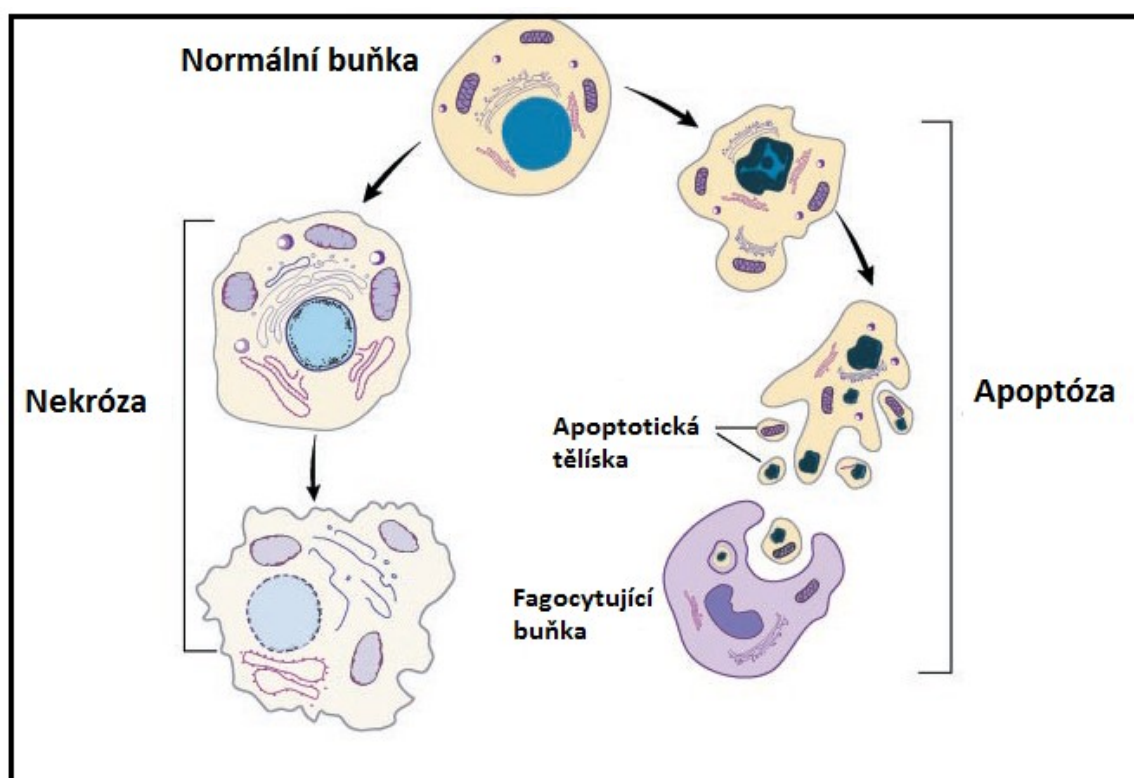
1.6.1. Základní mechanismus apoptózy

Pojem „programovaná smrt buňky“ poprvé použili Lockshin s Williamsem v roce 1964. Ve své práci popsali vymizení intersegmentálních svalů při vývoji nočního motýla v případě, že nebyl dodán juvenilní hormon. Dobře definovali situaci, ke které nedošlo náhodně, ale kdy přesná sekvence několika kroků v sebedestrukci rezultovala (138 Lockshin). Lockshin s Williamsem pokračovali v zevrubném studiu programované smrti buňky a záhy tento děj podrobně popsali ve svých čtyřech dalších pracích (139-142).

Samotný termín „apoptóza“ byl pak poprvé použit Kerrem, Wylliem a Curriem v roce 1972. Kerr byl stážistou ve Skotsku (působil na University of Queensland Medical School v Brisbane, Austrálii) a přesný popis apoptózy vznikl za jeho působení v Department of Pathology, University of Aberdeen. Autoři správně definovali apoptózu jako děj komplementární k mitóze, mající však roli opačnou. Dále předpokládali, že jde o naprogramovaný fenomén, který může být iniciován nebo inhibován mnoha faktory prostředí, ať už fyziologickými nebo

patologickými. Autoři popsali apoptózu jako dvoufázový děj: v prvním kroku dochází ke smrsknutí buňky, kondenzaci jádra a cytoplazmy a „rozpadnutí“ se buňky v ultrastrukturálně velmi dobře zachované, membránou ohraničené fragmenty. V druhém kroku dochází k „likvidaci“ těchto apoptotických tělísek okolními buňkami, v nichž jsou tělíška promptně degradována lysozomálním systémem. Autoři se dále zabývali faktem, že apoptotické děje jsou přítomny v mnoha zdravých tkáních dospělého jedince, programovaná smrt buňky je ale zodpovědná i za eliminaci buněk během normálního embryonálního vývoje.

Dále Kerr s kolegy pozoroval přítomnost apoptózy v neléčených maligních neopláziích a vyjádřil možnost spoluúčasti apoptózy v terapeuticky indukovaných regresích tumorů (143). Ve srovnání s apoptózou, při níž nedochází díky fagocytóze apoptotických tělísek ohraničených membránou ke vzniku zánětlivé reakce, je nekróza dějem naprosto odlišným: pro nekrózu jako typ buněčné smrti je typický otok buňky a jednotlivých organel, časné narušení buněčné membrány, lýza buňky (a jejího jádra), což nevyhnutelně vede k úniku cytozolu do extracelulárního prostoru a ke vzniku zánětlivé reakce (144-146), **Obrázek 1.6.1.**



Obrázek 1.6.1. Základní rozdíly mezi apoptózou a nekrózou (146)

1.6.2. BCL-2 rodina

BCL-2 rodina se skládá ze třech strukturálně a funkčně rozdílných podskupin: anti-apoptoticky působících (BCL-2, aj.), pro-apoptotických proteinů více domén (Bax, BAK, aj.) a BH3-pouze pro-apoptotických proteinů (PUMA, aj.) (147). Interakce mezi jednotlivými členy BCL-2 rodiny, které jsou velmi komplexní, rozhodují o tom, zda finálně dojde k apoptóze buňky (148).

Název BCL-2 je odvozen od B-buněčného lymfomu 2 (B-cell lymphoma 2). Právě u folikulárního lymfomu byla popsána translokace mezi 14. a 18. chromozomem t(14;18), která indukuje nadměrnou expresi anti-apoptoticky působícího BCL-2 (147). Deregulovaná exprese BCL-2 byla identifikována i u dalších typů hematologických malignit včetně chronické lymfatické leukémie (149), ale i u mnoha solidních nádorů včetně kolorektálního karcinomu (150).

BCL-2 je obzvláště významným anti-apoptotickým regulátorem (151). Nádorové buňky s vysokou expresí BCL-2 jsou rezistentní k apoptóze, což snižuje jejich senzitivitu k onkologickým terapeutickým modalitám a hraje významnou roli i při vzniku mnohočetné rezistence k léčivům (152, 153).

1.6.3. Inhibitory proteinů apoptózy

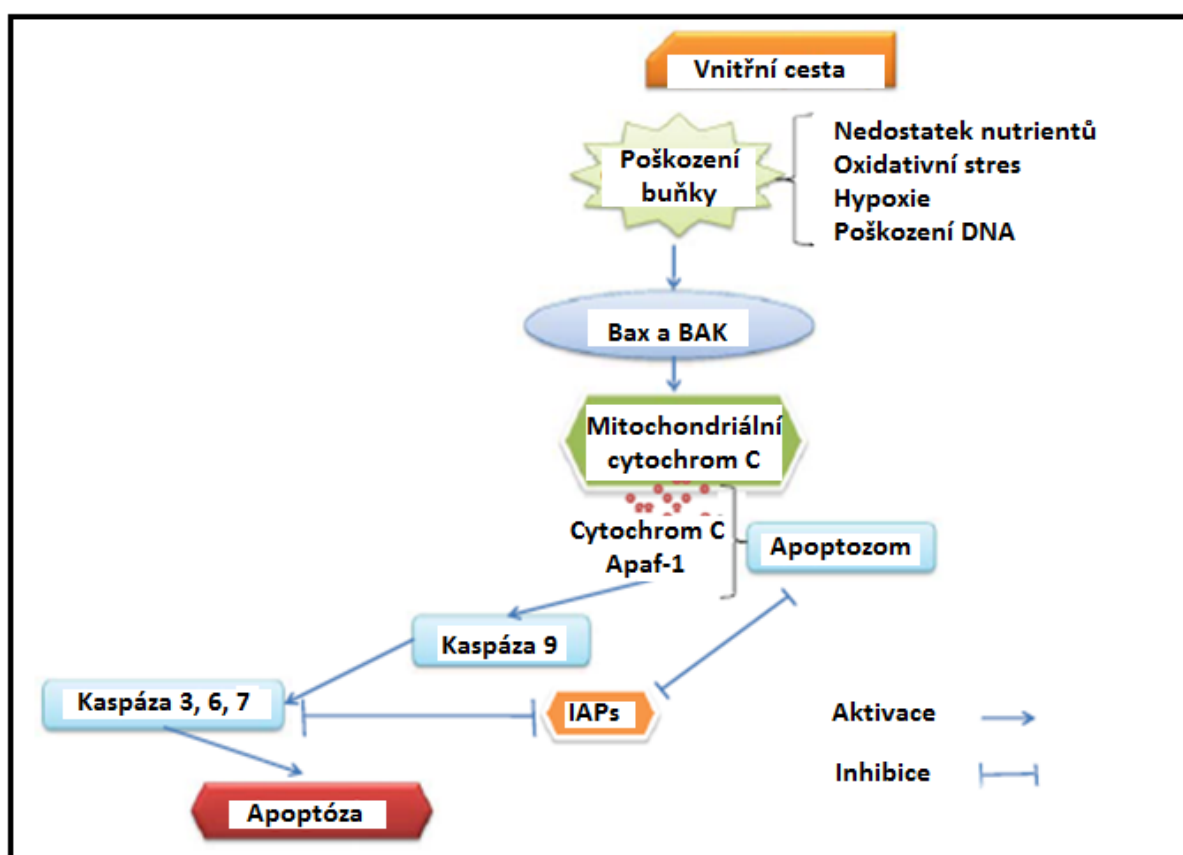
Inhibitory proteinů apoptózy („IAPs“) se vyznačují anti-apoptotickými vlastnostmi a uplatňují se při mitochondriální, vnitřní (Kapitola 1.6.4.), i receptor-dependentní, extracelulární apoptotické kaskádě (Kapitola 1.6.5.). Doposud bylo rozpoznáno 8 členů rodiny inhibitorů proteinů apoptózy (154, 155).

Nejmenším z rodiny IAPs je survivin; ten se stal díky své selektivní expresi v tumorózních buňkách ideálním tumorózním markerem a vzhledem ke své významné anti-apoptotické roli terapeutickým cílem (153-157). Survivin inhibuje kaspázu 3 a kaspázu 7, účastní se regulace buněčného cyklu především v G2 a M fázi, ovlivňuje chemorezistenci a angiogenezi (156, 158-161). Konturek et al. vyšetřovali u pacientů s distálním kolorektálním karcinomem vliv inhibitoru cyklooxygenázy-2 (celecoxibu) na expresi více markerů, kromě jiného i survivinu. Po 14-denní léčbě celecoxibem došlo ke statisticky významnému snížení exprese survivinu v nádorové tkáni, a zdravé sliznici vzdálené 10 cm od nádoru (162).

Práce norských autorů zkoumala význam imunohistochemických biomarkerů lidské telomerázy reverzní transkriptázy a survivinu v otázce predikce vývoje metachronního kolorektálního karcinomu u pacientů s diagnostikovaným sporadickým kolorektálním adenomem: studie prokázala, že oba zkoumané biomarkery jsou nezávislými prediktory vývoje metachronního kolorektálního karcinomu (163).

1.6.4. Apoptóza navozená intracelulárně

Vnitřní apoptotická cesta je aktivována různými mechanismy, ke kterým je řazena deprivace růstových faktorů, nedostatek nutrientů, hypoxie, oxidační stres, poškození DNA, nadbytek kalciových iontů, aj. Tato mitochondriální cesta je přísně kontrolována BCL-2 rodinou, která působí stimulaci rodiny proteinů BH3, což vede k aktivaci proapoptotických efektorů Bax a BAK. Aktivace Bax a BAK rezultuje v narušení mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu C do cytosolu. Cytochrom C indukuje formaci apoptozomového komplexu, který se skládá z kaspázy 9 a tzv. Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1). Aktivovaná kaspáza 9 se poté stává mediátorem aktivace efektorových kaspáz 3, 6, 7, a tak je finálně realizována apoptóza. Kaspáza 9 dále pozitivní zpětnou vazbou aktivuje kaspázu 6 a tím dochází dále k aktivaci kaspázy 8 a 10 (153, 164), **Obrázek 1.6.2.**

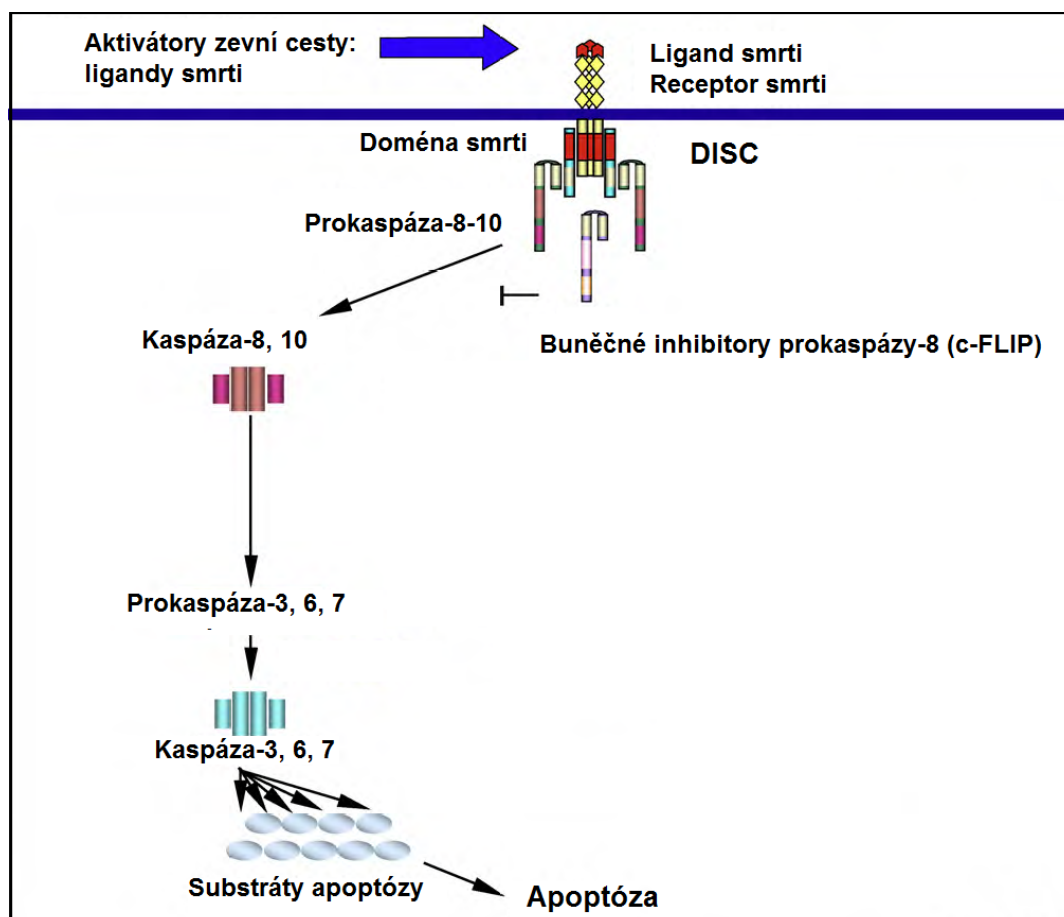


Obrázek 1.6.2. Intracelulární aktivace apoptózy: zpracováno podle Wang et al. (153), Baig et al. (164)

1.6.5. Apoptóza navozená extracelulárně

K aktivaci zevní, receptor dependentní, apoptotické kaskády dochází stimulací členů rodiny „receptorů smrti“ (death receptor, DR). Doposud bylo rozpoznáno šest členů DR rodiny. Všechny členové DR rodiny mají cytoplazmatickou doménu, která se nazývá doménou smrti (death domain, DD). Po vazbě ligandu smrti (death ligand, DL) na receptor smrti dochází k formaci tzv. DISC komplexu (death-inducing signaling complex).

DISC komplex obsahuje: 1) oligomerizované receptory; 2) doménu smrti (DD) spojenou s adaptující molekulou – FADD (Fas Associated Death Domain); 3) prokaspázu-8 (FLICE); 4) prokaspázu-10; 5) buněčné inhibitory FLICE (c-FLIP, cellular FLICE-inhibitory proteins, které mohou inhibovat prokaspázu-8 v případě aktivace DISC komplexu). Důsledkem formace DISC komplexu je aktivace prokaspázy-8 a prokaspázy-10, což iniciuje apoptotickou kaskádu (164, 165), **Obrázek 1.6.3.**



Obrázek 1.6.3. Schéma vnější apoptotické kaskády: převzato z Lavrik et al. (165)

1.6.6. Přirozené induktory apoptózy

Apoptóza je u CRC buněk s mutací ve WNT/beta-katenin dráze (která je přítomna u většiny sporadických CRC) indukována inhibitory histon deacetylázy. Známým inhibitorem histon deacetylázy je butyrát, který vzniká fermentací vlákniny působením intestinálních mikrobiot v tlustém střevě. Míra navozené apoptózy je však v zápětí snižována „aktivací záchranných drah“, k čemuž dochází na podkladě efektu mitogenů secernovaných z apoptotických buněk. Tyto mitogeny stimulují proliferaci přežívajících buněk v jakékoliv apoptotické populaci (166-168).

Mezi supresory apoptózou indukované proliferace patří propolis, produkt včely medonosné. Propolis zvyšuje apoptózu (znásobuje butyrátem indukovanou apoptózu) supresí dvou záchranných signálních drah: AKT a JAK/STAT (166, 169).

Další důležitou záchrannou signální dráhou je ERK dráha; tu je možné inhibovat kofeinem. Právě kombinace propolisu + kofeinu a butyrátu + propolisu + kofeinu vedla k indukci nejvyšších hodnot apoptózy u HCT-R (chemorezistentních buněk kolorektálního karcinomu) *in vitro* (166).

HCT-116, chemosenzitivní buňky kolorektálního karcinomu a LT97, buňky odvozené z kolorektálního adenomu, jsou na rozdíl od HCT-R buněk citlivější k butyrátem navozené apoptóze *in vitro*. Nejvyšších hodnot apoptózy bylo proto u buněk HCT-116 a LT97 dosaženo použitím kombinace butyrátu + propolisu, butyrátu + kofeinu a butyrátu + propolisu a kofeinu (166).

1.6.7. Význam butyrátu v regulaci apoptózy

Vláknina je definována jako část rostlin nebo jejich extraktů, která je rezistentní k trávení a absorpci v tenkém střevě a k její částečné nebo kompletní fermentaci dochází v tlustém střevě působením intestinálních mikrobiot (170). Vláknina zahrnuje polysacharidy (škrob, celulóza, hemicelulóza, pektin), oligosacharidy a ligniny (171). Hlavním produktem fermentace vlákniny jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem: acetát, propionát a butyrát. Právě butyrát je hlavním zdrojem energie pro buňky normální sliznice tlustého střeva (172, 173). Vzhledem k rozdílné koncentraci butyrátu při bazi krypt a v lumen střeva je jeho efekt na jednotlivé buňky sliznice tlustého střeva různý: nízké koncentrace butyrátu, přítomné při bazi krypt, jsou ihned

metabolizovány v mitochondriích, podléhají beta-oxidaci za vzniku acetyl-koenzymu A, který vstupuje do Krebsova cyklu (citrátový cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin), a jehož výsledkem je vznik ATP (adenosin trifosfátu). Za těchto okolností dochází k proliferaci buněk a zároveň nízké akumulaci butyrátu v jádru buňky (171, 173). Vyšší koncentrace butyrátu, které jsou přítomné v lumen tlustého střeva, výrazně převyšují metabolickou kapacitu kolorektální epitelové buňky. Nemetabolizovaný butyrát vstupuje do jádra buňky sliznice tlustého střeva a funguje jako inhibitor histon deacetylázy, což má za následek inhibici proliferace buňky a navození apoptózy (171). Právě butyrát byl prvním identifikovaným inhibitorem histon deacetylázy (174).

Zcela jinak je tomu u buněk kolorektálního karcinomu: ty podléhají tzv. Warburgovu efektu - jejich preferovaným zdrojem energie je glukóza (ne butyrát), jejíž vychytávání se zvyšuje více než 10-krát, a energii tak nádorové buňky čerpají při aerobní glykolýze. Důsledkem je nižší spotřeba butyrátu a jeho snazší akumulace v jádrech buněk kolorektálního karcinomu, kde se uplatňuje jako inhibitor histon deacetylázy, čímž dochází k indukci apoptózy s navozením tumor-supresorového efektu (171, 175).

Butyrát má rovněž protizánětlivý efekt, kdy kromě regulace transkripce genů pro cytokiny (např. pro interferon gama, tumor nekrotizující faktor alfa) inhibuje aktivaci nukleárního faktoru NF- κ B, který se podílí jak na rozvoji zánětu, tak ale i na karcinogenezi (171, 176, 177).

Ve studii Tanga et al. byly buňky lidského kolorektálního karcinomu vystaveny *in vitro* působení butyrátu a propionátu v koncentracích 1-3 mM. Tyto koncentrace nevedly k navození apoptózy, nýbrž indukovaly autofágii. Proces autofágie umožňuje/zvyšuje přežití buněk jednak „recyklací“ organel buňky, což vede k zabezpečení energetického metabolismu buňky, jednak likvidací agregátů bílkovin a poškozených organel, čímž snižuje cytotoxický stres buňky. Právě výsledky této studie by mohly vysvětlit, proč některé klinické studie s mastnými kyselinami s krátkým řetězcem neprokázaly jednoznačně jejich antitumorózní aktivitu. Je ale nutné dále zkoumat, zda k těmto dějům dochází i v *in vivo* podmínkách a zda autofágii mohou podlehnout i netransformované lidské epitelální buňky tlustého střeva. Pokud by tomu tak bylo, pak by terapeutická intervence inhibitorem autofágie měla vést ke zvýšení efektivity suprese vývoje kolorektálního karcinomu pomocí mastných kyselin s krátkým řetězcem (178).

1.6.8. Efekt žlučových kyselin na apoptózu buněk sliznice tlustého střeva

Žlučové kyseliny byly označeny za karcinogeny již v roce 1939 (179 Ajouz). Zvýšený přívod tuků ve stravě vede ke zvýšeným koncentracím sekundárních žlučových kyselin ve stolici a zvýšenému riziku kolorektálního karcinomu (180). Sekundární žlučové kyseliny, lithocholová a deoxycholová, vznikají z primárních žlučových kyselin, cholové a chenodeoxycholové působením intestinálních mikrobiot v tlustém střevě. Karcinogenní efekt žlučových kyselin spočívá především v jejich aktivaci protein kinázy C, PKC (181, 182). PKC je rodina více izoenzymů, které hrají mimo jiné roli v kontrole buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. PKC- α a PKC- β 11 působí ve většině buněk anti-apoptoticky, naopak PKC- δ má funkci proapoptotickou (181, 183). Práce McMillana et al. potvrdila, že kyselina ursodeoxycholová (řazená k sekundárním žlučovým kyselinám) vedla k aktivaci izoenzymu PKC- α , tedy působí anti-apoptoticky. Naproti tomu butyrát vede k aktivaci izoenzymu PKC- δ a působí tak proapoptoticky (181). Kromě anti-apoptotického vlivu mají žlučové kyseliny další prokarcinogenní vlivy v oblasti tlustého střeva: indukují vznik reaktivních kyslíkových radikálů, způsobují narušení buněčné membrány a mitochondrií, indukují nežádoucí poškození DNA (179).

2. Cíle práce

- Zavést metodiku a vyšetřit míru mitózy a apoptózy buněk sliznice tlustého střeva u pacientů s nepokročilým a pokročilým kolorektálním adenomem, kolorektálním karcinomem a u osob s normálním nálezem při koloskopickém vyšetření (s negativní osobní anamnézou kolorektální neoplázie a/nebo idiopatického střevního zánětu).
- Stanovit, zda míra mitózy a apoptózy v oblasti kolorektální patologie závisí na histologickém profilu patologie.
- Určit, zda je úroveň mitózy a apoptózy epiteliálních buněk zdravé sliznice u pacientů s nálezem kolorektální patologie odlišná ve srovnání s mitózou a apoptózou sliznice kolorekta jedinců z kontrolní skupiny.
- Stanovit, zda má lokalizace kolorektální patologie vliv na míru mitózy a apoptózy epiteliálních buněk v oblasti patologie.
- Predikovat, zda může mít ovlivnění apoptózy při progresi kolorektálního adenomu v karcinom klinické konsekvence.

3. Stanovení míry mitotické a apoptotické aktivity epiteliálních buněk sliznice tlustého střeva u pacientů s kolorektálními neopláziemi

Deregulace mitotické a apoptotické aktivity v oblasti kolorektální karcinogeneze není již v současnosti zpochybňovaná. Doposud však není ve světové literatuře k dispozici informace o tom, jak a jak významně je mitóza a apoptóza změněna v jednotlivých stádiích sporadické kolorektální neoplázie. Lze předpokládat, že byt' jsou mitotické a apoptotické děje v prostředí kolorekta ovlivňované a řízené mnoha faktory, mohla by intervence do těchto dějů v určité fázi vývoje kolorektálního adenomu v karcinom vést k zamezení progresu procesu, což by mělo nepochybně významně příznivé dopady v klinické medicíně.

3.1. Metodika

Ke stanovení míry mitózy a apoptózy epiteliálních buněk sliznice kolorekta byly kromě kontrolní skupiny (**Obr. 3.1.1.-3.1.4.**) vybrány 3 skupiny pacientů: nemocní s nepokročilým kolorektálním adenomem (non-advanced adenoma, non-a-A) (**Obr. 3.1.5.-3.1.6.**), osoby s pokročilým kolorektálním adenomem (advanced adenoma, a-A) (**Obr. 3.1.7.-3.1.8.**) a pacienti s kolorektálním karcinomem, CRC (**Obr. 3.1.9.-3.1.12.**).

Pokročilý kolorektální adenom je definován jako neoplázie velikosti >10 mm a/nebo obsahující vilózní komponentu a/nebo přítomnost vysokého stupně dysplázie (3 Kohoutova 2014 – ref jiz uvedena v kapitole 1.3.).

Mitotická a apoptotická aktivita byla vyšetřena u 17 jedinců s normálním koloskopickým nálezem a negativní osobní anamnézou kolorektální neoplázie a/nebo idiopatického střevního zánětu (6 mužů, 11 žen, ve věku 25-75, průměr 55±14), 18 pacientů s nepokročilým kolorektálním adenomem (13 mužů, 5 žen, ve věku 41-84 let, průměr 66±12), 13 pacientů s pokročilým kolorektálním adenomem (10 mužů, 3 ženy, ve věku 58-79 let, průměr 67±7) a 13 pacientů s kolorektálním karcinomem (5 mužů, 8 žen, ve věku 50-87 let, průměr 66±10).

V úvodu diagnostické a/nebo terapeutické koloskopie podepsal každý jedinec souhlas informovaného s vyšetřením apoptózy z bioptického materiálu (**Příloha 1**).

Nebolestivý bioptický odběr tkáně kolorekta byl realizován v průběhu endoskopie na endoskopickém pracovišti II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vždy byla bioptována přítomná kolorektální patologie,

jejíž histologie byla kontrolována po odečtení histopatologem. Dále byla bioptována makroskopicky normální sliznice vzdálená 10 cm od místa patologie. U zdravých jedinců s normálním nálezem v kolorektu byla biopsie zdravé sliznice provedena v oblasti rekta (po vyloučení orálněji lokalizované neoplázie). Obvykle byl materiál získán bioptickými klíšťkami (**Obr. 3.1.13.**), nebo odkrojením malé části kolorektální neoplázie odstraňované v případě přisedlé léze endoskopickou mukózní resekcí (**Obr. 3.1.14.-3.1.15.**), v případě stopkaté neoplázie polypektomicky (**Obr. 3.1.16.**). Získané vzorky byly ihned vloženy do zkumavky s 10% formalinem, fixovány a odeslány na Fakultu vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové. Zde byly vzorky odvodněny a zality do parafinu (Paramix, Holice, Česká Republika). Z každého vzorku byly odkrojeny 5 μ m silné řezy (Microtome model SM2000 R, Leica, Heidelberg, Německo), následně obarveny hematoxylinem-eozinem (Merck, Kenilworth, NJ, USA) a hodnoceny za použití mikroskopu BX-51 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japonsko). Vzhledem k charakteru kinetiky buněčné populace tlustého střeva byla v každém vzorku měřena apoptóza [apoptotický index (%) = počet apoptotických buněk \times 100/celkové množství hodnocených buněk] a mitóza [mitotický index (%) = počet mitotických figur \times 100/celkové množství hodnocených buněk] ve třech různých kompartmentech: povrchový v přímém kontaktu s lumen tlustého střeva, horní části krypt a dolní části krypt (**Obr. 3.1.17.**). Za apoptotické buňky byly považovány buď jednotlivé apoptotické fragmenty velikosti odpovídající sousedním buňkám nebo shluk alespoň 3 malých apoptotických tělísek. V každém kompartmentu bylo hodnoceno nejméně 750 buněk.

Apoptotická aktivita byla dále hodnocena pomocí imunohistochemických metod, konkrétně detekcí aktivované (štěpené) kaspázy-3, která je kritickým elementem regulujícím apoptotický proces. Byla použita králičí monoklonální protilátka (1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a standardní peroxidázová technika (184) na 5 μ m silných řezech všech adenomů, karcinomů a náhodně vybraných kontrolních vzorků. Vzorky byly po imunohistochemickém značení dobarveny hematoxylinem (**Obr. 3.1.18.**). Původní snahou bylo zhodnotit apoptotickou aktivitu ve třech kompartmentech a vyjádřit ji pomocí apoptotického indexu (aktivovaná-kaspáza-3 [%] = počet aktivovaných-kaspáza-3 pozitivních buněk \times 100/celkové množství hodnocených buněk). Po obarvení se však ukázalo, že imunohistochemická detekce vykazuje vysokou úroveň falešné positivity v okrajových oblastech (**Obr. 3.1.19.**), proto byl s vynecháním falešně pozitivních oblastí hodnocen kompartment horní a dolní části krypt v dostatečně velkých vzorcích. Hodnoceno bylo nejméně 1500 buněk/kompartiment.

Statistická analýza:

Získané výsledky byly zpracovány pomocí statistického softwaru Statistica. Byly vypočteny základní popisné statistiky a provedeno porovnání jednotlivých souborů pomocí Mann-Whitneyova testu.

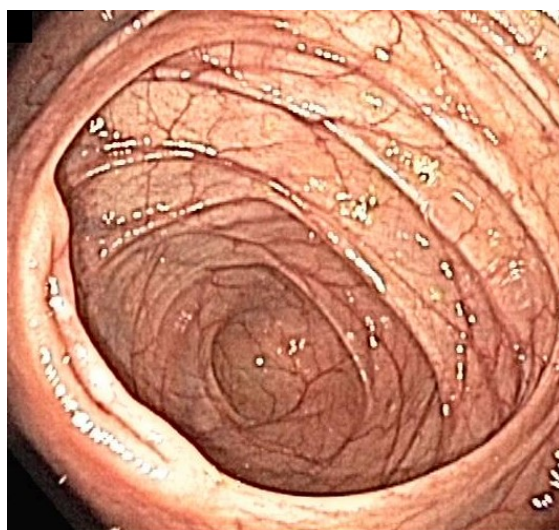
Etické kodexy:

Projekt byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Při vlastním provádění studie a při vyhodnocení získaných výsledků byla zajištěna ochrana osobních údajů vyšetřených osob v souladu s Metodickým návodem Ministerstva zdravotnictví ČR (*k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbirky o péči o zdraví lidu v platném znění*).



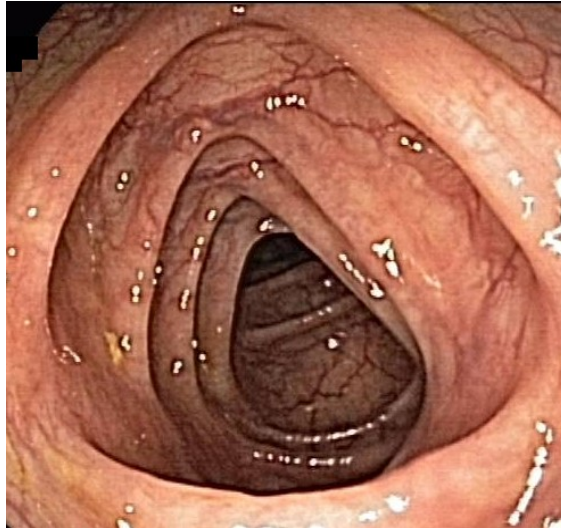
Obr. 3.1.1.

Endoskopický obraz: Cékum s ústím apendixu - fyziologický nález



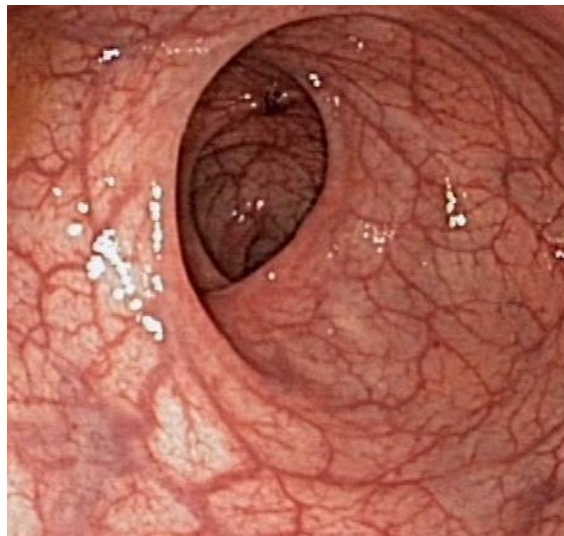
Obr. 3.1.2.

Endoskopický obraz: Cékum s Bauhinskou chlopní - fyziologický nález



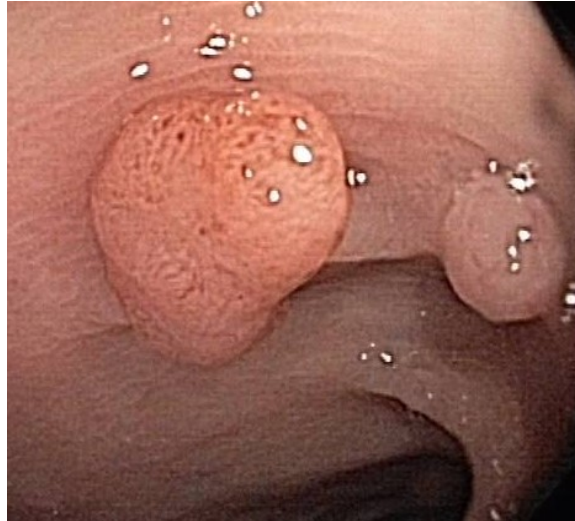
Obr. 3.1.3.

Endoskopický obraz: Colon transversum - fyziologický nález



Obr. 3.1.4.

Endoskopický obraz: Rektum - fyziologický nález



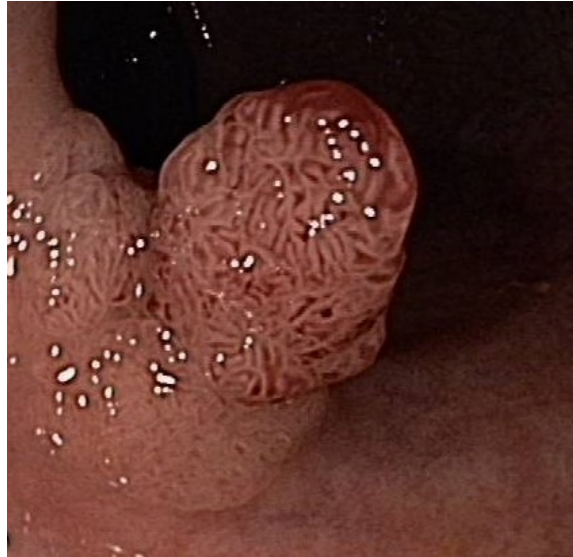
Obr. 3.1.5.

Endoskopický obraz: Přisedlý nepokročilý kolorektální adenom (vlevo), vpravo hyperplastický polyp



Obr. 3.1.6.

Endoskopický obraz: Stopkatý nepokročilý kolorektální adenom



Obr. 3.1.7.

Endoskopický obraz: Pokročilý kolorektální adenom (s přisedlou porcí)



Obr. 3.1.8.

Endoskopický obraz: Pokročilý kolorektální adenom (v NBI zobrazení - narrow band imaging = zúžený pás světla)



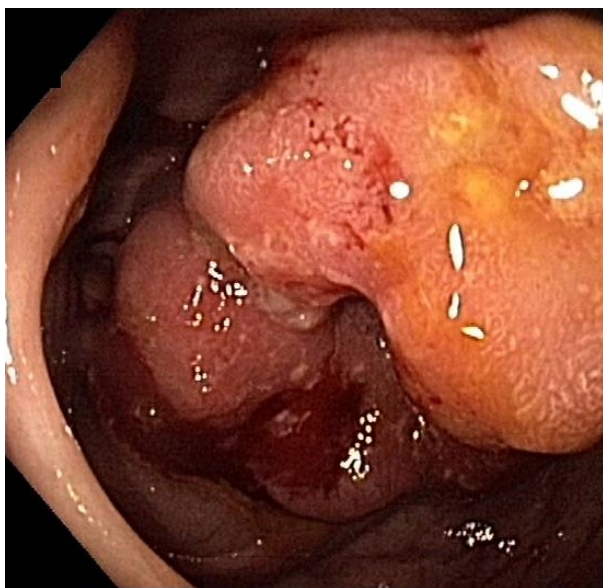
Obr. 3.1.9.

Endoskopický obraz: Kolorektální karcinom (zobrazení v bílém světle s vysokým rozlišením)



Obr. 3.1.10.

Endoskopický obraz: Kolorektální karcinom (stejný nález v NBI zobrazení)



Obr. 3.1.11.

Endoskopický obraz: Kolorektální karcinom céka, vlevo Bauhinská chlopeň



Obr. 3.1.12.

Endoskopický obraz: Kontaktně i spontánně krvácející, stenozující kolorektální karcinom



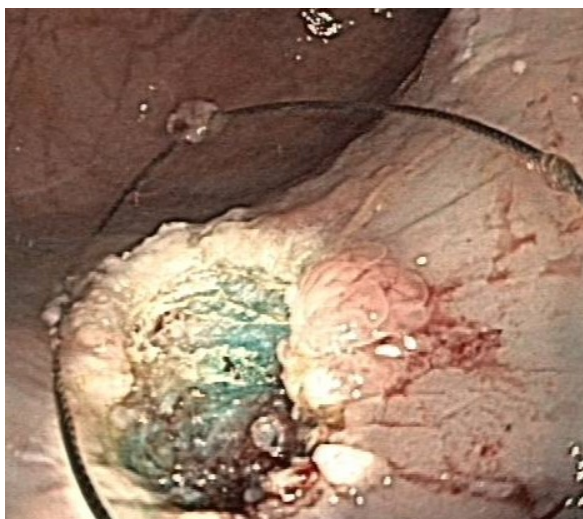
Obr. 3.1.13.

Endoskopický obraz: Biopstické klíšťky používané k biopstickým odběrům



Obr. 3.1.14.

Endoskopický obraz: Pokročilá kolorektální neoplázie (po podpichu, před endoskopickou mukózní resekcí)



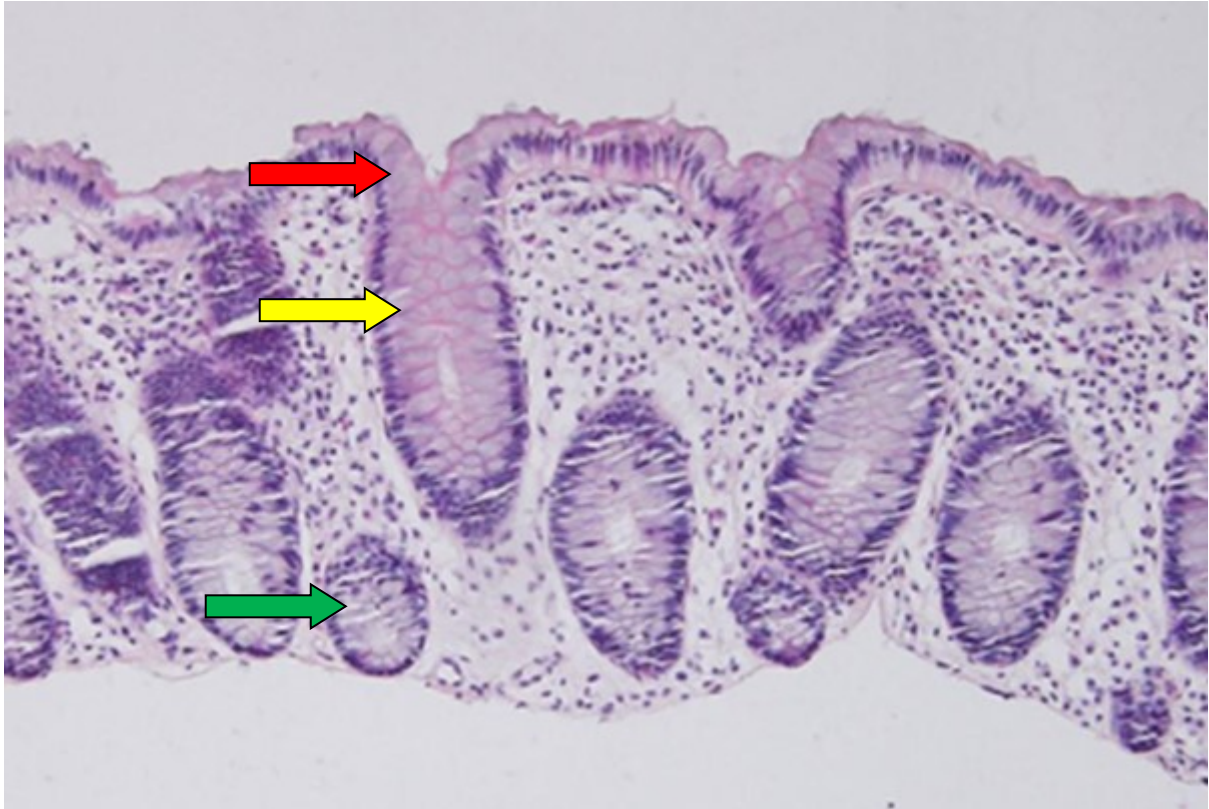
Obr. 3.1.15.

Endoskopický obraz: Endoskopická mukózní resekce kolorektální neoplázie



Obr. 3.1.16.

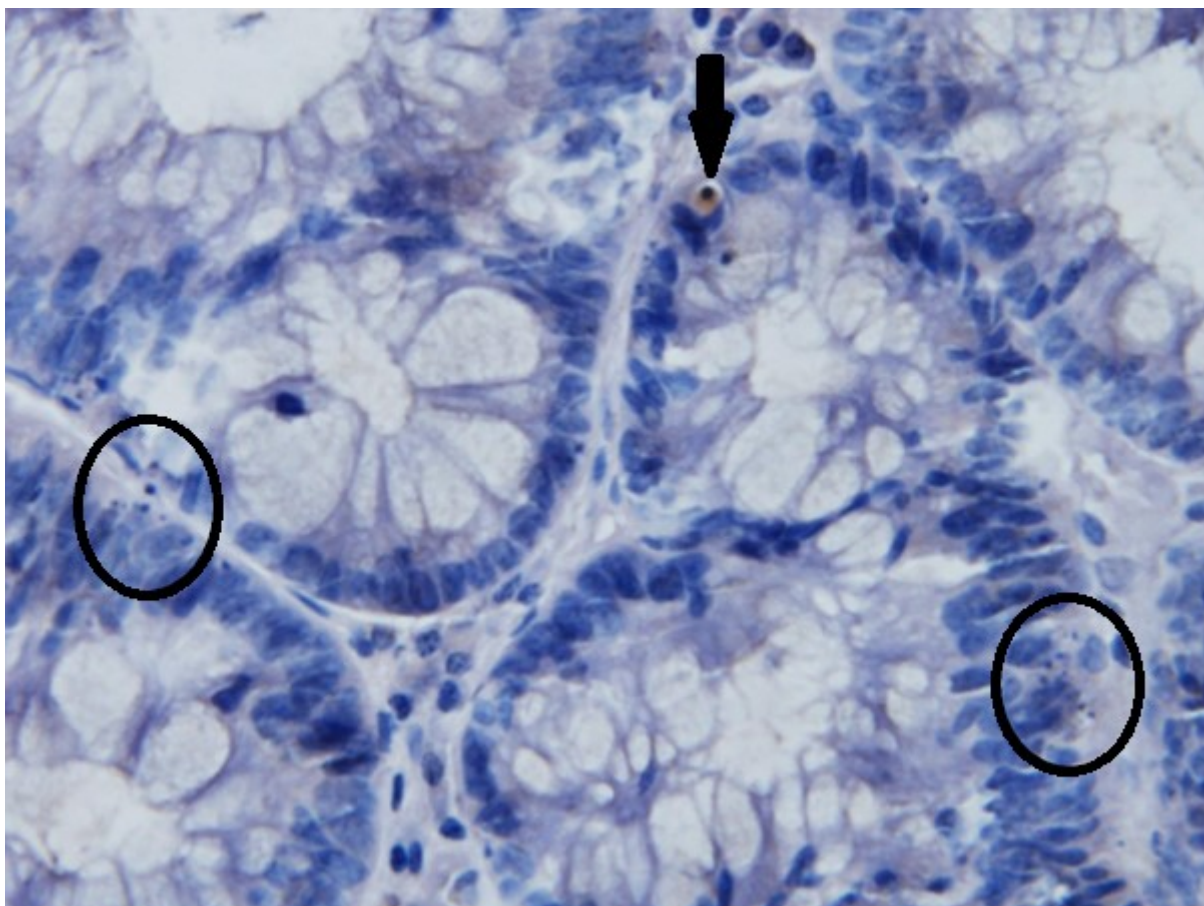
Endoskopický obraz: Polypektomie kolorektální neoplázie



Obr. 3.1.17.

Barvení hematoxylinem-eozinem, originální zvětšení: 100x

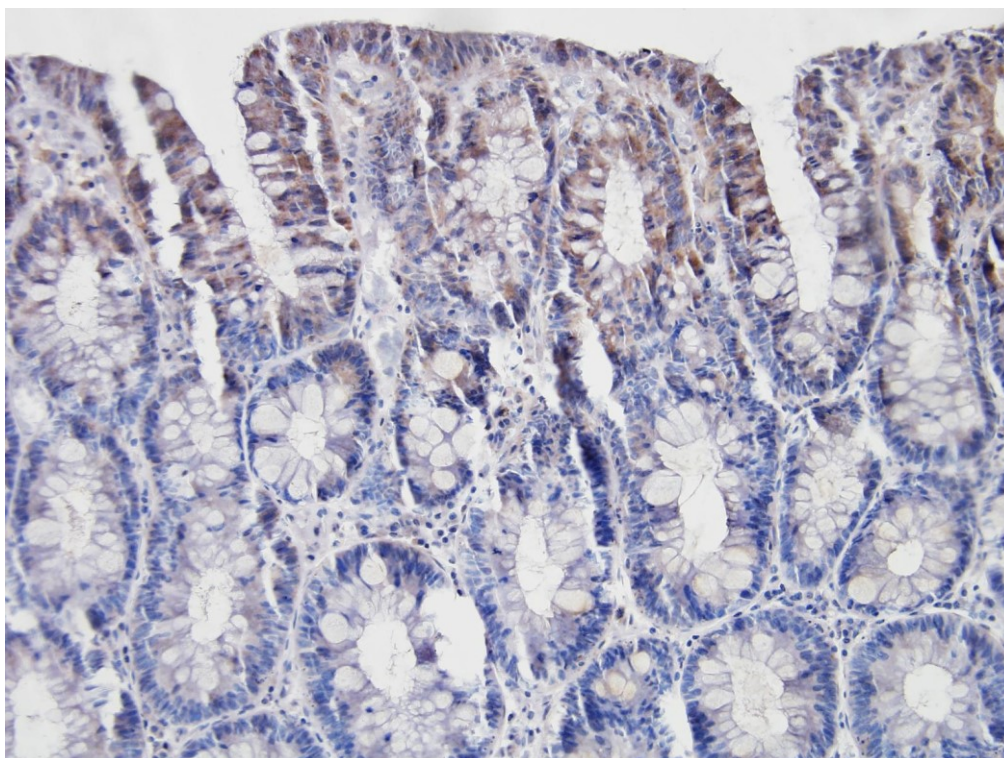
Kompartmenty pro hodnocení apoptózy: povrchový, v přímém kontaktu s lumen tlustého střeva (červená šipka), horní část krypt (žlutá šipka) a dolní část krypt (zelená šipka).



Obr. 3.1.18.

Imunohistochemická detekce aktivované-kaspázy-3 ve vzorcích dobarvených hematoxylinem; originální zvětšení: 600x

Na obrázku jsou znázorněny aktivovaná-kaspáza-3 pozitivní buňky (šipka). Rovněž jsou zde patrné 2 shluky ≥ 3 apoptotických tělísek (v kruhu), jež by při hodnocení ve vzorcích barvených hematoxylinem-eozinem byly považovány za pozitivní, pozitivitu aktivované-kaspázy-3 nicméně nevykazovaly. Apoptotická tělíska vykazovala pozitivitu pouze v případě, že v nich byla zachována cytoplazmatická hmota. Jestliže tělísko obsahovalo jen jaderný materiál, pozitivita zachycena nebyla.



Obr. 3.1.19.

**Imunohistochemická detekce aktivované-kaspázy-3, dobarveno hematoxylinem;
originální zvětšení: 200x**

Falešně pozitivní imunohistochemická detekce aktivované-kaspázy-3 v povrchovém kompartmentu a v ústí krypt bioptického vzorku.

3.2. Výsledky

Ve vzorcích kontrol byla pozorována mitotická aktivita pouze v dolní části krypt, kde byla doprovázena určitou úrovní apoptotické aktivity. V horní části krypt mitotická i apoptotická aktivita klesla k nulovým hodnotám (**Obr. 3.2.1.**). V superficiálním (povrchovém) kompartmentu byl přítomen nárůst apoptotické aktivity (**Graf 3.2.1a., 3.2.1b.**).

Přeměna zdravé sliznice v nepokročilý adenom (non-a-A) byla spojena se signifikantním zvýšením apoptotické aktivity ve všech třech kompartmentech (**Graf 3.2.2a., 3.2.3a., 3.2.4a.**); $p < 0,05$. Největší nárůst byl pozorován v horní části krypt. Statisticky významný nárůst mitotické aktivity byl při přeměně zdravé sliznice v nepokročilý adenom pozorován v dolní a horní části krypt (**Graf 3.2.2.b, 3.2.3b.**); $p < 0,05$.

Transformace nepokročilého v pokročilý adenom nevedla k dalšímu ovlivnění apoptotické aktivity (**Graf 3.2.2a., 3.2.3a., 3.2.4a.**), byla však spojena se signifikantním zvýšením mitotické aktivity v oblasti horní části krypt a v superficiálním kompartmentu (**Graf 3.2.3b., 3.2.4b., Obr. 3.2.2.**); $p < 0,05$.

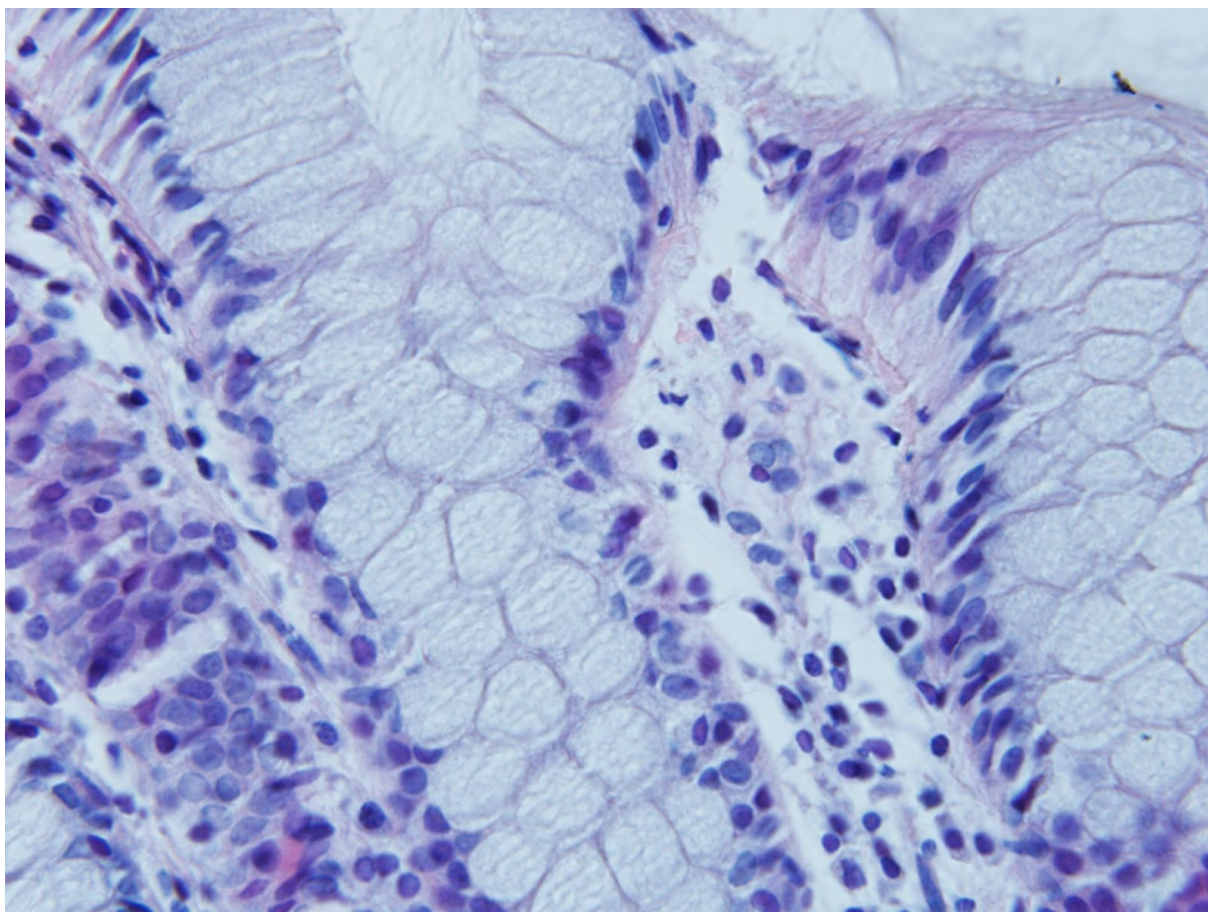
Ve vzorcích odebraných z kolorektálního karcinomu byl při srovnání s pokročilým adenomem pozorován statisticky významný pokles apoptotické aktivity ve všech třech kompartmentech (**Graf 3.2.2a., 3.2.3a., 3.2.4a.; Obr. 3.2.3.**); $p < 0,05$.

Při porovnání mitotické a apoptotické aktivity v kontrolních vzorcích odebraných ze zdravé sliznice u pacientů s kolorektální neoplázií se vzorky zdravých kontrol nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v žádném z kompartmentů; $p > 0,05$.

Apoptotická a mitotická aktivita byla porovnána s vlastními kontrolami odebranými ze zdravé tkáně v jednotlivých kompartmentech u pacientů s nepokročilým adenomem (**Graf 3.2.5a., 3.2.5b.**), u pacientů s pokročilým adenomem (**Graf 3.2.6a., 3.2.6b.**) a u jedinců s kolorektálním karcinomem (**Graf 3.2.7a., 3.2.7b.**).

Další statistická analýza byla zaměřena na porovnání apoptotické a mitotické aktivity mezi neopláziemi lokalizovanými v pravé (cékum, c. ascendens a c. transversum) a levé části tračníku (c. descendens, c. sigmoideum a rektum) u jednotlivých kolorektálních neoplázií. Lokalizace neoplázie neměla na míru mitotické a apoptotické aktivity signifikantní vliv; $p > 0,05$.

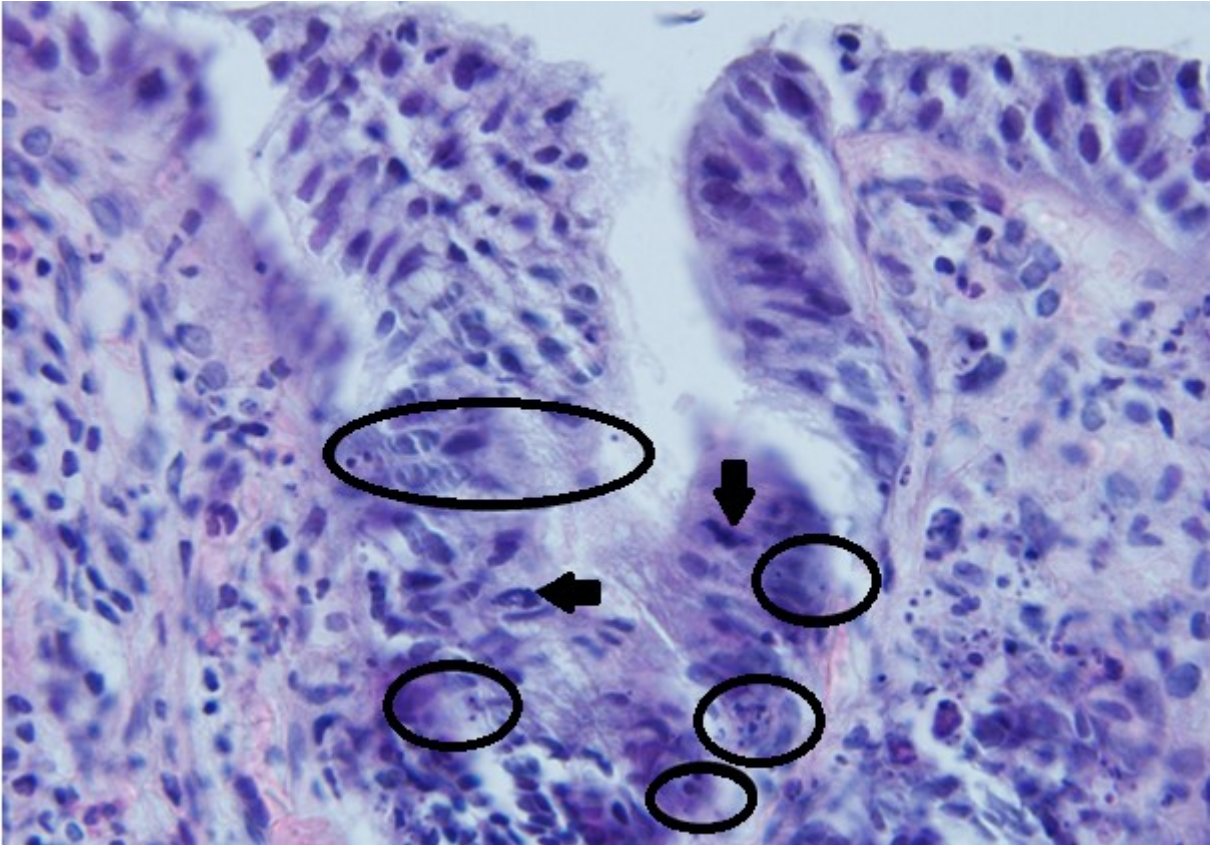
Immunohistochemická detekce aktivované kaspázy-3 prokázala signifikantní nárůst apoptotické aktivity v horní části krypt během transformace zdravé sliznice v nepokročilý a v pokročilý adenom ($p < 0,05$). Následně byl pozorován signifikantní pokles positivity aktivované kaspázy-3 ve vzorcích odebraných z kolorektálního karcinomu při srovnání se vzorky odebranými z nepokročilého adenomu a pokročilého adenomu v oblasti horní části krypt; $p < 0,05$ (**Tabulka 3.2.1.**).



Obr. 3.2.1.

Barvení hematoxylin-eozin, originální zvětšení 600x

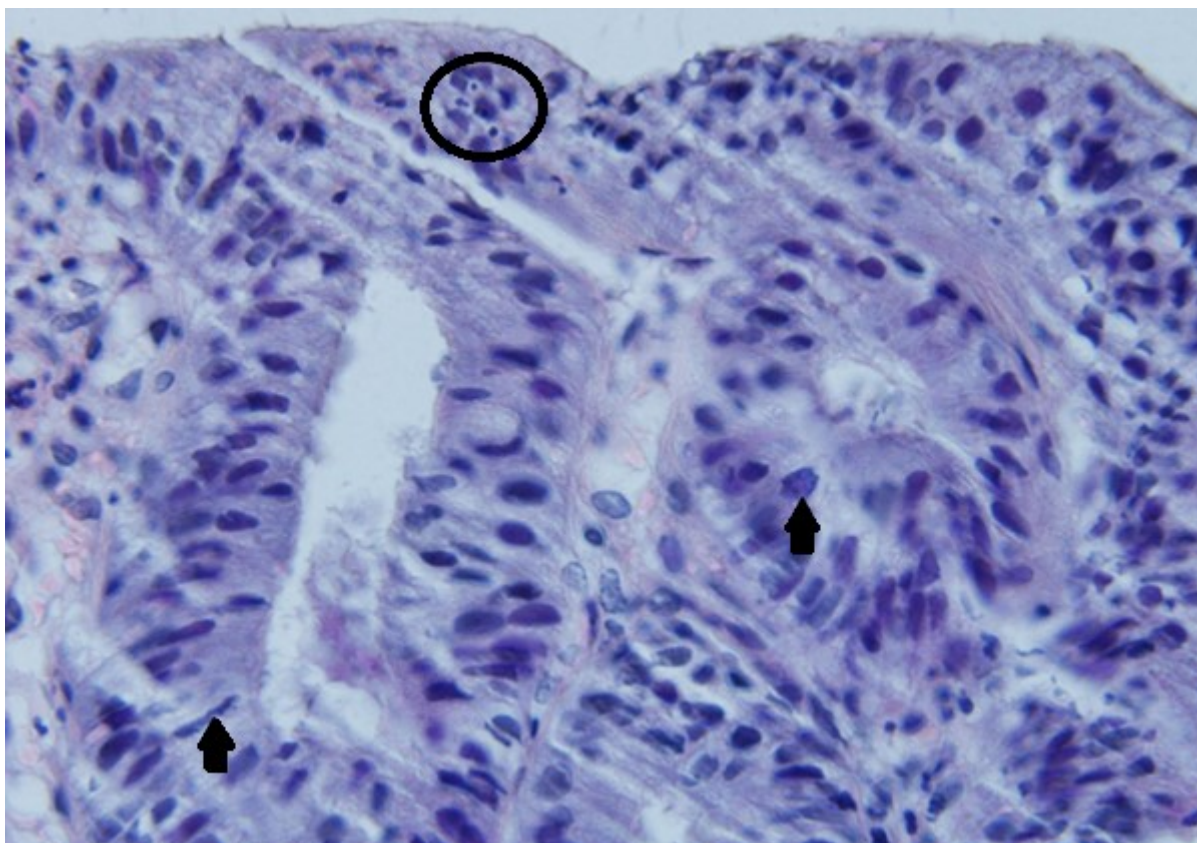
Nulová mitotická a apoptotická aktivita v horní části krypt kontrol.



Obr. 3.2.2.

Barvení hematoxylin-eozin, originální zvětšení 600x

Mitotická a apoptotická aktivita v horní části krypt pokročilého adenomu (šipka: mitotická figura; v kroužku: apoptotická tělíska).



Obr. 3.2.3.

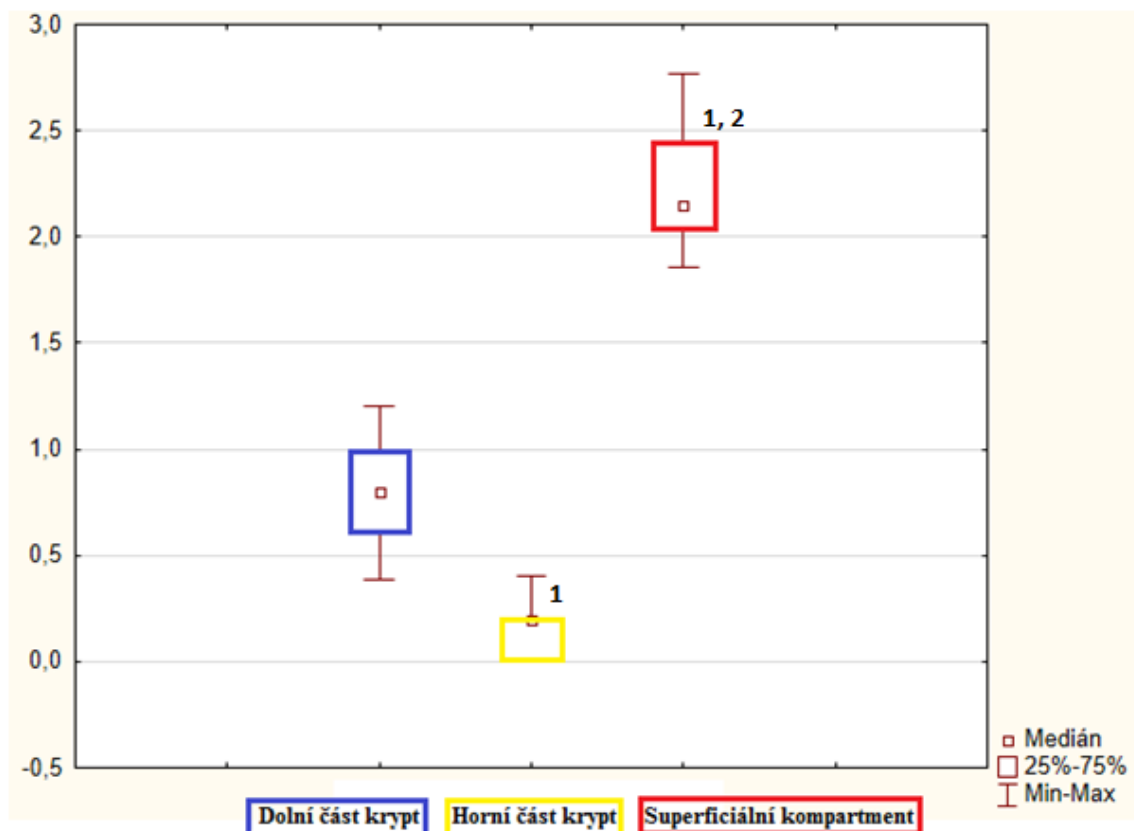
Barvení hematoxylin-eozin, originální zvětšení 600x

Mitotická a apoptotická aktivita v horní části krypt kolorektálního karcinomu (šipka: mitotická figura; v kroužku: apoptotická tělíška).

Graf 3.2.1a. Apoptóza v kontrolní skupině, vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti dolní části krypt ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti horní části krypt ($p < 0,05$)



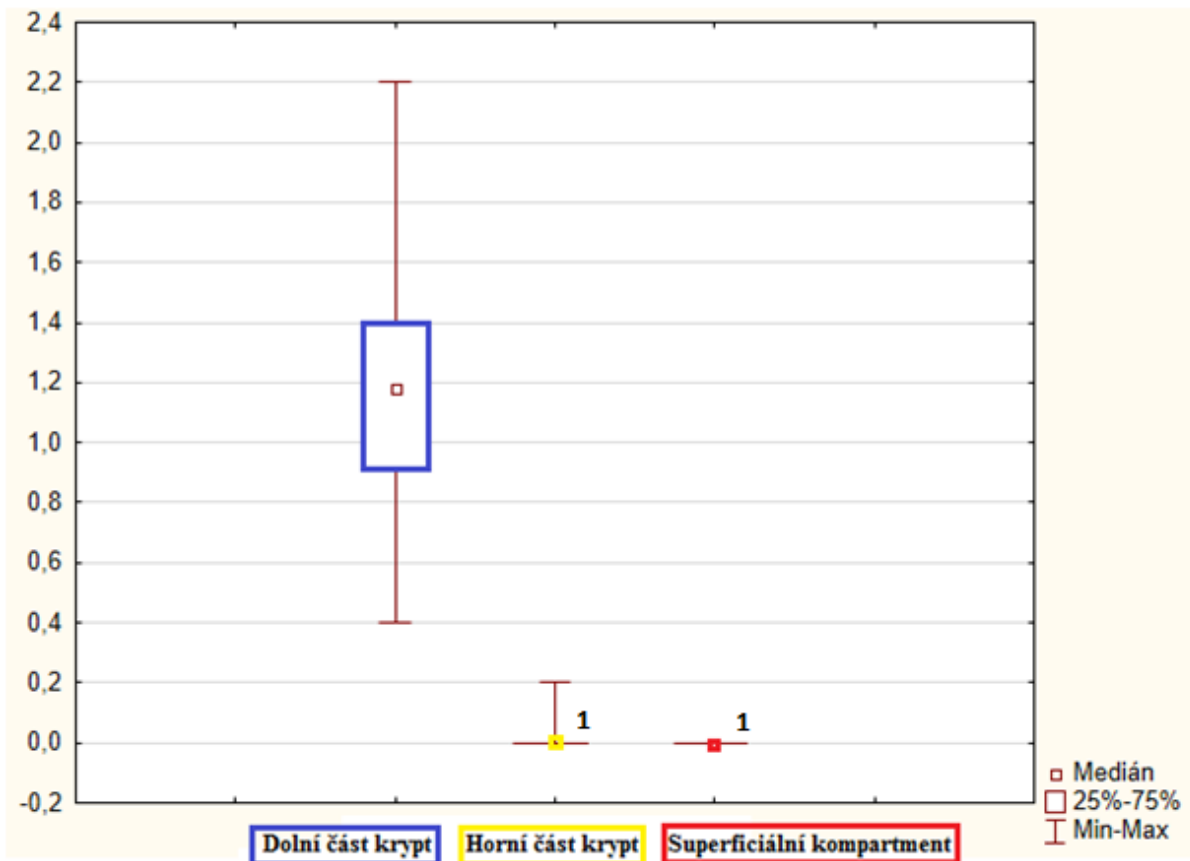
Dolní část krypt vs. horní část krypt: $p < 0,001$

Dolní část krypt vs. superficiální kompartment: $p < 0,001$

Horní část krypt vs. superficiální kompartment: $p < 0,001$

Graf 3.2.1b. Mitóza v kontrolní skupině, vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti dolní části krypt ($p < 0,05$)



Dolní část krypt vs. horní část krypt: $p < 0,001$

Dolní část krypt vs. superficiální kompartment: $p < 0,001$

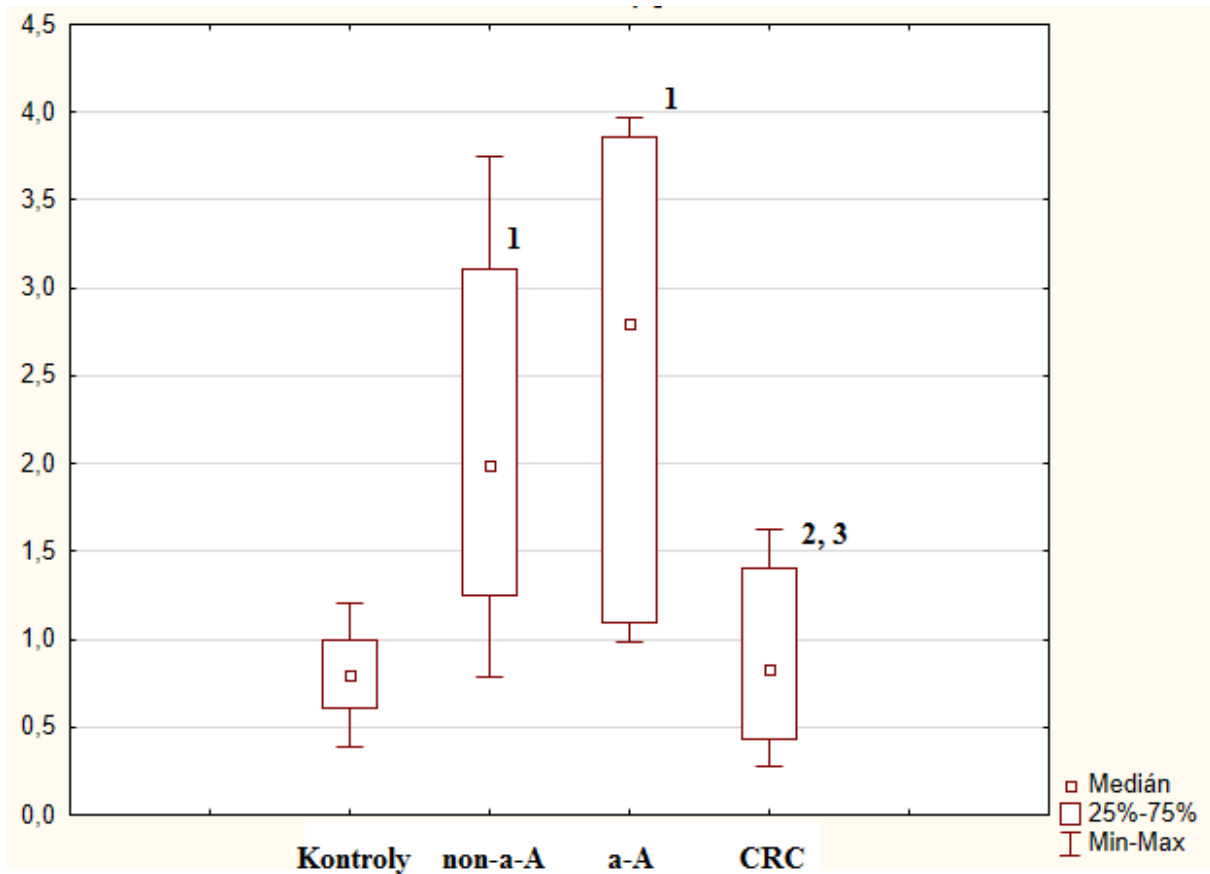
Horní část krypt vs. superficiální kompartment: $p > 0,05$

Graf 3.2.2a. Apoptóza v oblasti dolní části krypt, vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti nepokročilému adenomu ($p < 0,05$)

3: statisticky významný rozdíl proti pokročilému adenomu ($p < 0,05$)



Kontroly vs. non-a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. a-A: $p < 0,001$

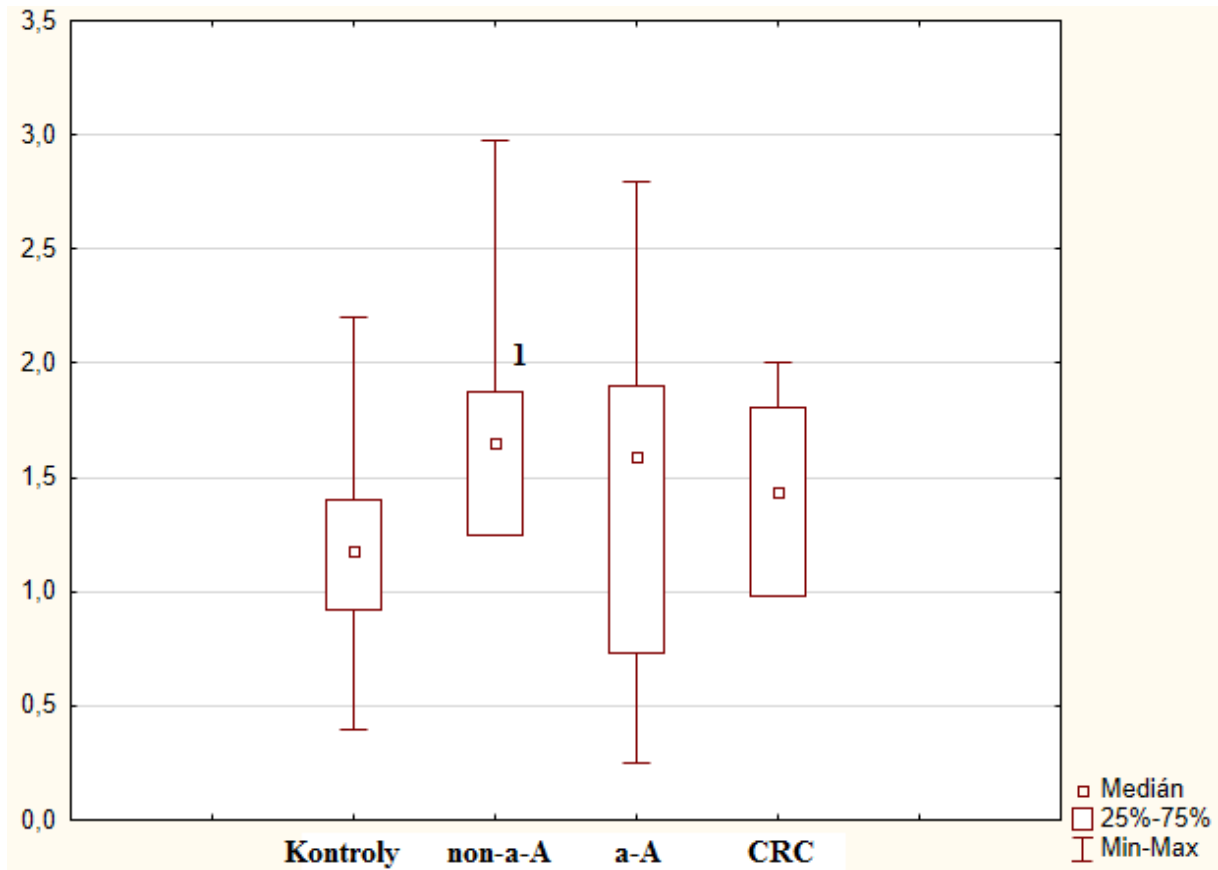
Kontroly vs. CRC: $p > 0,05$

CRC vs. non-a-A: $p = 0,026$

CRC vs. a-A: $p = 0,011$

Graf 3.2.2b. Mitóza v oblasti dolní části krypt, vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



Kontroly vs. non-a-A: $p = 0,006$

Kontroly vs. a-A: $p = p > 0,05$

Kontroly vs. CRC: $p = p > 0,05$

CRC vs. non-a-A: $p = p > 0,05$

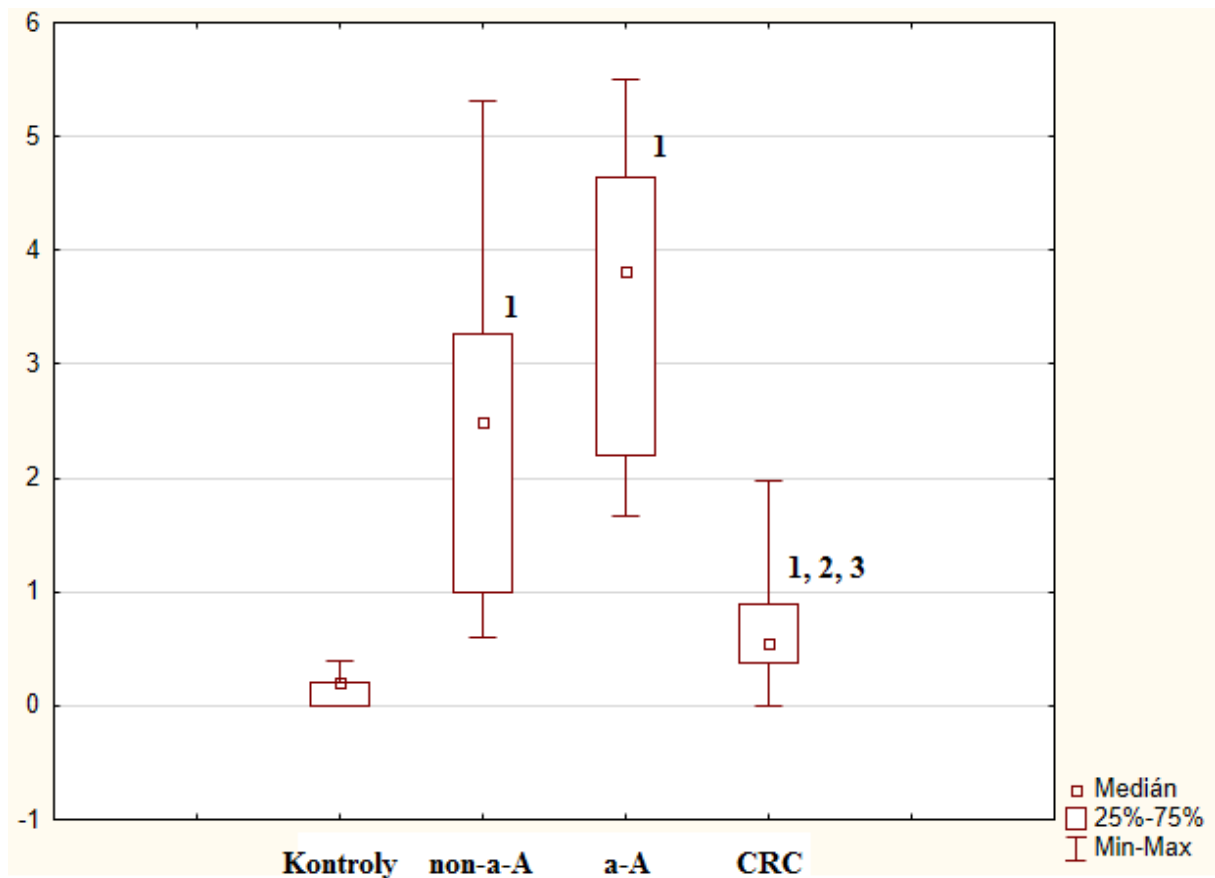
CRC vs. a-A: $p = p > 0,05$

Graf 3.2.3a. Apoptóza v oblasti horní části krypt, vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti nepokročilému adenomu ($p < 0,05$)

3: statisticky významný rozdíl proti pokročilému adenomu ($p < 0,05$)



Kontroly vs. non-a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. CRC: $p < 0,001$

CRC vs. non-a-A: $p < 0,001$

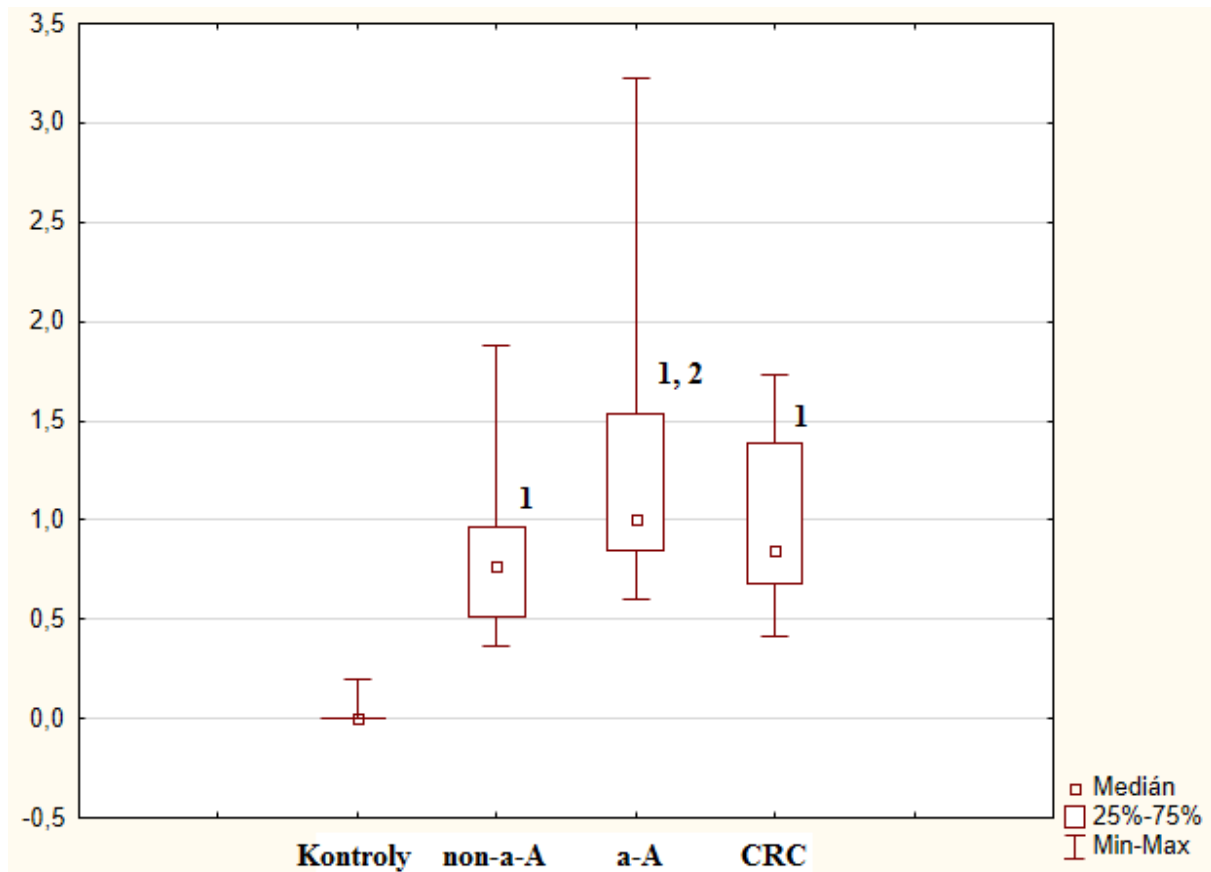
CRC vs. a-A: $p < 0,001$

Non-a-A vs. a-A: $p > 0,05$

Graf 3.2.3b. Mitóza v oblasti horní části krypt, vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti nepokročilému adenomu ($p < 0,05$)



Kontroly vs. non-a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. CRC: $p < 0,001$

CRC vs. non-a-A: $p = p > 0,05$

CRC vs. a-A: $p = p > 0,05$

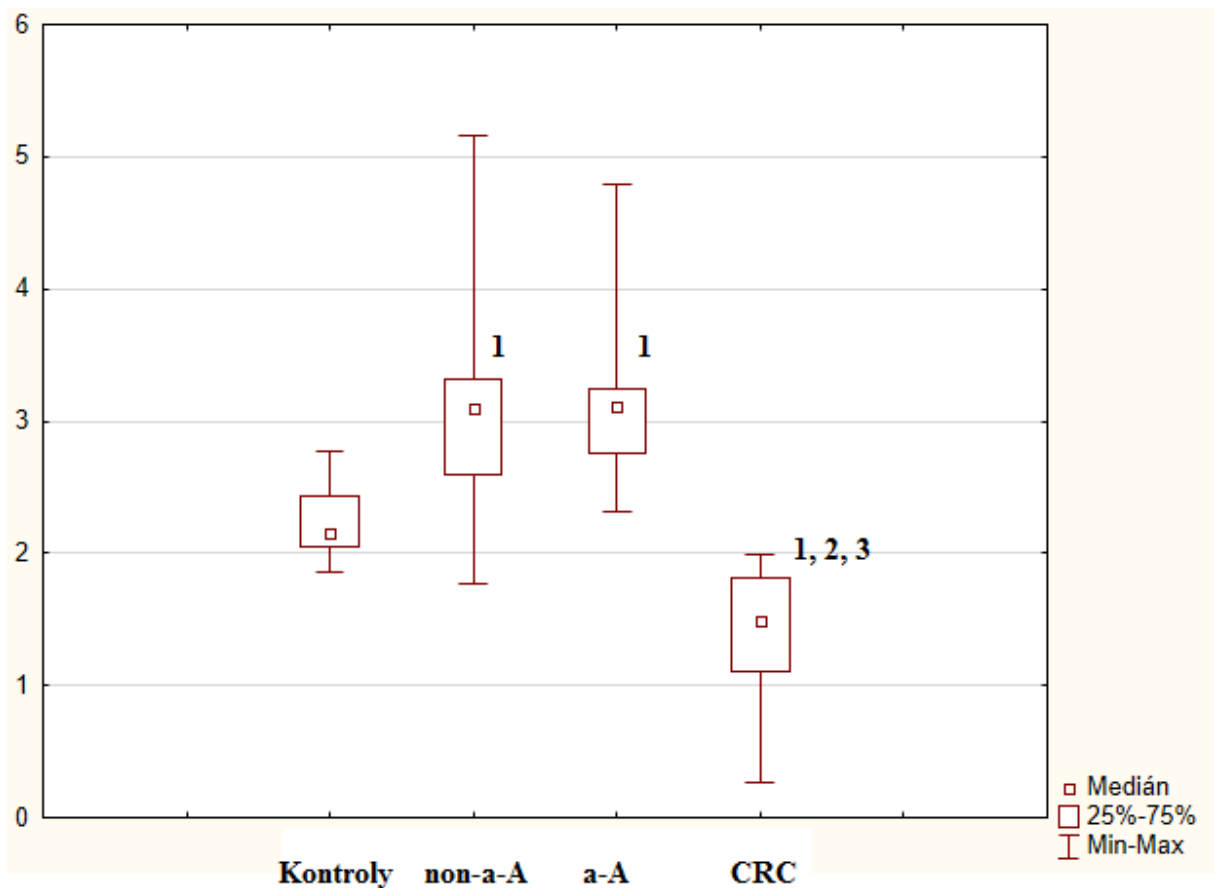
Non-a-A vs. a-A: $p = 0,025$

Graf 3.2.4a. Apoptóza v povrchovém kopartmentu, vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti nepokročilému adenomu ($p < 0,05$)

3: statisticky významný rozdíl proti pokročilému adenomu ($p < 0,05$)



Kontroly vs. non-a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. CRC: $p < 0,001$

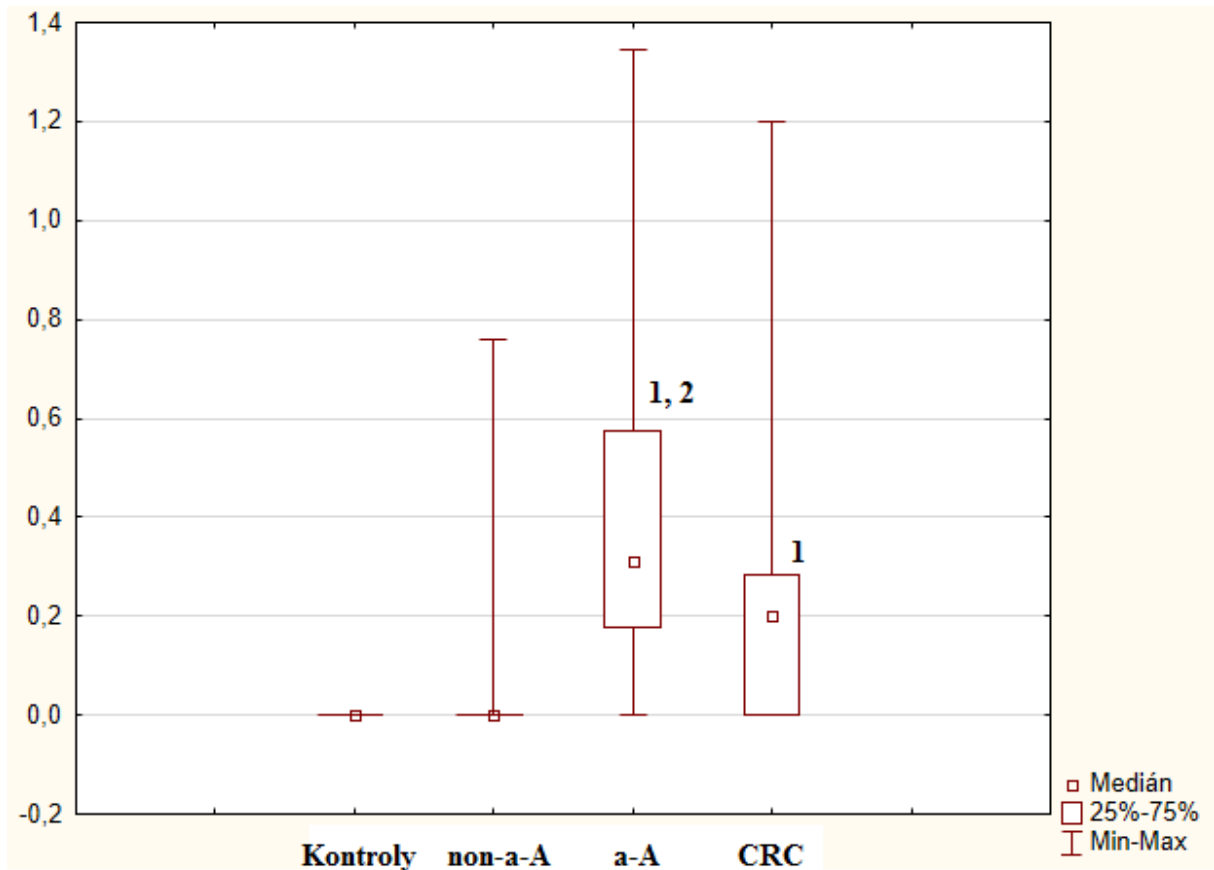
CRC vs. non-a-A: $p < 0,001$

CRC vs. a-A: $p < 0,001$

Graf 3.2.4b. Mitóza v povrchovém kopartmentu, vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti nepokročilému adenomu ($p < 0,05$)



Kontroly vs. non-a-A: $p = p > 0,05$

Kontroly vs. a-A: $p < 0,001$

Kontroly vs. CRC: $p = 0,007$

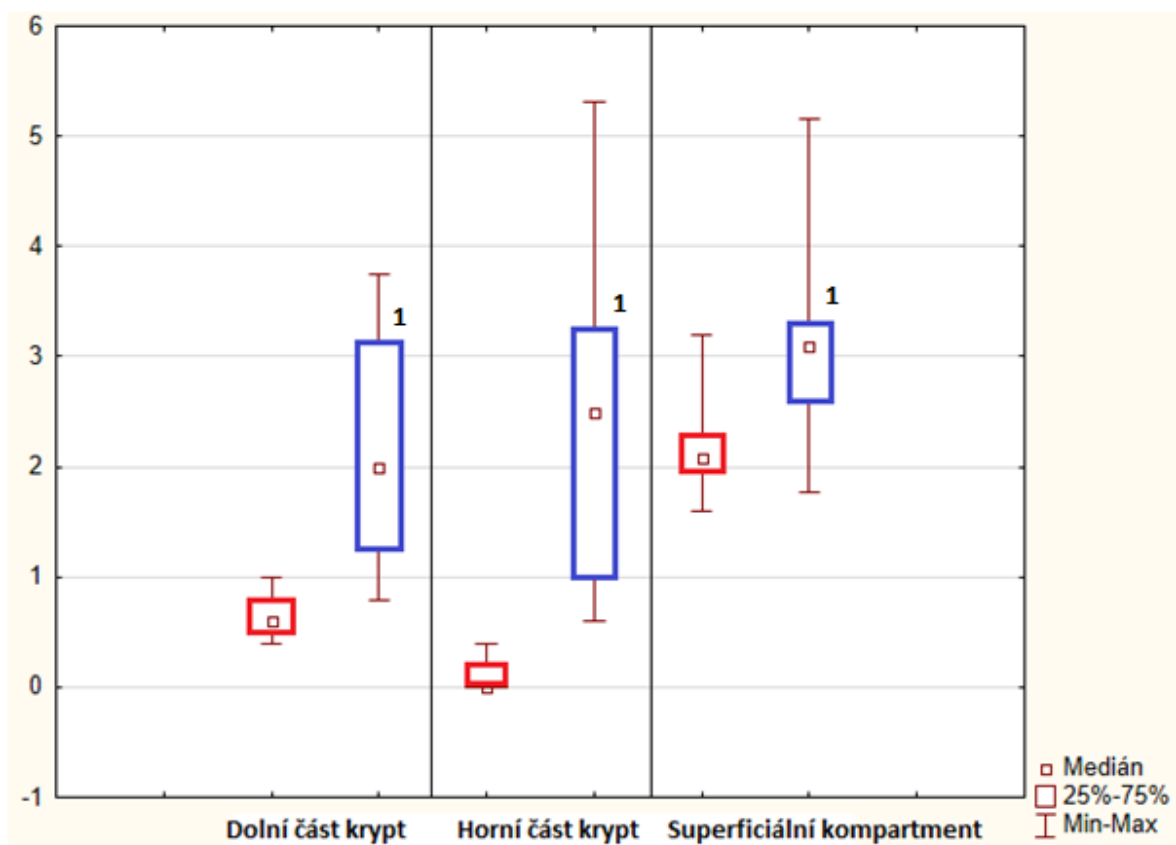
CRC vs. non-a-A: $p = p > 0,05$

CRC vs. a-A: $p = p > 0,05$

Non-a-A vs. a-A: $p = 0,014$

Graf 3.2.5a. Apoptóza u nepokročilého adenomu (modrá barva) ve srovnání s kontrolami v příslušném kompartmentu (červená barva), vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



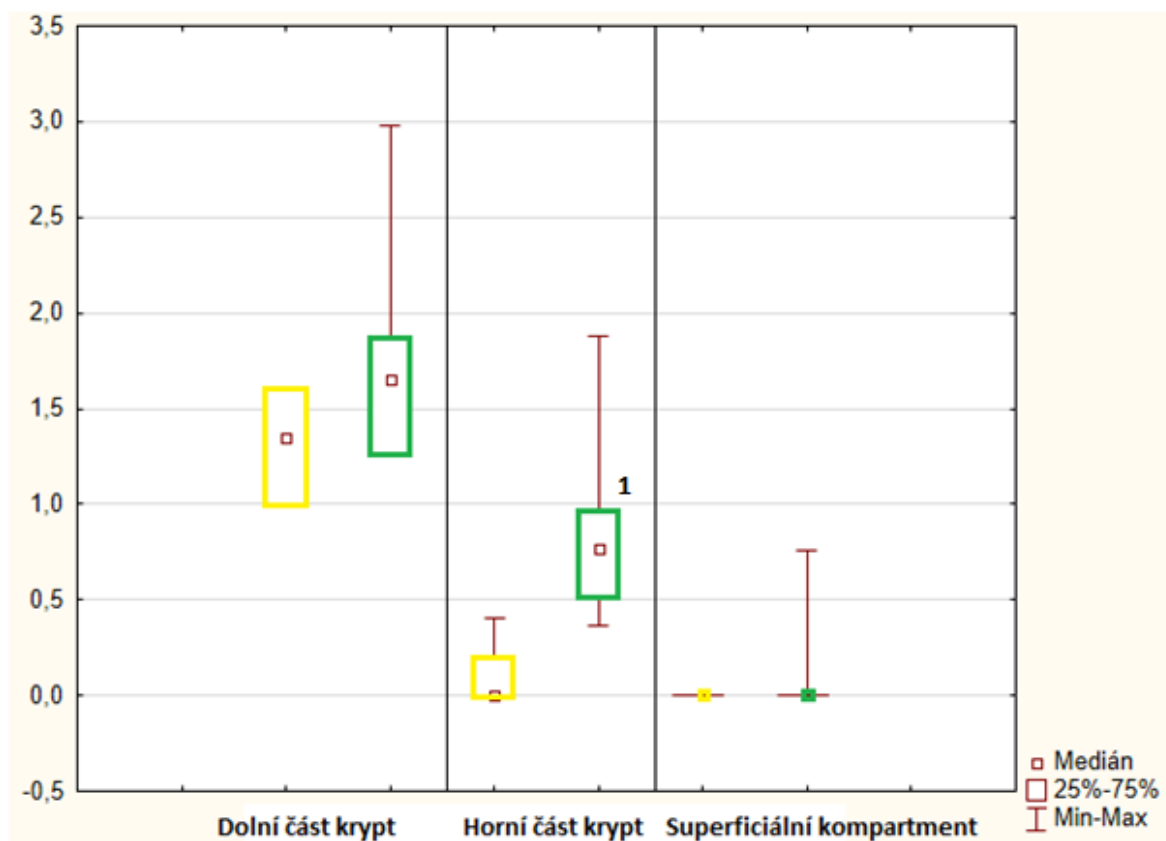
Dolní část krypt: $p = 0,004$

Horní část krypt: $p < 0,001$

Superficiální kompartment: $p = 0,003$

Graf 3.2.5b. Mitóza u nepokročilého adenomu (zelená barva) ve srovnání s kontrolami v příslušném kompartmentu (žlutá barva), vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



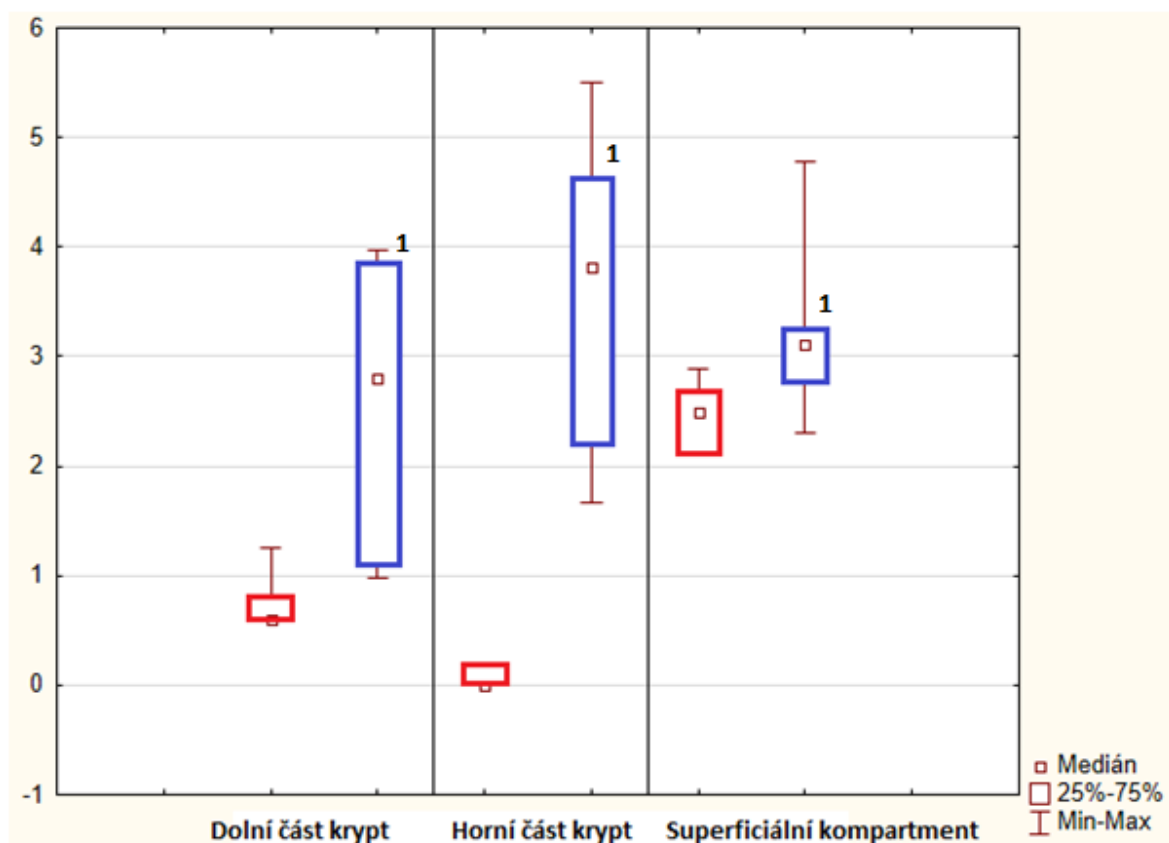
Dolní část krypt: $p > 0,05$

Horní část krypt: $p < 0,001$

Superficiální kompartment: $p > 0,05$

Graf 3.2.6a. Apoptóza u pokročilého adenomu (modrá barva) ve srovnání s kontrolami v příslušném kompartmentu (červená barva), vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



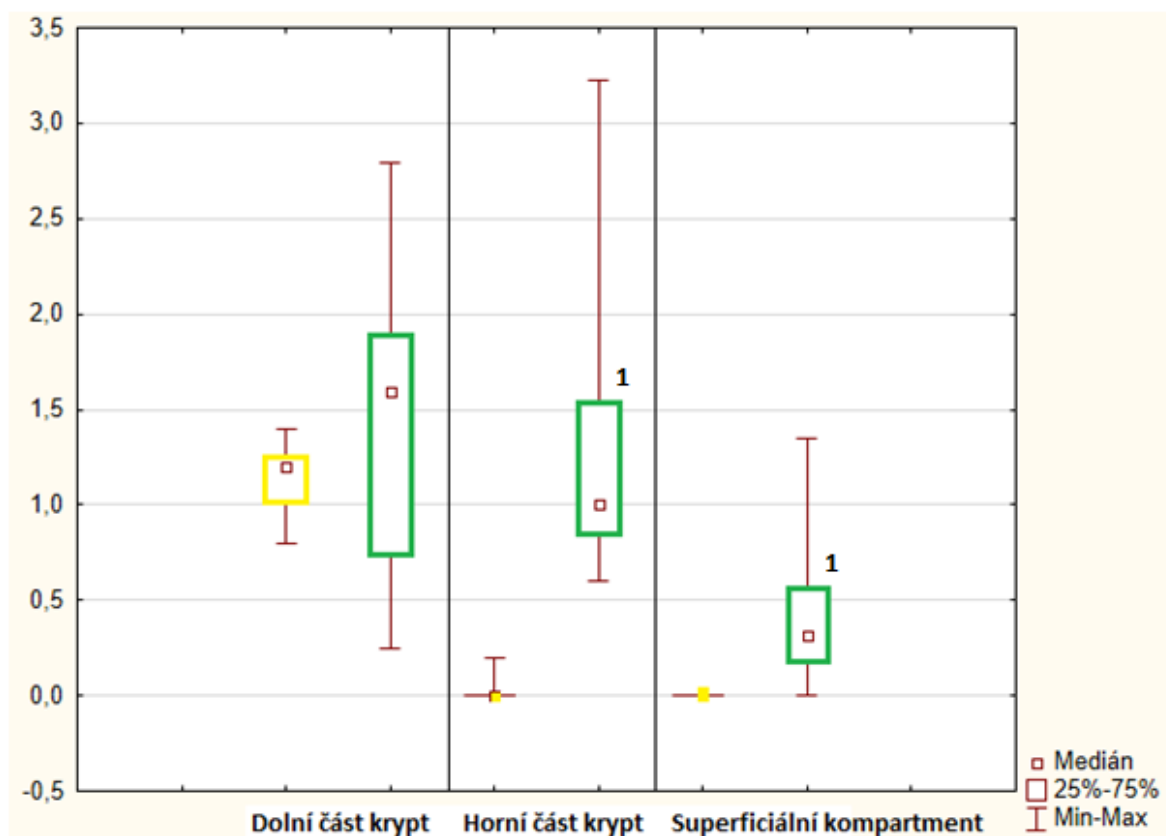
Dolní část krypt: $p = 0,005$

Horní část krypt: $p < 0,001$

Superficiální kompartment: $p = 0,01$

Graf 3.2.6b. Mitóza u pokročilého adenomu (zelená barva) ve srovnání s kontrolami v příslušném kompartmentu (žlutá barva), vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



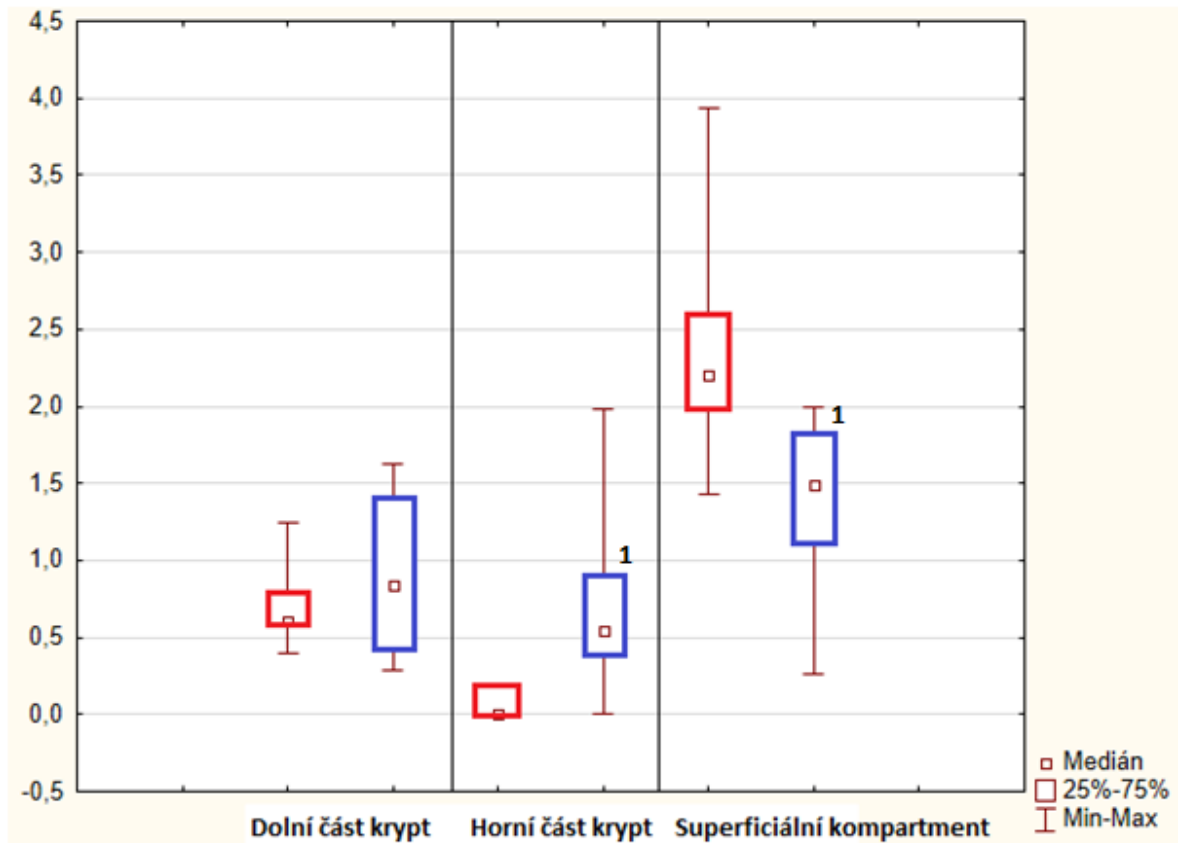
Dolní část krypt: $p > 0,05$

Horní část krypt: $p < 0,001$

Superficiální kompartment: $p = 0,003$

Graf 3.2.7a. Apoptóza u kolorektálního karcinomu (modrá barva) ve srovnání s kontrolami v příslušném kompartmentu (červená barva), vyjádřená jako apoptotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



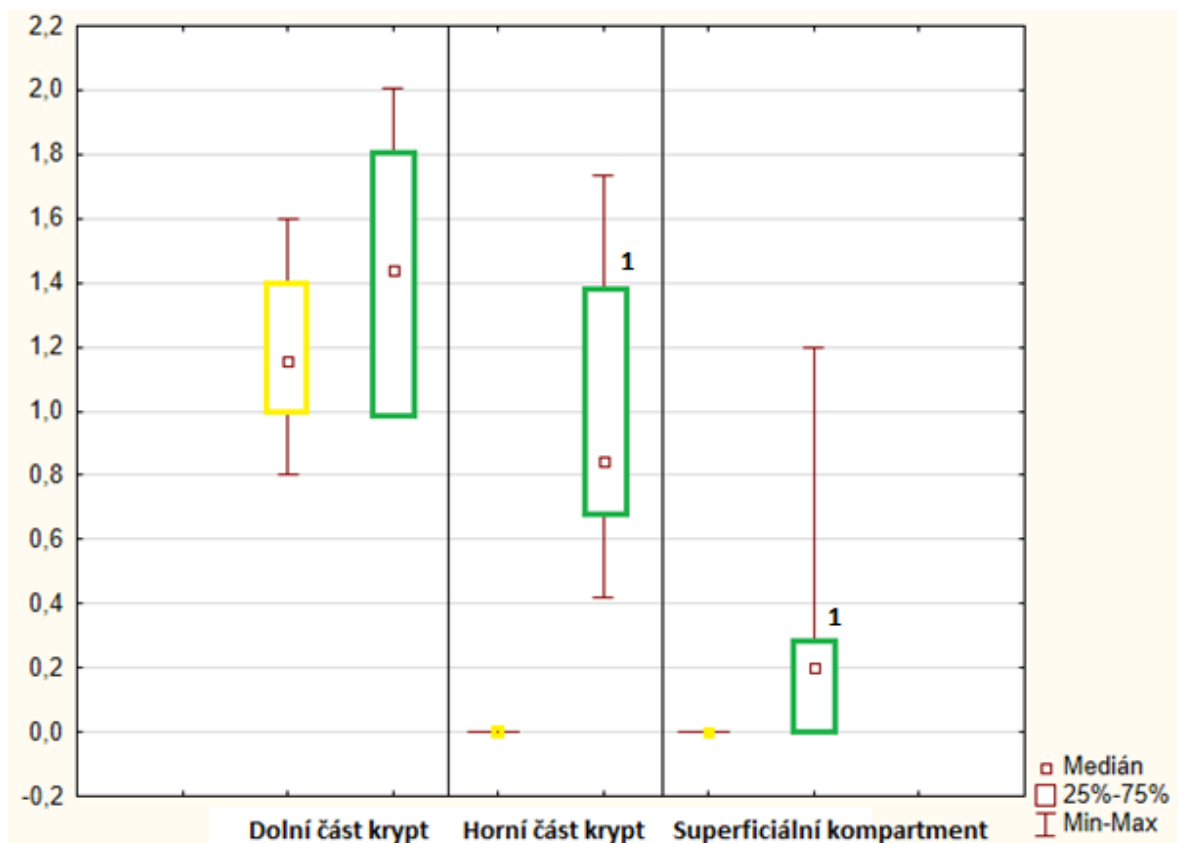
Dolní část krypt: $p > 0,05$

Horní část krypt: $p < 0,001$

Superficiální kompartment: $p = 0,003$

Graf 3.2.7b. Mitóza u kolorektálního karcinomu (zelená barva) ve srovnání s kontrolami v příslušném kompartmentu (žlutá barva), vyjádřená jako mitotický index [%]

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)



Dolní část krypt: $p > 0,05$

Horní část krypt: $p < 0,001$

Superficiální kompartment: $p = 0,013$

Tabulka 3.2.1.

Immunohistochemická detekce aktivovanou kaspázou-3 pozitivních buněk v oblasti horní části krypt. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián a interkvartilové rozpětí (IQR) apoptotických indexů.

Počet kompartmentů hodnocených v jednotlivých skupinách je uveden v závorce.

1: statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

2: statisticky významný rozdíl proti nepokročilému adenomu ($p < 0,05$)

3: statisticky významný rozdíl proti pokročilému adenomu ($p < 0,05$)

	Apoptotický index aktivovanou kaspázou-3 pozitivních buněk v horní části krypt (%)
Kontroly	Medián 0; IQR 0 (13)
Nepokročilý adenom	Medián 1,37; IQR 1,18-1,42 (8) ¹
Pokročilý adenom	Medián 1,84; IQR 1,72-2,03 (10) ^{1, 2}
Kolorektální karcinom	Medián 0,86; IQR 0,77-1,05 (9) ^{1, 2, 3}

3.3. Diskuse

Mitotické, proliferační a apoptotické děje epiteliálních kolorektálních buněk jsou fyziologickou součástí procesů odehrávajících se v tlustém střevě. Tyto děje jsou komplexně řízené a jakékoliv narušení rovnováhy může vést ke vzniku kolorektální patologie. Narušení míry mitotických a apoptotických dějů bylo detekováno u zánětlivých onemocnění tlustého střeva včetně idiopatických střevních zánětů (185, 186) a kolorektálních neoplázií (187-189).

Naše práce se zabývala stanovením míry mitózy a apoptózy v kolorektální neoplázii a okolní zdravé sliznici. Alteraci proliferace a apoptózy u adenomů a karcinomů kolorekta zkoumali vědecké týmy již od 90. let 20. století (187-189), avšak doposud nebyla ve světové literatuře publikována studie, která by zabývala stanovením mitotické a apoptotické aktivity v jednotlivých sporadických kolorektálních neopláziích podle současně platné definice pokročilosti kolorektálního adenomu.

Mitotické i apoptotické děje jsou i v případě kolorektálních neoplázií komplexně regulovány. Bylo dokumentováno, že se na regulaci apoptózy kolorektálních neoplázií kromě rodiny BCL-2 proteinů (148) a anti-apoptoticky působících inhibitorů proteinů apoptózy včetně survivinu (154, 155) významně podílí i exprese BCL-3 proteinů, a to cestou inhibice aktivace apoptózy. Kofaktor BCL-3 nukleárního faktoru- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) byl poprvé identifikován v případě translokace t(14;19) u chronické lymfatické leukémie, je však asociován s vývojem i dalších hematologických malignit a rovněž s vývojem solidních tumorů včetně kolorektálního karcinomu (190). Mezi expresí nukleárního BCL-3 a špatnou prognózou u nemocných s CRC existuje těsná korelace (191).

Signální cesta NF- $\kappa\beta$ má obzvláštní důležitost při vzniku a vývoji malignit: stimuluje přežívání a proliferaci buněk, podílí se na progresi tumoru, angiogenezi a metastazování (192, 193). Exprese BCL-3 urychluje růst CRC *in vivo*, a to cestou inhibice apoptózy díky indukcí „záchranné“ AKT signální dráhy. Obdobné výsledky byly pozorovány i u linie buněk odvozených od adenomu. Publikace Urbanové et al. zdůrazňuje, že účinek BCL-3 je závislý na jeho vazbě na NF- $\kappa\beta$ a pro kolorektální karcinogenezi je důležitý právě komplex BCL-3:NF- $\kappa\beta$ (190).

Minemura et al. se zabývali expresí genů v kolorektálních laterally spreading type tumorech (LST), které jsou definované jako neoplázie >10 mm (194). Kromě jiných produktů genů byl

ve tkáni vyšetřovaných adenomů stanovován BCL2L1 protein; ten byl výrazně zvýšen u LST ve srovnání s pedunkulujícími kolorektálními adenomy velikosti >10 mm. Produkt genu pro BCL2L1 je rovněž řazen mezi anti-apoptotické proteiny (195).

Vzhledem k fyziologicky odlišné míře proliferace a apoptózy cylindrických epiteliálních buněk v jednotlivých kompartmentech střevních krypt byla v naší studii mitotická a apoptotická aktivita epiteliálních buněk získaných z neoplázie a zdravé sliznice hodnocena ve třech různých kompartmentech a následně mezi jednotlivými patologiemi interkompartimentově porovnána. Naši studii považujeme za silnou mimo jiné proto, že v každém kompartmentu bylo po obarvení vzorků hematoxylinem eozinem hodnoceno celkem nejméně 750 buněk.

Míra apoptózy byla dále kvantifikována pomocí imunohistochemických metod, konkrétně detekcí aktivované (štěpené) kaspázy 3. Překvapivá falešná pozitivita imunohistochemické detekce v okrajových oblastech mohla být zřejmě způsobena traumatizací bioptického vzorku při jeho odběru, což vedlo k rychlé aktivaci apoptotických signálních drah. Část vzorků (zejména menších rozměrů) nebylo možné hodnotit vůbec. U zbylé (hodnocené) části vzorků nebylo možné odečíst apoptotickou aktivitu v povrchovém kompartmentu a aktivitu při ústí krypt, hodnocen byl tedy kompartment horní a dolní části krypt. Za směrodatná považujeme data z oblasti horní části krypt, neboť pouze z tohoto kompartmentu byl získán dostatečný počet vzorků k následnému statistickému zpracování.

Komplexnost a rovnováha proliferace a apoptózy epiteliálních buněk, zajišťující homeostázu v tlustém střevě i přes extrémní obrat cylindrických buněk sliznice tlustého střeva, je fascinující. Fyziologicky je přítomna mitotická aktivita pouze v dolní části krypt. V horní části krypt a v povrchovém kompartmentu je proliferační aktivita téměř nulová. I naše studie potvrdila, že mírná apoptotická aktivita je fyziologicky přítomna ve vzorcích zdravé sliznice v dolním kompartmentu krypt. Lze předpokládat, že apoptotická aktivita v této části krypt může být mechanismem přispívajícím k udržení stability genetické informace u množících se kmenových buněk a progenitorů (196, 197). Horní část krypt je kompartment, ve kterém buňky podléhají diferenciaci (198). Mitotická i apoptotická aktivita zde klesly k nulovým hodnotám. Opětný nárůst množství apoptotických buněk byl poté pozorován v povrchovém kompartmentu, ze kterého jsou buňky ze střevní sliznice odstraňovány v rámci své přirozené obnovy.

Stanovením proliferace a apoptózy se u adenomů asociovaných s familiární adenomatózní polypózou zabývali Sträter et al. Ti v roce 1995 identifikovali výrazně zvýšenou proliferaci

(hodnocenou pomocí Ki-67 indexu) a apoptózu (detekovanou pomocí TUNEL reakce – terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labelling) epiteliálních buněk v neoplasticky změněných adenomech. Dále dokumentovali abnormální distribuci proliferujících buněk a apoptotických dějů: proliferující buňky byly nejčastěji přítomny při povrchu krypt, v blízkosti lumen. Apoptotické děje byly nejčastěji lokalizovány v oblasti na přechodu dolní a horní části krypt (187).

Weiss at al. stanovovali míru proliferace a apoptózy epiteliálních buněk rovněž u pacientů s familiární adenomatózní polypózou, konkrétně v jejich sliznici kolorekta, tubulárních a tubovilózních adenomech. Potvrdili, že ve zdravé sliznici je přítomna rovnováha mezi proliferací a apoptózou buněk. U tubulárního i tubovilózního adenomu identifikovali signifikantně zvýšenou proliferaci; míru apoptózy dokumentovali u tubulárního adenomu jako nezměněnou a u tubovilózního (pokročilého) adenomu jako sníženou (188).

Naše studie prokázala, že při transformaci zdravé sliznice kolorekta v nepokročilý adenom došlo k signifikantnímu zvýšení mitotické aktivity v dolní a horní část krypt. Signifikantní zvýšení apoptotické aktivity bylo na rozdíl od Weissovy studie (188) u nepokročilého adenomu pozorováno, a to ve všech třech hodnocených kompartmentech. Míra apoptotické aktivity se signifikantně nezměnila při další progresi nepokročilého adenomu v pokročilý adenom; mitotická aktivita se však dále signifikantně zvýšila v oblasti horní části krypt a povrchovém kompartmentu. Vzhledem k obdobným trendům signifikantního zvýšení apoptotické a mitotické aktivity u nepokročilé a pokročilé kolorektální neoplázie ve srovnání s kontrolami lze předpokládat, že tyto děje mají společné spouštěče, včetně alterací genetických (Kapitola 1.3.). Velmi zajímavou skutečností je přítomnost nezměněné mitotické aktivity u nepokročilého adenomu v povrchovém kompartmentu, což je známkou zachování terminální diferenciace přes změněnou morfologii v tomto kompartmentu, a je tak v souladu s literaturou (199). Naproti tomu transformace nepokročilého adenomu v pokročilý adenom vede k signifikantnímu zvýšení mitotické aktivity v horní části krypt a povrchovém kompartmentu, což vylučuje možnost kompletní a fyziologické diferenciace epiteliálních buněk.

Alterací proliferace a mitózy u sporadických kolorektálních neoplázií včetně adenokarcinomu se zabývali Kikuchi et al., kteří publikovali svou studii na toto téma v roce 1997: dokumentovali, že u adenomů (skupina zahrnující adenomy různého stupně dysplazie) dochází ke zvýšené proliferaci; proliferace pak dosahuje maxima ve vzorcích adenokarcinomů. Identifikovali zvýšenou apoptózu ve skupině adenomů, ve skupině adenokarcinomů však

následně docházelo k poklesu míry apoptózy (189). Podobně i Leiszter potvrdil, že mitotický index je u sporadického kolorektálního adenokarcinomu signifikantně vyšší a apoptotický index signifikantně nižší ve srovnání se zdravou sliznicí kolorekta (126). V naší studii byl poslední krok sekvence adenom-karcinom spojen se signifikantním snížením apoptotické aktivity ve všech hodnocených kompartmentech, přičemž mitotická aktivita zůstala nezměněna. K progresi karcinomu tak jistě může přispívat produkce „inkompetentních“ buněk, které navíc nejsou dostatečně a správně eliminovány. Výsledky morfologických nálezů u nepokročilého adenomu, pokročilého adenomu a kolorektálního karcinomu dobře korelovaly s imunohistochemickými výsledky aktivované kaspázy-3 v horní části krypt.

Skutečnost, že při transformaci pokročilého adenomu v karcinom dojde k nežádoucímu signifikantnímu poklesu apoptózy, je jistě dána komplexním působením mnoha faktorů. Mimo jiné lze předpokládat stěžejní zapojení anti-apoptoticky působících inhibitorů proteinů apoptózy. Hernandez et al. zkoumali expresi survivinu ve tkáni kolorektálního adenomu a karcinomu: závěry jeho práce ukazují, že během sekvence vývoje normální sliznice kolorekta – adenom – karcinom dochází ke zvyšování exprese survivinu. Další výsledky této práce ukazují, že exprese survivinu je při srovnání s normální sliznicí tlustého střeva signifikantně zvýšená nejen ve tkáni primárního kolorektálního karcinomu, ale i v metastatické tkáni kolorektálního karcinomu (v jaterních metastázách, lymfatických uzlinách a plicních metastázách). Dále exprese survivinu korelovala s narůstající dediferenciací (gradingem) karcinomu. Tato zjištění podporují možnosti využití survivinu jako potenciálního terapeutického cíle. Jeho léčebné využití pro onemocnění v oblasti kolorekta jsou navíc žádoucí i proto, že survivin se v epitelálních buňkách tlustého střeva dospělého člověka vyskytuje v minimálním množství ve srovnání s tkání nádorovou (156).

Butyrát (podrobně Kapitola 1.6.6.), mastná kyselina s krátkým řetězcem, produkovaná střevním mikrobiomem z dietní vlákniny, je nejznámějším inhibitorem histon deacetylázy (174, 200). Butyrát je preferovaným zdrojem energie pro zdravé epitelální buňky tlustého střeva (201), přesto vzhledem ke své rozdílné koncentraci působí na epitelální cylindrické buňky různě: nízké koncentrace butyrátu, typické pro bazi krypt, jsou rychle metabolizovány a stimulují proliferaci buněk. Vyšší koncentrace butyrátu, přítomné v povrchovém kompartmentu, převyšují metabolickou kapacitu epitelálních buněk. Dochází tak k akumulaci butyrátu v jádře buňky, kde přebírá funkci inhibitoru histon deacetylázy a indukuje apoptózu (171). Předpoklady působení butyrátu na mitotické a apoptotické děje v epitelálních buňkách

uspořádaných v dolní části krypt a superficiálním kompartmentu ve vzorcích zdravé sliznice byly v naší studii potvrzeny.

Vzhledem k Warburgově efektu preferují buňky kolorektální neoplázie jako zdroj energie glukózu. Dochází tak snadno k akumulaci butyrátu v jádrech buněk neoplázie, kde opět indukuje apoptózu cestou inhibice histon deacetylázy (171). Naše studie potvrdila signifikantně vyšší apoptózu ve vzorcích nepokročilých i pokročilých adenomů ve srovnání se vzorky kontrolními, což naplňuje předpoklady Warburgova efektu. Chemopreventivní strategie vzniku kolorektálního karcinomu zahrnující užívání vlákniny a mikrobiot produkujících butyrát se zdá být ideální volbou z následujících důvodů: butyrát, jakožto inhibitor histon deacetylázy, je produkován výlučně v tlustém střevě, tím je vyloučena jeho systémová degradace. Dále je butyrát fyziologicky metabolizován normálními buňkami tlustého střeva a cíleně tumor-supresorově působí na buňky kolorektální neoplázie (171).

Signifikantní pokles apoptotické aktivity ve stádiu kolorektálního karcinomu ve srovnání s pokročilým kolorektálním adenomem je sice v souladu s předchozími studiemi (126, 189), avšak předpoklady Warburgova efektu naplněny nebyly. Vysvětlení jsou vícečetná, kromě jiného za poklesem apoptotické aktivity asociované s transformací pokročilého kolorektálního adenomu v karcinom stojí anti-apoptoticky působící proteiny včetně survivinu, avšak i další „záchranné“ dráhy – například AKT, JAK/STAT a ERK, které jsou indukovány mitogeny secernovanými apoptotickými tělísky (166). Efektivním komplexním přístupem k terapii kolorektálního karcinomu by tak mohlo/mělo být kombinované použití apoptózu-indukujících léčiv (inhibitory histon deacetylázy, např. butyrát) spolu s agens, které suprimují všechny kompenzatorní „záchranné dráhy“ aktivované během procesu apoptózy a léčiva inhibující expresi survivinu.

Mezi léčiva ovlivňující expresi survivinu patří inhibitory izoenzymu cyklooxygenázy-2, inducibilního produktu genu COX-2. COX-2 je zvýšeně exprimován v kolorektálních neopláziích (117) a účastní se vzniku prostaglandinů včetně prostaglandinu E2, který je mimo jiné důležitým mediátorem karcinogenních procesů (114-116). Celecoxib, inhibitor cyklooxygenázy-2, působí anti-apoptoticky snížením exprese inhibitoru proteinu apoptózy, survivinu, v nádorové tkáni kolorekta (162, 202), a působí antagonisticky vůči anti-apoptoticky působícímu proteinu Mcl-1. Inhibitory cyklooxygenázy-2 měly doposud místo v prevenci vývoje neoplázií kolorekta u pacientů s familiární adenomatózní polypózou, avšak vzhledem

ke kardiovaskulární toxicitě některých zástupců COX-2 inhibitorů je nutné hledat další léčiva s potenciálem příznivého ovlivnění apoptózy, avšak s nižšími nežádoucími účinky (202).

Preparáty 5-aminosalicylové kyseliny se u nemocných s idiopatickými střevními záněty používají především pro svůj protizánětlivý efekt. Tato léčiva se však v současné době používají i jako chemopreventivní agens, neboť jsou schopna příznivě ovlivňovat mitózu a apoptózu epiteliálních buněk kolorekta (130). Studie provedená Eadenem et al. prokázala, že riziko kolorektálního karcinomu u pacientů s ulcerózní kolitidou může být sníženo pravidelnou terapií 5-aminosalicylové kyseliny (203). Urbanová et al. ve své studii mimo jiné pozorovala, že 5-aminosalicylová kyselina suprimuje expresi BCL-3 v buňkách kolorektálního karcinomu, což vede ke snížení inhibice aktivace apoptózy regulované BCL-3 (190).

Koliciny, působky produkované gramnegativními bakteriemi v tlustém střevě, se vyznačují účinky anti-bakteriálními, probiotickými a pro-apoptotickými (95, 204). Asociaci produkce kolicinů s kolorektálními neopláziemi jsme zkoumali v našich předchozích studiích. Dokumentovali jsme signifikantně vyšší produkci kolicinů u pacientů s pokročilou kolorektální neoplázií ve srovnání s neoplázií nepokročilou. Dále jsme však potvrdili signifikantně vyšší produkci pro-apoptoticky působících kolicinů u pacientů s kolorektálním karcinomem ve srovnání s pacienty s kolorektálním adenomem (24), což neodpovídá míře apoptózy u kolorektálního karcinomu (ve srovnání s adenomem) v naší současné studii. Proto je tedy opět nevyhnutelně nutné akceptovat komplexnost řízení mitotických a apoptotických dějů včetně uplatnění se inhibitorů proteinů apoptózy a mitogenů uvolněných z apoptotických tělísek, aktivujících „záchranné signální dráhy“ při transformaci pokročilého kolorektálního adenomu v karcinom.

Z naší studie vyplynul důležitý závěr pro klinickou praxi: mitotická a apoptotická aktivita se při srovnání vzorků odebraných ze zdravé sliznice pacientů s kolorektální patologií se vzorky zdravých kontrol nelišila. Tím jsme dokumentovali, že alterace proliferace a apoptózy je lokalizovaná pouze do oblasti kolorektální neoplázie. Proto v případě, že nejde o kolorektální neoplázií asociovanou s idiopatickým střevním zánětem (ulcerózní kolitidou), je adekvátní odstranění samotné neoplázie (endoskopické nebo chirurgické) dostačující, a kolektomie není indikovaná.

Neprokázali jsme signifikantní rozdíly v mitotické a apoptotické aktivitě mezi neopláziemi lokalizovanými v pravé (cékum, c. ascendens, c. transversum) a levé (c. descendens, c. sigmoideum, rektum) části tračnicku. Výsledky však hodnotíme s rezervou, neboť se jedná o

malé podskupiny jedinců: pravostrannou neoplázií mělo 8/18 pacientů s nepokročilým adenomem, 4/13 jedinců s pokročilým adenomem a 4/13 nemocných s kolorektálním karcinomem.

V současné době je přítomnost deregulace mitózy a apoptózy při iniciaci a progresi maligních onemocnění včetně kolorektálního karcinomu nezpochybnitelná. Proto především v posledním desetiletí bylo ve výzkumu vyvinuto mnoho úsilí jak proliferaci a apoptózu neoplastických buněk ovlivňovat, a terapeutické strategie zahrnující inhibici mitózy a indukci apoptózy se staly a stávají efektivní součástí léčby maligních onemocnění, včetně léčby kolorektálního karcinomu (133, 134, 205-207).

V roce 2000 byl v České Republice do praxe zaveden populační screening kolorektálního karcinomu, který se jeví být podle posledních dostupných statistik úspěšným (2, 208-210). Přesto se domíváme, že aplikace poznatků vyplývajících z naší studie, konkrétně možnost ovlivnění mitózy a apoptózy již na úrovni pokročilého kolorektálního adenomu a kolorektálního karcinomu v jeho časném stádiu, se jeví pro klinickou praxi jako mimořádně účelná a žádoucí.

4. Závěry

- Zavedli jsme metodiku a stanovili jsme míru mitózy a apoptózy epiteliálních buněk sliznice tlustého střeva u pacientů s nepokročilým a pokročilým kolorektálním adenomem, kolorektálním karcinomem a u osob s normálním koloskopickým nálezem

(s negativní osobní anamnézou kolorektální neoplázie a idiopatického střevního zánětu).

- Potvrdili jsme, že míra mitotické a apoptotické aktivity v jednotlivých kompartmentech kolorektální neoplázie závisí na histologickém profilu patologie. Při transformaci zdravé sliznice v nepokročilý adenom došlo k signifikantnímu zvýšení apoptotické aktivity ve všech kompartmentech a k signifikantnímu zvýšení mitotické aktivity v oblasti dolní a horní části krypt. Při přeměně nepokročilého kolorektálního adenomu v pokročilý adenom nedošlo k další signifikantní změně v apoptotické aktivitě, avšak bylo pozorováno signifikantní navýšení mitotické aktivity v oblasti horní části krypt a v superficiálním kompartmentu. Při transformaci pokročilého kolorektálního adenomu v karcinom byl dokumentován signifikantní pokles v apoptotické aktivitě ve všech hodnocených kompartmentech.
- Dokumentovali jsme, že úroveň mitotické a apoptotické aktivity epiteliálních buněk zdravé sliznice u pacientů s nálezem kolorektální patologie nebyla odlišná při srovnání s mitotickou a apoptotickou aktivitou sliznice kolorekta jedinců z kontrolní skupiny. Tento poznatek má důležité konsekvence pro klinickou praxi.
- Prokázali jsme, že lokalizace kolorektální neoplázie neměla vliv na míru mitózy a apoptózy epiteliálních buněk v oblasti patologie.
- Domníváme se, že vzhledem k jasně definovaným změnám v mitotické a apoptotické aktivitě epiteliálních buněk v oblasti kolorektální neoplázie v jednotlivých stádiích, tedy u nepokročilého kolorektálního adenomu, pokročilého kolorektálního adenomu a kolorektálního karcinomu, by bylo možné získané poznatky aplikovat do klinické praxe s cílem zpomalit a/nebo zamezit definitivnímu vývoji kolorektálního karcinomu. Za optimální bychom považovali možnost komplexního ovlivnění míry mitotické a apoptotické aktivity při transformaci pokročilého kolorektálního adenomu v karcinom.

Literatura:

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359-86.

2. Epidemiologie zhoubných nádorů v České Republice. ISSN 1802-8861. Dostupné na: www.svod.cz. (cit. 2017-01-15).
3. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(4): 220-41.
4. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM klasifikace zhoubných novotvarů. 7. vydání. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2011. p 88-92. ISBN 978-80-904259-6-5.
5. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014; 383(9927): 1490-502.
6. Kappelman MD, Farkas DK, Long MD, Erichsen R, Sandler RS, Sørensen HT, Baron JA. Risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases: a nationwide population-based cohort study with 30 years of follow-up evaluation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12(2): 265-73.
7. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(6): 1688-94.
8. La Vecchia C, Ferraroni M, Mezzetti M, Enard L, Negri E, Franceschi S, Decarli A. Attributable risks for colorectal cancer in northern Italy. *Int J Cancer* 1996; 66(1): 60-4.
9. Dahm CC, Keogh RH, Spencer EA, Greenwood DC, Key TJ, Fentiman IS, Shipley MJ, Brunner EJ, Cade JE, Burley VJ, Mishra G, Stephen AM, Kuh D, White IR, Luben R, Lentjes MA, Khaw KT, Rodwell Bingham SA. Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(9): 614-26.
10. Boyle T, Fritschi L, Tabatabaei SM, Ringwald K, Heyworth JS. Smoking, alcohol, diabetes, obesity, socioeconomic status, and the risk of colorectal cancer in a population-based case-control study. *Cancer Causes Control* 2014; 25(12): 1659-68.
11. Peeters PJ, Bazelier MT, Leufkens HG, de Vries F, De Bruin ML. The risk of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes: associations with treatment stage and obesity. *Diabetes Care* 2015; 38(3): 495-502.
12. Alemán JO, Eusebi LH, Ricciardiello L, Patidar K, Sanyal AJ, Holt PR. Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. *Gastroenterology* 2014; 146(2): 357-73.

13. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, Schloss PD. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio* 2013; 4(6): e00692-13.
14. Lung MS, Trainer AH, Campbell I, Lipton L. Familial colorectal cancer. *Intern Med J* 2015; 45(5): 482-91.
15. Zambirinis CP, Theodoropoulos G, Gazouli M. Undefined familial colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2009; 1(1): 12-20.
16. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2): 78-85.
17. Burn J, Mathers J, Bishop DT. Genetics, inheritance and strategies for prevention in populations at high risk of colorectal cancer (CRC). *Recent Results Cancer Res* 2013; 191: 157-83.
18. Theodoratou E, Montazeri Z, Hawken S, Allum GC, Gong J, Tait V, Kirac I, Tazari M, Farrington SM, Demarsh A, Zgaga L, Landry D, Benson HE, Read SH, Rudan I, Tenesa A, Dunlop MG, Campbell H, Little J. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(19): 1433-57.
19. Centelles JJ. General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncol* 2012; 2012: 139268.
20. Kohoutová D, Rejchrt S, Čihák M, Morávková P, Cyrany J, Bureš J. Importance of correct colorectal cancer screening timing in the average-risk Czech population. *Abdomin Oncol* 2013; 1: 1-4.
21. IJspeert JE, Vermeulen L, Meijer GA, Dekker E. Serrated neoplasia-role in colorectal carcinogenesis and clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12(7): 401-9.
22. Kohoutova D, Pejchal J, Cyrany, Morávková P, Rejchrt S, Bureš J. Apoptosis in the development of colorectal neoplasia. *Gastroenterol Hepatol* 2016; 70(4): 313-318.
23. Hester CM, Jala VR, Langille MG, Umar S, Greiner KA, Haribabu B. Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups. *World J Gastroenterol* 2015; 21(9): 2759-69.

24. Kohoutova D, Smajs D, Moravkova P, Cyrany J, Moravkova M, Forstlova M, Cihak M, Rejchrt S, Bures J. Escherichia coli strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 733.
25. Trimbath JD, Giardiello FM. Review article: genetic testing and counselling for hereditary colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(11): 1843-57.
26. Zarzour P, Boelen L, Luciani F, Beck D, Sakthianandeswaren A, Mouradov D, Sieber OM, Hawkins NJ, Hesson LB, Ward RL, Wong JW. Single nucleotide polymorphism array profiling identifies distinct chromosomal aberration patterns across colorectal adenomas and carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2015; 54(5): 303-14.
27. Maring ED, Tawadros PS, Steer CJ, Lee JT. Systematic Review of Candidate Single-nucleotide Polymorphisms as Biomarkers for Responsiveness to Neoadjuvant Chemoradiation for Rectal Cancer. *Anticancer Res* 2015; 35(7): 3761-6.
28. National Cancer Institute. Dostupné: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colorectal-genetics-pdq>. (cit. 2016-01-12).
29. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(3): 181-94.
30. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913; 12: 546-555.
31. Lynch PM, Lynch HT, Harris RE. Hereditary proximal colonic cancer. *Dis Colon Rectum* 1977; 20(8): 661-8.
32. Rondagh EJ, Gulikers S, Gómez-García EB, Vanlingen Y, Detisch Y, Winkens B, Vasen HF, Masclee AA, Sanduleanu S. Nonpolypoid colorectal neoplasms: a challenge in endoscopic surveillance of patients with Lynch syndrome. *Endoscopy* 2013; 45(4): 257-64.
33. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424-5.

34. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453-6.
35. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(23): 1758-62.
36. 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. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261-8.
37. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2044-58.
38. Dalavi SB, Vedpalsingh TH, Bankar SS, Ahmed MH, Bhosale DN. Familial Adenomatous Polyposis (FAP)-A Case Study and Review of Literature. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(3): PD05-6.
39. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14(5): 428-38.
40. Nieuwenhuis MH, Lefevre JH, Bülow S, Järvinen H, Bertario L, Kernéis S, Parc Y, Vasen HF. Family history, surgery, and APC mutation are risk factors for desmoid tumors in familial adenomatous polyposis: an international cohort study. *Dis Colon Rectum* 2011; 54(10): 1229-34.
41. Repak R, Kohoutova D, Podhola M, Rejchrt S, Minarik M, Benesova L, Lesko M, Bures J. The first European family with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach: case report and review of the literature. *Gastrointest Endosc* 2016; 84(4): 718-725.
42. Li J Li J, Woods SL, Healey S Beesley J, Chen X, Lee JS, Sivakumaran H, Wayte N, Nones K, Waterfall JJ, Pearson J, Patch AM, Senz J, Ferreira MA, Kaurah P, Mackenzie R, Heravi-Moussavi A, Hansford S, Lannagan TR, Spurdle AB, Simpson PT, da Silva

L, Lakhani SR, Clouston AD, Bettington M, Grimpen F, Busuttil RA, Di Costanzo N, Boussioutas A, Jeanjean M, Chong G, Fabre A, Olschwang S, Faulkner GJ, Bellos E, Coin L, Rioux K, Bathe OF, Wen X, Martin HC, Neklason DW, Davis SR, Walker RL, Calzone KA, Avital I, Heller T, Koh C, Pineda M, Rudloff U, Quezado M, Pichurin PN, Hulick PJ, Weissman SM, Newlin A, Rubinstein WS, Sampson JE, Hamman K, Goldgar D, Poplawski N, Phillips K, Schofield L, Armstrong J, Kiraly-Borri C, Suthers GK, Huntsman DG, Foulkes WD, Carneiro F, Lindor NM, Edwards SL, French JD, Waddell N, Meltzer PS, Worthley DL, Schrader KA, Chenevix-Trench G. Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant. *Am J Hum Genet* 2016; 98(5): 830-42.

43. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ; American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008; 134(5): 1570-95.
44. Möslein G. Surgical considerations in FAP-related pouch surgery: Could we do better? *Fam Cancer* 2016; 15(3): 457-66.
45. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JH, Hansmann A, Möslein G, Royer-Pokora B, Vogel T, Phillips RK, Spigelman AD, Houlston RS. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* 2006; 12(10): 3209-15.
46. Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World J Gastroenterol* 2009; 15(43): 5397-408.
47. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bertario L, Blanco I, Bülow S, Burn J, Capella G, Colas C, Friedl W, Møller P, Hes FJ, Järvinen H, Mecklin JP, Nagengast FM, Parc Y, Phillips RK, Hyer W, Ponz de Leon M, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen JT, Clark SK, Hodgson

- SV. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 2010; 59(7): 975-86.
48. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-67.
49. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2059-72.
50. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359(6392): 235-7.
51. Otori K, Konishi M, Sugiyama K, Hasebe T, Shimoda T, Kikuchi-Yanoshita R, Mukai K, Fukushima S, Miyaki M, Esumi H. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer* 1998; 83(5): 896-900.
52. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340(8820): 626-30.
53. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996; 272(5264): 1023-6.
54. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(4): 1603-8.
55. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008; 13(12): 1270-5.
56. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88(3): 323-31.

57. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810): 307-10.
58. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002; 89(7): 845-60.
59. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396(6712): 643-9.
60. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(15): 8681-6.
61. Heavey PM, Rowland IR. Microbial-gut interactions in health and disease. *Gastrointestinal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2): 323-336.
62. Rafter J. Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17(5): 849-859.
63. Stanghellini V, Barbara G, Cremon C, Cogliandro R, Antonucci A, Gabusi V, Frisoni C, De Giorgio R, Grasso V, Serra M, Corinaldesi R. Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med* 2010; 5(1): S57-63.
64. Kohoutova D, Drahosova M, Moravkova P, Rejchrt S, Bures J. Anti-Outer membrane protein C and anti-glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel disease and their association with complicated forms of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 1195.
65. Kohoutova D, Bureš J. Střevní mikrobiota a kolorektální karcinom. *Interni Med* 2013; 15(5): 167-169.
66. Kohoutova D, Drahosova M, Cihak M, Moravkova P, Bures J. Anti-Outer membrane protein C antibodies in colorectal neoplasia. *Folia Microbiol* 2016; 61(4): 295-9.
67. Dove WF, Clipson L, Gould KA, Luongo C, Marshall DJ, Moser AR, Newton MA, Jacoby RF. Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res* 1997; 57(5): 812-814.
68. Yang L, Pei Z. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(42): 6741-6746.

69. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther* 2006; 5(10): 1265-1269.
70. Kohoutová D, Rejchrt S, Drahošová M, Förstl M, Morávková M, Šmajš D, Kopáčová M, Cyrany J, Čihák M, Bureš J. Střevní mikrobiota u idiopatických střevních zánětů a kolorektálních neoplázií. Praha: Nucleus HK, 2013, 128 p, ISBN 978-80-87009-97-0.
71. Gill CI, Rowland IR. Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr* 2002; 88(1): S73-87.
72. Hughes R, Kurth MJ, McGilligan V, McGlynn H, Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. *Nutr Cancer* 2008; 60(2): 259-266.
73. DuPont HL. Clinical practice. Bacterial diarrhea. *N Engl J Med* 2009; 361(16): 1560-1569.
74. Kang HY, Kim N, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Jung HC, Song IS. Progression of atrophic gastritis and intestinal metaplasia drives *Helicobacter pylori* out of the gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 2006; 51(12): 2310-2315.
75. Maggio-Price L, Treuting P, Bielefeldt-Ohmann H, Seamons A, Drivdahl R, Zeng W, Lai L, Huycke M, Phelps S, Brabb T, Iritani BM. Bacterial infection of Smad3/Rag2 double-null mice with transforming growth factor-beta dysregulation as a model for studying inflammation-associated colon cancer. *Am J Pathol* 2009; 174(1): 317-329.
76. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e20447.
77. Newman JV, Kosaka T, Sheppard BJ, Fox JG, Schauer DB. Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J Infect Dis* 2001; 184(2): 227-230.
78. Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006; 313(5788): 848-851.
79. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak

- S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464(7285): 59-65.
80. Shen X, Rawls J, Randall T, Burcal L, Mpande CN, Jenkins N, Jovov B, Abdo Z, Sandler RS, Keku TO. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* 2010; 1(3): 138-147.
81. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9(4): 138-141.
82. Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, Atries V, Crowther JS, Williams RE. Bacteria and aetiology of cancer of the large bowel. *Lancet* 1971; 1(7690): 95-100.
83. Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(9): 3202-3207.
84. Sears CL, Islam S, Saha A, Arjumand M, Alam NH, Faruque AS, Salam MA, Shin J, Hecht D, Weintraub A, Sack RB, Qadri F. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis* 2008; 47(6): 797-803.
85. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011; 6(1): e16393.
86. Drasar BS, Goddard P, Heaton S, Peach S, West B. Clostridia isolated from faeces. *J Med Microbiol* 1976; 9(1): 63-71.
87. Kanazawa K, Konishi F, Mitsuoka T, Terada A, Itoh K, Narushima S, Kumemura M, Kimura H. Factors influencing the development of sigmoid colon cancer. Bacteriologic and biochemical studies. *Cancer* 1996; 77(8): S1701-1706.
88. Paritsky M, Pastukh N, Brodsky D, Isakovich N, Peretz A. Association of *Streptococcus bovis* presence in colonic content with advanced colonic lesion. *World J Gastroenterol* 2015; 21(18): 5663-7.
89. Kornbluth AA, Danzig JB, Bernstein LH. Clostridium septicum infection and associated malignancy. Report of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68(1): 30-37.

90. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. PLoS ONE 2011; 6(5): e20447.
91. Boleij A, Roelofs R, Schaeps RM, Schulin T, Glaser P, Swinkels DW, Kato I, Tjalsma H. Increased exposure to bacterial antigen Rpl7/L12 in early stage colorectal cancer patients. Cancer 2010; 116(17): 4014-4022.
92. Huycke MM, Gaskins HR. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. Exp Biol Med 2004; 229(7): 586-597.
93. Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse Helicobacter species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin Microbiol Rev 2001; 14(1): 59-97.
94. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H. Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer. Gastroenterology 1998; 115(2): 281-286.
95. Kohoutová D, Šmajš D, Bureš J. Koliciny. Gastroenterológia pre prax 2014; 13: 130-133.
96. Štaudová B, Micenková L, Bosák J, Hrazdilová K, Slaninková E, Vrba M, Ševčíková A, Kohoutová D, Woznicová V, Bureš J, Šmajš D. Determinants encoding fimbriae type 1 in fecal Escherichia coli are associated with increased frequency of bacteriocinogeny. BMC Microbiol 2015; 15(1): 201.
97. Micenková L, Bosák J, Štaudová B, Kohoutová D, Čejková D, Woznicová V, Vrba M, Ševčíková A, Bureš J, Šmajš D. Microcin determinants are associated with B2 phylogroup of human fecal Escherichia coli isolates. Microbiol Open 2016; 5(3): 490-8.
98. Kohoutová D, Šmajš D, Čihák M, Bureš J. Association of Right-Sided Colorectal Cancer and Ulcerative Colitis With Escherichia coli Strains of Phylogenetic Group B2, Which Harbour Genotoxic “PKS” Island. Gastroenterology 2014; 146(5): S-568.
99. McIntosh GH, Royle PJ, Playne MJ. A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. Nutr Cancer 1999; 35(2): 153-159.

100. Rowland IR, Bearne CA, Fischer R, Pool-Zobel BL. The effect of lactulose on DNA damage induced by DMH in the colon of human flora-associated rats. *Nutr Cancer* 1996; 26(1): 37-47.
101. Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(9): 3202-3207.
102. Bokkenheuser VD, Winter J, Mosenthal AC, Mosbach EH, McSherry CK, Ayengar NK, Andrews AW, Lebherz WB 3rd, Pienta RJ, Wallenstein S. Fecal steroid 21-dehydroxylase, a potential marker for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1983; 78(8): 469-475.
103. Moravkova P, Kohoutova D, Rejchrt S, Cyrany J, Bures J. Role of S100 proteins in colorectal carcinogenesis. *Gastroenterol Res Pract* 2016; 2016: 2632703.
104. Chen H, Xu C, Jin Q, Liu Z. S100 protein family in human cancer. *Am J Cancer Res* 2014; 4(2): 89-115.
105. Schmidt-Hansen B, Ornås D, Grigorian M, Klingelhöfer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004; 23(32): 5487-95.
106. Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, Qin X, Li S. Clinicopathological and prognostic significance of S100A4 overexpression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Diagn Pathol* 2013; 8: 181.
107. Komatsu K, Andoh A, Ishiguro S, Suzuki N, Hunai H, Kobune-Fujiwara Y, Kameyama M, Miyoshi J, Akedo H, Nakamura H. Increased expression of S100A6 (Calcyclin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1): 172-7.
108. Itzkowitz SH. Blood group-related carbohydrate antigen expression in malignant and premalignant colonic neoplasms. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16G: 97-101.
109. Itzkowitz SH, Dahiya R, Byrd JC, Kim YS. Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissues. *Gastroenterology* 1990; 99(2): 431-42.

110. Salem RR, Wolf BC, Sears HF, Lavin PT, Ravikumar TS, DeCoste D, D'Emilia JC, Herlyn M, Schlom J, Gottlieb LS, Steel GD. Expression of colorectal carcinoma-associated antigens in colonic polyps. *J Surg Res* 1993; 55(3): 249-55.
111. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 2001; 15(12): 2057-72.
112. Half E, Arber N. Chemoprevention of gastrointestinal neoplasia. *Curr Gastroenterol Rep* 2013; 15(5): 320.
113. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9): 17279-303.
114. Gurpinar E, Grizzle WE, Piazza GA. NSAIDs inhibit tumorigenesis, but how? *Clin Cancer Res* 2014; 20(5): 1104-13.
115. Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Iigo M, Mutoh M. Prevention and intervention trials for colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43(7): 685-94.
116. Fajardo AM, Piazza GA. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Anti-inflammatory approaches for colorectal cancer chemoprevention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(2): G59-70.
117. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107(4): 1183-8.
118. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20(48): 18151-64.
119. van der Wath RC, Gardiner BS, Burgess AW, Smith DW. Cell organisation in the colonic crypt: a theoretical comparison of the pedigree and niche concepts. *PLoS One* 2013; 8(9): e73204.
120. Maskens AP, Dujardin-Loits RM. Kinetics of tissue proliferation in colorectal mucosa during post-natal growth. *Cell Tissue Kinet* 1981; 14(5): 467-77.
121. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, Wilson GD. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* 1992; 33(1): 71-78.

122. Zhao R, Michor F. Patterns of proliferative activity in the colonic crypt determine crypt stability and rates of somatic evolution. *PLoS Comput Biol* 2013; 9: e1003082.
123. Macey SL. *Encyclopedia of Time* (p 201). New York: Garland Publishing, 1994.
124. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach* (p 591-614). 3rd edition. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.
125. Rieder CL, Khodjakov A. Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 2003; 300(5616): 91-6.
126. Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai ÁV, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. Sporadic colorectal cancer development shows rejuvenescence regarding epithelial proliferation and apoptosis. *PLoS One* 2013; 8(10): e74140.
127. Endo A, Koizumi H, Takahashi M, Tamura T, Tatsunami S, Watanabe Y, Takagi M. A significant imbalance in mitosis versus apoptosis accelerates the growth rate of sessile serrated adenoma/polyps. *Virchows Arch* 2013; 462(2): 131-9.
128. Jaiswal AS, Narayan S. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer cells. *J Cell Biochem* 2004; 93(2): 345-57.
129. Caldwell CM, Kaplan KB. The role of APC in mitosis and in chromosome instability. *Adv Exp Med Biol* 2009; 656: 51-64.
130. Koelink PJ, Mieremet-Ooms MA, Corver WE, Wolanin K, Hommes DW, Lamers CB, Verspaget HW. 5-aminosalicylic acid interferes in the cell cycle of colorectal cancer cells and induces cell death modes. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(3): 379-89.
131. Wang X, Allen TD, May RJ, Lightfoot S, Houchen CW, Huycke MM. *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res* 2008; 68(23): 9909-17.
132. Yao R, Oyanagi J, Natsume Y, Kusama D, Kato Y, Nagayama S, Noda T. Suppression of intestinal tumors by targeting the mitotic spindle of intestinal stem cells. *Oncogene* 2016; 35(47): 6109-6119.

133. Adamsen BL, Kravik L, De Angelis PM. Cellular response to chemoradiotherapy, radiotherapy and chemotherapy in two colorectal cancer cell lines. *Radiat Res* 2009; 171(5): 562-71.
134. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)* 2011; 3(4): 279-96.
135. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(7): 532-42.
136. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004; 384(Pt 2): 201-32.
137. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-72.
138. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death- -II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *J Insect Physiol* 1964; 10(4): 643-649.
139. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death- -V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of the silkmooth. *J Insect Physiol* 1965a; 11: 831-844.
140. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death- -IV. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *J Insect Physiol* 1965b; 11: 803-809.
141. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death- -I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkmooth. *J Insect Physiol* 1965c; 11: 123-133.
142. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death- -III. Neural control of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *J Insect Physiol* 1965d; 11: 605-610.
143. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
144. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; 45(3): 528-37.

145. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31(4): 214-23.
146. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107(5): 489-506.
147. Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. A dual role for the antiapoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 2240-52.
148. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49-63.
149. Milpied P, Nadel B, Roulland S. Premalignant cell dynamics in indolent B-cell malignancies. *Curr Opin Hematol* 2015; 22(4): 388-96.
150. van der Heijden M, Winton DJ, Vermeulen L. Turning off the BCL-2 switch to prevent intestinal tumorigenesis. *Oncotarget* 2016; 7(20): 28763-4.
151. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1414-24.
152. Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(7): 455-465.
153. Wang F, Wang H, Sun X, Li M. Apoptosis-induction is a novel therapeutic strategy for gastrointestinal and liver cancers. *Curr Gene Ther* 2015; 15(2): 193-200.
154. Wang K, Lin B. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) as regulatory factors of hepatic apoptosis. *Cell Signal* 2013; 25(10): 1970-80.
155. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(6): 401-410.
156. Hernandez JM, Farma JM, Coppola D, Hakam A, Fulp WJ, Chen DT, Siegel EM, Yeatman TJ, Shibata D. Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011; 10(3): 188-93.
157. Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis* 2007; 28(6): 1133-9.

158. Liu W, Zhu F, Jiang Y, Sun D, Yang B, Yan H. siRNA targeting survivin inhibits the growth and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 2013; 29(3): 1183-8.
159. Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19(10): 1346-53.
160. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58(23): 5315-20.
161. Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(3): 478-82.
162. Konturek PC, Rembiesz K, Burnat G, Konturek SJ, Tusinela M, Bielanski W, Rehfeld J, Karcz D, Hahn E. Effects of cyclooxygenase-2 inhibition on serum and tumor gastrins and expression of apoptosis-related proteins in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51(4): 779-87.
163. Søreide K, Gudlaugsson E, Skaland I, Janssen EA, Van Diermen B, Körner H, Baak JP. Metachronous cancer development in patients with sporadic colorectal adenomas-multivariate risk model with independent and combined value of hTERT and survivin. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23(4): 389-400.
164. Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death Dis* 2016; 7: e2058.
165. Lavrik IN. Systems biology of apoptosis signaling networks. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21(4): 551-5.
166. Bordonaro M, Drago E, Atamna W, Lazarova DL. Comprehensive suppression of all apoptosis-induced proliferation pathways as a proposed approach to colorectal cancer prevention and therapy. *PLoS One* 2014; 9(12): e115068.
167. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wntless signaling pathways. *Dev Cell* 2004; 7(4): 491-501.

168. Fan Y, Bergmann A. Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! *Trends Cell Biol* 2008; 18(10): 467-73.
169. Drago E, Bordonaro M, Lee S, Atamna W, Lazarova DL. Propolis augments apoptosis induced by butyrate via targeting cell survival pathways. *PLoS One* 2013; 8(9): e73151.
170. Blaut M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr* 2002; 41 Suppl 1: I11-6.
171. Bultman SJ. Molecular pathways: gene-environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. *Clin Cancer Res* 2014; 20(4): 799-803.
172. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987; 28(10): 1221-7.
173. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 2011; 13(5): 517-26.
174. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 2003; 133(7 Suppl): 2485S-2493S.
175. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell* 2012; 48(4): 612-26.
176. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(2): 104-19.
177. Fung KY, Cosgrove L, Lockett T, Head R, Topping DL. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr* 2012; 108(5): 820-31.
178. Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D. The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer. *Autophagy* 2011; 7(2): 235-7.

179. Ajouz H, Mukherji D, Shamseddine A. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol* 2014; 12: 164.
180. Reddy BS, Wynder EL. Metabolic epidemiology of colon cancer. Fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps. *Cancer* 1977; 39(6): 2533-9.
181. McMillan L, Butcher SK, Pongracz J, Lord JM. Opposing effects of butyrate and bile acids on apoptosis of human colon adenoma cells: differential activation of PKC and MAP kinases. *Br J Cancer* 2003; 88(5): 748-53.
182. Huang XP, Fan XT, Desjeux JF, Castagna M. Bile acids, non-phorbol-ester-type tumor promoters, stimulate the phosphorylation of protein kinase C substrates in human platelets and colon cell line HT29. *Int J Cancer* 1992; 52(3): 444-50.
183. Deacon EM, Pongracz J, Griffiths G, Lord JM. Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *Mol Pathol* 1997; 50(3): 124-31.
184. Pejchal J, Novotný J, Mařák V, Osterreicher J, Tichý A, Vávrová J, Sinkorová Z, Zárýbnická L, Novotná E, Chládek J, Babicová A, Kubelková K, Kuča K. Activation of p38 MAPK and expression of TGF- β 1 in rat colon enterocytes after whole body γ -irradiation. *Int J Radiat Biol* 2012; 88(4): 348-58.
185. Rubio CA, Befrits R. Atypical mitoses in colectomy specimens from patients with long standing ulcerative colitis. *Anticancer Res* 1997; 17(4A): 2721-6.
186. Qian J, Zhao W, Miao X, Li L, Zhang D. Sam68 modulates apoptosis of intestinal epithelial cells via mediating NF- κ B activation in ulcerative colitis. *Mol Immunol* 2016; 75: 48-59.
187. Sträter J, Koretz K, Günthert AR, Möller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1995; 37(6): 819-25.
188. Weiss H, Jacobasch KH, Haensch W, Streller B, Hieke B. Significance of apoptosis in the process of tumorigenesis in colorectal mucosa and adenomas in FAP patients. *Anal Cell Pathol* 1997; 14(2): 61-73.
189. Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* 1997; 431(2): 111-7.

190. Urban BC, Collard TJ, Eagle CJ, Southern SL, Greenhough A, Hamdollah-Zadeh M, Ghosh A, Poulsom R, Paraskeva C, Silver A, Williams AC. BCL-3 expression promotes colorectal tumorigenesis through activation of AKT signalling. *Gut* 2016; 65(7): 1151-64.
191. Puvvada SD, Funkhouser WK, Greene K, Deal A, Chu H, Baldwin AS, Tepper JE, O'Neil BH. NF-kB and Bcl-3 activation are prognostic in metastatic colorectal cancer. *Oncology* 2010; 78(3-4): 181-8.
192. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441(7092): 431-6.
193. Moorchung N, Kunwar S, Ahmed KW. An evaluation of nuclear factor kappa B expression in colorectal carcinoma: an analysis of 50 cases. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(3): 631-5.
194. Kudo S, Kashida H, Nakajima T, Tamura S, Nakajo K. Endoscopic diagnosis and treatment of early colorectal cancer. *World J Surg* 1997; 21(7): 694-701.
195. Minemura S, Tanaka T, Arai M, Okimoto K, Oyamada A, Saito K, Maruoka D, Matsumura T, Nakagawa T, Katsuno T, Kishimoto T, Yokosuka O. Gene expression profiling of laterally spreading tumors. *BMC Gastroenterol* 2015; 5: 64.
196. Harfouche G, Martin MT. Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. *Mutation Research* 2010; 704: 167-174.
197. Umar S. Intestinal stem cells. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 340-348.
198. Dhawan P, Ahmad R, Srivastava AS, Singh AB. Cancer stem cells and colorectal cancer: an overview. *Curr Top Med Chem* 2011; 11(13): 1592-8.
199. Roostae A, Benoit YD, Boudjadi S, Beaulieu JF. Epigenetics in Intestinal Epithelial Cell Renewal. *J Cell Physiol* 2016; 231(11): 2361-7.
200. Candido EP, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 1978; 14(1): 105-13.
201. Csordas A. Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5(4): 221-31.

202. Jendrossek V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332(2): 313-24.
203. Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14(2): 145-53.
204. Smajstrla V, Ehrmann J, Matoušková I. Colicinogeny in patients after cholecystectomy. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*. 1988; 120: 245-9.
205. Rudolf E, Králová V, Cervinka M. Selenium and colon cancer--from chemoprevention to new treatment modality. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8(6): 598-602.
206. Rudolf E, John S, Cervinka M. Irinotecan induces senescence and apoptosis in colonic cells in vitro. *Toxicol Lett* 2012; 214(1): 1-8.
207. Koehler BC, Jäger D, Schulze-Bergkamen H. Targeting cell death signaling in colorectal cancer: current strategies and future perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20(8): 1923-34.
208. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, Fric P. Colorectal cancer screening in Europe. *World J Gastroenterol* 2009; 15(47): 5907-15.
209. Zavoral M, Suchanek S, Majek O, Fric P, Minarikova P, Minarik M, Seifert B, Dusek L. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3825-34.
210. Zavoral M, Vojtěchová G, Májek O, Ngo O, Grega T, Seifert B, Dušek L, Suchánek Š. Population colorectal cancer screening in the Czech Republic. *Cas Lek Cesk* 2016; 155(1): 7-12.

Přílohy

1. Souhlas informovaného.
2. Kohoutová D, Rejchrt S, Čihák M, Morávková P, Cyrany J, Bureš J. Importance of correct colorectal cancer screening timing in the average-risk Czech population. *Abdomin Oncol* 2013; 1: 1-4.
3. Kohoutova D, Drahosova M, Moravkova P, Rejchrt S, Bures J. Anti-Outer membrane protein C and anti-glycoprotein 2 antibodies in inflammatory bowel disease and their association with complicated forms of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 1195.
4. Kohoutova D, Smajs D, Moravkova P, Cyrany J, Moravkova M, Forstlova M, Cihak M, Rejchrt S, Bures J. Escherichia coli strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 733.

5. Kohoutova D, Drahosova M, Cihak M, Moravkova P, Bures J. Anti-Outer membrane protein C antibodies in colorectal neoplasia. *Folia Microbiol* 2016; 61(4): 295-9.
6. Moravkova P, Kohoutova D, Rejchrt S, Cyrany J, Bures J. Role of S100 proteins in colorectal carcinogenesis. *Gastroenterol Res Pract* 2016; 2016: 2632703.
7. Kohoutova D, Pejchal J, Bures J. Apoptotic and mitotic activity in colorectal carcinogenesis. V recenzním řízení.