

**UNIVERZITA KARLOVA**

Lékařská fakulta v Plzni

MUDr. Jan Brůha

Význam tumor infiltrujících lymfocytů jako  
prognostických faktorů u pacientů po embolizaci  
portální žíly (PVE) a po PVE s aplikací autologních  
kmenových buněk

Doktorandská dizertační práce

Chirurgická klinika LF UK v Plzni

2018

**UNIVERZITA KARLOVA**

Lékařská fakulta v Plzni



MUDr. Jan Brůha

**Význam tumor infiltrujících lymfocytů jako  
prognostických faktorů u pacientů po embolizaci  
portální žíly (PVE) a po PVE s aplikací autologních  
kmenových buněk**

Doktorandská dizertační práce

Chirurgická klinika LF UK v Plzni

2018

# 1. Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval všem osobám, které se podílely na vzniku této práce. Především děkuji svému školiteli prof. MUDr. Vladislavu Třeškovi, DrSc. za navržení zajímavého námětu, odborné vedení a poskytnutí prostředků, bez kterých by tato práce nevznikla. Dále děkuji za konzultace a cenné postřehy doc. MUDr. Václavu Liškovi, Ph.D. a celému týmu jaterních chirurgů a sester z Chirurgické kliniky FN Plzeň. Rozsah této práce je široký a k jejímu naplnění byla nezbytná multidisciplinární spolupráce. Za CT volumetrie děkuji Doc. MUDr. Hynku Mírkovi, Ph.D., MUDr. Kristýně Bajcurové a MUDr. Jaroslavu Ludvíkovi. Dále patří díky týmu intervenčních radiologů, jmenovitě MUDr. Františku Šlaufovi a MUDr. Petru Durasovi. Za konzultace stran odběru, zpracování a aplikace kmenových buněk patří mé díky Doc. MUDr. Danielu Lysákovi, Ph.D. Děkuji MUDr. Petru Novákovi, Ph.D. a MUDr. Ondřeji Vyčítalovi, Ph.D. za zahájení programu stanovení tumor infiltruujících lymfocytů na Chirurgické klinice FN Plzeň. Poděkování si zaslouží i MUDr. Magdalena Dubová, Ph.D. a as. MUDr. Věra Křížková, Ph.D., které provedly odečty tumor infiltruujících lymfocytů a ABCC transportérů. Za statistické zpracování získaných dat děkuji Ing. Petru Hoškovi, Ph.D. V neposlední řadě bych rád poděkoval za trpělivost své manželce Adéle a celé rodině, která mě podporovala.

Souhlasím se zapůjčením dizertační práce pro vědecké a pedagogické účely.

V Plzni 27.3.2018

MUDr. Jan Brůha

# Obsah

<b>1.</b>	<b>Poděkování .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>4.</b>	<b>Přehled dosavadních znalostí.....</b>	<b>10</b>
4.1	Metastazující kolorektální karcinom.....	10
4.1.1	Epidemiologie .....	10
4.1.2	Dispenzarizace pacientů s kolorektálním karcinomem .....	11
4.2	Diagnostika a léčba jaterních metastáz kolorektálního karcinomu.....	22
4.2.1	Diagnostika jaterních metastáz kolorektálního karcinomu.....	22
4.2.2	Chirurgická léčba jaterních metastáz kolorektálního karcinomu.....	29
4.3	Kmenové buňky.....	48
4.3.1	Definice .....	48
4.3.2	Hierarchie, základní dělení a vlastnosti kmenových buněk.....	48
4.3.3	Etické aspekty využití kmenových buněk v humánní medicíně.....	50
4.3.4	Využití hematopoetických kmenových buněk v regeneraci jater.....	52
4.3.5	Podpora růstu malignity kmenovými buňkami.....	56
4.3.6	Teorie nádorové kmenové buňky.....	57
4.4	Imunitní systém a jeho interakce s kolorektálním karcinomem.....	60
4.4.1	Definice imunitního systému a vznik imunocytů .....	60
4.4.2	Nespecifická imunitní reakce.....	61
4.4.3	Specifická imunitní reakce.....	72
4.4.4	Význam stanovení tumor infiltrujících lymfocytů a imunoscoringu .....	87
<b>5.</b>	<b>Cíle.....</b>	<b>89</b>
<b>6.</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>90</b>
6.1	Studie sledování efektu PVE a PVE s aplikací SCs na FLRV a CLM.....	90
6.1.1.	Pacienti a metoda.....	90
6.1.2	Indikace k PVE a PVE SCs.....	92
6.1.3	Provedení PVE.....	92
6.1.4	Zisk, zpracování a aplikace kmenových buněk.....	93
6.1.5	Volumetrie jater a výpočetní tomografie.....	94
6.1.6	Sledování pacientů .....	94
6.2	Stanovení tumor infiltrujících lymfocytů .....	95
6.2.1	Pacienti a metoda.....	95
6.2.2	Histopatologické vyšetření vzorků .....	95
6.2.3	Imunohistochemická vyšetření vzorků .....	96
6.2.4	Sledování pacientů .....	96



6.3	Stanovení ABCC10 a ABCC11 .....	97
6.3.1	Pacienti a metoda.....	97
6.3.2	Histopatologické vyšetřené vzorků .....	97
6.3.3	Sledování pacientů .....	98
6.4	Statistická metoda .....	99
6.4.1	Analýza vlivu aplikace SCs při PVE .....	99
6.4.2	Analýza TILs, ABCC10 a ABCC11 .....	100
<b>7.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>102</b>
7.1	Efekt PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM.....	102
7.1.1	Růst FLRV .....	102
7.1.2	Růst jaterních metastáz a dopad na operabilitu nemocných.....	106
7.1.3	DFI a OS po resekčních výkonech u pacientů s provedenou PVE a PVE s aplikací SCs .....	111
7.1.4	OS, DFI a vztah k onkologické léčbě s 5-FU u pacientů s provedenými resekčními výkony .....	114
7.3	Výsledky stanovení TILs .....	118
7.3.1	Zastoupení jednotlivých TILs mezi sledovanými skupinami .....	118
7.3.2	Vztah TILs k DFI a OS.....	124
7.4	Stanovení ABCC10 a ABCC11 .....	129
<b>8.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>131</b>
8.1.	Diskuze k efektu PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM.....	131
8.1.1	Diskuze k růstu zbytkového jaterního objemu .....	131
8.1.2	Diskuze k progresi maligního onemocnění a dopadu na operabilitu nemocných po PVE a PVE s aplikací SCs.....	132
8.1.3	Diskuze k DFI, OS a vztahu k onkologické léčbě po resekčních výkonech u pacientů po PVE, po PVE s aplikací SCs a pacientů primárně resektabilních .	132
8.2	Diskuze k tumor infiltrujícím lymfocytů .....	135
8.2.1	Diskuze k zastoupení jednotlivých TILs mezi sledovanými skupinami.....	135
8.3	Diskuze k ABC transportům .....	143
<b>9.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>145</b>
<b>10.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>147</b>
<b>11.</b>	<b>Souhrn.....</b>	<b>173</b>
<b>12.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>174</b>
<b>13.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>175</b>
	Publikace autora.....	175
	Publikace v ostatních periodících .....	178
	Knihy - kapitoly ve skriptech .....	180
	Seznam přednášek autora .....	180
	Kopie publikací se vztahem k tématu dizertační práce .....	184

## 2. Seznam zkratek

Zkratka	anglicky	česky
5-FU	5-fluorouracil	5-fluorouracil
ABC	ABC transporter	ABC transportér
ALPPS	associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy	
APC	antigen presenting cells	antigen prezentující buňky
ASR	age standardised rate	věkově standardizovaná incidence
ASCO	American Society of Clinical Oncology	Americká společnost klinických onkologů
BCR	B-cell receptor	receptor B lymfocytů
B-RAF	B-raf murine sarcoma viral oncogene	B raf virový onkogen sarkomu hlodavců
CA	carbohydrate antigen	karbohydrátový antigen
CAM	cell adhesion molecule	buněčná adhezivní molekula
CASH	chemotherapy-associated steatohepatitis	chemoterapií vyvolaná steatohepatitida
CCL	C-Cmotiv ligand	ligand C-C motivu
CCR	chemokine receptor	receptor chemokinu
CD	cluster of differentiation	diferenciační antigen
CEA	carcinoembryonic antigen	karcinoembrionální antigen
CEUS	contrast-enhanced ultrasound	ultrasonografie s použitím kontrastní látky
CHT	chemotherapy	chemoterapie
CLM	colorectal liver metastases	metastázy kolorektálního karcinomu do jater
CRC	colorectal cancer	kolorektální karcinom
Crohn - like	Crohn – like lymphocytic infiltration	Crohn - like infiltrace lymfocyty
CSCs	cancer stem cells	nádorové kmenové buňky
CT	computed tomography	výpočetní tomografie
CTCs	circulating tumour cells	cirkulující nádorové buňky
CVP	central venous pressure	centrální žilní tlak

CRTH2	prostaglandin D receptor	receptor prostaglandinu D2
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4	antigen 4 cytotoxického T lymfocytu
DAMPs	damage - associated molecular patterns	molekuly na povrchu buněk spouštějící imunitní reakci
DCs	dendritic cells	dendritické buňky
DFI	disease free interval	bezpříznakové přežití
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EGFs	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálního růstového faktoru
ERCP	endoscopic retrograde cholangio-pancreatography	endoskopická retrogradní cholangiopankreatografie
ESCs	embryonic stem cells	embryonální kmenové buňky
Fas	cell surface death receptor	receptor buněčné smrti
FasL	Fas ligand	Fas ligand
<sup>18</sup> FDG	18-fluorodeoxyglucose	18-fluorodeoxyglukóza
Foxp3	forkhead box P3	marker T regulačních lymfocytů
FLRV	future liver remnant volume	předpokládaný zbytkový jaterní objem
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	granulocytární kolonie stimulující faktor
GIT	gastrointestinal tract	gastrointestinální trakt
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	kolonie granulocytů a makrofágů stimulující faktor
HABR	hepatic arterial buffer response	nárazníkový efekt jaterní tepny
HCC	hepatocellular carcinoma	hepatocelulární karcinom
HGF	hepatocyte growth factor	růstový faktor hepatocytů
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen (též MHC)
HPF	high power microscopical fields	zorné pole pod největším (400x) zvětšením
HSCs	hematopoietic stem cells	hematopoetické kmenové buňky
HU	Hounsfield unit	Hounsfieldova jednotka
ICG	indocyanine green test	test indocyaninovou zelení
IFN	interferon	interferon

Ig	immunoglobulin	imunoglobulin
IGF	inzulin like growth factor	inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukin	interleukin
IOUS	intraoperative ultrasound	peroperační ultrasonografie
ISL	intrastromal lymphocytic infiltration	intrastromální infiltrace lymfocyty
ITL	intratumoral lymphocytic infiltration	intratumorální infiltrace lymfocyty
KIR	killer cell immunoglobulin - like receptor	imunoglobulinu podobný receptor přirozených zabíječů
KLR	killer lectin-like receptor	lektinu C podobný receptor přirozených zabíječů
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Kirstenův onkogen krysího sarkomu
MAB	monoclonal antibody	monoklonální protilátka
MAP	mitogen activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex (též HLA)
MMPs	metalloproteinases	metaloproteinázy
MR	magnetic resonance	magnetická rezonance
MRCP	magnetic resonance cholangiopancreatography	magnetickou rezonancí provedená cholangiopankreatografie
MSCs	mesenchymal stem cells	mesenchymální kmenové buňky
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NFAT	nuclear factor of activated T cells	nukleární faktor aktivovaných T buněk
NKs	natural killers	přirození zabíječi
NKG2	natural killer group 2 receptor	inhibiční lektinový receptor přirozených zabíječů skupina 2
NKTs	natural killer T cells	přirozený zabíječ T lymfocyty
NLR	neutrophil / leukocyte ratio	poměr neutrofilů a leukocytů
OCs	oval cells	oválné buňky
OS	overall survival	celkové přežití
PDR	plasma disappearance rate	míra eliminace z plazmy

PET	positron emission tomography	pozitronová emisní tomografie
PET/CT	positron emission tomography / computed tomography	pozitronová emisní tomografie / výpočetní tomografie
PET/MR	positron emission tomography / magnetic resonance	pozitronová emisní tomografie / magnetická rezonance
PDGF	platelet derived growth factor	růstový faktor z destiček
PTEN	phosphatase and tensin homolog	homolog fosfatázy a tensinu
PTL	peritumoral lymphocytic infiltration	peritumorální infiltrace lymfocyty
PVE	embolization of right branch of portal vein	embolizace pravé větve portální žíly
PVL	ligation of right branch of portal vein	ligace pravé větve portální žíly
R15	ICG retention rate after 15 minutes	míra retence ICG po 15 minutách
RFA	radiofrequency ablation	radiofrekvenční ablace
ROR $\gamma$	retinoic acid receptor related orphan receptor $\gamma$	marker Th17 lymfocytů
SCs	stem cells	kmenové buňky
SDF	stromal derived factor	faktor ze stromálních buněk
SOS	sinusoidal obstruction syndrom	sinusoidální obstrukční syndrom
STAT	signal transducer and activator of transcription	intracelulární posel a aktivátor transkripce
T reg	regulatory Th lymphocytes	regulační Th lymfocyty
TACE	transarterial chemoembolization	transarteriální chemoembolizace
TAM	tumor associated macrophages	s tumorem asociované makrofágy
TAN	tumor associated neutrophils	s tumorem asociované neutrofily
Tc	cytotoxic lymphocytes (CD8 <sup>+</sup> )	cytotoxické lymfocyty (CD8 <sup>+</sup> )
Tc-GSA	technecium - galactosyl serum albumin	techneciem značený lidský sérový albumin
Tc-HIDA	technecium - hepatobiliary iminodiacetic acid	techneciem značené deriváty kyseliny imidooctové
TCR	T-cell receptor	imunoglobulinový receptor T lymfocytů
TGF- $\alpha$	transforming growth factor - $\alpha$	transformující růstový faktor - $\alpha$
TGF- $\beta$	transforming growth factor - $\beta$	transformující růstový faktor - $\beta$

Th	T helper lymphocytes (CD4 <sup>+</sup> )	T pomocný lymfocyt (CD4 <sup>+</sup> )
TIDCs	tumor infiltrating dendritic cells	tumor infiltruující dendritické buňky
TILs	tumor infiltrating lymphocytes	tumor infiltruující lymfocyty
TK	tymidinkinase	tymidinkináza
TLR	toll like receptor	receptor rozeznávající cizí antigeny
TLV	total liver volume	celkový objem jater
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor - $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TNM	TNM classification of malignant tumors	TNM klasifikace maligních nádorů
TPA	tissue polypeptide antigen	tkáňový polypeptidový antigen
TPS	tissue polypeptide specific antigen	specifický tkáňový polypeptidový antigen
UICC	union for international cancer control	mezinárodní organizace pro léčbu karcinomů
USG	ultrasonography	ultrasonografie
VCAM	vascular cell adhesion molecule	vaskulární adhezivní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
VELIPI	vascular, lymphatic and perineural CRC microinfiltration	endovaskulární, lymfatická a perineurální invaze mikrometastázami CRC
VLM	volume of CLM	objem CLM

### 3. Úvod

Kolorektální karcinom (Colorectal Cancer, CRC) je ve vyspělém světě velmi časté onemocnění [1]. U téměř 20 % pacientů se v době diagnózy CRC vyskytují jaterní metastázy (Colorectal Liver Metastases, CLM) a až u 50 % pacientů se v průběhu pooperační dispenzarizace CLM objeví [2, 3]. Léčba onemocnění je řízena na podkladě stádia podle mezinárodní organizace pro léčbu karcinomů (Union for International Cancer Control, UICC) [4]. Chirurgická léčba je stále jediný způsob jak dosáhnout radikálního odstranění tumoru [5].

Díky technickému vývoji a moderním postupům dosáhla chirurgická léčba CLM významného posunu. I přes tyto pokroky zde stále existují faktory, které rozsah chirurgického výkonu limitují. Zásadní je zbytkový jaterní objem (Future Liver Remnant Volume, FLRV). Nízký FLRV vystavuje pacienta riziku akutního jaterního selhání v pooperačním období [6]. Nízký FLRV podpořil vývoj augmentačních metod typu embolizace (portal vein embolization, PVE) nebo ligace (portal vein ligation, PVL) portální žíly (obvykle pravé větve) nebo ALPPS (Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy) [7, 8, 9]. V případě PVE však u řady pacientů dochází k selhání nárůstu FLRV a až 40 % pacientů ve výsledku nemůže podstoupit radikální resekcční výkon [10, 11]. Nový směr, kterým lze podpořit nárůst FLRV je intraportální aplikace kmenových buněk (Stem Cells, SCs) do neokludované větve portální žíly. Většina studií byla prozatím provedena na heterogenních souborech pacientů s různými typy maligního onemocnění jater [12, 13]. Naše pracoviště se zaměřilo jen na pacienty s CLM a má tak homogenní soubor pacientů, u kterých tuto metodu zkoumá. Nevyjasněný je především vztah aplikace SCs a progrese maligního onemocnění.

V posledních letech je velmi diskutován význam tumor infiltrujících lymfocytů (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) a jejich vztah k malignímu onemocnění. Jedná se především o situace, kdy u pacientů s příznivým histopatologickým nálezem došlo k recidivě onemocnění po radikální chirurgické léčbě. Samotná přítomnost nebo i lokalizace TILs mohou napomoci vytipovat rizikové pacienty, u kterých je vhodné podat adjuvantní onkologickou léčbu, nebo zkrátit intervaly mezi vyšetřovacími metodami v rámci dispenzarizace [14]. U CRC je již popsána řada studií s TILs a TILs se pomalu začínají dostávat do klinické praxe. V případě CLM bylo publikováno výrazně méně studií [15, 16, 17] a u pacientů s PVE nebyl ještě vztah TILs a CLM vůbec popsán.

## 4. Přehled dosavadních znalostí

### 4.1 Metastazující kolorektální karcinom

#### 4.1.1 Epidemiologie

Výskyt kolorektálního karcinomu (Colorectal Cancer, CRC) je celosvětově vysoký a po karcinomu plic a prsu je celosvětově třetím nejčastějším karcinomem. V roce 2012 byla odhadnuta světová incidence (počet nově vzniklých případů) na 1 360 602 nově diagnostikovaného CRC a téměř 694 000 pacientů v souvislosti s touto diagnózou zemřelo [18]. Celosvětová odhadovaná prevalence do 5 let od diagnózy (počet žijících pacientů s CRC) za rok 2012 byla 3 543 582 (68,2 na 100 000 osob) [1].

Ve výskytu CRC převažují rozvinuté země oproti rozvojovým zemím. Státy západní a střední Evropy mají dlouhodobě nejvyšší zátěž CRC. Age - Standardised Rate incidence (ASR = statistická úprava věku, která dovoluje porovnání pacientů i přes rozdílný věk) CRC u evropských států byla v roce 2012 udávána jako 29,5 případu na 100 000 obyvatel. V evropské populaci je u mužů CRC třetím nejčastějším typem malignity s ASR incidencí 37,3 případů na 100 000 obyvatel, u žen je pak ASR incidence 23,6 na 100 000 obyvatel (nejsou započítány nádory kůže). V roce 2012 v Evropě v důsledku CRC zemřelo 113 246 mužů a 101 620 žen. Prevalence pro Evropu byla v roce 2012 1 203 943 pacientů [1, 19].

Incidence nádorů trávicího traktu je v České republice obecně velice častá a je příčinou vysoké nemocnosti i úmrtnosti obyvatelstva a velkou měrou se na ní podílí právě CRC [20 s. 26]. Ročně je v České republice diagnostikováno kolem 8 000 pacientů s tímto onemocněním a téměř 4 000 pacientů ročně na CRC umírá [21]. V celosvětovém a evropském měřítku je Česká republika na 4., respektive na 3. místě v incidenci CRC u mužů a na 16., respektive 10. místě v incidenci CRC u žen. V České republice je CRC druhým nejčastějším typem malignity u mužů, a to jak v incidenci (ASR 81,0 na 100 000 obyvatel), tak i v počtu úmrtí (35,4 pacientů na 100 000 obyvatel). U žen je pak CRC na druhém místě v incidenci (ASR 40,5 na 100 000 obyvatel) a na třetím místě v počtu úmrtí za rok (ASR 15,8 na 100 000 obyvatel) [19].

Pětiletá prevalence CRC v České republice byla dle GLOBOCAN 2015 pro muže 12 258 a pro ženy 8 057. Můžeme zde sledovat trend, kdy je stabilizovaný stav mortality a



setrvale rostoucí incidence. To je důvodem, proč v České republice stále stoupá prevalence [21].

Prognóza pacienta je určena především pokročilostí nádorového onemocnění. V České republice stále přetrvává vysoké procento pacientů zastižených ve III. nebo IV. stádiu se vzdálenými metastázami. Jaterní metastázy kolorektálního karcinomu (Colorectal Liver Metastases, CLM) se vyskytují u 15-20 % pacientů jako synchronní a u 15-50 % pacientů s CRC jsou diagnostikovány metachronní metastázy [2, 3].

#### **4.1.2 Dispenzarizace pacientů s kolorektálním karcinomem**

##### **4.1.2.1 Strategie dispenzarizační péče**

Pacienti po resekci CRC jsou zařazeni do klinického stádia onemocnění podle UICC klasifikace na podkladě histologického a radiologického zhodnocení tumoru, zhodnocení postižení regionálních uzlin a vzdálených metastáz, které jsou shrnuté v TNM hodnocení. Na jeho podkladě je pak onkologem nebo především u IV. stádia onemocnění multioborovým týmem (onkolog, chirurg, radiolog, gastroenterolog) stanoven průběh další léčby. Všichni pacienti s odoperovaným CRC spadají do dispenzární péče obvykle řízené onkologem nebo gastroenterologem. Cílem dispenzarizace je včasný záchyt metastáz a lokální recidivy, zlepšení dlouhodobého přežívání a zvýšení kvality života. CRC nejčastěji metastazuje do jater, plic a po peritoneu. Další lokalizace metastazování jsou lymfatické uzliny a ovaria. Méně častý je rozvoj mozkových nebo kostních metastáz [22]. Vzhledem k rozdílné lokalizaci možné recidivy nelze užít jeden diagnostický nástroj, ale je potřeba kombinace různých vyšetřovacích metod (zobrazovací, endoskopické, laboratorní). Doporučené postupy dispenzarizace vycházejí z faktu, že riziko relapsu je nejvyšší v prvních 2 až 2,5 letech od resekce CRC, kdy se objeví 80 % rekurencí. Současně se 95 % rekurencí v podobě metachronních metastáz objeví v období do 5 let od resekce primárního tumoru [20 s. 79, 23]. American Society of Clinical Oncology (ASCO) doporučuje pravidelné kontroly a odběr anamnézy každé 3 měsíce. Sérová hladina karcinoembryonálního antigenu (CarcinoEmbryonic Antigen, CEA) je stanovena opakovaně po 3 - 6 měsících, a to po dobu 5 let. U pacientů s vyšším rizikem rekurence je doporučeno stanovovat CEA v časnějších intervalech. Z grafických metod je prováděna počítačová tomografie (Computed Tomography, CT) hrudníku a břicha 1x ročně po dobu

prvních 3 let od resekčního výkonu na tlustém střevě a konečniku. U pacientů po resekci rekta se k prováděnému CT snímku hrudníku a břicha doplňuje i CT pánve. V případě pacientů s vyšším rizikem lze interval u CT vyšetření zkrátit i na 6 měsíců. Pozitronová Emisní Tomografie (Positron Emmision Tomography/ Computed Tomography, PET/CT) není v rámci dispenzarizace rutinně využívána a je vyhrazena až k diagnostice nejasných nálezů a určení rozsahu případné diseminace. Kontrolní kolonoskopie je dle ASCO doporučena 3 roky po operaci a v případě normálního nálezu je opakována pravidelně po 5 letech [23]. Na našem pracovišti je kontrolní kolonoskopie provedena 1. rok po operaci CRC a následně každé 2 roky, pokud bylo kolonoskopické vyšetření negativní.

#### **4.1.2.2 Prognostické faktory recidivy CRC**

Prognostické faktory jsou parametry, které napomáhají odhadnout přežití pacientů a riziko progresu nádorového onemocnění. Prognostické faktory u CRC lze rozdělit do 3 skupin, které se ve výsledku vzájemně prolínají [20 s. 120-121, 24]:

- a. Faktory biologického chování nádoru
- b. Faktory pacientovy odpovědi na nádorové onemocnění
- c. Faktory ve vztahu k léčbě

#### Faktory biologického chování

Mezi faktory popisující chování nádoru patří TNM klasifikace, stádium onemocnění, sérové hladiny vybraných onkomarkerů a nově i molekulárně biologické parametry K-RAS a B-RAF. Z nově se formujících prediktivních faktorů to jsou cirkulující nádorové buňky a tzv. tumor budding [20 s 120-121].

#### TNM klasifikace

TNM (obr. 1.) je základní způsob deskripce patologického, operačního a radiologického nálezu. U tumoru (T) se posuzuje hloubka prorůstání nádoru skrze jednotlivé vrstvy v lumen kolon a rekta. Popis postižení uzlin (N) slouží k popisu infiltrace uzlin mezokola nebo mezorekta nádorovými buňkami. Je nezbytné vyšetření veškerých uzlin v závěsu resekátu. V ideálním případě je vyšetřeno minimálně 12 lymfatických uzlin. Vyšetření menšího počtu lymfatických uzlin přináší riziko podstážování onemocnění.

K popisu vzdálených metastáz (M) jsou využívána jak dostupná radiologická vyšetření, tak excize ze vzdálených ložisek (např. excize nebo biopsie z jater při resekci tlustého střeva). Na podkladě TNM hodnocení je pacient zařazen do příslušného stádia onemocnění (obr. 2).

Tlusté střevo a konečník	
T1	submukóza
T2	muscularis propria
T3	subseróza, perikolické / perirektální tkáně
T4a	viscerální peritoneum
T4b	jiné orgány nebo struktury
N1a	1 regionální
N1b	2–3 regionální
N1c	satelit(y) bez regionálních uzlin
N2a	4–6 regionálních
N2b	7 a více regionálních
M1a	1 orgán
M1b	> 1 orgán, peritoneum

Obr. 1: TNM klasifikace [4]

#### ROZDĚLENÍ DO STADIÍ

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II	T3, T4	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jakékoliv T	N1, N2	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IVA	jakékoliv T	jakékoliv N	M1a
Stadium IVB	jakékoliv T	jakékoliv N	M1b

Obr. 2: rozdělení CRC do stádií na podkladě TNM klasifikace a UICC 2002. Tlustou čarou jsou označena stádia s pooperačně indikovanou onkologickou léčbou [4]

#### Onkomarkery

Karcinoembryonální antigen (CarcinoEmbryonic Antigen, CEA) je v dnešní době jeden z nejpoužívanějších onkomarkerů. Jedná se o glykoprotein, který nacházíme v embryonální tkáni, ale i v epiteliální tkáni gastrointestinálního traktu (GastroIntestinal Tract, GIT), bronchů nebo prsní žlázy. U CRC je využíván ke stanovení individuální

prognózy, detekci rekurence onemocnění po radikální resekci a monitoringu všech stádií CRC [25]. Elevace CEA v předoperačním období koreluje se stádiem onemocnění. Neklesající hladina CEA v časném pooperačním období je obvykle známkou rezidua nebo vzdálených metastáz nádorového onemocnění [20 s. 120-121]. U III. stádia CRC mají pacienti s předoperační hladinou CEA pod 27 ug/l lepší bezpříznakové období (Disease Free Interval, DFI) i celkové přežití (Overall Survival, OS).

Další onkomarkery, které jsou stanovovány u pacientů s CRC a CLM, jsou karbohydrátový antigen 19-9 (Cancer Antigen 19-9, CA 19-9), tkáňový polypeptidický antigen (Tissue Polypeptide Antigen, TPA), tkáňový specifický polypeptidický antigen (Tissue Polypeptide Specific antigen, TPS), thymidin kináza (Thymidine Kinase, TK). Tyto markery jsou využívány spíše při pooperačním sledování a dispenzarizaci pacientů než jako diagnostické faktory.

CA 19-9 je glykoproteinový antigen, který je u dospělých v malém množství obsažen v epitelu dýchacích cest a GIT. Asi 10 % nemocných tento onkomarker neprodukuje (krevní skupina Lewisa-a- a Lewis-b-) z důvodu deficitu flukonyl-transferázy [26]. Zde je možné použití dalšího nádorového markeru, a to např. CA 242 [27]. CA 19-9 je pozorován ve vysokých hodnotách především u karcinomu slinivky, ale výrazný nárůst lze pozorovat i při rozvoji vzdálených metastáz. CA 19-9 je stanovován v kombinaci s CEA jako onkomarker druhé volby, a to v situacích, kdy CEA může být nespecificky zvýšený při benigních onemocněních GIT nebo u kuřáků. Hladiny CA 19-9 a CEA u pacientů léčených Bevacizumabem mohou mít i prediktivní význam ve vztahu k DFI a OS [28].

TPA a TPS jsou onkomarkery ze skupiny cytokeratinů. Jedná se o směs fragmentů filamentózních proteinů tvořících skelet buňky. Cytokeratiny vznikají při rychlém buněčném růstu nádorových buněk. Vypovídají tak o buněčné aktivitě a dělení buněk. Stoupající hladiny TPA a TPS v plazmě jsou známkou proliferace a růstu nádorových buněk. TPA a TPS jsou využívány v diferenciální diagnostice primárních tumorů jater, kdy TPA je zvýšen u cholangiogenního karcinomu a u HCC není detekován. TPA a TPS se využívají k včasné diagnostice relapsu CRC a ke kontrole paliativní onkologické terapie [26].

TK je katalytický enzym ovlivňující přeměnu thymidinu na thymidinmonofosfát. Ten je využit v alternativních cestách syntézy DNA, do které je zapojen. Syntéza TK je zvýšena

ve fetálním období a po narození klesá. S elevací sérových hladin TK se setkáváme v případě rychlé proliferace tkání především GIT nebo u hematologických malignit. Hladiny TK mohou být ovlivněny při podávání některých chemoterapeutických preparátů, které blokují běžnou syntézu DNA. V důsledku toho dochází k aktivaci alternativních drah syntézy DNA, kde se TK uplatňuje (v případě CRC např. 5- fluorouracil (5-FU)). Stanovení TK by tak mělo být prováděno v období, kdy není onkologická léčba podávána. Předjedeme tak falešně pozitivním výsledkům. U pacientů s CRC je TK využívána při monitorování efektu paliativní léčby [26].

### Mutace K-RAS a B-RAF

V rámci molekulárně genetických vyšetření jsou stanovovány a sledovány mutace v K-RAS a B-RAF genech kódující příslušné proteiny. Proteiny K-RAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) a B-RAF (B-raf murine sarcoma viral oncogene) jsou důležité složky v kaskádě signální dráhy Ras/Raf/MAP/MEK/ERK a PTEN/PI3K/Akt aktivované příslušným receptorem pro epidermální růstové faktory (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Tyto dráhy jsou zodpovědné za regulaci buněčného cyklu, genové transkripce, buněčného dělení a apoptózy. V případě mutací K-RAS a B-RAF proteinů se spouštějí alternativní efektorové dráhy podporující proliferaci, migraci a metastazování nádorových buněk.

Stanovení mutací K-RAS a B-RAF z tkáňových vzorků je nutné provést pro správnou indikaci k léčbě monoklonálními protilátkami (Monoclonal AntiBody, MAB) proti EGFR (Cetuximab - Erbitux, Panitumumab – Vectibix), a to především u pokročilých nálezů CRC [29, 30]. V případě mutací K-RAS a B-RAF jsou tyto mutace brány jako negativní prediktivní faktor cílené léčby projevující se rezistencí na cetuximab a panitumumab. Přínos mutací K-RAS a B-RAF jako prognostického faktoru je stále diskutován, a to především ve vazbě k mutacím na konkrétním kodónu (např. kodón 12 a 13 u K-RAS). Ze studií zatím vyplývá, že v případě mutací K-RAS i B-RAF mají pacienti s metastazujícím CRC kratší DFI a OS oproti stejné skupině pacientům s nemutovaným K-RAS a B-RAF proteinem [29, 31]. Tento fakt, ale úzce souvisí s podanou onkologickou léčbou a je nezbytné vyhodnocení dalších studií. Fiala uvádí, že pacienti s CLM a mutací typu G12V/A K-RAS měli při léčbě Bevacizumabem horší DFI a OS oproti pacientům s nemutovanou formou

KRAS. Uzavírá, že mutace G12V a G12A K-RAS může být užitečným prognostickým biomarkerem [32].

#### Cirkulující nádorové buňky

Cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumor Cells, CTCs) jsou nádorové buňky uvolněné z primárního tumoru. Nádorové buňky jsou schopné přestupu do vaskulárního řečiště v důsledku intra- a extravazace. Díky tomu mohou být získány minimálně invazivním přístupem a následně stanoveny. Jsou tak nadějným nástrojem s využitím v rámci diagnostiky, stanovení prognózy a eventuální identifikace lékové rezistence. V případě, že jsou v krvi pacientů detekovány CTCs, koreluje tento nálezný se stádiem onemocnění i s kratším OS a DFI [33, 34]. Jako pozitivní prognostický faktor byl navržen nálezný NO a kompletní vymizení CTCs v krvi po resekčním výkonu [35]. V budoucnu tak stanovení CTCs může být významným faktorem, který rozhodne o podání adjuvantní onkologické léčby [33].

#### Tumor budding

Tumor budding je histologický nálezný u karcinomů, kdy nádorové buňky nebo jejich shluky migrují do okolního stromatu a oddělují se od samotného tumoru. V důsledku této dediferenciace se mění fenotyp epiteliálních buněk a ty získávají schopnost agresivnější invaze a progresu nádoru. Nálezný tumor buddingu je známkou agresivního fenotypu nezávisle na stádiu onemocnění a je tak významným negativním faktorem spojeným s časnou rekurencí a kratším OS. Sledování tumor buddingu u CRC má význam především v I. a II. stádiu, kde většinou není indikována adjuvantní chemoterapie. V případě, že je u těchto pacientů nálezný tumor buddingu, mohou být uznáni jako riziková z časných rekurencí a mohou podstoupit adjuvantní onkologickou léčbu [20 s. 120-121, 36].

#### Faktory pacientovy odpovědi na nádorové onemocnění

Na progresi nádorového onemocnění se podílí řada mechanismů. Jedná se např. o mechanismy vedoucí k mutacím buněčných cyklů, mutacím v apoptotických drahách a mechanismům invazivního růstu a metastazování tumoru. Vedle toho je dalším důležitým mechanismem i únik buněk karcinomu z dosahu imunitního systému [37]. Imunitní systém a nádorové onemocnění se vzájemně neustále ovlivňují. Nádorové buňky

rozpoznávají a jako první na ně reagují přirození zabíječi (Natural Killers, NKs), antigen prezentující buňky (Antigen Presenting Cells, APC) a makrofágy. Usmrcené nádorové buňky jsou fagocytovány dendritickými buňkami a v lymfatických uzlinách prezentovány T buňkám (Th lymfocyty- CD4<sup>+</sup> tzv. helperské lymfocyty – zahajují a regulují imunitní odpověď v reakci na předložený antigen a Tc lymfocyty CD8<sup>+</sup> tzv. cytotoxické lymfocyty, které způsobují destrukci cílových buněk). Aktivované CD4<sup>+</sup> buňky svými humorálními působky aktivují efektorové CD8<sup>+</sup> lymfocyty, které pak putují zpět do nádorové tkáně a destrukují nádorové buňky s příslušnými antigeny. Soudí se však, že některé podskupiny CD4<sup>+</sup> lymfocytů tzv. regulátoři mohou mít opačný efekt a vést k přežití a progresi maligních buněk [37].

Způsoby, jak spolu imunitní systém a nádorové buňky interagují, jsou v dnešní době rozsáhle studovány a lze je shrnout pod název nádorová imunoeditace. V rámci této teorie je možné rozdělit vývoj nádorového onemocnění a imunitní reakce proti němu do tří fází, a to eliminace, rovnováha a únik. Ve fázi eliminace je imunitní systém schopen udržet dohled nad vyvíjejícími se nádorovými buňkami. Jedná se o zapojení externích obranných mechanismů daného organismu poté, co selhaly vnitřní faktory ochrany v jednotlivých buňkách. Nádorové buňky v časných fázích vývoje tumoru vyplavují cytokiny, které aktivují dendritické buňky (Dendritic Cells, DCs) a následně i buňky specifické imunity. Druhý mechanismus, který se v této fázi uplatňuje, je tvorba tzv. DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) molekul. Tyto molekuly se objevují na povrchu umírajících nádorových buněk (např. v důsledku hypoxie) nebo na povrchu buněk poškozených tkání. DAMPs molekuly jsou pak rozpoznány imunokompetentními buňkami a dané buňky jsou zničeny. Třetím mechanismem je exprese stresových ligandů, které jsou spouštěčem pro NKG2D (aktivační receptor přirozených zabíječů). Při aktivaci tohoto receptoru pak dochází ke spuštění zánětlivé odpovědi a vyplavení imunomodulačních cytokinů vyvolávajících aktivaci protinádorové imunity. Podstatou eliminační fáze je přesná souhra nespecifické a specifické imunity s prezentací nádorových antigenů efektorovým Th a Tc lymfocytům. Některé nádorové buňky jsou však schopné odolat imunologické odpovědi organismu a vstupují do fáze rovnováhy. Tyto buňky obvykle prošly mutacemi, které buňky imunitního systému nejsou schopné rozpoznat. V této fázi je imunitní systém schopen ještě zabránit rozšiřování tumoru, ale už není schopen nádor

zcela eliminovat. Nádorové buňky se zde nacházejí v dormantním (spícím) stavu. Na něm se z velké části podílejí Th a Tc lymfocyty, které produkují interleukiny (InterLeukin, IL), především IL-12 a Interferon gama (InterFeroN gamma, IFN- $\gamma$ ). Ty zabraňují šíření nádorových buněk, ale buňky nezničí. Fáze rovnováhy je nejdelší fáze a může být také konečným stádiem nádorového imunoeditingu. V takovém případě je imunitní systém schopen držet nádorové buňky v dormantním stádiu i po zbytek života daného jedince. Na druhou stranu jsou nádorové buňky schopné uniknout z obranných mechanismů čtyřmi způsoby. Prvním je změna povrchových antigenů jako důsledek dalších mutací (např. se sníží hustota povrchových antigenů nebo pomocí sialylace maskují povrchové nádorové antigeny). Za druhé se nádorové buňky mohou stát rezistentní na signály vysílané imunokompetentními buňkami. Třetí možností, jak mohou nádorové buňky uniknout, je jejich imunosupresní status s ovlivňováním mikroprostředí ve svém okolí. Mohou tak např. blokovat správnou funkci T lymfocytů a vyvolávat tak imunosupresní účinek nebo apoptózu lymfocytů. Čtvrtá možnost pak zahrnuje aktivaci anti-apoptotických mechanismů u nádorových buněk a setrvalou aktivaci proonkogenních faktorů s pokračujícím růstem tumoru. Tyto čtyři základní kroky tak mohou nádorovým buňkám pomoci přestoupit z fáze rovnováhy do fáze úniku, kdy imunokompetentní buňky už nejsou schopné ovlivnit další růst nádorových buněk [38, 39]. Bližší vazby a vztahy jednotlivých imunokompetentních buněk jsou popsány dále v kapitole 4.4.

Vazby mezi imunitním systémem a nádorovou buňkou jsou ovlivňovány i vnějšími faktory, jako jsou rozsah chirurgického traumatu, diskutovaný je počet krevních transfuzí podaných v perioperačním období a onkologická léčba. Tyto faktory mají na jedné straně imunosupresní efekt, ale na druhé straně v organismu stimulují vyplavení působků zodpovědných za zánětlivou reakci. Vyplavené růstové faktory, chemokiny a angiogenní faktory následně mohou stimulovat růst mikrometastatického postižení. V dnešní době je tedy kladen důraz na miniinvazivní chirurgický přístup, který snižuje velikost ranné plochy a s tím i spojené méně časté použití krevních derivátů. Při onkologické léčbě je využíván metronomický přístup, kdy je chemoterapeutikum podáváno v menších dávkách po delší časový úsek [20 s. 56-58].



## Faktory ve vztahu k léčbě

### Radikalita chirurgického výkonu

Základním předpokladem úspěšné léčby je radikální R0 resekce s odstraněním veškeré nádorové tkáně. Nemožnost zanechání negativních resekčních ploch přináší horší prognózu a přežití pacienta [5]. Za R0 resekci lze považovat pouze ten výkon, kde jsou odstraněna veškerá a to i vzdálená metastatická ložiska. Na R0 resekci jsou tak navázány další prognostické faktory jako TNM klasifikace, stádium onemocnění, hladiny CEA apod. [20 s. 121]. V rámci kolorektální chirurgie je důležité ponechání dostatečných vzdáleností resekčních okrajů od tumoru a provedení totální resekce mesokolon nebo mesorekta. Délka ponechaných resekčních okrajů je dlouhodobě diskutována. V minulosti byly ponechané 5cm okraje považovány za dostačující. Toto doporučení vycházelo z faktu, že pacienti s okraji minimálně 5 cm od tumoru měli nižší riziko rekurence v anastomóze. Po zařazení totální mesokolické/mesorektální excize a vysokého podvazu magistrálních cév pro danou oblast do běžné chirurgické praxe bylo doporučeno ponechat resekční okraje střeva mezi 8 až 10 cm. Při tomto rozsahu je odstraněno větší množství lymfatických uzlin, které danou oblast drénují [40]. Kromě větší šance odstranit veškeré lymfatické uzliny postižené metastatickým procesem se tak snižuje i riziko podstázování onemocnění, které můžeme vidět při vyšetření nedostatečného počtu lymfatických uzlin.

### Výživa pacientů s maligním onemocněním

Stav výživy je důležitým faktorem podílejícím se na úspěšnosti léčby onkologicky nemocných pacientů. Pacienti s maligním onemocněním jsou obecně rizikovou skupinou k rozvoji malnutrice. S malnutricí u CRC se můžeme setkat až u 60 % pacientů a pokles na váze o 10 % v předoperačním období je pozorován až u 45 % pacientů hospitalizovaných pro nádorové onemocnění. Rychlejší úbytek na váze svědčí o nepříznivé biologické aktivitě tumoru. Proteino - energetická malnutrice je u onkologických pacientů indikátorem špatné prognózy. Snížení hladiny makro i mikronutrientů v organismu pak vede ke zhoršené imunitní odpovědi organismu a zhoršenému hojení ran a tím vyššímu riziku pooperačních komplikací [41, 42].

### Pooperační komplikace

Významným faktorem, který ovlivňuje pooperační morbiditu, mortalitu a dlouhodobé přežití, jsou pooperační komplikace. Jako nejzávažnější jsou považovány komplikace při leaku střevních anastomóz [43, 44] a nejobávanější jsou pak pelvické sepse po resekcích rekta [20 s. 121]. Incidence insuficience anastomóz se zvyšuje aborálním směrem. V závislosti na anatomické lokalizaci se incidence insuficience spojky pohybuje mezi 1 % až 39 %. Dehiscence anastomózy prodlužuje hospitalizaci, zvyšuje morbiditu, výrazně ovlivňuje kvalitu života a je často spojena s nutností založení stomie. S prodlužováním chirurgické léčby se odkládá i zahájení onkologické léčby, a tím se zvyšuje riziko lokální a systémové recidivy tumoru a zkracuje se DFI a OS [45, 46].

### Chemoterapeutická léčba

Součástí komplexní léčby pacientů s onkologickým onemocněním je podání chemoterapie. Chemoterapeutickou léčbu lze rozdělit na chemoterapii neoadjuvantní, adjuvantní a paliativní. Neoadjuvantní režimy jsou podávány před radikální chirurgickou léčbou nádoru za účelem jeho downsizingu. Adjuvantní režim slouží k zajištění pacientů po chirurgickém výkonu. Tato terapie je zaměřena na mikrometastatické postižení, které v danou chvíli není makroskopicky detekovatelné na zobrazovacích metodách nebo není patrné při operačním výkonu. Paliativní režimy slouží ke zpomalení růstu chirurgicky neřešitelných nálezů. V rámci konvenčních chemoterapeutických cyklů jsou u CRC využívány preparáty 5-FU (blokuje tvorbu RNA), Irinotecanu (blokádou topoizomeráz blokuje tvorbu DNA) a Oxaliplatinu (interkalačními vazbami blokuje replikaci a reparační pochody). I přes významný pokrok, který tyto základní chemoterapeutické látky přinesly, stoupá u nádorových buněk rezistence vůči těmto látkám. Selhání této léčby pak vede ke zkrácení DFI a OS pacientů [20 s. 123-130, 47].

Mechanismy rezistence lze rozdělit na buněčné a nebuněčné. Mezi nebuněčné faktory patří extracelulární faktory, omezená vaskularizace a mikroprostředí tumoru. Buněčné mechanismy pak zahrnují enzymy a transportní mechanismy uvnitř buněk, které brání dostatečné expozici chemoterapeutika v buňce. Proces se děje efluxem přes membránové transportéry, které snižují hladiny jak fyziologických substancí (cholesterol, mastné kyseliny, hormony apod.), tak i xenobiotik v buňkách. Tyto transportéry

rozdělujeme do dvou základních skupin, a to solute carrier transportéry (SLC) a ATP-binding cassette transportéry (ABC). V současné době je známo čtyřicet osm humánních transportérů. Na podkladě sekvencí jejich aminokyselin se rozdělují do sedmi skupin ABC A – G. Každá z těchto skupin je ještě dělena do podtypů označených čísly. Tyto transportéry přenášejí chemoterapeutické látky z buněk do extracelulární matrix a zásadním způsobem tak přispívají k rezistenci buněk CRC, karcinomu slinivky nebo karcinomu prsu k chemoterapii. Zvýšená exprese ABC transporterů byla popsána i u CRC už v době stanovení diagnózy. Samotné podání chemoterapie pak indukuje zvýšenou expresi těchto transportérů. Naše pracoviště mělo možnost spolupracovat na studiích, které porovnávaly zastoupení ABC transportérů v buňkách CRC a zdravých tkání a současně hledaly vztah ABC transporterů k onkologické léčbě. V první studii byl stanoven a porovnán transkripční profil ABC transportérů ve vzorcích CRC a zdravé sliznice resekovaných pacientů. Informace o up nebo down regulaci pak byly porovnány s klinickými daty. V této práci se podařilo prokázat korelace transkripčních hladin intratumorálního ABCC10 s gradingem tumoru. Intratumorální transkripční hladiny ABCC11 byly u pacientů s paliativní chemoterapií statisticky významně spojeny s odpovědí na paliativní léčbu. DFI bylo významně kratší u pacientů s adjuvantní chemoterapií, pokud byly transkripční hladiny ABCC11 nízké [48]. V druhé navazující studii bylo cílem prověřit prognostický význam proteinové exprese ABCC10 a ABCC11 u pacientů s CRC. Nízké hladiny proteinu ABCC10 třikrát zvyšovaly riziko úmrtí pacientů proti vysokým hladinám proteinu ABCC10. Nízké zastoupení proteinu ABCC11 čtyřikrát zvyšovalo riziko rekurence. Pacienti, kteří byli léčeni deriváty 5-FU a měli nízké zastoupení ABCC11 v tumoru, měli kratší DFI oproti pacientům s vysokou hustotou ABCC11 [49].

## 4.2 Diagnostika a léčba jaterních metastáz kolorektálního karcinomu

### 4.2.1 Diagnostika jaterních metastáz kolorektálního karcinomu

Mezi zobrazovací vyšetření využívané k diagnostice onemocnění jater a posouzení diseminace onemocnění patří ultrasonografie (UltraSonoGraphy, USG), výpočetní tomografie (Computed Tomography, CT) jater, magnetická rezonance (Magnetic Resonance imaging, MR) jater a pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography, PET) v kombinaci s CT (PET/CT) nebo MR (PET/MR). Základním úkolem těchto metod je diagnostikovat a odlišit od sebe benigní a maligní léze. V případě nutnosti chirurgické léčby jsou nástrojem k posouzení operability.

#### 4.2.1.1 *Transabdominální ultrasonografie*

Pro vyšetření jater je USG metoda první volby díky své dostupnosti, minimální zátěži a nízké ceně. USG je neinvazivní metoda, která k zobrazení využívá ultrazvukové vlny a jejich odrazy na rozhraní tkání. V rozmezí využívaných frekvencí nemá nežádoucí biologické účinky. Pro USG jater se využívají sondy o frekvencích od 2 do 4 MHz [50 s.31-40]. USG jater se provádí v dvojrozměrném černobílém zobrazení. Při systematickém zobrazení jednotlivých laloků a segmentů se hodnotí velikost orgánu, echogenita, textura parenchymu, cévní a žlučové cesty. Dále se sledují ložiskové léze a jejich vztah k velkým cévám a žlučovodům. Pro lepší zobrazení cévních struktur využíváme dopplerometrické zobrazení [50 s. 31-40]. Největší přínos USG je v diagnostice ložiskových lézí, kde dosahuje senzitivity kolem 76 % [20 s. 84]. Sekundární jaterní ložiska se obvykle zobrazují jako hypoechogenní nebo terčovitě léze. Léze jsou často mnohočetné až mapovitě splývající. V případě, že se jaterní léze zobrazí jako hyperechogenní, pak metastatické léze mají ve své periférii hypoechogenní haló. Hyperechogenní léze je nezbytné odlišit od hemangiomů.

USG je zobrazovací metoda určená k primárnímu záchytu jaterních lézí a v druhé době je obvykle doplněno CT nebo MR jater [50 s. 31-44, 51]. Nevýhodou USG je špatná reprodukovatelnost, která je ovlivněna i subjektivitou a erudicí sonografisty. Na straně pacienta mohou vyšetření negativně ovlivnit habitus pacienta, obezita, jaterní steatóza a přítomnost plynu mezi sondou a játry (např. plyn v tračníku, podkožní emfyzém).

USG lze využít i k provedení intervenčních výkonů jako je biopsie z jater nebo radiofrekvenční ablace (RadioFrequency Ablation, RFA). V posledních letech je však vytlačováno CT zobrazením nebo USG bývá použito jako doplněk CT navigace [52].

#### **4.2.1.2 Ultrasonografie s podáním kontrastní látky**

USG s podáním kontrastní látky (Contrast - Enhanced Ultrasound, CEUS) je relativně novou možností, jak zpřesnit diferenciální diagnostiku jaterních lézí. Využití kontrastní látky v rámci USG vyšetření vedlo ke zvýšení sensitivity v diagnostice metastatického postižení jater [53]. Pro detekci jaterních metastáz se využívá kontrastní látky na principu mikrobublin (např. Sonovue obsahující fluorid sírový stabilizovaný fosfolipidovou membránou). Bubliny v krevním řečišti fungují jako odražeč ultrazvukového vlnění a zvyšují tak echogenitu tkání [50 s. 31-40]. Kontrastní látka je vydýchána plicemi a nealteruje tak ledvinné funkce jako kontrastní látky u CT a MR vyšetření [54]. Diagnostika v rámci CEUS je založena na vyhodnocení syčení ložisek v jednotlivých fázích. Kontrastní látka je podána jako i.v. bolus. Po podání nejprve pozorujeme arteriální plnění přibližně do 20-35 sekund po aplikaci, portální (venózní) 30 - 120 sekund po aplikaci a pozdní fázi po 120 sekundách. Pro detekci jaterních metastáz jsou nejdůležitější fáze portální a pozdní. Hypovaskulární metastázy (např. metastázy adenokarcinomů – CRC, karcinomu pankreatu nebo žaludku) se v arteriální fázi buď nesytí kontrastní látkou, nebo se zvýrazňuje jejich periferní lem. Hypervaskulární metastázy (např. metastázy melanomu nebo neuroendokrinních tumorů) se díky rychlému arteriálnímu průtoku zobrazí jako nehomogenní zesílení signálu v arteriální fázi. V portální a pozdní fázi se jak hypovaskulární, tak i hypervaskulární metastázy zobrazují jako tmavé defekty, zatímco normální parenchym má stále zesílený signál. Pro jaterní metastázy je tedy typické rychlé vymytí kontrastní látky a pokles echogenity ložisek v případě hypervaskulárních metastáz [53] nebo v případě hypovaskulárních metastáz se ve všech fázích zobrazí jako hypoechogenní ložisko s eventuálně se vymývajícím lemem ložiska v průběhu pozdní fáze. CEUS je jako definitivní diagnostická metoda využíván u benigních lézí s typickým kontrastním obrazem (hemangiomy, fokální nodulární hyperplazie, fokální steatóza). V případě podezření na malignitu je stále nezbytné doplnění MR nebo CT vyšetření [50]

s. 31-40], i když některé studie již ukazují sensitivitu i specifitu CEUS srovnatelnou s CT nebo MR.

#### ***4.2.1.3 Peroperační ultrasonografie jater***

Peroperační USG jater (IntraOperative UltraSound, IOUS) je v současné jaterní chirurgii standardním vyšetřením, které vedle klasické aspekce a palpáce využíváme jako základní zobrazovací metodu při operační exploraci jater. K IOUS je využívána speciálně tvarovaná sonda o vyšší frekvenci (4 – 10MHz), která se přikládá přímo k jaternímu povrchu. Úlohou IOUS je zhodnocení lézí, které byly zjištěny na předoperačním zobrazovacím vyšetření. Posuzuje se velikost a počet ložisek a jejich vztah k cévním a žlučovým strukturám, eventuálně jejich invaze do cév s tvorbou intravaskulárních trombů. Druhým úkolem IOUS je zhodnocení ponechávaného jaterního parenchymu. IOUS se také využívá ke kontrole zaváděných sond při otevřených RFA. IOUS pomáhá odhalit i ložiska, která nebyla na předoperačním zobrazovacím vyšetření patrna. Jak uvedla studie na Klinice zobrazovacích metod FN Plzeň, byla pomocí IOUS odhalena i ložiska, která nebyla patrna na předoperačním vyšetření. V případě CT a PET/CT nebylo odhaleno až 18 % ložisek, v případě MR nebylo odhaleno 10 % ložisek [55]. IOUS je tak zásadní pro peroperační zhodnocení resektability jaterních ložisek. IOUS je metoda, která má do budoucna vysoký potenciál v rámci plánování USG navigovaných jaterních resekcí.

#### ***4.2.1.4 Vyšetření jater výpočetní tomografií***

CT břicha a jater je standardním vyšetřením u pacientů s diagnostikovaným CRC. Na jeho podkladě je možné vyjádřit podezření na infiltraci spádových lymfatických uzlin a případné metastatické postižení jater. Současně je i klíčovým vyšetřením jater před plánovaným operačním výkonem. Díky němu získáváme přehled o anatomii cévního zásobení a biliárního stromu, zjišťujeme množství a uložení ložiskových lézí a jejich vztah k cévním a žlučovým strukturám. U rozsáhlých resekcí počítáme z CT scanů předpokládaný objem pooperačně ponechané jaterní tkáně. Každou ložiskovou lézi je nezbytné individuálně posoudit, protože vedle sebe mohou koexistovat benigní i maligní léze. Jejich chybná interpretace pak nese i riziko chybně zvolené léčby [56 s.266-271].

V pooperačním follow up je CT jater spolu s USG základní vyšetřovací metodou včasné detekce rekurence onemocnění.

Jaterní parenchym se na CT scanech zobrazuje jako hyperdenzní orgán (vůči ostatním orgánům dutiny břišní) o hodnotách kolem 50 Hounsfieldových jednotek (Hounsfield Unit, HU). V případě nativního vyšetření jater můžeme zachytit jen metastatická ložiska, která jsou velká a mají dostatečný denzní rozdíl oproti jaternímu parenchymu. Takové optimální podmínky však nacházíme zřídka [20 s. 89]. Vyšetření s podáním kontrastní látky je tak nezbytností.

K vyšetření jater nejčastěji využíváme multidetektorové CT, které je schopné současně zaznamenat více datových stop, a tím umožní získat velmi tenké řezy a také dokonalou prostorovou orientaci v libovolné rovině. Pomocí technik DSCT (dual – source CT) a DECT (CT zobrazení duální energií) je možné získat mapu distribuce kontrastní látky a podrobněji tak zobrazit perfúzi jater a vaskularizaci ložisek [50 s. 64-66].

Rozvoj perfúzních CT můžeme zaznamenat po roce 2000 a jeho přínos je v posunu diagnostiky z morfologického popisu do funkční roviny. Játra mají unikátní anatomii cévního zásobení, kdy krev do jater přitéká jak arteriální cestou (20-25 % krevního průtoku), tak i cestou v. portae (75-80 % krevního průtoku). Oba systémy se pak potkávají v jaterních sinusoidách. V případě patologických změn dochází ke změně rezistence v jaterních sinusoidách (např. cirhoza jater), a tím i ke změně parametrů průtoku krve játry. U nádorových ložisek jsou změny v perfúzi jater dané v důsledku novotvořené angiogeneze. Perfúzní CT jater neudává jen celkový průtok krve v játrech, ale pomáhá odlišit i arteriální a portální perfúzi. K měření se využívá first pass efektu intravenózně podané jódové kontrastní látky přes jaterní parenchym. Na podkladě koncentrace kontrastní látky a změny denzit cév (a. hepatica propria, aorty, portální žíly), parenchymu jater a sleziny vypočítává software perfúzní parametry. Pro játra získáváme kromě obecných dat z perfúzního CT i data o arteriální a portální perfúzi a tzv. perfúzní jaterní index, který v procentech udává podíl arteriální perfúze na celkové perfúzi jater [57, 58]. Limitaci u CT vyšetření můžeme najít u ložisek menších než 1 cm, kdy klesá senzitivita CT vyšetření o více jak polovinu [59]. Některé práce však uvádějí, že perfúzní CT je schopné detekovat i mikrometastatické postižení jater. Toto je umožněno především faktem, že nádorové léze od velikosti 2-3 mm potřebují cévy pro svoji další výživu a růst. Ze studie

provedené na Klinice zobrazovacích metod FN Plzeň vedlo využití perfúzního CT jater ke zvýšení senzitivity v diagnostice CLM z 86 na 97,3 % [57].

Na podkladě cévního zásobení jater vycházejí i jednotlivé fáze, které jsou na CT po podání kontrastní látky snímány. První fází je fáze arteriální nastupující cca 20s po aplikaci kontrastní látky do žíly. Arteriální fázi dělíme na fázi časnou a pozdní. Časná fáze umožňuje odhalit variety v tepenné anatomii jater, pozdní arteriální fáze je užitečná k detekci hypervaskularizovaných ložisek. Druhou fází je fáze portální, která začíná kolem 40 s a vrcholu dosahuje kolem 65s po aplikaci kontrastní látky. V portální fázi je dosaženo největšího kontrastu mezi jaterními lézemi a okolním parenchymem. Jsou zde i nejlépe vykresleny cévy portálního stromu a jaterních žil. Portální fáze je využívána k rutinním vyšetřením jater. V případě, že předpokládáme přítomnost maligních ložisek, je nezbytné provedení i fáze arteriální [56 s. 266-271]. Třetí fází je fáze ekvilibria (též venózní fáze), kdy se vytváří rovnovážný stav v parenchymu jater a homogenně se vysycuje extracelulární prostor. Této fáze je dosaženo po 3 minutách od aplikace kontrastní látky. Jako pozdní fáze je označován stav, kdy se z ložiskových lézí pomalu vyplavuje kontrastní látka, a zřetelný pokles denzity můžeme zaznamenat zhruba po 10 minutách [50 s. 64-66].

Při CT diagnostice patologických ložisek jater se hodnotí jejich denzita a charakter syčení kontrastní látkou. U sekundárních nádorů je důležité, jakou cestou byly metastázy do jater zaneseny. CRC metastazuje do jater cestou portální žíly. Tyto metastázy většinou nejsou vaskularizované z arteriálního řečiště. Proto se i na CT v arteriální i portální fázi zobrazují jako hypodenzní léze, které mohou mít hyperdenzní lem v portální fázi. V pozdní fázi jsou vzhledem k pomalému vymývání kontrastní látky hyperdenzní. Karcinomy konečníku však mohou metastazovat i cestou systémového oběhu. Zde se tedy můžeme setkat i s hypervaskularizací, a tudíž i hyperdenzitou již při arteriální fázi [50 s. 64-66]. Na perfúzním CT se u hypervaskularizovaných metastáz můžeme setkat s obdobným nálezem jako u hepatocelulárního karcinomu, kdy se zvyšuje arteriální perfúze spolu s jaterním perfúzním indexem a na druhou stranu se snižuje portální perfúze spolu s tranzitním časem a snížením permeability [51].



### Význam zbytkového jaterního objemu

Pacienti, u kterých je zvažována velká resekce jater (3 a více jaterních segmentů), jsou ohroženi jaterním selháním v pooperačním období v závislosti na stavu jaterního parenchymu. Jako prevence pooperačního akutního jaterního selhání je ponechání dostatečného objemu zbytkového jaterního parenchymu (Future Liver Remnant Volume, FLRV) [6]. FLRV je předpokládaný objem jaterní tkáně, který je pacientovi ponechán po resekčním výkonu. Velikost FLRV pomáhá odhadnout minimální funkční rezervu jater. Součástí plánování rozsáhlých resekčních výkonů na játrech je tedy i předoperační CT vyšetření jater, při kterém jsou stanoveny objemy jednotlivých jaterních laloků, celkový objem jater (Total Liver Volume, TLV) a objem nádorových ložisek - v našem případě metastáz (Volume of Liver Metastases, VLM). FLRV je pak převeden na procenta jako poměr  $FLRV/TLV \cdot 100$ . Stanovení FLRV musí být provedeno individuálně u každého pacienta s přihlédnutím k rozsahu plánovaného výkonu. CT volumetrii lze provést jak z nativního CT, tak i z CT s podáním kontrastní látky. U vícefázového CT se k provedení CT volumetrie využívá venózní fáze, protože se zde nejlépe zobrazují i hranice nádorových ložisek [60].

Ke stanovení jaterních objemů využíváme buď manuální, nebo semiautomatickou CT volumetrii [61]. Zatímco manuální volumetrie má vysoké nároky na čas a erudici radiologa, semiautomatické metody jsou oproti manuální volumetrii uživatelsky jednodušší, rychlejší, ale jsou i stejně přesné [62]. Novým trendem CT volumetrií jsou i 3D vizualizace jater, plánování vedení resekčních linií na játrech a ozřejmení periferních parametrů na mikrostrukturální úrovni cévního řečiště jater [63, 64].

#### **4.2.1.5 Magnetická rezonance jater**

MR využívá efektu magnetického pole, které excituje protonová jádra. Po vybuzení se jádra postupně dostávají zpět do klidového a rovnovážného stavu. Tyto relaxační časy jsou u každé tkáně jiné a lze je snímat a následně vyhodnotit. V porovnání s CT jater, MR dobře zobrazuje měkké tkáně především v jejich nativním obraze. Proti CT nebo USG jater však MR nepatří mezi rutinní vyšetření. V MR jater obvykle využíváme difúzi vážených obrazů a vyšetření pomocí hepatotropních kontrastních látek. U difúzi vážených obrazů je měřena schopnost molekul vody difundovat do tkání a zvyšovat tak jejich celulární

denzitu. V případě metastatického postižení jater je difúze vody omezena, což napomáhá zpřesnit diagnostiku metastáz oproti běžně používaným T1 a T2 váženým obrazům [50 s. 74, 65]. Další faktor, který výrazně pomáhá zpřesnit diagnostiku metastatického postižení jater, je použití pro hepatocyty specifických kontrastních látek. Z kontrastních látek se nejčastěji používají látky s gadoliniem, pro hepatocyty ideálně ve vazbě na cheláty. Dále se využívají preparáty s příměsí manganu nebo kyselina gadoxetová. Tyto hepatospecifické látky jsou vychytávány v hepatocytech a nejvyšší koncentrace dosahují přibližně 20 minut po jejich i.v. aplikaci. Léze, které neobsahují hepatocyty (např. CLM), se tak jeví jako hypointenzivní oproti zbylému parenchymu.

MR jater je využívána především v případě, kdy není možné provedení CT nebo v případě diagnostických rozpaků na USG nebo CT jater, protože difúzí vážené obrazy dobře odliší jaterní cysty a hemangiomy od CLM. Barral ve svém shrnutí uvádí sensitivitu 86 % a specifitu až 94 % v diagnostice CLM. V rámci diagnostiky jaterních lézí také doporučuje při MR vyšetření kombinovat difúzí vážené obrazy a T1 vážené obrazy [66].

V rámci MR vyšetření lze provést MR cholangiopankreatografii (Magnetic Resonance CholangioPancreatography, MRCP) a zobrazit biliární a pankreatické cesty.

#### **4.2.1.6 Pozitronová emisní tomografie**

Hybridní metody využívající PET v kombinaci s některou z konvenčních zobrazovacích metod (CT nebo MR) jsou nezastupitelné při stagingu onkologických pacientů. PET je metoda využívající aplikaci radiofarmaka a jeho akumulaci ve tkáních na podkladě fyziologických a patofyziologických pochodů. Po i.v. aplikaci radiofarmaka dochází k jeho distribuci do orgánů. Radiofarmaka emitují pozitronové částice ze svého jádra. Následně interaguje s nejbližším elektronem ve svém obalu za vzniku dvou fotonů, které jsou emitovány ze tkání. Tyto fotony jsou v celém těle snímány gama kamerou. Nejvíce rozšířeným radiofarmakem, které je při PET používáno, je značená 18-fluorodeoxyglukóza (18-FluoroDeoxyGlucose, <sup>18</sup>FDG). Tento analog glukózy vstupuje do buněk stejnou cestou jako glukóza. V buňce je fosforylován hexokinázou na <sup>18</sup>FDG-6-fosfát, který již buňky dále nezpracovávají, a radiofarmakum se tak v buňce akumuluje. Tkáně s vysokým metabolickým obratem akumuluji větší množství této látky. Jedná se především o nádorová a zánětlivá ložiska. Díky rychlému růstu buněk v nádorových tkáních, a tím i

vysoké potřebě glukózy jsou nádorové léze zobrazeny vysokým kontrastem oproti méně metabolicky aktivním tkáním. Samotné PET však má špatné prostorové rozlišení, a proto je prováděno jako hybridní metoda nejčastěji v kombinaci s CT nebo MR. V onkologii mají tyto hybridní metody význam především k vyloučení vzdálených a neočekávaných ložisek. [50 s. 76-77, 56 s. 234-240].

PET/MR je zcela nová metoda nabízející kombinaci vysokého rozlišení měkkých tkání v kombinaci s jejich metabolickou aktivitou. Jak shrnuje Karaosmanoglu v porovnání s PET/CT má PET/MR větší senzitivitu v detekci CLM, má velký přínos při hodnocení efektu jak systémové, tak i lokoregionální léčby [67].

#### **4.2.2 Chirurgická léčba jaterních metastáz kolorektálního karcinomu**

Chirurgická léčba jaterních metastáz je základním kamenem léčebné strategie. Jako jediná metoda nabízí pacientovi šanci na kompletní odstranění nádorových ložisek. V kombinaci s onkologickou léčbou cílenou na mikrometastatické postižení tak lze dosáhnout i kurativní léčby a celkové remise pacienta [68]. CLM se vytvoří až u 50 % pacientů léčených pro kolorektální karcinom [3], ale bohužel jen 20 - 25 % těchto pacientů je primárně resekabilních [69, 70]. U pacientů s primárně neresekabilními CLM je možné volit mezi několika přístupy. V prvé řadě je nezbytné zvážit postupy, které pacientovi mohou nabídnout radikální chirurgický výkon. Sem patří využití neoadjuvantní chemoterapie s downsizingem CLM a následnou jaterní resekcí. Další možností je provedení etapového výkonu nebo využití augmentačních metod, např. embolizace větve portální žíly (Portal Vein Embolization, PVE) - typicky u bilobárních lézí [8].

K dalším metodám patří paliativní postupy. Zde bychom na prvním místě měli uvést destrukční metody, jako jsou RFA – otevřená nebo pod CT přístupem, mikrovlnná nebo laserová ablace a kryoablace. Dále je možné využití radiointervenčních výkonů v podobě transarteriální chemoembolizace (TransArterial ChemoEmbolization, TACE) (transarteriální chemoembolizace) nebo transarteriální radioembolizace [50 s. 173-191]. Jako poslední modalita pak zůstává samotná paliativní chemoterapie.

##### **4.2.2.1 Indikace pacientů k jaterním resekcím**

Díky pokroku v resekčních technikách, technickému zázemí operačních sálů, perioperační a pooperační péči a zlepšování diagnostických a zobrazovacích metod došlo

k významnému navýšení počtu pacientů, kteří jsou schopni podstoupit resekční výkon. Mezi významné faktory, které v minulosti kontraindikovaly resekční výkony, patřila nevhodná lokalizace metastáz (bilobární uložení metastáz), vysoký počet (více než 3) a velikost metastáz, mimo jaterní šíření CRC a postižení lymfatických uzlin jaterních pediklů [20 s. 168, 71]. Fong ve své studii uvádí celkem 7 negativních faktorů, které zhoršují prognózu pacientů s CLM. Jsou to pozitivní resekční linie, extrahepatální postižení, infiltrace lymfatických uzlin u primárního nádoru, doba mezi odstraněním primárního ložiska a rozvojem metastáz kratší než 12 měsíců, počet CLM větší než 1, velikost CLM větší než 5 cm a předoperační hladina CEA vyšší než 200ng/ml [72]. Tyto faktory jsou v dnešní době považovány za prognosticky nepříznivé, ale jako takové nekontraindikují chirurgický výkon.

#### **4.2.2.2 Posouzení resekability**

Při posuzování resekability CLM nejprve zvažujeme samotnou technickou proveditelnost tak, abychom dosáhli R0 resekce. Resekabilita je ve většině případů dána uložení CLM a jejich vztahem eventuálně i invazí k portálním strukturám a jaterním žilám. Pokud to anatomické poměry dovolí, snažíme se provést resekční výkon s uchováním co největšího objemu jaterního parenchymu. Toto platí i v případě bilobárních nebo víceložiskových lézí, kde preferujeme menší neanatomické resekce nebo metastazektomie. U anatomicky nevhodně uložených bilobárních lézí je v dnešní době možné využít i etapové postupy, které budou zmíněny níže.

V případě extrahepatálních metastáz je nutné posoudit resekabilitu i těchto ložisek (nejčastěji intraabdominální lymfatické uzliny a plicní metastázy). Dostupná data nasvědčují, že operační výkony na játrech jsou přínosné i v případě limitovaného extrahepatálního postižení nebo extrahepatálního postižení, u kterého je předpoklad dlouhodobého přežití při podání onkologické léčby [73]. Např. v případě plicních ložisek následují metastazektomie nebo plicní resekce v druhé době po operaci jater s relativně uspokojivými výsledky. Na naší klinice byl u těchto pacientů medián OS 83 měsíců [74]. Vysoký věk pacienta není kontraindikací resekčního výkonu, pokud je biologický věk pacienta nižší a pokud operační výkon pacientovi poskytne delší OS a dostatečnou kvalitu života v pooperačním období [75].

Mezi faktory určujícími operabilitu pacientů patří i celkový stav pacienta. Je nutné, aby interní komorbiditativy nelimitovaly operační výkon, a to především po stránce kardiální, respirační, renální a endokrinní. Pacienty, kteří jsou zvažováni k operačnímu výkonu, je nezbytné posoudit i z hlediska možnosti rozvoje akutního jaterního selhání v pooperačním období, a to především u rozsáhlých jaterních resekcí (více jak tři segmentů) [76]. K posouzení rizika rozvoje jaterního selhání nám slouží anamnéza a dokumentace o podaných chemoterapeutických cyklech a odezva onemocnění na jejich podání. Dále využíváme CT volumetrie se stanovením FLRV a eventuálním posouzením difúzního jaterního onemocnění, pokud je na CT rozlišitelné. Další možností je doplnění funkčního vyšetření jater. Kontraindikací výkonu je difúzní onemocnění jater, které by při podání onkologické léčby mohlo progredovat do jaterního selhání. Relativní kontraindikací výkonu jsou nádorová onemocnění jater, která nereagují na podanou neoadjuvantní onkologickou léčbu, a to jak v kombinaci s biologickou léčbou, tak i po změně chemoterapeutického režimu.

Předoperační vyšetření krve zahrnující stanovení bilirubinu, alkalické fosfatázy, gamaglutamyltransferázy, alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy, albuminu a hemokogulační vyšetření, je základním screeningem, který nám dává prvotní informaci o stavu jaterního parenchymu. Součástí odběrů krve je i stanovení onkologických markerů, především CEA, CA19-9 a alfa fetoproteinu. Hladiny biochemických markerů jsou pak využity v rámci skórovacích systémů, které pacienty rozdělují do skupin podle závažnosti jejich jaterního postižení. Nejznámější je Child-Pughova klasifikace. Tato klasifikace je využívána hlavně u pacientů s difúzním jaterním postižením, především cirhózou. Pacienti jsou rozděleni do tří skupin na základě biochemických a klinických parametrů tak, jak shrnuje obr. 3. Pacienti ze třídy A jsou hodnoceni jako málo rizikovní pacienti, naopak skupina C jako vysoce rizikovní pacienti. Pacienti ze třídy A a B ještě mohou být indikováni k resekcí výkonům. Třída C je kontraindikací jaterních resekcí [76].

K posouzení funkce jater u pacientů s CLM využíváme na naší klinice retenční test s indocyaninovou zelení (IndoCyanin Green, ICG). Tento test hodnotí jaterní clearance ICG a jaterní exkretční funkci. ICG je látka rozpustná ve vodě, která je z cirkulace eliminována v játrech a následně vyloučena do žlučových cest. V rámci testu se hodnotí míra eliminace ICG z plazmy (Plasma Disappearance Rate, PDR) a míra retence ICG po 15 minutách

(Retention rate at 15 minutes, R15). Normální hodnoty pro PDR jsou 18-25 %/min u R15 0-10 %. Na základě R15 je vyjádřen i vztah k rozsahu jaterní resekce, jak ukazuje obr. 4 [77].

K ozřejmení funkčního stavu jater je možné využít i radionuklidové vyšetření, při kterém je využíván techneciem značený lidský sérový albumin (Tc - Galactosyl Serum Albumin, Tc-GSA) nebo techneciem značené deriváty kyseliny imidoctové (Tc - Hepatobiliary IminoDiacetic Acid, Tc-HIDA). Tc-GSA je vychytáváno specifickými receptory na sinusoidálních membránách hepatocytů. V případě chronického jaterního postižení se snižuje množství těchto receptorů, což se projeví i při vyšetření na dynamické scintigrafii zaměřené na játra a srdce, kde je měřena akumulace v krvi. Maximální akumulace radiofarmaka v játrech je při normální funkci dosaženo po 30 minutách.

**Child-Pughova klasifikace funkčního hodnocení jater u pacientů s cirhózou.**

Klinické a laboratorní parametry	Bodová hodnota parametrů		
	1	2	3
bilirubin (μmol/l)	< 35	35–50	> 50
albumin g/l	> 35	28–35	< 28
ascites	0	reverzibilní	ireverzibilní
encefalopatie	0	mírná (1 a 2)	zřetelná (3 a 4)
INR	< 1,7	1,71–2,20	> 2,20

Zhodnocení: třída A: 5–6 bodů, třída B: 7–9 bodů, třída C: 10–15 bodů

Obr. 3: Child-Pughova klasifikace jaterních funkcí [77]

**Vztah R15 (míra retence ICG po 15 minutách) a rozsahu jaterní resekce**

< 6 %	bez omezení velikosti resekce
7–15 %	nejvíce bisegmentektomie
16–20 %	segmentektomie
21–30 %	povrchní jaterní excize

Obr. 4: R15 a jeho vztah k rozsahu jaterní resekce [77]

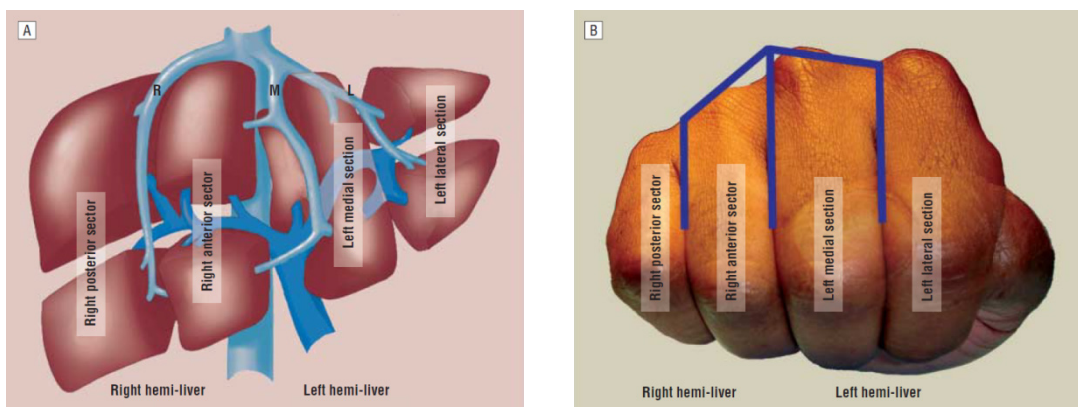
Tento test se využívá především u pacientů s primárním tumorem jater a je využíván především v Japonsku. V USA a v Evropě dostupný není [56 s. 35]. Zde je pak využíván test pomocí Tc-HIDA. Tato látka je taktéž vychytána hepatocyty a exprimována do žluči. Po jejím nahromadění ve žlučníku je evakuována po i.v. podání cholecystokininu do duodena. Celý proces je opět snímán scintigrafickou kamerou. Clearance Tc-HIDA je tedy ovlivňována jak funkcí hepatocytů, tak i zpomalením pasáže žlučovými cestami. Z nasnímaných akumulací farmaka v játrech a srdci lze matematickými modely stanovit jaterní exkretční frakci, která vyjadřuje množství vychytané HIDA při jednom průtoku jater. Normální hodnoty jsou 90-100 %, u závažných poruch jsou jen 10 % [77].

### **4.2.2.3 Chirurgické výkony na játrech**

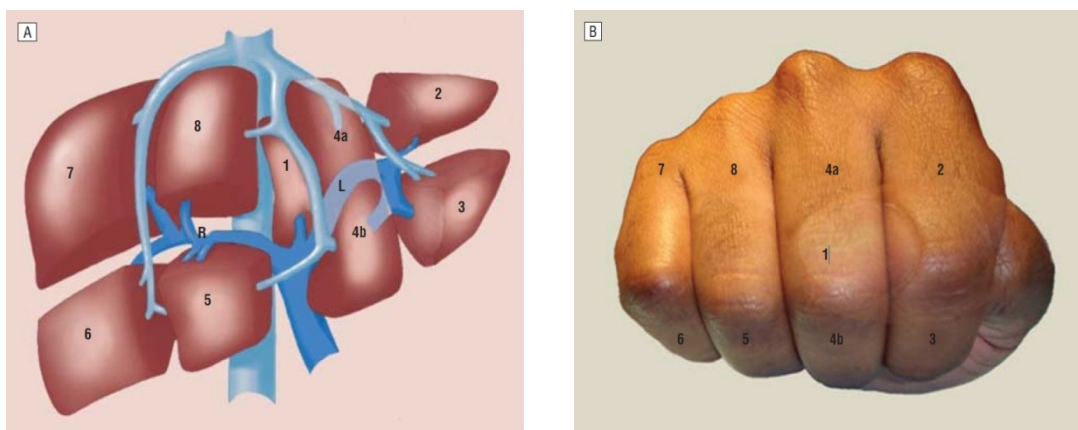
#### Chirurgická anatomie jater

Chirurgické výkony na játrech vycházejí z anatomického uspořádání jater. Místo klasické anatomie však využíváme tzv. funkční anatomii jater a rozdělení jater dle Couinauda. To je určeno na podkladě cévního zásobení jater z portální žíly a následně i jaterních žil. Do jater je krev přiváděna portální žilou a vlastní jaterní tepnou. Z jater pak vycházejí pravá, střední a levá jaterní žíla. Portální žíla rozděluje játra na pravý a levý lalok, zatímco jaterní žíly rozdělují játra na čtyři sektory. Tento proces je někdy nazýván jako interdigitace, protože rozdělení připomíná prsty ruky. Pro přehlednější orientaci je přiložen i obr. 5,6,7,8. Pravý jaterní lalok je rozdělen pravou jaterní žílou na dorzální a ventrální (anteriorní) sektor, levý jaterní lalok je rozdělen levou jaterní žílou na laterální a mediální sektor. Střední jaterní žíla odděluje mediální a ventrální sektor. Jak je zmíněno výše, na podkladě zásobení jater z vena portae jsou játra rozdělena na pravý a levý lalok. V případě podvazu jedné z hlavních větví portální žíly se tato linka demarkuje jako Rex-Cantlie linie, která probíhá od fundu žlučníku k vyústění v. hepatica media. Pravá větev v. portae se následně větví pro ventrální a dorzální sektor. Pro ventrální sektor pak vydává terminální větve pro segment V a VIII a v dorzálním sektoru terminální větve pro segment VI a VII. Levá větev v. portae se dělí na větve pro laterální sektor a mediální sektor. V laterálním sektoru se dělí na terminální větve pro II. a III. segment. V mediálním sektoru se nacházejí terminální větve pro segment IVa a IVb. Samostatnou jednotkou je SI (lobus caudatus), který se nachází mezi dolní dutou žílou a větvením portální žíly. SI má

samostatné cévní zásobení z obou větví portální žíly (a stejně tak i z jaterní tepny) a je drenován řadou drobných spojek do dolní duté žíly. Dle Couinauda tedy rozlišujeme 8 jaterních segmentů. Levý jaterní lalok je tvořen segmenty II, III a IV (tzv. lobus quadratus, který je dělen na segment IVa a IVb). V pravém laloku, který je větší a tvoří cca 60 % jaterní tkáně, pak rozlišujeme SV, SVI, SVII a SVIII. Pro lepší orientaci jsou přiloženy obr. 7 a 8. Jednotlivé segmenty mají i příslušné větve jdoucí z a. hepatica propria a jsou drenovány do odpovídajících žlučových kanálků, které odpovídají větvení v. portae [20 s. 144-154, 50 s. 11-26, 78].



Obr. 5 a 6: rozdělení jater na sektory v závislosti na jaterních žilách R- pravá jaterní žíla, M střední jaterní žíla, L levá jaterní žíla [78]



Obr. 7 a 8: rozdělení jaterních segmentů na podkladě větvení jaterních žil a portální žíly. L - levá větev v. portae, R - pravá větev v. portae, jednotlivá čísla označují dané jaterní segmenty[78]

### Základy jaterních resekcí

Jaterní resekce lze rozdělit na resekce neanatomické a anatomické. Neanatomické resekce jsou resekce, které nerespektují jaterní segmenty. Obvykle se jedná o menší výkony v podobě excizií, metastazektomií nebo klínovitých resekcí. Zásadou je odstranit



metastázu s ponechaným lemem zdravého jaterního parenchymu. Mikroskopicky by měla být resekční linie vzdálená 1mm od CLM [79]. Anatomické resekce jsou takové resekce jaterního parenchymu, které respektují jejich segmenty, a tudíž i cévní zásobení. U jaterních resekcí existuje několik názvosloví, které tyto výkony popisují. V dizertační práci je používána Brisbain klasifikace z roku 2000. V případě odstranění jednoho segmentu hovoříme o segmentektomii. Při odstranění 2 segmentů o bisegmentektomii. V případě resekce SV, SVI, SVII a SVIII udáváme, že jde o pravostrannou hepatektomii. U resekce SIV, SII a SIII mluvíme o levostranné hepatektomii. Pokud tyto výkony doplníme o resekci dalšího segmentu, mluvíme o rozšířené (extendované) jaterní hepatektomii. Jako mesohepatektomii nebo centrální resekci jater označujeme výkon, kde resekujeme SI, SIV, SV a SVIII [20 s 165-169, 50 s 121-122, 79]. Trendem v dnešní době je preferovat parenchym šetřící výkony, jejichž dlouhodobé výsledky jsou stejné v porovnání s velkými anatomickými resekcemi. Tyto postupy navíc šetří jaterní parenchym i z hlediska opakovaných jaterních resekcí při recidivě CLM [79, 80].

Základem chirurgické léčby je dosažení R0 resekce, a tedy maximální možné radikality výkonu. V případě resekcí CLM prošla kritéria na radikalitu resekcí významným vývojem. V minulosti byl za R0 resekci považován výkon s ponecháním minimálně 1 cm zdravé tkáně. Jako R1 resekce pak byl označován výkon, který ponechal lem zdravé tkáně v rozmezí od 1 do 9 mm. Za R2 resekce byl považován výkon, kde byla resekční linie v kontaktu s CLM [81]. Tato kritéria byla vytvořena v důsledku obavy, že ponechání menšího množství než 1 cm zdravé tkáně snižuje OS pacientů a zvyšuje riziko rekurence v důsledku mikrometastatického postižení v okolí CLM [81, 82]. Pod tíhou dalších studií však byly tyto limity postupně snižovány [83]. Dnes je uznávaný jako R0 jaterní resekce jakýkoliv výkon, kde resekční linie mikroskopicky ani makroskopicky nezasahuje do CLM. Resekční výkon, kde resekční linie mikroskopicky zasahuje do CLM je označován jako R1. R2 jsou výkony, kde je makroskopicky patrný kontakt resekční linie a CLM [82, 94].

#### **4.2.2.4 Etapové resekce**

Až u 50 % pacientů léčených pro CRC se vytvoří CLM [3]. Bohužel jen čtvrtina těchto pacientů je primárně resekabilních [69, 70, 85]. Hlavní příčinou primární neresekability CLM je nedostatečný FLRV, který by měl být u zdravého jaterního parenchymu větší než

30% a u poškozeného parenchymu (např. prolongované chemoterapie, steatohepatitidy apod.) více než 40 % [6]. FLRV můžeme zvětšit některými z augmentačních metod, mezi které řadíme ligaci větve portální žíly (Portal Vein Ligation, PVL), PVE a tzv. Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy (ALPPS).

#### Ligace větve portální žíly

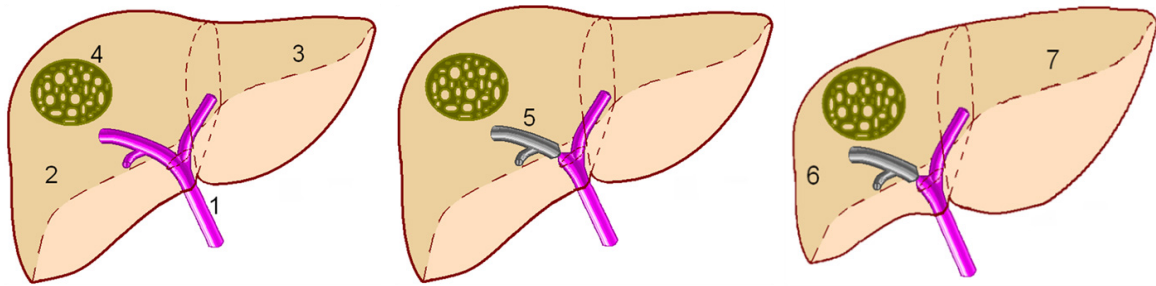
V roce 1920 Rous jako první provedl experiment s PVL na králících a psech, u kterých pozoroval, jak jaterní parenchym s ligovaným portálním řečištěm atrofuje a neokludovaný jaterní parenchym hypertrofuje [86]. V sedmdesátých letech 20. století pak tuto myšlenku využil Honjo, který PVL využil u 22 pacientů s inoperabilními primárními tumory jater. Metoda byla dobře snášena a měla minimum komplikací [7].

Při PVL je během operačního výkonu provedena izolace a podvaz větve portální žíly na straně jaterního nádoru. Bezprostřední efekt PVL lze ověřit jednak pohledem při demarkaci Rex-Cantileho linie, ale také je možné provést USG s dopplerometrickou kontrolou krvního toku [87].

#### Embolizace větve portální žíly

PVE je dnes již dobře etablovaná metoda, jak předoperačně navýšit nedostatečný FLRV [88]. První klinické použití PVE je přisuzováno Makuuchimu a Takayasuovi, kteří od roku 1982 využívali PVE u pacientů s Klatskinovým tumorem [89,90]. Od té doby vyšla již řada studií, které potvrdily bezpečnost této metody, a v současné době patří PVE ke standardnímu způsobu, jak navýšit FLRV.

PVE je obdobně jako PVL metoda, při které je uzavřena část portálního řečiště a tok portální krve je tak přeměřován do neokludovaného řečiště. Okluze se provádí na straně plánované operace. V důsledku tohoto výkonu dochází ke kompenzatorní hypertrofii jaterního parenchymu neokludovaného portálního řečiště. Naopak na straně jaterního parenchymu s tumorem a okludovaným portálním řečištěm dochází k atrofii jaterního parenchymu, viz obr. 9a-9c.



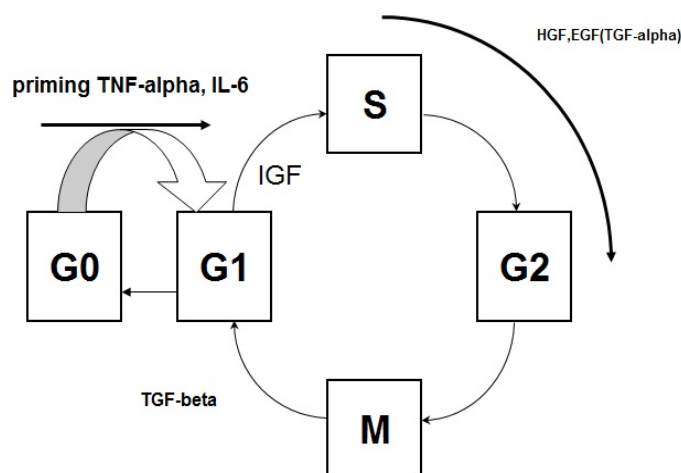
Obr. 9a-9c: mechanismus efektu embolizace/ligace pravé větve portální žíly. 9a: tumor pravého jaterního laloku řešitelný rozsáhlou jaterní resekcí, ale současně nízkým FLRV. 9b: provedení PVE. 9c: proces kompenzatorní hypertrofie FLRV a atrofie jaterního parenchymu s okludovaným portálním řečištěm. 1. v. portae, 2. pravý jaterní lalok, 3. levý jaterní lalok s nedostačujícím FLRV, 4. tumor., 5. embolizace/ligace pravé větve v. portae, 6. atrofie jaterního parenchymu s okludovaným portálním řečištěm, 7. hypertrofie FLRV. Použito se souhlasem autora obrázků MUDr. Ondřeje Vyčítala, Ph.D.

### Mechanismus regenerace jater a hypertrofie jater po PVL, PVE

Regenerační schopnost jater je dána dvěma základními mechanismy. Prvním je replikace samotných hepatocytů, druhým je vytvoření nových jaterních buněk z progenitorových buněk. V játrech jsou progenitorové buňky nazývané oválné buňky (Ovall Cells, OCs). Při poranění jater jsou aktivovány pochody, které vedou k replikaci hepatocytů. V případě těžkého jaterního infarktu, kdy je potlačena replikační schopnost hepatocytů, se do regeneračních pochodů zapojují oválné buňky [91].

Vyvolávajícím mechanismem, který stimuluje regeneraci jater, je u obou zmíněných situací změna hemodynamických poměrů v portálním řečišti. Po PVL a PVE stoupá průtok krve v ponechaném nebo neokludovaném portálním řečišti. Vysoký intraportální tlak způsobuje stresovou reakci endoteliálních buněk, hvězdčovitých buněk a Kupfferových buněk v oblasti jaterních sinusoid. Ty začnou vyplavovat řadu působků, které aktivují replikační procesy v játrech [88].

Celý proces dělení hepatocytů lze rozdělit do tří fází – priming hepatocytů, fáze vlastního dělení hepatocytů a terminální fáze. V každé fázi se uplatňují jiné působky. Ty nejpodstatnější shrnuje obr. 10. Priming hepatocytů je proces, kdy se hepatocyty, které se nacházejí v G0 klidové fázi buněčného cyklu, přepnou do fáze G1. V této fázi se uplatňují především tumor nekrotizující faktor alfa (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- $\alpha$ ) a IL-6, které jsou uvolňovány především z Kupfferových buněk. Po reakci s příslušnými receptory na povrchu hepatocytů se aktivují kaskády vnitřních posílů, které v jádrech hepatocytů spouštějí pochody zakončené replikací DNA, a hepatocyt tak vstupuje do G1 fáze buněčného cyklu.



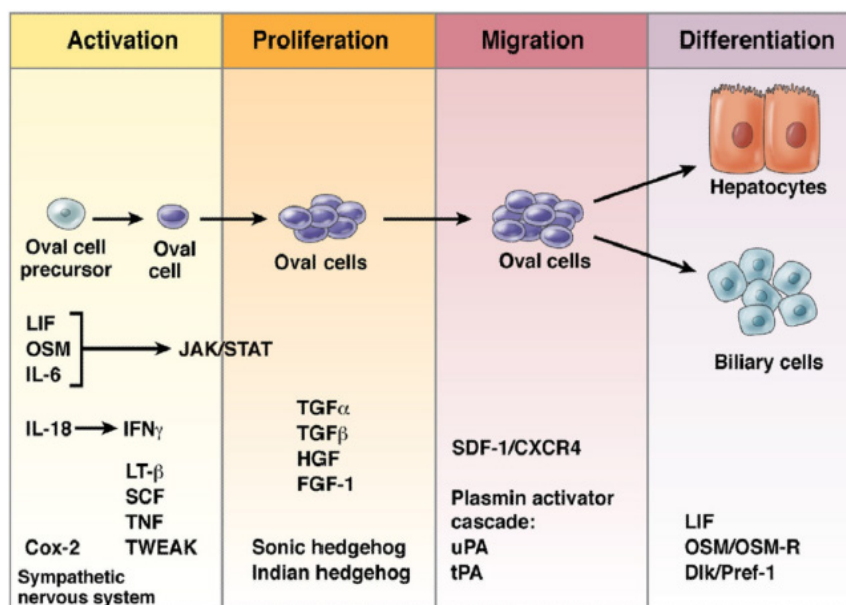
Obr. 10: cytokiny, interleukiny a růstové faktory ovlivňující buněčný cyklus hepatocytů [92]

Dále je buněčný cyklus ovlivňován růstovými faktory. Prvním z faktorů, který ovlivňuje hepatocyt mezi fázemi G1 a S, je inzulin a inzulinu podobný růstový faktor (Inzulin like Growth Factor, IGF) [92]. Díky portálnímu řečišti jsou játra orgánem, přes který prochází veškerá produkce inzulinu secernovaná pankreatem. V experimentálních modelech vedlo snížení přísunu inzulinu do jater k atrofii jater, která byla reverzibilní po opětovném podání inzulinu. Ve studiích s kulturami hepatocytů byla prokázána snížená odpověď na stimulaci mitogeny v případě absence inzulinu. Inzulin je tak důležitým regulačním faktorem v udržení homeostázy hepatocytů, ale nejedná se o přímý mitogen. Faktory, které provedou hepatocyt prakticky celým buněčným cyklem, jsou především hepytocyární růstový faktor (Hepatocyte Growth Factor, HGF) a rodina epidermálních růstových faktorů (Epidermal Growth Factors, EGFs). HGF je produkován z neparenchymových buněk jater a na játra tak má parakrinní a endokrinní efekt. Část HGF je ukládána v jaterní extracelulární matrix. Odtud je HGF uvolněn tkáňovým aktivátorem plasminogenu, který je exprimován endoteliálními buňkami v případě zvýšení proudění v portální žíle [93]. Vysoké hladiny HGF jsou tak přítomny od samotného začátku buněčného cyklu hepatocytů a patří mezi zásadní mitogenní faktory. Rodina EGFs zahrnuje celou řadu růstových faktorů, kde nejvýznamnější úloha je přisuzována transformujícímu růstovému faktoru alfa (Transforming Growth Factor alpha, TGF- $\alpha$ ). Tento faktor je produkován samotnými hepatocyty a má tak autokrinní efekt. EGFs po vazbě na příslušný receptor spouští pochody zakončené replikací DNA a dělením hepatocytů [92]. Terminální fáze buněčného cyklu hepatocytů vede k opětovnému

přepnutí hepatocytů do klidového stádia G0. V této fázi buněčného cyklu hepatocytů je úloha ukončení regenerace přisuzována transformujícímu růstovému faktoru beta (Transforming Growth Factor beta, TGF- $\beta$ ) a Activinu. Oba faktory patří mezi silné mitoinhibitory epiteliálních buněk. TGF- $\beta$  je produkován především v mesenchymálních buňkách. Jeho produkce je regulována hladinou EGFs a především HGF. Na druhou stranu TGF- $\beta$  působí jako supresor pro HGF. Současně i stimuluje hvězdčité buňky k tvorbě extracelulární matrix a vytváření jaterních sinusoid. Extracelulární matrix vyvazuje HGF do svých struktur a po vyrovnání hladin HGF a TGF- $\beta$  jsou tak hepatocyty usazeny v klidovém stádiu do svých typických histologických struktur [93].

V případě rozsáhlého jaterního postižení, kdy je narušena replikace hepatocytů, jsou do regeneračních pochodů zapojeny i oválné buňky (OCs). Tyto buňky jsou jaterními progenitorovými buňkami, které se nacházejí v Heringových kanálcích (terminální část žlučových cest), a jsou schopné se diferencovat jak do hepatocytů, tak i do cholangiocytů. K jejich aktivaci dochází po 2-3 dnech od inzultu [93].

Odpověď OCs na inzult lze rozdělit do několika kroků, kterými jsou: aktivace, proliferace, migrace a diferenciaci OCs vedoucí ke vzniku nového hepatocytu nebo cholangiocytu (obr. 11). Jako faktor, který OCs aktivuje a vyvolá jejich proliferaci, je udáván IL-6 [94, 95]. OCs následně migrují a kolem 7. dne po inzultu se dostávají k poškozenému místu v játrech. Migrace OCs je ovlivňována řadou faktorů, a to především HGF, rodinou EGFs a od stromatu odvozeného růstového faktoru (Stromal Derived Factor, SDF) [91]. Fáze migrace trvá zhruba dalších 7 dní [96]. V momentě, kdy migrující OCs dosáhnou svého cíle, začíná diferenciaci do finální somatické buňky. Během regenerace jater navozené OCs se kolem OCs kumulují makrofágy a myofibroblasty, které vytvářejí nicher potřebnou pro expanzi OCs. Na podkladě signálů z této nicher se v OCs aktivuje příslušná kaskáda vnitřních poslů. V případě diferenciaci do hepatocytu se aktivuje Wnt kaskáda, v případě diferenciaci do cholangiocytu se aktivuje tzv. Notch kaskáda [96, 97].



Obr. 11: přehled jednotlivých fází vývoje OCs a faktorů, které vývoj stimuluji [105]

Postupnou replikací hepatocytů a proliferací a diferenciací OC jsou játra schopná se zrestaurovat do původního objemu tkáně. Na konci regenerace se v játrech vyskytuje větší procento hepatocytů než byl původní počet. Sakamoto popsal, že hepatocyty na konci regenerace prochází apoptotickou vlnou, která finálně upraví jejich počet [98]. Ve studiích na psech, kde byla provedena transplantace velkých jater do malého zvířete a naopak, bylo možné pozorovat, jak se váha a velikost jater upravila v závislosti na velikosti zvířete. Michalopoulos ve svém shrnutí nazývá tento finální krok regenerace jater „hepatostat control system“ [93]. Finální tvar jater po dokončení regeneračního procesu nemá stejnou anatomickou strukturu, ale jedná se o proces kompenzatorní hypertofie za ztracenou tkáň [99].

### Provedení PVE

PVE se provádí perkutánním transhepatálním přístupem obvykle na straně jaterního laloku, kde je PVE plánována [100]. Při PVE je nejprve provedena portografie a po ozřejvení anatomie portálního stromu je provedena samotná embolizace [101, 102]. Mezi nejčastěji používané embolizační materiály patří želatinové pěny, coiling, kyanoakrylát, polyvinyl alkohol, fibrin nebo lipiodol. Velmi spolehlivým embolizačním materiálem jsou deriváty kyanoakrylátu. Samotný kyanoakrylát je cytotoxický a může vyvolat jaterní nekrózu. Nejčastěji je používán derivát n-butyl kyanoakrylát ve směsi

s jodizovaným olejem, např. jako preparát Histoacryl. Tento materiál je schopen vydržet více než 4 týdny od PVE bez rekanalizace v. portae. Kyanoakrylát snadno proniká do větvi portální žíly druhého a třetího řádu a kompletně tak vyplní povodí dané větve portální žíly. Tím lze omezit i případné snížení efektu PVE možnými mezilalokovými kolaterálami. Rizikem však je i snadný únik kyanoakrylátu do FLRV a tím i snížení efektu PVE. Kyanoakrylát také nese riziko vzniku nekróz a fibrózní reakce kolem portální triády a tím i ztížení následujícího operačního výkonu [103, 104, 105].

Posouzení FLRV je nejčastějším faktorem, na jehož základě indikujeme PVE. Podle dostupných studií pacienti se zdravým jaterním parenchymem potřebují ponechání FLRV minimálně 25 % [106]. Ferrero ve své studii uvádí FLRV 26,5 % [107], aby u pacientů nedošlo k pooperační jaterní insuficienci. Jsou však i doporučení, která udávají, že u zdravých jater je dostačující i FLRV 20 % [73]. Obecně přijímaný fakt je, že u pacientů se zdravým jaterním parenchymem ponecháváme FLRV v rozmezí 25-30 % [108]. Avšak s touto situací se v klinické praxi setkáváme velmi málo.

Pacienti s CLM obvykle podstupují onkologickou léčbu, která ovlivňuje morfologické a fyziologické poměry v játrech [109], a zvyšuje tak i riziko pooperačních komplikací. V případě resekčních výkonů jsou tito pacienti zatíženi vyšším rizikem jaterního selhání. Proto je u nich nutné ponechání i vyššího FLRV. V případě standardních chemoterapeutických režimů (tzn. při neoadjuvantní chemoterapii před resekci jater v rámci down sizingu 6 cyklů a v případě adjuvantní chemoterapie po resekci primárního tumoru 12 cyklů) je doporučeno ponechat 30-35 % FLRV. K PVE tak indikujeme pacienty, kteří mají FLRV menší než 30 %. V případě prolongované chemoterapie (12 cyklů a více), nebo primárního poškození jaterní tkáně (např. cirhózou) je vhodné počítat s FLRV minimálně 40 % [6, 109, 110]. U menších objemů tak opět indikujeme PVE. Kromě prolongované chemoterapie, která může vyvolat sinusoidální obstrukční syndrom (Sinusoidal Obstruction Syndrom, SOS) nebo chemoterapií vyvolanou steatohepatitidu (Chemotherapy - Associated Steatohepatitis, CASH) a tím negativně ovlivnit regenerační kapacitu jater, je jako další negativní faktor jaterní regenerace udáván diabetes mellitus. Deficit inzulínu vyvolává steatózu a při kombinaci s chemoterapií i steatohepatitidu, která opět narušuje regenerační potenciál jater. Význam inzulínu a IGF byl již zmíněn výše. U pacientů s diabetem je tedy nutné předpokládat, že mohou mít sníženou regenerační

schopnost jater. I k tomuto faktu můžeme přihlídnout v případě zvažování indikace k PVE, a to především v situacích, kdy jsou výše zmíněná indikační kritéria hraniční.

Nárůst FLRV je sledován pravidelnými CT kontrolami v intervalu 2-4 týdnů od provedení PVE. V případě, že v tomto období nedojde k nárůstu požadovaného FLRV, opakuje se další CT s odstupem 1 měsíce od posledního CT [6]. Obvyklá doba nárůstu FLRV, tzn. doba mezi PVE a resekcí výkonem, je 14 - 42 dní (2 – 6 týdnů), v průměru 25 dní (3,5 týdne) [111]. Rychlost nárůstu FLRV je závislá na jeho výchozím objemu. Bylo prokázáno, že játra s menším vstupním FLRV mají rozsáhlejší následnou hypertrofii [6, 112, 113].

Průběh nárůstu FLRV může být, mimo výše zmíněnou chemoterapii a diabetes mellitus, negativně ovlivněn i dalšími faktory. Patří mezi ně biliární obstrukce, abusus alkoholu, stav výživy, mužské pohlaví, věk a infekce [114]. Zvýšené sérové hladiny bilirubiny v den prováděné PVE zhoršují růst neembolizovaného jaterního laloku [115] a negativní vliv na regeneraci jater byl popsán i ve zvířecím modelu na krysách s cholestatickým postižením jater [116].

#### Kontraindikace PVE

Kontraindikace PVE jsou relativní a lze je rozdělit na kontraindikace ve vztahu k základnímu onemocnění a na obecné kontraindikace invazivních výkonů.

Ve vztahu k základnímu onemocnění je PVE kontraindikována u neodstranitelných extrahepatálních metastáz, protože nejsme schopni dosáhnout chirurgické radikality. V případě mimojaterního postižení (typicky u plicních metastáz), kdy lze předpokládat, že bude možné provést resekcí výkon v druhé době, je indikace k PVE na zvážení v rámci individuálního přístupu k pacientovi a po diskuzi v multioborovém týmu chirurga, onkologa, radiologa a gastroenterologa.

Biliární postižení již není kontraindikací výkonu. Je však nezbytné v první době provést chirurgický výkon, kterým sanujeme CLM v neembolizovaném jaterním laloku. Druhým krokem pak je provedení PVE a následně i jaterní resekcce po dosažení adekvátního FLRV.

Do skupiny kontraindikací ve vztahu k tumoru lze ještě uvést infiltraci portální žíly tumorem a útlak žlučových cest tumorem vedoucí k obstrukčnímu ikteru. Biliární



obstrukce je jeden z faktorů, který limituje jaterní regeneraci. PVE lze u těchto pacientů zvažovat v momentě, kdy provedeme zevní nebo vnitřní drenáž žlučových cest a vymizí ikterus s hyperbilirubinémií. Kontraindikací PVE jsou také koagulopatie, abscesy jater, portální hypertenze a renální selhání vyžadující hemodialýzu [20 s. 175].

#### Rizika spojená s embolizací větve portální žíly

Mezi rizika PVE, která ovlivňují vyhlídky pacienta na kurativní resekci po PVE je nedostačující nárůst FLRV a progresse základního onemocnění.

Posuzování selhání PVE lze sledovat dvěma pohledy. Jedním je hodnocení samotného růstu a finální hodnota FLRV. Druhým pohledem je dovedení pacienta po PVE ke zdárné radikální operaci. Údaje o selhání růstu FLRV se různí podle autorů. V případě CLM je úspěšnost PVE a provedení resekčního výkonu možná u 60 % - 75 % pacientů. Tzn. 25-40 % pacientů se nedaří po PVE radikálně odoperovat [10, 11, 117]. Příčinou, proč nedovedeme pacienty s CLM k úspěšné resekci, je nepoměr mezi rychlostí nárůstu FLRV a progresí samotných CLM po provedené PVE. Druhým problémem neúspěchu PVE je samotná rychlá progresse CLM po PVE. Řada prací potvrdila progresi CLM po PVE, a to jak v embolizovaném, tak i neembolizovaném laloku [118, 119, 120, 121]. Pamecha ve své studii uvádí progresi CLM u pacientů s PVE oproti kontrolní skupině s provedenou jaterní resekci. Progrese byla patrná jak v objemu CLM, tak i v rychlosti růstu. Autorka pozorovala i vyšší mitotický index a signifikantní zvýšení Ki67 v CLM u pacientů po PVE [118]. Obdobných výsledků dosáhla i Hoekstra, která udává rychlejší růst CLM, ale popisuje i vznik nových CLM až u 25 % pacientů, kteří podstoupili PVE. Uzavírá, že tříleté OS pacientů bylo lepší u pacientů, kteří nemuseli podstoupit PVE [119]. Simoneau ve své práci pozorovala, že progresse CLM po PVE byla patrná u 66 % pacientů a 17 % pacientů vytvořilo nové CLM. Zároveň uzavírá, že progresse CLM po PVE nemusí nutně ovlivňovat OS pacientů, ačkoliv u pacientů s progresí CLM po PVE častěji pozorovali časnou rekurenci [121]. Vzhledem k evidentní progresi CLM po PVE je nezbytné před provedením PVE provést sanaci neembolizovaného jaterního laloku a zbavit ho tak všech makroskopicky a na zobrazovacích metodách patrných CLM.

Mechanismy, jakými je ovlivněna progresse CLM, se v dnešní době udávají tři: vliv cytokinů a růstových faktorů, hepatic arterial buffer response a lokální odpověď vyvolaná

embolizací jaterního laloku [122]. Růstové faktory a cytokiny, které ovlivňují regeneraci hepatocytů, se vyskytují ve zvýšených hladinách i v embolizovaných jaterních lalocích. Ve studiích bylo prokázáno, že tyto faktory stimulují růst kultur tvořených buňkami CRC [123, 124]. Kromě lokálního zvýšení těchto faktorů může růst CLM stimulovat i samotné zvýšení těchto faktorů v krvi, které jsou do krve uvolněny z neembolizovaného laloku [122].

Po provedení PVE můžeme v embolizovaném jaterním laloku pozorovat zvýšení průtoku arteriální krve skrz embolizovaný jaterní lalok. Vzhledem k tomu, že arteriální systém není PVE zasažen, snaží se zvýšením svého průtoku kompenzovat snížený průtok krve portálním systémem. Tento děj se nazývá nárazníkový efekt jaterní tepny (Hepatic Arterial Buffer Response, HABR) [114]. Díky tomuto efektu jsou jaterní sinusoidy po PVE promývány pouze arteriální krví. V případě vytvořené vaskularizace tumorů jsou tumory živěny právě touto arteriální krví, která tak může podpořit růst CLM.

Posledním mechanismem, který se na stimulaci růstu CLM může podílet, je lokální odpověď na provedenou PVE. Reakcí na provedenou PVE je zvýšení genové exprese pro heat shock proteiny, oxygenázy nebo inhibitor aktivátoru plasminogenu. Tyto faktory podporují angiogenesi v CLM a tím i jejich růst [122].

Možnosti, jak zmírnit progresi CLM, jsou v podobě TACE nebo podáním systémové chemoterapie. V případě TACE je využit efekt chemoterapie vázané na částice, které se umístí do tepen vyživujících tumor. Díky chemoterapii, lokální ischemii a zánětu je indukována nekróza daného ložiska. V případě, že kombinujeme PVE s TACE, lze dosáhnout velmi dobrého efektu především u pacientů s HCC. Možný je i postup prvotního provedení TACE a následně s odstupem provedení PVE [101]. U CLM je TACE v kombinaci s PVE využíváno velmi zřídka, a to především proto, že CLM jsou často uloženy na více místech v daném jaterním laloku. Rizikem kombinace TACE a PVE je kompletní nekróza jaterního laloku s rozvojem septickým komplikací a jaterního selhávání.

Stále diskutovaným tématem je vztah chemoterapie, regenerace jater a indikace podání onkologické léčby před samotnou resekci jater. Druhou otázkou je, jak podaná chemoterapie ovlivní regeneraci jater po PVE. V chemoterapeutických cyklech, které jsou standardně využívány k léčbě CRC a CLM, je zastoupen 5-FU, leucovorin, oxaliplatin a irinotecan. Tyto látky mohou vyvolat toxická poškození jater. V případě oxaliplatinu dochází

k postižení na úrovni sinusoid, kdy jsou sinusoidy dilatované, tvoří se zde drobné tromby a vyvolávají tak tzv. sinusoidální obstrukční syndrom (SOS). Makroskopicky se játra zdají namodralá. Tento stav se nazývá blue liver syndrom [109]. SOS způsobuje zvýšení intraportálního tlaku, a tím negativně ovlivňuje růst hypertrofie po PVE [88].

Podání chemoterapie v režimech FOLFOX nebo FOLFIRI vyvolává rozvoj středně až těžce závažné steatózy až u 18,3 % pacientů [125]. Pokud se do terénu steatózy začlení i zvýšení oxidačního stresu, kterým chemoterapie je, dochází k aktivaci zánětlivé odpovědi v okolí hepatocytů a CASH [125]. V důsledku akumulace vakuol tuku se játra makroskopicky zdají nažloutlá. Tento stav se označuje jako syndrom žlutých jater a přináší riziko progresse do fibrózy a cirhózy, která vyústí v jaterní selhání [109]. V dříve publikovaných studiích bylo prokázáno, že prolongovaná chemoterapie podaná ještě před provedením PVE, vede ke zhoršení regeneračních schopností jater po provedené PVE [126]. Na druhé straně Fong udává, že PVE je možností, jak pomoci zlepšit regeneraci hepatocytů [127]. V případě předpokládaného chemoterapeutického postižení je však nezbytné s tímto faktem počítat a přizpůsobit tomu i objem FLRV.

V rámci využití onkologické léčby u pacientů s CLM bylo zkoumáno i využití chemoterapie v mezidobí mezi provedenou PVE a resekcí výkonem. Běžným postupem bylo přerušování onkologické léčby 1 měsíc před provedením PVE. Goéré ve své studii neprokázala vliv chemoterapie podané po PVE na růst FLRV. Udává, že počty provedených resekcí a množství pooperačních komplikací byly shodné mezi skupinami s podanou chemoterapií po PVE (před resekcí) a bez podané chemoterapie [128]. Obdobných výsledků dosáhl i Fischer, který udává i snížení progresse CLM po PVE s podanou onkologickou léčbou. Onkologická léčba podaná v mezidobí mezi PVE a jaterní resekcí může být slibnou modalitou, která brání progresi CLM vyvolanou právě PVE [129]. Na druhou stranu Beal uvádí, že pacienti s podanou chemoterapií po PVE měli pomalejší nárůst FLRV a doporučuje tak opatrnou indikaci užití onkologické léčby po PVE, a to především u pacientů s FLRV menším než 20 % [130]. U pacientů s předpokládaným chemoterapeutickým postižením jater bychom se měli podání této léčby vyvarovat.

### Komplikace po embolizaci portální žíly

Komplikace vyskytující se po PVE při perkutánní transhepatálním přístupu jsou subkapsulární hematomy jater, hemobilie, infekce, arteriovenózní píštěle a arteriální pseudoaneuryzmata. Rizikem samotné embolizace je i únik embolizačního materiálu a trombóza portální žíly pro FLRV. V případě otevřeného přístupu přes ileokolické řečiště se ke spektru komplikací přidává i riziko střevní neprůchodnosti [20 s. 179-181]. Nicméně úspěšnost provedení PVE je až 98 % [131]. Procento komplikací po provedené PVE se pohybuje kolem 3,9 % [132]. Mortalita po resekcčním výkonu u pacientů s PVE se pohybuje kolem 6-7 %, což je porovnatelná hodnota s resekcními výkony bez provedené PVE [133, 134], a procento komplikací po resekcčních výkonech u pacientů s PVE se pohybuje mezi 25 - 39 % [132, 134]. Lindner udává i nulovou úmrtnost po rozšířených resekcích jater u pacientů s provedenou PVE a zkrácení doby hospitalizace po resekcčním výkonu oproti pacientům s rozšířenou pravostrannou hepatektomií bez provedené PVE [135].

### Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy

Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy (ALPPS) je nejmladší metodou, která je využívána v rámci etapových resekcí při nutnosti augmentace FLRV. Výkon se opět týká pacientů, u kterých je nezbytné provedení pravostranné nebo rozšířené pravostranné hepatektomie s nízkým vstupním FLRV. ALPPS lze použít jak u primárních, tak i u sekundárních jaterních lézí. Provedení ALPPS je rozděleno do dvou etap. Při první etapě je provedena chirurgická explorace břišní dutiny a jater. Po exploraci následuje provedení PVL a kompletní přerušení jaterního parenchymu při pravé hraně falciformního ligamenta. Žlučové cesty, arteriální zásobení a jaterní žíly jsou ponechány. Následně je výkon ukončen a pacient je kontrolován pravidelnými CT volumetriemi, kde je sledován nárůst FLRV. Po dosažení adekvátního FLRV pacient podstupuje druhý výkon, kdy je dokončena resekce jaterního parenchymu s přerušením jaterní tepny a žlučových cest a jaterní parenchym s CLM je zresekován a odstraněn [9]. Podle dostupných studií dochází při použití ALPPS k rapidnímu nárůstu FLRV [9, 136]. Schnitzbauer udává dostatečný nárůst FLRV po 9 dnech. Takto rychlý nárůst mohou způsobit 2 faktory. Prvním je přerušení mezilalokových porto – portálních kolaterál. Druhým je transekce jaterního parenchymu, do které je zahrnut i SIV jater. Tyto 2 aspekty uvádí Schnitzbauer jako

klíčové k promptní akceleraci FLRV [9]. Adekvátní nárůst lze dosáhnout mezi 5. - 28. dnem. V porovnání s PVE dosahuje ALPPS lepších výsledků, a to jak ve výsledném nárůstu FLRV, tak i v jeho rychlosti, která je u ALPPS až 11x větší [137]. Problematickou částí ALPPS však je výrazně vyšší procento perioperační mortality, které dosahuje až 12 %, a pooperačních komplikací, které sahají až k 68 % [9]. Eshmuminov ve své metaanalýze uvádí procento komplikací po ALPPS dosahující až 70 % a uzavírá, že ALPPS je metoda s lepším růstem FLRV, ale za cenu vysoké morbidity a mortality [134].

## 4.3 Kmenové buňky

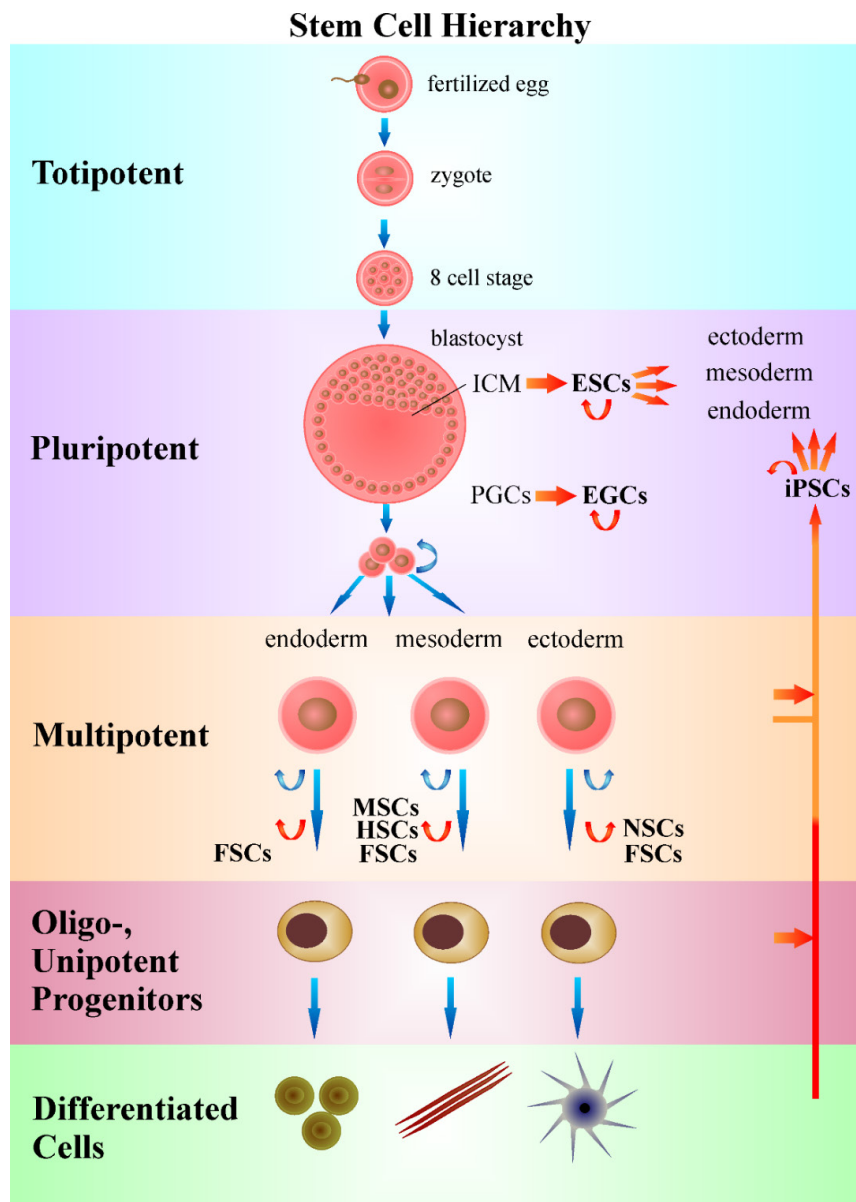
### 4.3.1 Definice

Kmenové buňky (SCs) jsou základní primární nediferencované buňky, které se mohou diferencovat do jiných buněčných typů. Základními prvky, díky kterým můžeme kmenové buňky nazvat kmenovými, jsou schopnost sebeobnovy a multipotence. Sebeobnova je důležitou vlastností SCs, díky které mohou SCs udržovat počty své populace. Během mitózy SCs podstupují asymetrické dělení za vzniku jedné dceřiné kmenové buňky a jedné dceřiné buňky. Dceřiná kmenová buňka zůstává v kompartmentu SCs a dceřiná buňka tento kompartment opouští a dává vzniknout progenitorovým buňkám, které se dále diferencují a proliferují do konkrétní buněčné linie a tkáně. SCs jsou schopné i symetrického dělení, kdy vznikají dvě identické dceřiné SCs. Toto dělení je využíváno v případě, kdy je potřeba doplnit redukováný kompartment SCs. Multipotence je schopnost SCs proliferovat a diferencovat se do zralých tkáňově specifických buněk [138 s. 17].

### 4.3.2 Hierarchie, základní dělení a vlastnosti kmenových buněk

SCs mají jasně dané hierarchické uspořádání. Toto uspořádání je určeno pomocí SCs, nebo-li do kolika buněčných linií jsou dané SCs schopné se diferencovat. Čím větší počet linií jsou dané SCs schopné doplňovat, tím výše se v hierarchickém žebříku nacházejí. Na základě potence lze buňky rozdělit na totipotentní, pluripotentní, multipotentní, unipotentní a tkáňově specifické. Ratajczak ve své publikaci popisuje schopnost potence na základě začlenění a diferenciaci buněk už od samotného embryonálního vývoje (obr. 12) [139]. Totipotentní buňky jsou schopné se diferencovat a měnit v jakékoliv buněčné typy. Totipotentní buňky jsou nejvíce primitivní buňky, nacházející se v prvních buňkách blastomery a v morule. Tvoří tak základní pool SCs pro vývoj embrya i placenty. Pluripotentní buňky jsou dceřinými buňkami totipotentních buněk. Do této skupiny buněk patří embryonální kmenové buňky (ESCs). ESCs se nacházejí ve vnitřní buněčné vrstvě blastocyst a dávají tak vzniknout embryu. Oproti totipotentním buňkám ztrácejí schopnost vytvářet placentu (trofoblast), a proto se v hierarchii SCs nacházejí o stupeň níže oproti totipotentním buňkám. Z pluripotentních buněk se dále diferencují buňky epiblastu, které jsou základem pro 3 zárodečné linie, a to mesoderm, ektoderm a

endoderm. V rámci diferenciacie v zárodečných liniách se postupně vytrácí pluripotence a vznikají multipotentní SCs, které jsou již specifické tím, že dávají vzniknout konkrétním řadám buněk. Do mesodermální linie jsou začleněny i hematopoetické kmenové buňky (HSCs), ze kterých vznikají buňky krevní řady nebo mesenchymální kmenové buňky (MSCs). V těchto konkrétních liniích vznikají z multipotentních SCs buňky uni- nebo monopotentní, které jsou již charakteristické pro konkrétní orgán. Sem řadíme např. OCs v Heringových kanálcích nebo intestinální SCs v kryptách tenkého střeva. Tyto buňky lze také nazývat jako progenitorové buňky. Progenitorové buňky nejsou schopné sebeobnovy, ale zároveň jsou nezralé, a proto i schopné diferenciacie ve zralou buňku příslušného orgánu [139].



Obr. 12: hierarchie SCs. [140]

V naší studii jsme pracovali s adultní SCs. Adultní SCs jsou nediferencované buňky přítomné v už vyvinutých tkáních. Obvykle se jedná o multipotentní buňky. Jako příklad vyvinuté tkáně můžeme uvést kostní dřev a jako adultní SCs např. HSCs nebo MSCs [141]. Tyto SCs jsou také nejčastěji zmiňovány a využívány v rámci regenerace jater.

Prostředí, ve kterém se SCs nacházejí a vyvíjejí, se označuje jako nische. Zde jsou přítomné veškeré podpůrné buňky, které jsou nezbytné pro vytváření mikroprostředí zabezpečující správnou funkci SCs. Nejčastěji se jedná o fibroblasty. Mezibuněčné prostředí se nazývá stroma. Na základě mezibuněčné komunikace a komunikace buněk a okolní matrix jsou produkovány faktory, které ovlivňují vývoj a chování SCs [142]. V případě potřeby jsou z nische uvolňovány dceřiné SCs, které v podobě progenitorů proliferují a vyžívají do zralých specifických tkáňových buněk. Z kostní dřevě však mohou být uvolněny i samotné SCs, které pak jako cirkulující SCs cestují do hostitelské tkáně. V hostitelské tkáni se podílejí na vytvoření tkáně, která za normálních okolností není ve standardním poolu buněk, které obnovuje. V dané tkáni vytváří progenitorovou buňku. To se děje buď fúzí se zralou tkáňově specifickou buňkou, nebo transdiferenciací. Při fúzi SCs poskytují svoji jadernou výbavu zralé buňce za vzniku progenitorové buňky. Při transdiferenciaci se cirkulující SCs vlivem stimulace z okolního prostředí postupně diferencují do progenitorových buněk daného orgánu. Z těchto progenitorových buněk se proliferací vytvářejí zralé buňky dané tkáně. Schopnost buněk vytvořit zralé buňky původně jiné buněčné linie se označuje jako plasticita. Největší potenciál v tomto směru nabízejí HSCs a MSCs [138 s. 18-21].

### **4.3.3 Etické aspekty využití kmenových buněk v humánní medicíně**

Použití SCs v humánní medicíně vzbuzuje řadu kontroverzí a nevyjasněných otázek. Míra kontroverze je dána především způsobem, jak jsou SCs pro vědecký účel získány. Právě proto je nejvíce kontroverzní využití ESCs. ESCs se získávají z blastocyst na samotném začátku vývoje embrya (4. – 5. den vývoje), které je tak zničeno. Zacházení a manipulaci s embryi shrnují 3 přístupy, které se zde střetávají. První postoj říká, že lidské embryo není osobou, a nepřiznává tak embryím základní lidská práva, tudíž je možné je využívat pro vědecké účely. Druhý postoj je zcela opačný. Ten považuje embryo jako jednu z etap lidského života a uznává embryo jako lidskou osobu se všemi právy, která jí náleží, a proto se nesmí do embrya nijak zasahovat. Třetí přístup považuje sice embrya za



lidské osoby, ale zároveň připouští, že výhody, které poskytuje výzkum ESCs, je natolik podstatný, že vyžaduje určité oběti. Druhým typem SCs, které jsou méně kontroverzní, jsou SCs získané ze zárodečných buněk plodu. Tyto buňky je možné získat při potratech. Kontroverzi zde přináší zisk těchto buněk z potratů na přání pacientky. Při spontánních potratech tato kontroverze odpadá. Nejmenší kontroverzi z pohledu zisku přinášejí adultní SCs, které se získávají ze tkání dospělých jedinců po jejich předchozím souhlasu. Určité řešení jak se vyhnout kontroverznímu zisku SCs, a to především ESCs, mohou přinést tzv. indukované pluripotentní SCs, kdy přidáním příslušných genů do diferencované buňky je možný zisk buňky s pluripotentními vlastnostmi [143]. Je otázkou do budoucna, jestli obdobným krokem bude možné získat i ESCs, aniž bychom poškozovali embryo [144]. Dalším možným zdrojem zisku embryí pro vědecké účely jsou nadbytečná embryo, která jsou skladována ve tkáňových bankách fertilizačních center a rodiče už o ně nemají zájem. Česká legislativa podle zákona č. 227/2006 sb. umožňuje výzkum na ESCs získaných právě z nadbytečných embryí po předchozím povolení Ministerstvem zdravotnictví. Zákon nepovoluje reprodukční klonování embryí.

V případě adultních SCs, které byly použity i v naší studii, odpadají etické aspekty ze zisku příslušných SCs. Pacient je autonomní osobou, která je schopná se sama nezávisle rozhodnout. Před samotným odběrem a použitím adultních SCs je samozřejmě nezbytné pečlivé vysvětlení celé léčebné procedury, vysvětlení našich očekávaných cílů a samozřejmě i příslušných rizik. V případě, že pacient souhlasí s provedením, je nezbytný jeho podpis informovaného souhlasu. Samozřejmostí je ponechání dostatečné doby na rozmyšlenou a případné prodiskutování celého procesu s jeho blízkými.

Kontroverzním bodem využití SCs v humánní medicíně a léčbě je i riziko rozvoje nádorového onemocnění. V současné době stále není jasné, jestli se SCs samotné mohou zvrhnout v maligní nádorové onemocnění anebo jestli toto onemocnění mohou stimulovat ještě ve fázi, kdy je toto onemocnění skryté, nebo toto onemocnění podpořit u pacientů s již známým onkologickým onemocněním.

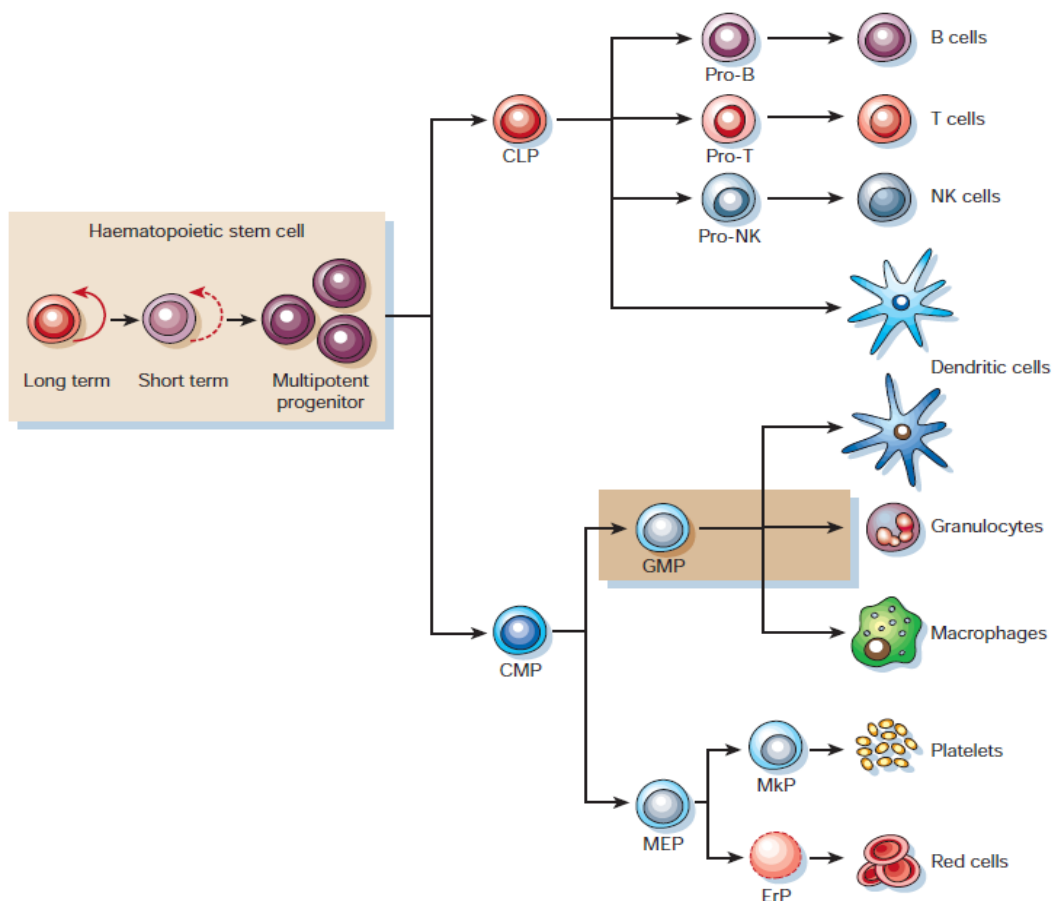
V současné době je pro pacienta s CLM jedinou šancí k vyléčení kombinace chirurgické a onkologické léčby. V naší studii byli k využití SCs indikováni pacienti, kteří by s pomocí běžných léčebných postupů neměli šanci dosáhnout radikálního chirurgického výkonu. SCs nesloužily jako léčebný prvek, ale posloužily jako prostředek, díky kterému

jsme schopni pacientovi chirurgickou léčbu přiblížit, a tak mu nabídnout možnost delšího přežití. Všichni pacienti byli informováni o možných rizicích, která tato metoda přináší. Jedním z rizik je i možná progresse nádorového onemocnění.

V současné době je využití kmenových buněk v humánní medicíně pouze otázkou klinických studií. Jediný obor, kde lze již mluvit o léčebném prostředku, je hematonekologie, kde se kostní dřeň a kmenové buňky využívají k obnově krevních elementů. V rámci klinických studií je v současné době největší potenciál využití SCs u pacientů s kritickou končetinovou ischemií, kde SCs napomáhají odvrátit amputační výkony [145]. Je však nutné mít na paměti, že prozatím je léčba pomocí SCs ve fázi klinického výzkumu a je tedy nutné pacienty na tyto aspekty upozornit a prodiskutovat s nimi veškeré používané postupy a jejich rizika.

#### **4.3.4 Využití hematopoetických kmenových buněk v regeneraci jater**

SCs, které se mohou podílet na regeneraci jater, lze rozdělit na SCs intrahepatální a extrahepatální. V případě intrahepatálních SCs se jedná o OCs, které byly zmíněny výše. Z extrahepatálních SCs jsou v regeneraci jater nejčastěji zmiňovány adultní SCs z kostní dřeně, a to především HSCs a MSCs. Tyto buňky díky své plasticitě mohou přispět k regeneraci jater. To se podařilo prokázat v experimentálních modelech, kdy u krys s transplantovanými buňkami kostní dřeně bylo možné pozorovat hepatocyty odvozené z těchto buněk. U pacientů s transplantovanou kostní dření, kde dárce byl opačného pohlaví, bylo možné pozorovat jaterní epitelové buňky odvozené od dárcovské kostní dřeně [94]. V rámci regenerace jater je studován efekt mnoha typů SCs. V naší studii jsme se zaměřili na využití HSCs. HSCs jsou v rámci regenerace jater nejvíce studované kmenové buňky. Již od 60. let 20. století je znám jejich efekt na obnovení hematopoetického systému (obr. 13). HSC můžeme podle délky a doby jejich sebeobnovy rozdělit na 3 skupiny. Na HSCs obnovující se pomalu a dlouhou dobu, HSCs obnovující se rychle v krátkém časovém úseku a na multipotentní progenitorové HSCs bez schopnosti sebeobnovy, ale s vysokou mitotickou aktivitou. Zatímco HSCs s dlouhou dobou sebeobnovy tvoří základ pro zralé hematopoetické buňky, HSCs s krátkou dobou sebeobnovy a multipotentní progenitory jsou aktivovány v případě inzultů a u myši jsou schopné obnovit buňky hematopoetické řady během 8 týdnů od ozáření [146].



Obr. 13: HSCs a jejich efekt na hematopoézu CLP – buňky lymfoidní řady (prekurzory T a B lymfocytů a NKs), CMP – buňky myeloidní řady, GMP – prekurzory monocytů a makrofágů, MEP prekurzory megakaryocytů a erytrocytů [146]

Lidské HSCs na svém povrchu exprimují znaky  $CD133^+$  a  $CD34^+$ , na jejichž podkladě je možná i jejich detekce. Výhodou těchto buněk je, že je lze získat v hojném počtu a relativně jednoduchou cestou. HSCs získáváme buď z přímo odebrané kostní dřeně, z periferní krve po předchozí stimulaci příslušnými cytokiny a růstovými faktory, nebo z pupečnickové krve. HSCs z kostní dřeně získáváme aspirací kostí dřeně z lopaty kosti kyčelní. Výkon je prováděn v celkové anestezii a za sterilních kautel. Maximální množství kostní dřeně, které je možné aspirovat, je 20ml/kg. V klinických studiích regenerace jater postačují odběry mezi 200-300ml. Získaná dřeň je následně zpracována v centrifuze nebo ve speciálním centrifugačním zařízení. Podstatou je na základě hmotnostních gradientů separovat jednotlivé buněčné složky přítomné v kostní dřeni. Tím se oddělí monocelulární buňky, mezi kterými je vysoké zastoupení  $CD133^+$  a  $CD34^+$  buněk. V případě zisku HSCs z periferní krve je nezbytné nejprve stimulovat vyplavení HSCs z kostní dřeně. Pacientovi

je po dobu 4 dní aplikován faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) v dávce 5-15 µg/kg/den. Po 4 dnech stimulace pacient podstupuje leukaferézu, kde je opět získána frakce monocelulárních buněk s vysokým obsahem CD133<sup>+</sup> a CD34<sup>+</sup> buněk.

Nejjednodušeji se získávají HSCs z pupečnickové krve, ale je nutné počítat s relativně malým ziskem HSCs. Přes kanylovanou žílu v pupečníku je obvykle nasbíráno 80-160ml pupečnickové krve [147]. Díky snadnému a málo invazivnímu způsobu získání a relativně jednoduché izolaci jsou HSCs ideální pro studium buněčné terapie [96, 148].

Játra a hematopoetické buňky mají k sobě úzký vztah, a to především v prenatálním období, kdy se játra na hematopoéze přímo podílejí. V postnatálním období, kdy se již játra za fyziologických podmínek na hematopoéze nepodílejí, však některé buňky s hematopoetickými schopnostmi v játrech přetrvávají a aktivují se v případě některých hematologických onemocnění. Jedná se především o CD34<sup>+</sup> buňky, které se podílejí i na regeneraci jater [138 s. 25]. Vysoký regenerační potenciál HSCs byl prokázán v experimentálních modelech, kde HSCs indukovaly kompletní repopulaci jater s defektní fumaryl acetoacetát hydrolázou včetně úpravy fenotypu onemocnění. Z experimentálních studií také vyplynulo, že největší regenerační potenciál mají HSCs získané z pupečnickové krve, následované HSCs získanými z kostní dřeně. HSCs získané z periferní krve měly nejmenší regenerační potenciál [148].

HSCs byly již využity i v klinických studiích. Nevýhodou těchto studií je, že byly provedeny na malých skupinách pacientů, často bez porovnání s kontrolní skupinou a bez detailního prozkoumání mechanismu účinku. Khan ve své studii zkoumá efekt CD34<sup>+</sup> buněk získaných z kostní dřeně u pacientů s chronickým jaterním selháním a vyjádřenou cirhózou. Získané CD34<sup>+</sup> buňky byly podány cestou a. hepatica. Pacienti byli sledováni po dobu 6 měsíců od aplikace. Aplikace nevyvolala žádné vedlejší účinky a po dobu sledování nevedla k narušení funkce žádného z orgánů. U většiny pacientů pozoroval zvýšení sérových hladin albuminu, snížení sérových hladin bilirubinu a transamináz [149]. Gaia ve své práci popisuje pozitivní efekt mobilizovaných CD34<sup>+</sup> buněk u pacientů s cirhózou. Po dobu 8 měsíců přežívali všichni pacienti. U žádného z pacientů se za tuto dobu neobjevil HCC a autorka pozorovala zlepšení v Child Pugh skóre u většiny pacientů [150]. Studie, které se zabývaly vyplavením CD133<sup>+</sup> a CD34<sup>+</sup> buněk po resekcích jater, potvrdily mobilizaci

těchto buněk do periferní krve [151, 152]. Hladiny CD133<sup>+</sup> buněk korelovaly s rozsahem jaterní resekce [152].

V současné době již proběhlo několik studií, které zkoumaly efekt CD133<sup>+</sup> nebo CD34<sup>+</sup> buněk na růst FLRV po PVE. Všechny studie byly provedeny na heterogenním souboru pacientů s jaterní malignitou (převážně primární tumory jater, menší počty pacientů se sekundárními tumory jater různé etiologie) a vstupní FLRV byl menší než 30 %. Dvě studie využily CD133<sup>+</sup> buňky získané z kostní dřeně a aplikované intraportálně do neokludovaného portálního řečiště. Obě studie prokázaly pozitivní efekt na nárůst FLRV, který byl signifikantně vyšší oproti samotné PVE. Průměrný nárůst FLRV byl 9,5 – 9,9 ml/den. Počet komplikací po resekčních výkonech byl bez signifikantních rozdílů [12, 13] Další dvě studie využily mobilizace CD34<sup>+</sup> buněk pomocí G-CSF. Mobilizované CD34<sup>+</sup> byly po PVE opět intraportálně aplikovány. Han tuto metodu využil u pacientů s HCC a FLRV menším než 25 %. Porovnával pacienty s PVE a aplikací CD34<sup>+</sup> buněk, pacienty s PVE a aplikací monocelulárních buněk a pacienty s PVE a aplikací fyziologického roztoku u kontrolní skupiny. Nejlepší efekt v nárůstu FLRV pozoroval u skupiny s aplikovanými CD34<sup>+</sup> buňkami. Zde byl průměrný nárůst 4,9ml jaterní tkáně /den oproti 2,5ml/den u skupiny s podanými monocelulárními buňkami a 1,1 ml/den u kontrolní skupiny. Také pozoroval vzestup sérových hladin albuminu a pokles jaterních testů a INR. Kromě poklesu bilirubinu byly rozdíly mezi skupinami nesignifikantní [153]. Canepa uvádí zlepšení v nárůstu objemů po PVE [154]. Jak je patrné z dostupných studií, podání HSCs se jeví jako slibný způsob stimulace jaterního růst a regenerace. U studií, kde jsou HSCs využity po provedení PVE, jde obvykle o pacienty s různými maligními diagnózami nebo o soubory pacientů s HCC. Proto se na našem pracovišti zabýváme využitím těchto metod u pacientů s CLM [117, 155].

Během studia efektu SCs na regeneraci jater byly popsány tři způsoby, kterými mohou SCs regeneraci jater ovlivnit. Jedná se o fúzi, transdiferenciaci a efekt parakrinní stimulace hepatocytů pomocí SCs. Fúze a transdiferenciace jsou prvky využívající plasticity buněk.

Při fúzi dochází ke splynutí SC s poškozenou jaterní buňkou za vzniku mnohojaderného regenerujícího hepatocytu. Na myších modelech s tyrosinemií bylo zjištěno, že podané HSCs fúzovaly s poškozenými hepatocyty a vytvářely s nimi

regenerační uzle. Další studie se spíše přiklánějí k tomu, že transplantované SCs se v játrech za specifických podmínek transdiferencují do hepatocytů, a tím nahradí toxicky postižené hepatocyty. Proces transdiferenciace může probíhat i přes OCs, které mohou být doplněny z poolu SCs získaných z kostní dřeně. Je možné, že procesy fúze a transdiferenciace mohou probíhat současně. Na druhé straně Dahlke na podkladě dostupných studií ve svém shrnutí zmiňuje, že proces transdiferenciace je raritní a pro tělo nefyziologický. Nicméně toto téma je stále široce diskutováno [138 s. 29, 156]. Poslední teorií je efekt parakrinní stimulace hepatocytů pomocí SCs. SCs zde svojí přítomností a uvolňováním růstových faktorů a cytokinů vytváří mikroprostředí, ve kterém je stimulována regenerace, inhibována apoptóza a podporována angiogeneze [157]. Ve studii provedené na našem pracovišti bylo na prasečím modelu možné pozorovat akceleraci růstu FLRV po PVL a intraportální aplikaci autologních MSCs značených pomocí 5 – bromo – 2 - deoxyuridinu. I přes patrné urychlení růstu v prvním týdnu po provedeném výkonu, bylo v odebraných tkáňových vzorcích možné detekovat jen minimální množství značených MSC [158]. Tento fakt spíše ukazuje na tzv. „bystander“ efekt SCs. Otázkou zůstává, zdali SCs a jejich aplikace do portální žíly mohou svojí přítomností vyvolat stimulaci nádoru [159].

#### **4.3.5 Podpora růstu malignity kmenovými buňkami**

Prozatím nejasnou a velmi diskutovanou otázkou terapie pomocí SCs je riziko vytvoření nebo stimulace růstu maligního onemocnění. Při terapii SCs je nutné si uvědomit, že se nejedná o jednorázový efekt podání, jako je tomu u běžných léků, ale jde o dlouhodobý stav, kdy je pravděpodobné, že SCs v organismu přetrvávají po delší dobu. Jaký však je dlouhodobý účinek SCs, není prozatím jasné. Efekt adultních SCs při tvorbě tumoru můžeme rozdělit na nepřímý a přímý. Nepřímý efekt je tumor modulační, přímý je maligní transformace SCs.

Tumor modulační efekt SCs na nádor se může realizovat několika způsoby. První je parakrinní stimulace, která ve své podstatě odpovídá teorii tzv. bystander efektu, který je popsán výše. Přítomnost chemokinů, cytokinů a růstových faktorů může stimulovat kromě hepatocytů, u kterých je v našem případě tento efekt žádán, i nádorové buňky. Další faktory, které se mohou podílet na podpoře progresu maligního onemocnění, jsou inhibice apoptózy v nádorových buňkách nebo imunosupresní efekt SCs. Tento efekt byl

popsán především u MSCs. Zatímco imunosupresní efekt může být žádaný u pacientů s autoimunitním onemocněním, může v dlouhodobém horizontu případná imunosuprese vést i k potlačení protinádorové odpovědi. Všechna výše uvedená fakta pak mohou přispět k progresi a metastazování nádorového onemocnění [160]. Jak rozdílné chování mohou vykazovat adultní SCs (v tomto případě MSCs) v in vitro a in vivo studiích, ukázala experimentální studie Ramasamy. V in vitro studiích jsou MSCs schopné blokovat růst nádorových buněk zablokováním buněčného cyklu v G1 fázi. Na druhou stranu, pokud byly použity v in vivo studiích, byl růst nádorových buněk naopak urychlen. MSCs jsou známé tím, že v kostní dřeni se podílejí na tvorbě mezibuněčného stromatu. Je možné, že stejným způsobem podpořily růst nádorových buněk tím, že vytvořily stroma, které potencovalo růst těchto buněk, a to především podporou angiogeneze [161].

Adultní SCs mohou přispět k progresi maligního onemocnění i pomocí jejich transformace do maligních buněk. Při buněčné terapii, kde jsou využívány právě adultní SCs, jsou tři možné způsoby, kdy se tyto SCs mohou transformovat. První je během in vitro expanze, která nabízí zajímavou možnost navýšení počtu SCs, které jsou následně využity v buněčné terapii. V případě, že jsou adultní SCs vystaveny dlouhodobému in vitro dělení, může docházet v jejich jádrech k chromosomálním nestabilitám následovaných maligním zvratem. Druhou možností je transformace SCs v nádorové buňky při jejich vycestování do nádoru. Zde pak v důsledku lokální interakce se stromatem tumoru může dojít k diferenciaci SCs do nádorové buňky. Třetí možností je genetická manipulace s SCs, která může tyto buňky změnit na nádorové [160].

#### **4.3.6 Teorie nádorové kmenové buňky**

Klasický koncept tumorigeneze předpokládá postupnou přeměnu zdravých buněk do buněk nádorových v několikastupňovém procesu. V této přeměně dochází postupně k nahromadění mutací, které nejprve mění genotyp buňky. Následně dochází k epigenetickým změnám, které jsou následovány změnami fenotypu buňky. Vznikají tak heterogenní nádorové buňky, které ztrácí autoregulační schopnosti a zvyšuje se jejich proliferační kapacita. Všechny tyto buňky pak mohou extenzivně proliferovat a vytvářet nové tumory. Tato teorie však nevysvětluje, jak mohou buňky s krátkou životností rychle získat schopnost sebeobnovy [162]. Tuto otázku by mohla zodpovědět právě teorie nádorové kmenové buňky (Cancer Stem Cells, CSCs).

CSCs má obdobně jako běžná SCs rozsáhlou proliferační schopnost, která jí umožní založit novou, v tomto případě abnormální nádorovou tkáň. CSCs proliferují do heterogenní kombinace buněk s rozdílným fenotypem. Na jedné straně tak vznikají nádorové buňky, které mají malou nebo omezenou proliferační kapacitu, ale tvoří samotnou solidní složku tumoru. Na druhé straně je přítomna buňka, která má extensivní proliferační kapacitu a tyto nádorové buňky neustále doplňuje. Právě tyto buňky jsou pak považovány za tumorigenní a nazývají se CSCs. Je zde tedy určitá paralela ke klasickými SCs, které ze své niche obnovují zralé tkáňové buňky. Ovšem i mezi buňkami tvořícími samotnou masu tumoru jsou buňky s rozdílnou proliferační aktivitou. Ačkoliv má většina těchto buněk proliferační aktivitu omezenou a nemohou se chovat jako CSCs, jsou zde přítomny i skupiny buněk, které mají schopnost rychlé proliferace a schopnost dál tvořit tumor. Tím lze i vysvětlit, proč u některých pacientů nejsme schopni podchytit růst a metastazování. Co však způsobí mutaci a vznik CSCs, není doposud jasné. CSCs může vzniknout jak na úrovni buněk kostní dřeně, tak i na úrovni jednotlivých progenitorových buněk [146].

Jedním ze způsobů, jak mohou SCs kostní dřeně přispět k rozvoji karcinomu, je chronický zánět. V případě karcinomu plic je spouštěčem chronického zánětu např. kouření. V jeho důsledku jsou v plicích aktivovány zánětlivé a reparační pochody. V momentně, kdy samotná plicní tkáň není schopná tyto opravy provést, vyplavují se SCs z kostní dřeně. Ty se spolu se specifickými progenitorovými buňkami v rámci reparačních pochodů podílejí na opravě epitelálních buněk. V důsledku dlouhodobých inzultů, pokračování v kouření a vystavení SCs a progenitorových buněk karcinogenním faktorům dochází ke vzniku mutací i v těchto SCs, které se tak mění na CSCs a svoji proliferační aktivitou vedou ke vzniku karcinomu plic. Alternativou může být fúze SCs s aberantními epitelovými buňkami plic [163].

Paralelou k výše popsanému zvratu SCs u karcinomu plic může být i popis vzniku HCC za přispění adultních buněk kostní dřeně. V případě regenerace jater byl v minulosti popsán úzký vztah HSCs a jaterních buněk, a to především díky značné podobnosti povrchových znaků na OCs, které byly nalezeny i na HSCs. HSCs jsou tak pravděpodobným zdrojem, který OCs v játrech doplňuje. Jak bylo již zmíněno výše, OCs jsou aktivovány v situaci, kdy hepatocyty nejsou schopné už sami zvládnout regenerační



procesy. To nastává v situacích, kdy jsou játra vystavena opakovaným inzultům. V důsledku chronické zánětlivé odpovědi a hypoxii hepatocytů dochází jednak k rozvoji cirhózy, ale také je stimulována kostní dřeň k vyplavování adultních SCs. Tyto převážně HSC doplňují OCs a podporují tak jaterní regeneraci. V důsledku pokračujících inzultů a chronického zánětu opět může dojít k mutacím u těchto buněk a následnému vzniku CSC, které vytvářejí HCC [159].

Přijetí této teorie je pak nezbytné reflektovat i do přístupu v léčbě onkologických pacientů. V současné době je onkologická léčba cílena na zničení veškerých nádorových buněk, protože se přepokládá jejich neomezená proliferační aktivita. To ovšem neplatí u CSCs, které navíc mohou být odolné vůči konvenčním chemoterapeutickým prostředkům. V případě CSCs je nezbytné onkologickou léčbou zničit především CSCs a nádorové buňky s vysokou proliferační kapacitou nádorů. Jen tak lze zamezit obnově buněk karcinomu.

## 4.4 Imunitní systém a jeho interakce s kolorektálním karcinomem

### 4.4.1 Definice imunitního systému a vznik imunocytů

Imunitní systém v organismu zajišťuje ochranu organismu před zevními i vnitřními antigenními strukturami. Díky zajištění obranyschopnosti (rozpoznání pro organismus škodlivých antigenů a jejich zneškodnění), autotolerance (rozpoznání vlastních tkání organismu a tolerance vůči nim) a imunitního dohledu (odstranění deficientních buněk z organismu) tak přispívá k udržení základní homeostázy organismu [38 s. 23]. Na podkladě rozpoznání škodlivých antigenů imunitní systém spouští humorální (protilátkové) a buněčné mechanismy nespecifické a specifické imunity. V rámci buněčných mechanismů jsou k obraně organismu využívány tzv. imunocyty. Imunocyty jsou buňky imunitního systému, které vznikají z HSCs kostní dřeně (obr. 13). Ke vzniku a vývoji imunocytů dochází v tzv. primárních lymfatických orgánech kostní dřeně a brzlíku. Z HSCs se diferencují buňky myeloidní a lymfoidní řady. V myeloidní řadě se prekurzory dále diferencují v monocyty (sem patří makrofágy a dendritické buňky (Dendritic Cells, DCs)) nebo granulocyty (mezi ně patří neutrofil, eosinofil a bazofil, které se po vycestování do tkání mění v mastocyty). V lymfoidní linii pak vznikají přirození zabíječi (Natural NKs) a prekurzory T a B lymfocytů. Z prekurzorů pro T lymfocyty se dále vyvíjejí cytotoxické (T cytotoxic lymphocytes, Tc lymfocyty nebo také CD8<sup>+</sup>) a pomocné T lymfocyty (T helpers lymphocytes, Th lymfocyty nebo také CD4<sup>+</sup>). Po setkání s antigenem z nich vznikají příslušné efektorové buňky. Z prekurzorů pro B lymfocyty vznikají B lymfocyty, které svůj vývoj dokončují v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, lymfatické uzliny, slizniční lymfatická tkáň) po setkání s příslušným antigenem. Vzniká tak plazmocyt, který produkuje protilátky. Část T a B lymfocytů se po setkání s antigenem zachovává jako tzv. paměťové buňky, které se aktivují při opakovaném setkání s příslušným antigenem. Veškeré buňky myeloidní řady jsou zodpovědné za nespecifickou část imunitní reakce. Z lymfoidní linie se v nespecifické imunitní reakci uplatňují NKs [38 s. 24-29]. V této studii sledujeme efekt buněčných složek imunitního systému proti CLM. Dále se tedy zaměřujeme na popis pouze buněčné složky imunitního systému.

#### **4.4.2 Nespecifická imunitní reakce**

Nespecifická (nebo také neadaptivní) imunitní reakce je soubor vrozených obranných mechanismů, které jsou v organismu předem připraveny a které jsou schopné reagovat do několika minut po rozpoznání antigenu. Rozpoznání antigenu se obvykle děje rozlišením chemických struktur na povrchu např. mikroorganismů. Na podkladě této stimulace dochází k aktivaci humorálních a buněčných složek nespecifické imunity.

Mezi humorální složky nespecifické imunity patří proteolytické enzymy komplementu, IFN- $\gamma$ , lektiny a sérové proteiny. Jejich úkolem je označení patogenních struktur, které mají být zničeny. V případě komplementu dochází i k tvorbě lytických komplexů, které narušují membrány patogenních struktur a tím je ničí. Další úlohou humorální složky je i chemotaxe dalších imunokompetentních buněk [38 s. 24-31].

Buněčná složka nespecifické imunity zahrnuje buňky myeloidní řady, patří sem tedy jak monocytární složka, tak i granulocyty a z lymfoidní linie NKs. Úlohou nespecifické buněčné imunity je fagocytóza patogenních struktur a mikroorganismů, jejich rozštěpení a likvidace. Část buněk nespecifické imunity je zodpovědná i za prezentaci antigenů buňkám specifické imunity [38 s. 24-31].

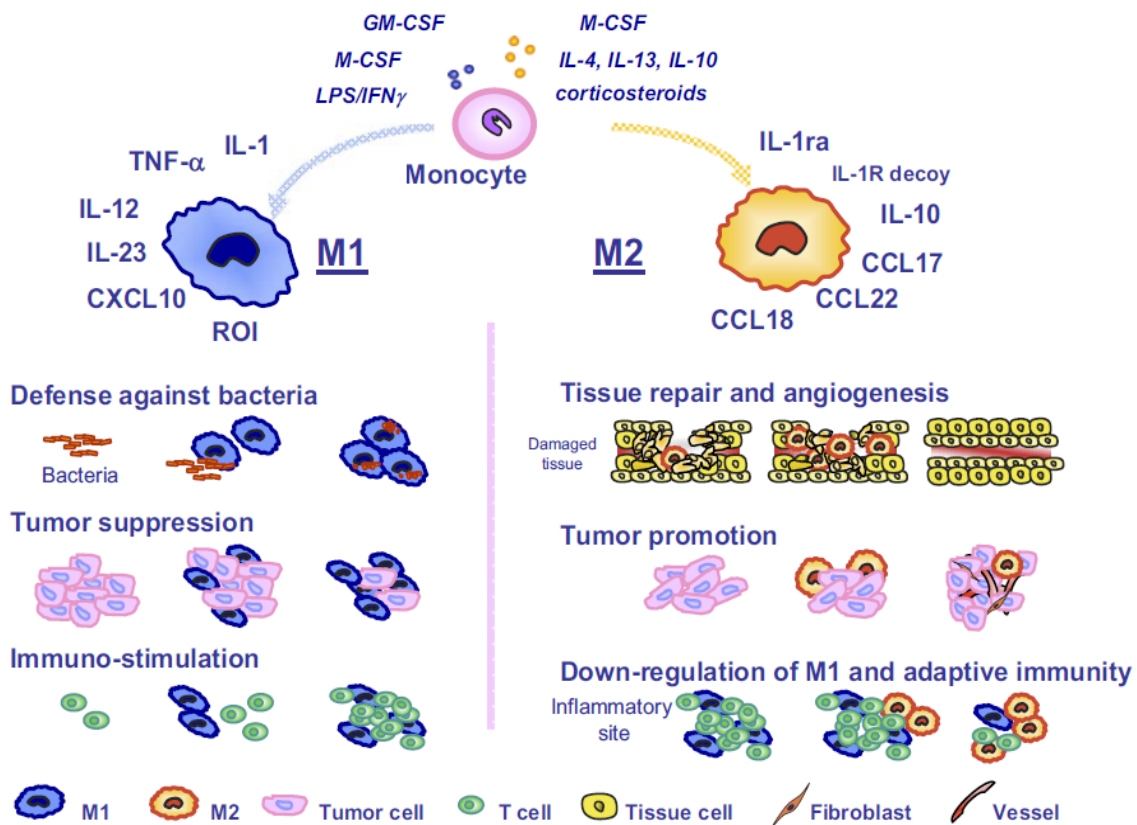
##### **4.4.2.1 Monocyty a makrofágy**

Monocyt je největší krevní buňka a u zdravého člověka je v krevním oběhu zastoupena mezi 5 - 10 %. Monocyty adherují na povrchu endoteliálních buněk pomocí vaskulárních adhezních molekul (VCAM). V případě cestování do místa zánětu je efekt zesílen přítomností dalších adhezních molekul např. intracelulárními adhezními molekulami (Intracellular Adhesion Molecul, ICAM). Monocyt mezi endoteliálními buňkami přestupuje do tkání tzv. diapedézou neboli extravazací. Ve tkáních se mění v makrofágy. Úlohou makrofágů je fagocytóza degradovaných buněk ve tkáních. Při zánětu nebo kontaktu s patogeny se aktivují přes Toll Like Receptory (TLR). Aktivace TLR podporuje jednak tvorbu cytokinů a prozánětlivých faktorů, které se následně podílejí na interakci s buňkami specifické imunity. Aktivované monocyty cestují do místa zánětu na podkladě chemotaxe a gradientu vyvolaného např. složkami komplementu, IL-8, chemotaktického faktoru pro monocyty, tzv. MIP-1 $\beta$ , nebo peptidy pocházející z bakteriálních proteinů, které se vážou na příslušný receptor na povrchu monocytů. Po

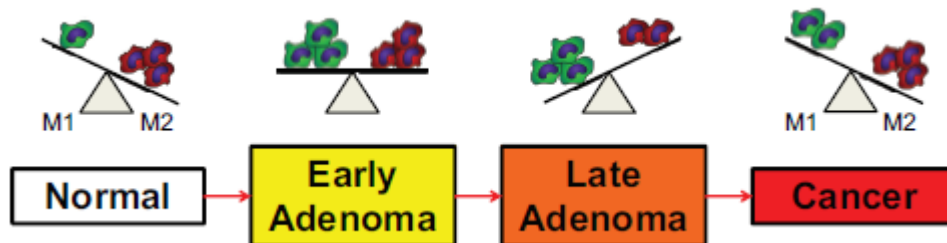
vstupu do tkání se makrofágy pomocí hydrolytických enzymů a adhezivních struktur na svém povrchu posunují buněčným stromatem do místa zánětu. K samotné fagocytóze makrofágy využívají několik mechanismů. Prvním jsou lektinové receptory na povrchu makrofágů. Tyto receptory se váží na sacharidy nebo glykoproteiny na bakteriálním povrchu. Druhým mechanismem je rozpoznání opsoninů. Opsonizace je zde způsobena složkami komplementu, proteiny akutní fáze např. C-reaktivní protein, fibrinogen, amyloid P nebo imunoglobuliny, které se váží na Fc receptory makrofágů. Třetím mechanismem je aktivace přes scavengerové receptory, které váží fosfolipidy přítomné na povrchu apoptoticky změněných buněk. Po navázání patogenu na povrch makrofágu dochází k obestoupení patogenu pseudopodiemi, které ho zcela obepnou. Vzniká nová vakuola, tzv. fagozom, který splývá s lysozomy. Zde jsou přítomny hydrolytické enzymy, které pohlčené patogeny štěpí. V případě aktivace Fc receptorů a komplementových receptorů dochází k tvorbě kyslíkových radikálů cestou NADPH oxidázy. Kyslíkové radikály ničí struktury DNA a buněčné membrány mikroorganismů. Pod účinkem cytokinů se v makrofázích aktivuje NO syntáza, která produkuje oxid dusnatý, který zabíjí parazity makrofágů. Působky a baktericidní látky, které se uplatňují uvnitř fagocytů, mohou unikat i mimo fagocyty. Pak způsobují destrukci okolní tkáně a podporují tak chronický zánět, který můžeme vidět např. u aterosklerózy. Kyslíkové radikály navíc mohou mít imunosupresivní efekt a tím mohou podpořit rozvoj kancerogeneze v místě chronického zánětu [38 s. 29-42].

#### Vztah makrofágů a kolorektálního karcinomu

Makrofágy přítomné v mikroprostředí tumoru (Tumor Associated Macrophages, TAM) tvoří až 50 % nádorové masy. Makrofágy lze rozdělit na 2 podtypy a to M1 a M2 (obr. 14). M1 makrofágy jsou aktivované tzv. klasickou cestou např. složkami přítomnými na povrchu mikrobů, IFN- $\gamma$ , IL-12 a IL-23 nebo jako odpověď na stimulaci T lymfocyty. Úkolem M1 makrofágů je obrana organismu proti bakteriím a virům, likvidace nádorových buněk a stimulace další imunitní odpovědi. M2 makrofágy jsou aktivované tzv. alternativní cestou přes stimulaci IL-4 a IL-13, komplexy TLR/ligand nebo IL-10 a glukokortikoidy.



Obr. 14.: podtypy makrofágů a jejich funkce [164]



Obr. 15: vliv M1 a M2 makrofágů na vznik sporadického CRC [166]

Úlohou M2 makrofágů jsou změny v metabolických drahách, regulují a snižují funkci M1 makrofágů, podporují angiogenesi a jsou zodpovědné za obnovu a odstranění poškozených tkání. M2 makrofágy jsou zastoupeny v TAM, ale přisuzuje se jim i podpora nádorového růstu. Důvod, proč právě fenotyp M2 makrofágů je v TAM přítomen, není jasný. Buňky karcinomů produkují chemokiny (např. CCL-2,5,7, CXCL8 a 12), které přitahují monocyty/makrofágy do nádorové tkáně, a ty ji celou prostupují. V nádoru dochází k polarizaci makrofágů do typu M2. V oblasti tumoru pak produkují působky,

kteře podporují růst tumorózních buněk a podporují tvorbu cév. TAM jsou v nádoru přitahovány především do hypoxických nekrotických oblastí (především skupinou HIF – hypoxií indukovaných faktorů). Pod jejich vlivem pak TAM uvolňují VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , které podporují neoangiogenezi. Další látky, které TAM produkují, jsou metaloproteinázy (MMPS). Upregulace MMPS vede k narušení mezibuněčných spojů a rozvolnění extracelulární matrix. Díky tomu TAM mohou podpořit metastazování a diseminaci nádorových buněk [164]. TAM se mohou podílet i na odolnosti buněk karcinomů vůči onkologické léčbě [165]. Soudí se, že M2 makrofágy podporují růst nádoru, zatímco M1 makrofágy hrají důležitou roli v kancerogenezi. Jejich proonkogenní efekt je nejspíše způsoben prolongovanou sekrecí prozánětlivých faktorů. Za fyziologického stavu převažují ve tkáni tlustého střeva M2 makrofágy. V momentě, kdy se v tlustém střevě začínají vytvářet adenomy, vyrovnává se poměr mezi M1 a M2 makrofágy a v případě pozdních forem adenomů tyto M1 makrofágy začnou převažovat. Ve stádiu, kdy je už vyvinut karcinom, opět převládají M2 makrofágy. Předpokládá se, že buňky karcinomu stimulují přeměnu fenotypu M1 makrofágů na M2 makrofágy, které jim napomáhají v dalším šíření a metastazování (obr. 15) [166].

Engström ve své in-vitro studii popsal efekt M1 makrofágů na inhibici růstu linie buněk CRC. U M2 makrofágů, tento efekt nepozoroval [167]. Patras ve svých in vitro studiích sledoval vliv TAM na růst linie buněk CRC (buňky C26) spolu s 5-FU. Pozoroval, že přítomnost makrofágů podpořila efekt 5-FU na tyto buňky. Usuzuje, že TAM mohou pomoci blokovat únik nádorových buněk z cytotoxického účinku [165].

V klinických studiích není zatím vyjasněn přínos TAM. Můžeme najít studie, které prokázaly, že vysoké množství TAM je v korelaci s delším OS [168]. Na druhé straně však jsou studie, které udávají, že masivní zastoupení makrofágů u CRC vede k progresi a vyšší agresivitě onemocnění. Tento rozdílný efekt lze nejspíše vysvětlit lokalizací TAM v nádoru-invazivní část tumoru versus stroma nádoru. Případný protinádorový účinek je v tuto chvíli přisuzován především M1 makrofágům v časných fázích onemocnění [169]. Giakoustidis ve svém shrnutí uvádí, že není podstatné celkové množství TAM, ale poměr M1 a M2 typů. Vyšší zastoupení M2 je spojené s vyšší invazivitou a vznikem CLM [170].

#### **4.4.2.2 Dendritické buňky**

DCs jsou druhou skupinou buněk, která se diferencuje z monocytů. Jsou schopné fagocytózy a jedná se o nejvýznamnější antigen prezentující buňky (Antigen Presenting Cells, APCs). DCs lze rozdělit na DCs klasické – konvenční nebo plasmocytoidní. Podle vývoje můžeme DCs rozdělit na nezralé a zralé. Nezralé DCs jsou přítomné na sliznicích, včetně sliznice střeva, a tvoří až 2 % z celkového počtu buněk. Nezralé DCs jsou rozmístěné mezi epiteliemi, kde svými výběžky kontrolují antigeny v okolním prostředí. V případě střeva tak provádí kontrolu antigenů v potravě. Dalším úkolem nezralých DCs je likvidace odumřelých buněk organismu. Fagocytované buňky jsou následně rozštěpeny a jejich jednotlivé části jsou v lymfatických uzlinách vystaveny na povrchu DCs spolu s komplexy MHC. Takto komunikují s T lymfocyty, kterým předávají informaci o tělu vlastních antigenech. Z T lymfocytů se stávají regulační lymfocyty, které pak tlumí imunitní reakci proti tělu vlastním antigenům. V případě, že nezralé DCs rozpoznají tělu cizí antigen, je zahájen proces jejich maturace ve zralé DCs. Rozpoznání antigenů je především cestou TLR. Zralé DCs již nemají schopnost fagocytózy, mění se v APCs a putují do lymfatických uzlin. Na svém povrchu pak exprimují vysoké počty MHC a tzv. kostimulačních molekul CD80, CD86 a uvolňují cytokiny a interleukiny. Tím aktivují prekurzory T lymfocytů, které se následně přemění do efektorových buněk. Maturace DCs trvá zhruba 48 hodin. Následně DCs přežívají 2-3 dny a posléze podlehnou apoptóze. Tyto mechanismy jsou typické především pro klasické DCs. Plasmocytoidní DCs se uplatňují především při virových infekcích. Na svém povrchu exprimují především TLR7 a TLR9 a produkují IFN- $\gamma$ , který aktivuje NKs a T lymfocyty. Obdobně jako konvenční DCs i plasmocytoidní DCs maturují po aktivaci cizorodými antigeny [38 s. 43-45].

#### Vztah dendritických buněk a kolorektálního karcinomu

Tumor infiltrující DCs (TIDCs) jsou nejčastěji detekovány imunohistochemickým barvením na základě přítomnosti povrchových znaků S100<sup>+</sup>, CD83, CD86 a CD163. Nakayama ve své studii uvádí, že pacienti, kteří měli v okrajových částech tumoru vyšší zastoupení S100<sup>+</sup> TIDCs, měli signifikantně lepší prognózu s nižším počtem rekurencí CRC. Nízké zastoupení S100<sup>+</sup> buněk bylo detekováno u pacientů s klinickým stádiem III a IV [171]. Studie Gulubové prokázala, že pacienti s vyšším zastoupením S100<sup>+</sup> ve stromatu

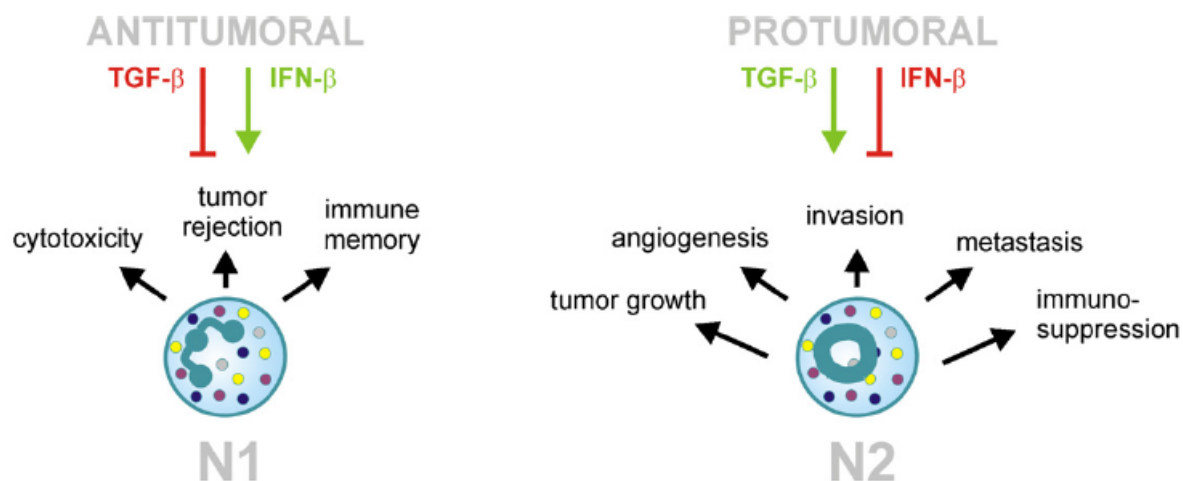
mají lepší 5 leté OS. Studie provedená na našem pracovišti neprokázala vliv S100<sup>+</sup> buněk v okrajích tumoru na OS ani na DFI [172]. Při detekci CD83<sup>+</sup> TIDCs Gulubova prokázala, že vysoké zastoupení CD83<sup>+</sup> buněk v okrajích tumoru i ve stromatu významně koreluje se stádiem onemocnění. Pacienti s nízkou infiltrací okrajů tumoru CD83<sup>+</sup> buňkami měli častěji vzdálené metastázy a horší prognózu po chirurgické léčbě. U těchto pacientů pozorovala i nízké zastoupení CD1a<sup>+</sup> TIDCs [173]. Schwaab detekoval CD83<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> v okrajích tumoru a při jejich vysokém zastoupení pozoroval trend lepšího OS [174]. Kito u pacientů s CLM prokázal, že pacienti s CLM infiltrovanými CD83<sup>+</sup> buňkami spolu s CD8<sup>+</sup> buňkami (T lymfocyty) mají prodloužené období, za které CLM zdvojnásobí svoji velikost [175]. V současné době se vysoká přítomnost TIDCs zdá jako prognosticky faktor delšího OS pacientů s CRC. Jedním ze zvažovaných mechanismů tohoto efektu je přítomnost vyvrálých forem DCs, které slouží jako APCs a mohou tak stimulovat T-lymfocyty a NK buňky. Tato teze však v současné době není potvrzena [176].

#### **4.4.2.3 Granulocyty**

Mezi granulocyty řadíme neutrofilly, eozinofily, bazofily, žírné buňky a mastocyty. Zatímco neutrofilly a eozinofily se podílejí na fagocytóze, basofily a jejich tkáňové a pojivové formy mastocyty se podílejí na sekreci fyziologicky účinných látek. Granulocyty obvykle neslouží jako APCs, i když eozinofily toto pravidlo zcela nerespektují [177]. Eozinofily, basofily a mastocyty se uplatňují především v eliminaci parazitů. Neutrofilly jsou v krvi nejvíce zastoupený typ bílých krvinek a tvoří 60-70 % leukocytů a obsahují řadu proteáz – elastázy, kolagenázy, katepsin G. Na svůj povrch jsou navíc schopni vystavovat úseky DNA s navázanými proteiny, které mohou vychytávat patogenní struktury [38 s. 27, 178]. Podobně jako makrofágy mohou neutrofilly uvolnit obsah svých granul do okolí a tím se podílet na setrvalé zánětlivé odpovědi. Vztah neutrofilů a protinádorové imunity je dvojnásobný. V minulosti byl již popsán efekt s tumorem asociovaných neutrofilů (TAN) na inhibici růstu např. melanomu. Efektu bylo dosaženo, jen pokud byl intratumorálně podán IL-1. Intramuskulární aplikace IL-1 zvýšila počet neutrofilů v cirkulaci, ale nevedla k navýšení TAN [179]. Na druhou stranu se soudí, že může podporovat růst tumoru uvolňováním stimulačních molekul, matrix degradujících proteáz a mediátorů podporujících angiogenesi. Obdobně jako u makrofágů bylo navrženo



rozdělení neutrofilů na N1 (protinádorové) a N2 (pronádorové) neutrofilů. Jejich polarizace je dána složením cytokinů v nádorovém prostředí. Diferenciace do N2 je dána přítomností TGF- $\beta$ , naopak přítomnost IFN- $\beta$  je spojena s protinádorovým efektem (obr. 16.) [178].



Obr. 16: polarizace TAN [178]

### Vztah neutrofilů a kolorektálního karcinomu

Vlivem neutrofilů na rozvoj CRC se zabýval McLean, který pozoroval vysoké zastoupení neutrofilů v adenomech, a připouští tak, že neutrofilů produkující metaloproteinázy mohou fungovat jako kancerogenní faktory [180]. Rao ve své studii využil imunohistochemického barvení CD66b<sup>+</sup> k průkazu TAN. Prokázal, že vysoká intratumorální infiltrace neutrofilů korelovala s velikostí tumoru, přítomností metastáz, a tedy i s klinickým stádiem. Tato skupina pacientů měla i nižší OS. Rao také uvádí, že intratumorální zastoupení neutrofilů vypovídá i o prognóze pacientů ve 2. a 3. stádiu onemocnění. Vysoká intratumorální hladina TAN je nezávislý faktor špatné prognózy u pacientů s CRC [181]. Na druhou stranu studie detekující neutrofilů na základě přítomnosti myeloperoxidázy, která je přítomna v granulech neutrofilů, prokázala, že vysoká infiltrace tumoru tímto typem buněk vykazovala signifikantně lepší prognózu a přežívání pacientů [182]. Před zahájením léčby CRC byl z krve stanovován poměr mezi neutrofilů a leukocyty (Neutrophil / Leukocyte Ratio, NLR). Vysoké hodnoty NLR vycházely jako negativní prognostické faktory. Tsai ve své metaanalýze uvádí hranici NLR 5. Pokud byla hodnota NLR před zahájením léčby vyšší než 5 (vysoké zastoupení neutrofilů vůči nízkému

zastoupení lymfocytů), bylo zaznamenáno signifikantně nižší OS i DFI. Pacienti s NLR pod 5 častěji dosáhli 5 letého OS [183]. Vysoké intratumorální zastoupení eozinofilů bylo prokázáno jako nezávislý faktor dobré prognózy u pacientů s CRC [184]. Vysoké zastoupení eozinofilů jak v peritumorální, tak i intratumorální lokalizaci bylo spojeno s menší velikostí tumoru a nižším počtem postižených lymfatických uzlin. Jako prognosticky významné bylo hodnoceno jen vysoké peritumorální zastoupení eozinofilů [185].

#### **4.4.2.4 *Natural killers***

NKs jsou jediné buňky lymfoidní linie, které se podílejí na nespecifické imunitě. NKs z morfologického hlediska vypadají jako lymfocyty a na svém povrchu exprimují i řadu struktur odpovídajících lymfocytárním znakům. Co však NKs zásadně odlišuje od lymfocytů, je nepřítomnost specifických receptorů pro APCs. Hlavním mechanismem, kterým rozpoznávají patogenní struktury, je množství molekul MHC glykoproteinu I (Major Histocompatibility Complex glycoprotein I, MHC gp I) exprimovaných na povrchu buněk a patogenů. V případě nízkého zastoupení MHC gp I dochází k aktivaci NKs. NKs se zapojují do nespecifické imunitní reakce časnou odpovědí a destrukcí viry napadených buněk a také se podílejí na protinádorové imunitní reakci [186]. Efekt NKs je dán přímým cytotoxickým účinkem. Z cytotoxických granulí v NKs jsou po stimulaci aktivační dráhy vypouštěny především perforin a granzymy. Perforin narušuje buněčnou stěnu a může tak vyvolat osmotickou lýzu buněk. Druhou možností destrukce buňky je průnik granzymů do buněk skrze otvory vytvořené perforiny. Granzymy pak v buňce cestou kaspáz vyvolají apoptózu [38 s. 151-152]. Dalším efektem, kterým se NKs podílejí na imunitní odpovědi, je produkce řady působků, především IFN- $\gamma$ , ale i např. TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-8, IL-10, G-CSF a chemokinů (např. CCL 2-5, XCL1). Sekrece těchto látek je obvykle spuštěna aktivací TLRs. Díky nim pomáhají v chemotaxi DCs, makrofágů, neutrofilů a zároveň se podílejí na provázání nespecifické imunitní reakce se specifickou přes regulaci APCs s T a B lymfocyty, které na ně reagují [186].

Na povrchu NKs můžeme rozpoznat 2 základní typy receptorů- aktivační a inhibiční. Na základě začlenění jednotlivých aktivačních a inhibičních receptorů a jejich vzájemné kooperaci pak převládá i výsledná reakce NKs. Při převážení efektu aktivačních receptorů se

spouští cytotoxická reakce. Mezi aktivační receptory patří struktury na povrchu NKs, které rozpoznávají proteiny virů, proteiny na povrchu virem napadených buněk nebo proteiny, které exprimují buňky při infekci nebo nádorové transformaci. Další složkou, která může aktivovat NKs, jsou solubilní ligandy - především různé typy cytokinů. Zde jsou zapojeny např. receptory pro IL-2, IL-15, IL-21. Tyto receptory jsou obvykle spojené s konečnou maturací a efektorovou reakcí NKs. NKs jsou schopné reagovat i na struktury opsonizované protilátkami IgG. Ty se vážou na receptor CD16, což je vazebné místo pro Fc část imunoglobulinu (tento Fc receptor je označován jako FcγRIIIA) a následně spouští tzv. cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC). Vyšší zastoupení tohoto receptoru zprostředkuje účinnější ADCC. Dané protilátkové receptory se označují jako killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). Další skupinou receptorů, které se nacházejí na povrchu NKs, je skupina C-lektinových receptorů, která je pojmenována jako killer lectin-like receptors (KLR). Mezi cytotoxické receptory řadíme např. NKp46/NCR1, NKp44/NCR2, NKp30/NCR3. Jako poslední zde zmíním aktivační receptor označený jako NKG2D (Natural Killer group 2 member D). Tento receptor je mimo NKs exprimován i na CD8<sup>+</sup> buňkách a malé populaci CD4<sup>+</sup> buněk. Jeho úlohou je rozpoznávat tzv. neklasické MHC glykoproteiny, které jsou exprimovány na povrchu buněk virem infikovaných nebo stresu vystavených buněk. Tento mechanismus aktivace se označuje jako MIC (MHC class I Chain-related). Aktivační receptory jsou na vnitřní straně cytoplazmatické membrány napojeny na systém ITAMs (immunoreceptors tyrosine - based activation motifs), který spouští intracelulární kaskádu reakcí zakončenou cytotoxickým účinkem NKs. Vždy však záleží na kooperaci s inhibiční složkou NKs [38 s. 154-156, 186].

Inhibiční receptory fungují na podkladě rozpoznání MHC gp I. V případě, že NKs na povrchu buňky detekují tyto struktury v odpovídajícím množství, spouští se inhibiční reakce, která zablokuje spuštěnou aktivační dráhu [38 s. 154-156]. Mezi inhibiční receptory řadíme jak imunoglobulinové receptory z rodiny KIR, tak i receptory ze skupiny KLR, kam patří i NKG2A, který hraje význam v maturaci NKs. Inhibiční receptory jsou na vnitřní straně cytoplazmatické membrány napojeny na inhibiční systém nazývaný imunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs), který blokuje cytotoxický účinek NKs [38 s. 154-156, 187].

NKs můžeme na základě povrchových znaků CD56 a CD16 rozdělit do jednotlivých subpopulací. Další znak, který se vyskytuje na povrchu NKs a je použit i v rámci této studie, je CD57.

CD56 je izoforma adhezních molekul lidských neuronů (NCAM – Neural cells adhesion molecules), ale zároveň byla nalezena na povrchu NKs. Užívá se jako základní marker pro stanovení NKs a rozděluje je na CD56<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>. CD16 je již výše zmiňovaný Fc receptor NKs pro imunoglobuliny. V periferní krvi je nejvíce zastoupena subpopulace CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup>, která tvoří kolem 90 % NKs a je neúčinnější cytotoxická jednotka. V periferní krvi je možné nalézt i subpopulace CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, které vznikají po aktivaci cytotoxické formy. Na opačné straně cytotoxických buněk pak stojí subpopulace CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim/-</sup>, která je nejvíce zastoupena v lymfatických uzlinách. CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim/-</sup> jsou ještě považované za nevyzrálé a slouží jako zdroj cytokinů i jako prekurzor pro CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> [188]. Maturace do cytotoxické formy se děje v několika krocích a souvisí se snížením inhibičních lektinových receptorů NKG2A a získáním receptorů skupiny KIRs. Během této maturace NKs na svém povrchu začínají exprimovat i receptory vypovídající o jejich zralosti, a to především CD57 [189].

### CD57

CD57 (galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferáza 1, v minulosti také označovaný jako LEU 7 nebo HNK-1(Human Natural Killer)) je marker diferenciaci buněk a jejich stárnutí. V případě NKs nebyl tento znak prokázán u fetálních NKs, ale jeho zastoupení stoupá s věkem a je znakem diferenciaci NKs [190]. Expresi CD57 detailně studoval Lopez-Vergés. Udává, že z 98 % je CD57 exprimován na CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> buňkách, které reprezentují maturované NKs. Lopez-Vergés považuje CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> NKs za konečné stádium maturace, kdy CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup> vznikají z CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>-</sup> po stimulaci IL-2 a stimulačních buněk produkujících IL-15. Takto vyspělé NKs vykazují nižší proliferační kapacitu, mají sníženou odpověď na stimulaci IL-12 a 18 a nižší produkci IFN- $\gamma$  než CD57<sup>-</sup> NKs. CD57<sup>+</sup> buňky vyrovnají produkci IFN- $\gamma$  po stimulaci CD16 [191]. CD57 je tak užitečným markerem k detekci zralých cytotoxických forem NKs [192]. CD57 nebyl popsán jen u NKs, ale nachází se i na povrchu T lymfocytů nebo jako adhezní molekula u neuronů. Jak u NKs, tak i u T lymfocytů koreluje zastoupení CD57<sup>+</sup>

s expresí granzymů A i B a perforinů. Proto se usuzuje, že buňky s expresí CD57 vykazují vysoký cytolytický potenciál. Lopéz-Vergés však tento fakt neprokázal. Na druhou stranu referuje, že buňky CD57<sup>+</sup> lépe reagují na aktivaci CD16 a jejich cytotoxicita je tak navozena právě touto cestou [191].

### Vztah natural killers a kolorektálního karcinomu

V minulosti byl již prokázán velmi silný protinádorový efekt NKs, a to především u hematologických malignit [193]. V případě CRC Menon prokázal, že přítomnost CD57<sup>+</sup> buněk při nádorových okrajích je nezávislý prognostický faktor delšího DFI [194]. Chaput prezentoval výsledky pacientů chirurgicky léčených pro druhé a třetí stádium CRC. Vyšší zastoupení NKs bylo spojeno s lepším OS a delší dobou do relapsu [195]. Obdobně i studie z našeho pracoviště udává infiltraci CD57<sup>+</sup> buňkami jako prognostický faktor lepšího OS a DFI [172]. Vyčítal ve své dizertační práci udává vysokou hodnotu CD57<sup>+</sup> buněk u pacientů s CRC (UICC II a UICC III) jako silný nezávislý pozitivní prognostický faktor pro DFI a OS. Pacienti s vysokým zastoupením CD57<sup>+</sup> buněk měli nižší výskyt metastatického postižení lymfatických uzlin. Může tak být faktorem, který ovlivní rozhodnutí o podání adjuvantní onkologické léčby [196]. Protichůdné výsledky udává Sconocchi, který v jedné studii prokázal, že infiltrace tumoru NKs (CD56<sup>+</sup> a CD57<sup>+</sup> buňky) a T lymfocyty je spojena s delším přežíváním pacientů [197]. V datech, která však publikoval dříve, neprokázal signifikantní infiltraci NKs v CRC. Uvádí, že populace CD16<sup>+</sup> je nejvíce zastoupená v rámci nespecifické imunitní reakce proti CRC a zlepšuje OS pacientů. Tyto CD16<sup>+</sup> buňky zastupují především makrofágy, ale ne NKs [198]. Obdobně Sandel udává malé zastoupení NKs v rámci infiltrace CRC [199]. Gulubova studovala infiltraci TILs u pacientů s CLM a jaterními metastázami karcinomu žaludku. V této studii popisuje nízkou infiltraci NKs v okolí těchto metastáz v porovnání s pacienty bez metastatického postižení. Také ale pozorovala pozitivní korelaci mezi zastoupením NKs a CD8<sup>+</sup> lymfocytů. Pro NKs tak v tomto případě přisuzuje regulační funkci a uzavírá, že neefektivní nespecifická imunita a konkrétně snížení počtů NKs, které jsou v jaterní tkáni za normální situace hojně zastoupeny, může stát za progresí onemocnění [200]. Tím tak potvrzuje data a závěry, které ve své studii již dříve publikoval Kasper [201]. Důvodem progresu onemocnění může být snížená funkce NKs proti nádorovým buňkám, a to cestou snížení exprese receptoru

NKG2D. Snížená exprese byla popsána jak na povrchu NKs infiltrujících tumor [202], tak i na povrchu cirkulujících NKs u pacientů s generalizovaným CRC, kde je exprese tohoto receptoru snížena v porovnání se zdravými kontrolami [203]. Pod vlivem TGF- $\beta$  produkovaného v nádorových buňkách klesá u NKs exprese NKG2D a následně i lytický efekt těchto buněk. Snížená exprese NKG2D je způsob, jakým jsou nádorové buňky schopné uniknout cytolytickému efektu NKs [204].

#### **4.4.3 Specifická imunitní reakce**

Specifická imunitní reakce je cílená reakce imunokompetentních buněk vůči konkrétní struktuře - antigenu. Buňky nespecifické imunity jsou spouštěčem specifické imunitní reakce přes APC. Proto je nezbytná přesná kooperace těchto dvou systémů. Po aktivaci se specifická imunitní reakce rozvine během dní až týdnů. Hlavní složkou specifické imunitní reakce jsou B a T lymfocyty. Každá z těchto buněk se mírně liší strukturou svých vazebných míst. Díky velkému množství, ve kterém se v organismu vyskytují (dosahuje hodnot desítek milionů), se vždy najde buňka, která je schopná vázat daný antigen. Tzn., že imunitní systém je schopen předvídat (anticipovat), s jakými antigeny se setká. Následně se daná buňka začne diferencovat a dělit. Vytvoří tak klony buněk, které jsou schopné specificky destruovat konkrétní antigen. Doba mezi aktivací specifického systému a výsledným efektem může být několik dní až týdnů. V rámci specifické imunity jsou příslušné buňky schopné si daný antigen zapamatovat a při následujícím kontaktu vyvolat rychlejší reakci proti danému antigenu [38 s. 25-30].

Rozpoznání antigenů se děje pomocí antigenně specifických lymfocytárních receptorů: B – cell receptor (BCR) nebo T cell receptor (TCR). Na úrovni genů jsou konkrétní receptory a řetězce imunoglobulinů vždy složeny z konstantní (C) a variabilní (segmenty označované jako V, D, J) složky. Variabilní složky jsou pak pomocí rekombináz vystříhávány a kombinovány, respektive přeskupovány, do řady typů a variant. Takto vystříhané, kombinované a zakončené geny jsou základem pro fenotypovou diverzitu. Mechanismus, který může diverzitu dále rozšířit, je tzv. spojovací variabilita. Při ní nejsou úseky daného genu po vystříhání a přeskupení zakončeny a při napojení nového řetězce tak může vzniknout nový typ receptoru. Dalším mechanismem, který variabilitu dále zvyšuje, je prodlužování odstřížených konců o náhodné sekvence pomocí terminální transferázy, kdy opět vzniká celá škála receptorů. U imunoglobulinů se uplatňuje

izotypový přesmyk. Při něm jsou z imunoglobulinů vyštěpovány konstantní úseky, a tím dochází ke změnám v těžkých řetězcích imunoglobulinů. Díky těmto přesmykům jsou B-buňky schopné paralelně produkovat více typů imunoglobulinů. Poslední mechanismus, který může ovlivnit množství variant imunoglobulinů, jsou somatické mutace přeskupených genů, které kódují jak těžké, tak i lehké řetězce imunoglobulinů [38 s. 25-30]. Vzhledem k zaměření této práce budeme dále popisovat buněčnou složku specifické imunity, tedy T lymfocyty.

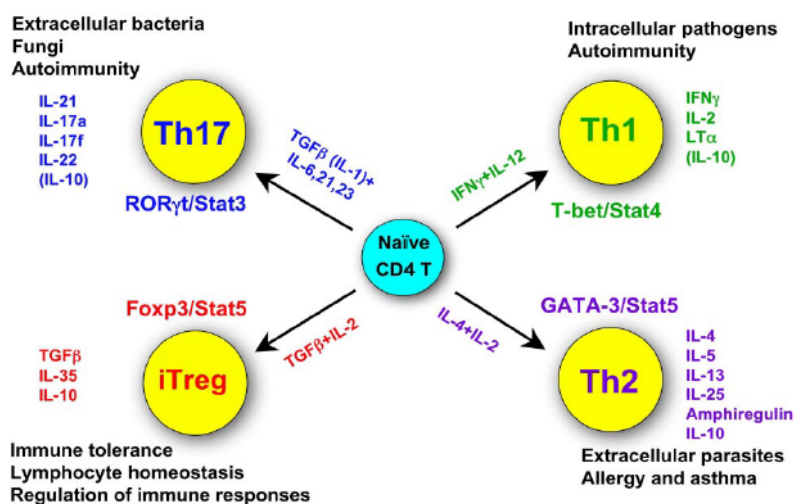
#### **4.4.3.1 T lymfocyty a jejich dělení**

T lymfocyty jsou základním kamenem antigenně specifické imunity. Jejich cílem je být konečnou efektorovou buňkou likvidující daný antigen. Zároveň však slouží i jako buňky regulující vývoj B buněk. T lymfocyty jsou charakteristické přítomností TCR na svém povrchu, které lze rozdělit podle typů řetězců na  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$ . Nejčastějším typem jsou TCR  $\alpha\beta$ , které rozeznávají MHC gp. Vývoj těchto T lymfocytů začíná v kostní dřeni a pokračuje v brzlíku, kam prekurzory vzniklé v kostní dřeni vcestují a dokončují vývoj do prekurzorů pomocných a cytotoxických T lymfocytů. Oproti tomu TCR  $\gamma\delta$  jsou v organismu zastoupeny málo, jsou schopné se vyvíjet mimo thymus a k rozpoznání antigenu nepotřebují MHC gp, protože jako antigeny rozpoznávají jednoduché organické látky přítomné např. v potravě nebo produkované mikroorganismy.

TCR  $\alpha\beta$  se dále dělí podle přítomnosti znaků na CD4 a CD8. Molekula CD4 je koreceptorem MHC glykoproteinu II (Major Histocompatibility Complex glycoprotein II, MHC gp II) a je typická pro prekurzory pomocných T lymfocytů, tzv. helperů (Th). Jak napovídá jejich název, tyto buňky pomáhají stimulovat B lymfocyty k tvorbě protilátek, podporovat funkci buněk nespecifické imunity a produkcí cytokinů regulovat imunitní reakci. Na podkladě signálů z okolí se naivní formy Th lymfocytů mohou diferencovat ve čtyři podtypy buněk: Th1, Th2, Th17 a T regulační (T reg) lymfocyty (obr 17). Molekula CD8 je koreceptorem pro MHC gp I a je typická především pro cytotoxické formy T lymfocytů, tzv. (Tc). Díky produkci celé škály biogenních působků se mohou podílet i na regulačních pochodech [38 s. 139-141].

## Th1 lymfocyty

Th1 lymfocyty vznikají z naivních CD4<sup>+</sup> buněk po stimulaci IFN- $\gamma$  a IL-12, který je produkovaný především APC. Th1 jsou zodpovědné za reakci proti intracelulárním virovým i bakteriálním patogenům např. mykobakteriím. Svoji regulační funkcí mohou přispět i k rozvoji autoimunitních onemocnění.



Obr. 17: vývoj a charakterizace jednotlivých Th lymfocytů [206]

Th1 mají ve svém jádře přítomny transkripční faktory T-bet a STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT). Th1 lymfocyty lze detekovat pomocí povrchových markerů CD4<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup>. Hlavní působky jejich produkce jsou IL-2 a IFN- $\gamma$ . První kontakt s antigenem obvykle zprostředkovávají dendritické buňky, které naivní Th lymfocyty aktivují. Při této aktivaci jsou na povrchu vystaveny antigeny společně s MHC gp II a současně jsou vyplaveny i IFN- $\gamma$  a IL – 12. Pro správný průběh reakce je důležitá role kostimulačních molekul CD40 (na povrchu APC) a CD40L (na povrchu lymfocytu) a CD28 (receptor na povrchu lymfocytů pro protein CD80 a CD86 na povrchu APC). Aktivace pomocí této tzv. imunologické synapse vede k diferenciaci naivních Th lymfocytů do Th1 lymfocytů. Th1 lymfocyty produkují IL-2 a IFN- $\gamma$ . IL-2 slouží jako autokrinní stimulant podporující dělení Th1 lymfocytů. Vyprodukovaný IFN- $\gamma$  jednak poskytuje zpětnou vazbu pro Th1, které tím zvyšují produkci T-bet a následně i IFN- $\gamma$ , ale také je zodpovědný za stimulaci fagocytů, zejména aktivuje makrofágy, kde zvyšuje jejich fagocytární aktivitu. Makrofágy fungují jako APC a jsou i určitou zpětnou vazbou, protože předkládáním naštípaných antigenů podporují další aktivitu Th1 lymfocytů, ale také cytotoxických CD8<sup>+</sup>. Vznik efektorových CD8<sup>+</sup> buněk je podpořen i samotnými Th1 lymfocyty. To je dáno



jednak produkcí IL-2, která stimuluje diferenciaci CD8<sup>+</sup>, a pak také nepřímo přes APC buňku po kontaktu příslušných CD40 a CD40L struktur.

Th1 tímto kontaktem kostimulačních molekul aktivuje APC, která opět stimuluje vyžrávání CD8<sup>+</sup> buněk. Jak je zřejmé, úlohou Th1 je udržení lokální zánětlivé odpovědi. Díky sekreci IL-2 a IFN- $\gamma$  se podílejí na vytváření paměťových buněk, a to jak typu Th1, tak i CD8<sup>+</sup> paměťových buněk [38 s. 141-144, 205,206

### Th2 lymfocyty

Th2 lymfocyty jsou zapojeny do imunitních pochodů proti extracelulárním parazitům včetně helmintů. Současně mohou být zodpovědné za perzistující asthma bronchiale a alergické reakce. Th2 lymfocyty se diferencují z naivních Th lymfocytů pod stimulací IL-2 a IL-4 secernovaných okolními basofily, žírnými buňkami a NKs. V prvním kroku se opět musí naivní Th lymfocyt setkat s APC. Ta mu předloží antigen spolu s MHC gp II. Jako kostimulační proteiny se zde uplatňují CD80 a CD89 na APC a TCR, CD28 (receptor na Th lymfocytu pro protein CD 80 a CD86). Následně z naivního Th lymfocytu vzniká efektorová buňka Th2 lymfocytu. Identifikačním markerem na povrchu Th2 lymfocytů jsou znaky CD4<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> a CRTH2<sup>+</sup>. Ve svém jádře jsou bohaté na transkripční faktory GATA-3 a STAT3. Th2 lymfocyty produkují a uvolňují IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 a amphiregulin. IL-4 působí zpětnovazebně, když stimuluje Th2 lymfocyty k diferenciaci, ale také ovlivňuje i B lymfocyty k produkci IgE. IgE následně stimuluje basofily a žírné buňky, které vyplavují histamin a serotonin a podílejí se tak na alergických reakcích. Dalším faktorem, který je zapojen u alergických reakcí, je IL-9, protože stimuluje tvorbu mucinu z epitelálních buněk především v dýchacích cestách. Do antiparazitární imunity je zapojen IL 13 a především IL-9, který aktivuje eosinofily, žírné buňky a lymfocyty. Naopak IL-10 je supresní faktor, který omezuje proliferaci Th1 lymfocytů a funkci APC s vlivem především na dendritické buňky [38 s. 144-145, 205, 206].

### Th17 lymfocyty

V roce 2003 byla popsána nová efektorová skupina Th lymfocytů, která byla charakterizována vysokou produkcí IL-17 a cytokinů, které neprodukuje Th1 ani Th2 lymfocyty. Th17 lymfocyty se diferencují z naivních Th lymfocytů pod vlivem TGF- $\beta$ , IL-6,

IL-21 a IL-23. V jádře produkují transkripční faktory STAT3 a hlavní transkripční faktor Th17 lymfocytů, tzv. ROR $\gamma$ t. Ten může být použit k jejich detekci. K té lze také využít expresi povrchových znaků CD4<sup>+</sup> a CCR6. Th17 lymfocyty produkují celou škálu interleukinů a cytokinů. IL-21 zpětnovazebně stimuluje diferenciaci Th17 lymfocytů. IL-21 také ovlivňuje funkci CD8<sup>+</sup> buněk, B lymfocytů, NKs a dendritických buněk. Dalším vysoce secernovaným interleukinem je IL-17a a IL-17f, které v mesenchymálních i epitelálních buňkách podporují vyplavení IL-6 a IL-8 a tím podporují rozvoj zánětlivé reakce. IL-17 stimuluje neutrofile, které zvyšují svoji imunitní odpověď proti extracelulárním bakteriím a houbám. Vyplavení IL-22 podporuje rozvoj kožní zánětlivé reakce a řídí imunitní odpověď proti patogenům, jako je *Klebsiella pneumoniae* nebo *Citrobacter rodentium*. Na druhou stranu v játrech slouží jako ochranný faktor hepatocytů při akutním jaterním selhání [38 s. 145, 205, 206].

### Regulační Th lymfocyty

Th regulační lymfocyty (T reg) hrají zásadní roli v imunosupresi, protože chrání organismus před autodestrukcí vlastním imunitním systémem. Defekty v T reg tak mají vliv na rozvoj autoimunitních reakcí. V současné době rozeznáváme tři základní podtypy Th buněk spadajících do obecného pojmenování T reg. Jsou to naivní T reg (nT reg), indukované T reg (iT reg) a cytotoxické T reg (cT reg). Pod iT reg je počítána i populace Th3 lymfocytů a Tr1 lymfocytů. Toto označení bylo používáno před nálezem a charakterizací T reg tak, jak je známe v dnešní době. Především Th3 byl přisuzován podíl na slizniční imunitě. T reg se diferencují z naivních Th lymfocytů díky působení TGF- $\beta$  a IL-2, kdy IL-2 spolu se stimulací MHC gp II jsou silným signálem, který vede k rozvoji T reg. Kromě TCR na svém povrchu exprimují znaky označované jako CD25, GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein), OX40 (CD134), CD62L a CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4). Ve svém jádře produkují především transkripční faktory Foxp3 a STAT5. Pro jejich detekci jsou využívány povrchové znaky CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> a transkripční faktor Foxp3 [38 s. 148-150, 205, 207].

Povrchová struktura CD25 byla využita i v této studii. Jedná se o  $\alpha$  řetězec membránového receptoru pro IL-2. Tento receptor však není začleněn do transmembránového přenosu, protože jeho cytoplazmatická část je příliš krátká. Jeho

význam je především ve schopnosti vazby IL-2, ke kterému je vysoce afinní. Tento receptor ovlivňuje efektorovou funkci lymfocytů. Povrchové receptory CD4<sup>+</sup> a CD25<sup>+</sup> ovlivňují tvorbu transkripčního faktoru Foxp3. Na myších modelech byl popsán vyšší výskyt závažných autoimunitních onemocnění v případě deplece CD25. CD25<sup>+</sup> lze detekovat na T buňkách, B buňkách, thymocytech a oligodendrocytech [208].

Foxp3 (Forkhead box P3) je další faktor, který byl využit v této studii. Foxp3 je transkripční faktor selektivně produkovaný v T reg. Přesný mechanismus účinku Foxp3 není zcela jasný. Usuzuje se, že přes tzv. NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) ovlivňuje transkripci genů. Jejich přesné složení není doposud známé, ale pravděpodobně jde o geny ovlivňující expresi imunosupresních receptorů na povrchu buňky a dále o geny zodpovědné za tvorbu cytokinů, které ovlivňují efektorové T buňky ve svém okolí a utlumují tak jejich činnost. Foxp3 není nezbytný pro přežití T reg prekurzorů, ale je zcela nezbytný pro správnou supresní funkci T reg. Tento Foxp3 protein je kódován příslušným Foxp3 genem na X chromozómu. Mutace v tomto genu způsobí závažné multiorgánové autoimunitní onemocnění nazývané IPEX (Imunodysregulace, Polyendokrinopatie, Enteropatie a dědičné syndromy vázané na X chromozóm) [207, 209, 210].

T reg jsou schopné navodit supresní účinek dvěma způsoby. Prvním je přímý buněčný kontakt a druhým je uvolňování cytokinů. Přímý buněčný kontakt a následná suprese je dána receptory GITR a především CTLA-4. CTLA-4 se přímo váže na kostimulační receptory CD80/CD86 na efektorových T buňkách, ale i na APCs - především DCs. Na T lymfocyty tak vyše přímý inhibiční signál. U DCs dochází k aktivaci indolamin 2,3 dioxygenázy, která snižuje koncentraci tryptofanu v okolí buněk. Snižená koncentrace tryptofanu byla popsána jako faktor snižující aktivaci T buněk. Tento typ imunosuprese je typický především pro nT reg. Druhým způsobem, kterým T reg ovlivňují funkci imunokompetentních buněk, je cytokinová cesta, která je využívána především iT reg. Supresního efektu je dosaženo především sekrecí TGF- $\beta$  a IL-10. TGF- $\beta$  podporuje vyžívání iT reg z naivních Th buněk. Deficience TGF- $\beta$  byla popsána např. u diabetu. IL-10 je faktor, který omezuje maturaci DCs a ty se stávají více tolerantní k antigenům ve svém okolí. Produkce IL-10 byla např. popsána jako preventivní faktor zánětlivého postižení střev. Poslední efekt, který byl u T reg popsán, je produkce granzymu A a perforinu. Tyto

produkty můžeme pozorovat především u efektorových CD8<sup>+</sup> buněk. T reg tím získávají schopnost ničit aktivované CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buňky [38 s. 148-150, 207].

### Tc lymfocyty

Tyto buňky jsou základní destrukční jednotkou lidského organismu. Tc lymfocyty rozpoznávají buňky napadené intracelulárními patogeny včetně virů. Jsou schopné rozpoznat i abnormální buňky včetně těch nádorových. APCs (nejčastěji DCs nebo makrofágy) předkládají na svém povrchu MHC gp I spolu s daným antigenem. Naivní Tc lymfocyty na svém povrchu exprimují CD8<sup>+</sup> receptor, který tyto signály rozpoznává, a po této aktivaci se diferencují v efektorové Tc buňky. Tento proces se nazývá cross prezentace [211]. Pro správnou interakci APCs s Tc lymfocyty je opět nezbytná přítomnost kostimulačních molekul CD80, CD86 a CD28L. Celému procesu diferenciaci napomáhají i Th1 lymfocyty, které produkují IL-2 a jsou tak silným stimulačním faktorem. Mimoto je přítomnost Th1 důležitá i pro DCs, protože před samotnou cross prezentací je potřeba, aby tyto buňky byly Th1 aktivovány cestou CD40 (receptor na povrchu DCs) a CD40L (molekula na povrchu Th1). Tato aktivace DCs vede ke zvýšení exprese CD80 a CD86 na povrchu DCs a sekreci IL-1 a IL-12 - faktorů účastnících se cross prezentace. DCs se tedy po setkání s Th1 stává plně funkční a vyžralou APCs. Cross prezentace probíhá v lymfatických uzlinách. Z lymfatických uzlin se pak zralé efektorové Tc lymfocyty rozšíří do organismu hematogenní cestou. Tyto zralé buňky jsou pak v místě působení schopné okamžité reakce po aktivaci přes TCR (již není potřeba kostimulačních procesů) [38 s. 150-153].

Obdobně jako bylo popsáno u NKs i Tc lymfocyty na svém povrchu exprimují receptory ze skupiny KIRs, KLR, tak i NKG2D. Před jejich aktivací je však nutná aktivace TCR. Základním rozpoznávacím prvkem Tc buněk, který je používán i k jejich detekci, je receptor CD8. Z dalších povrchových struktur můžeme uvést již zmiňovaný CTLA-4, T cell imunoglobulin and mucin domain 3, lymphocyte activity gene 3 nebo Fas ligan (FasL), který se svojí strukturou podobá TNF. Aktivované Tc buňky produkují celou řadu chemokinů a cytokynů, jako jsou IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL17-a, IL17f, IL-21 a IL 22 [212]. Dalším produktem Tc lymfocytů jsou perforiny a granzymy, které slouží jako jeden z celkových tří mechanismů, kterými Tc lymfocyty usmrcují okolní buňky. Perforiny i granzymy jsou přítomny v cytoplazmě jako cytotoxická granula. Po aktivaci TCR se tato

granula přesouvají k místu setkání obou buněk a degranulují se do štěrbin mezi obě buňky. Perforin do cílové buňky vytváří otvory a póry, kterými do buňky vstupují granzymy. Granzymy v cytoplazmě buněk aktivují kaspázy, na jejichž podkladě dojde ke spuštění apoptotických kaskád a následně apoptóze buňky. Druhým mechanismem, který vyvolá destrukci cílové buňky, je aktivace cestou FasL. Tento ligand se váže na apoptotický receptor Fas (CD95), který se nachází na povrchu řady buněk lidského organismu. Aktivace Fas receptoru opět aktivuje apoptotickou kaskádu, která v buňce vyvolá apoptózu. Tento mechanismus se uplatňuje i u Tc buněk. Díky tomu je funkce Tc lymfocytů limitována a regulována. Oba dva výše popsané cytolytické mechanismy vyžadují kontakt zúčastněných buněk. Třetí mechanismus cytolýzy je vyvolán solubilními složkami vypouštěnými z Tc buněk. Jedná se o lymfotoxin (LT, TNF-β), který je také schopen aktivovat FasL s následnou apoptózou buňky [38 s. 151-153].

#### ***4.4.3.2 Vztah T lymfocytů ke kolorektálnímu karcinomu***

Již od 80. let 20. století je známý příznivý efekt infiltrace lymfocytů v okolí CRC [213, 214]. Galón ve své studii prokázal lepší prognózu pacientů, kteří měli CRC infiltrovaný T buňkami (CD3<sup>+</sup>) [215]. Díky odhalování povrchových znaků, transkripčních faktorů a secernovaných cytokinů, kterými lze T lymfocyty stanovit, bylo postupně možné studovat i jednotlivé podskupiny T lymfocytů.

#### **Th lymfocyty**

Nakayama prokázal sníženou přítomnost Th1 lymfocytů u pacientů s CRC ,a to jak v periferní krvi, tak i ve spádových lymfatických uzlinách. Udává, že rozvoj CRC souvisí s disbalancí Th1/Th2 lymfocytů [216]. Evans ve vzorcích periferní žilní krve pacientů s CRC pozoroval nižší zastoupení cytokinů produkovaných Th1 lymfocyty oproti zdravým kontrolám. U zdravých kontrol také pozoroval vyšší poměr v zastoupení Th1/Th2 lymfocytů [217]. Cui ve své práci shrnul, že zvýšená sekrece cytokinů Th2 lymfocyty a snížená produkce cytokinů Th1 lymfocyty v periferní krvi souvisí s progresí onemocnění z adenomu do CRC. Udává, že změny a hladiny cytokinů souvisí se stádiem onemocnění a mohou se normalizovat po resekčním výkonu. Také popisuje, že lokalizace Th1 lymfocytů je u adenomů v subepiteliální oblasti stromatu, zatímco u CRC jsou Th1 difúzně

rozmístěny ve stromatu tumoru [218]. Tosolini prokázal, že Th1 lymfocyty jsou díky své humorální aktivitě a produkci IFN- $\gamma$  silným stimulatorem Tc buněk. Pacienti po resekci pro CRC s vysokou expresí genů pro Th1 lymfocyty a cytotoxické lymfocyty měli delší DFI [219]. Pagés ve svém shrnutí udává důležitost posouzení VELIPI, tzn. zhodnocení přítomnosti embolů v nádorových cévách (Vascular Embolisation, VE), invazi nádorových buněk do lymfatických struktur (Lymphatic Invasion, LI) a perineurální infiltraci (Perineural Invasion, PI). Negativní VELIPI přináší delší DFI a OS. Současně bylo zjištěno, že pacienti s negativním VELIPI mají v tumoru vysoké zastoupení Th1 lymfocytů a efektorových CD8 buněk. Negativní VELIPI nekorelovalo s přítomností Th2 lymfocytů [220]. Hou v experimentu na myších prokázal, že vystavení myší stresové situaci vedlo ke snížení aktivace Th1 lymfocytů a zvýšené aktivaci Th2 lymfocytů. U těchto myší také pozoroval rychlejší progresi CRC [221]. Osawa ve své experimentální studii na myších prokázal efekt Th2 lymfocytů na progresi karcinomu [222]. Tosolini nepotvrdil význam Th2 lymfocytů na prognózu pacientů [219]. Cui hojně detekoval cytokiny produkované Th2 lymfocyty v epitelu maligních buněk CRC. Udává, že Th2 mohou být faktorem, který inhibuje Th1 lymfocyty a vede k progresi CRC [218]. Figueiredo propojuje dietní návyky s rozvojem CRC. Ve své genové analýze vzorků CRC zjistil upregulaci GATA3 u pacientů konzumujících maso. Tento transkripční faktor je spojen s diferenciací Th2 lymfocytů. Upregulace GATA3 byla zjištěna u pacientů s ulcerózní kolitidou, která přináší i zvýšené riziko vzniku CRC. Konzumace masa nejspíše vyvolá protumorigenní zánětlivou odpověď, která vyústí ke kumulaci Th2 lymfocytů a následnému zvýšení hladiny GATA3. Přesný mechanismus deregulace GATA3 a případného vzniku CRC však není doposud objasněn [223].

Th17 lymfocyty byly už v minulosti spojeny s progresí maligního onemocnění. Výše hladiny IL-17 korelovala s agresivitou např. karcinomu žaludku nebo ovária. Obdobné výsledky byly popsány i u CRC. V Tosoliniho studii měli pacienti s nízkým zastoupením Th17 lymfocytů lepší DFI. Zastoupení a odpověď Th17 lymfocytů stoupala s progresí tumoru [219]. Yoshida prokázal význam stanovení poměru ROR $\gamma$ T/CD3<sup>+</sup>. Vysoký ROR $\gamma$ T/CD3<sup>+</sup> koreloval s metastatickým postižením lymfatických uzlin a považuje ho za silný negativní prognostický faktor s krátkým přežitím pacientů. Th17 tak mají úzký vztah k metastatickému šíření buněk CRC. Tento proces je pravděpodobně způsoben složením cytokinů, které Th17 produkují. Tím ovlivňují indukci genů v buňkách karcinomů a

podporují jejich metastatický potenciál. Ve stejné studii nebyl prokázán význam Th1 a Th2 lymfocytů na prognózu onemocnění, ačkoliv shrnuje, že přítomnost Th1 lymfocytů obvykle koreluje s dobrou prognózou, zatímco vysoké zastoupení Th2 je spojenou se špatnou prognózou [224]. Sharp udává, že Th17 a hladina IL-17a je signifikantně zvýšena ve vzorcích CRC u pacientů s pokročilým stádiem onemocnění. Systémové hladiny cytokinů produkované Th17 lymfocyty byly signifikantně zvýšené u metastazujícího CRC. Sharp v diskuzi uvádí i efekt IL-17 na remodelaci extracelulární matrix, která je důležitým krokem v metastazování CRC [225].

### Regulační Th lymfocyty

T reg díky svým imunosupresním vlastnostem a díky imunotoleranci vůči tělu vlastním buňkám přinášejí i riziko potlačení imunitních reakcí proti nádorovým buňkám. Tento efekt byl např. popsán u non-Hodgkinských lymfomů. U pacientů s karcinomem jícnu nebo žaludku přináší vysoké zastoupení T reg v TILs vyšší riziko úmrtí a zkracuje DFI [207]. Ling porovnával vzorky periferní krve a nádorové tkáně zdravých pacientů a pacientů s CRC. Nalezl zvýšené množství T reg jak v periferní krvi, tak i v rámci TILs u pacientů s časnou i pokročilou formou CRC. Tyto T reg lymfocyty byly Foxp3<sup>+</sup> a suprimovaly CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> buňky. Nevyjadřuje se však k přežití pacientů [226]. Salama došel k závěru, že CD45R0<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> a překvapivě i Foxp3<sup>+</sup> buňky a jejich vysoké zastoupení v tumorózní tkáni korelují s dobrou prognózou pacientů ve stádiu II a III [227]. Nosho sledoval vliv CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45R0<sup>+</sup> a Foxp3<sup>+</sup> buněk na prognózu pacientů s mikrosatelitní nestabilitou CRC. V univariační analýze byl Foxp3 spojen s dlouhým OS. V multivariační analýze však vyšla pouze denzita CD45R0<sup>+</sup> buněk jako významná k OS [228]. Vzhledem k diskrepanci ve výsledcích jednotlivých studií provedl deLeeuw metaanalýzu, kam zahrnul 10 studií s CRC, kde 4 práce uvádějí T reg jako pozitivní prognostický faktor a 6 prací, které neprokázaly vliv T reg na prognózu onemocnění [229]. Svensonová naopak uvádí, že vysoké zastoupení T reg ve tkáni CRC je spojeno se snížením počtu Th1 lymfocytů. Tento stav pak imunitnímu systému znemožňuje účinnou reakci proti nádorovým buňkám. Potlačení T reg vidí jako možnou cestu v imunoterapii pro kolorektální karcinom [230]. Pernot pak udává, že rozdílnost výsledků je dána heterogenitou metod, které jsou ke stanovení T reg používány. Udává, že

v experimentálních modelech na myších a in vitro studiích T buněk z krve pacientů s CRC vedla deplece T reg lymfocytů ke zlepšení odpovědi CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk vůči tumorózním antigenům. Domnívá se, že akumulace T reg lymfocytů v tumoru je dána hladinami cytokinů, které jsou tumorem produkovány (např. TGF-β, VEGF). Tyto faktory vedou ke konverzi CD4<sup>+</sup> buněk do T reg lymfocytů, které pak zvyšují riziko rekurence a kratšího OS [231].

### Tc lymfocyty

Tc jsou hlavní efektorové buňky TILs zapojené do protinádorové imunity. Naito v roce 1998 popsal proliferační aktivitu těchto CD8<sup>+</sup> buněk jak v okrajích tumoru, tak i ve stromatu a uvnitř nádorové tkáně. Udává, že v multivariační analýze bylo zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk v samotném tumoru jako pozitivní prognostický faktor pro OS. Nižší zastoupení CD8<sup>+</sup> pozoroval od III. stádia onemocnění [15]. Pagés popisuje, že pacienti bez metastatického postižení lymfatických uzlin měli vyšší zastoupení TILs v preparátech s vyšším zastoupením mRNA pro Th1 lymfocyty a efektorové Tc buňky. U nemetastazujícího karcinomu pozoroval také vyšší zastoupení paměťových Tc lymfocytů s pozitivním vlivem na OS [232]. Také Mlecnik ve své studii popisuje, že pacienti s metastatickým postižením lymfatických uzlin měli nižší zastoupení TILs v tumoru. Vysoké zastoupení Tc lymfocytů bylo pozorováno v časném stádiu tumoru Tis a T1 a to až u 60 % pacientů s tímto stádiem. U těchto pacientů pak bylo nízké riziko relapsu. Na druhou stranu u relapsu onemocnění bylo nízké zastoupení Tc lymfocytů nezávisle na stádiu onemocnění. Nízké zastoupení Tc lymfocytů bylo spojeno s krátkým DFI a OS. Článek tak uzavírá, že hodnocení Tc lymfocytů je užitečným kritériem, jak predikovat rekurenci onemocnění a OS pacientů. Toto stanovení Tc lymfocytů v rámci imunoskóre jak v centru tumoru, tak i v invazivních okrajích pak může být lepším prediktorem rekurence než samotná TNM klasifikace [233]. Hagland u pacientů s CRC bez CLM sledoval korelaci T lymfocytů v krvi se zastoupením T lymfocytů v bioptickém vzorku. Ve studii našel korelaci mezi přítomností CD3<sup>+</sup> buněk v předoperačním vzorku krve se zastoupením CD3<sup>+</sup> jak v invazivní okraji tumoru, tak i v centru tumoru. Silná korelace pak byla pozorována mezi přítomností CD4<sup>+</sup> buněk v krvi a přítomností CD8<sup>+</sup> buněk v invazivní části tumoru. Nevyjadřuje se sice k prognóze pacientů, ale studii uzavírá, že stanovení CD3<sup>+</sup> buněk v krvi



může být určitým biomarkerem imunitní odpovědi jak v tumoru, tak i v jeho invazivní části [234].

#### **4.4.3.3 Vztah T lymfocytů k metastázám kolorektálního karcinomu**

Wagner porovnával zastoupení CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk u pacientů s CLM se vzorky zdravé tkáně. U pacientů s CLM pozoroval vyšší aktivitu CD8<sup>+</sup> buněk. Také detekoval pozitivní korelaci mezi hladinami Th buněk (CD4<sup>+</sup>) a cytotoxickou aktivitou tumor infiltrujících lymfocytů. Studii uzavírá s tvrzením, že Th buňky podporují cytotoxickou reakci proti tumoru [235]. Katz porovnával zastoupení T lymfocytů v souboru pacientů, kteří zemřeli do 2 let od resekce jater pro CLM, s pacienty, kteří po jaterní resekci přeživali více jak 10 let. Vysoké zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk a nízké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v resekatétech korelovalo s dlouhodobým přežitím, které bylo delší 10 let. V této skupině pacientů mělo 31 % pacientů vysoké zastoupení CD8<sup>+</sup> buňkami oproti 2 % pacientům, kteří se nedožili 2 let. 69 % pacientů, kteří zemřeli do 2 let, mělo vysoké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v CLM oproti 22 % pacientů přeživších více jak 10 let. CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> tak byly silné prediktory pro OS. Autor s odkazem na experimentální studie udává, že přítomnost CD4<sup>+</sup> buněk může svědčit o přítomnosti Th2 lymfocytů, které produkují imunopresní cytokiny. Vysoké množství CD4<sup>+</sup> buněk pak může zamezit efektivní obraně proti CLM [16]. V druhé své práci se tento autor zaměřil na stanovení CD3<sup>+</sup> buněk, CD4<sup>+</sup> buněk, CD8<sup>+</sup> buněk a T reg buněk (Foxp3) u pacientů s CLM. Udává, že 40 % pacientů se dožilo 5 let a 25 % pacientů 10 let od operace. Vysoké zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk v poměru vůči celkovému počtu T lymfocytů (CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) bylo hodnoceno jako nezávislý prediktor pro OS. Dalším prediktivním faktorem pro OS bylo stanovení poměrů FoxP3/CD4<sup>+</sup> a FoxP3/CD8<sup>+</sup>. Jejich vysoké hodnoty měly negativní dopad na OS. Na druhou stranu vysoké hladiny samotných T reg nevyšly vůči OS signifikantně. Tento výsledek se přiklání spíše k imunopresnímu účinku T reg na ostatní Th a Tc buňky. Oproti předchozí studii referované výše tak v této studii množství CD4<sup>+</sup> buněk korelovalo s OS. Udává, že odlišný výsledek je dán rozdílnou skladbou pacientů a také faktem, že byly použity moderní terapeutické postupy při neoadjuvantní léčbě před resekcí CLM (Oxaliplatin i Irinotecan zvyšují hladiny CD4<sup>+</sup> buněk v rámci TILs). Na závěr uvádí, že stanovení poměrů mezi jednotlivými skupinami T lymfocytů přináší lepší informaci o imunitních interakcích v rámci TILs [17].

Halama se zaměřil na denzitu imunokompetentních buněk v invazivním okraji CLM ve vztahu k podávané chemoterapii. Pacienti s vysokou denzitou T buněk v okraji CLM ( $CD3^+ > 600$  buněk/ $mm^2$ ,  $CD8^+ > 200$  buněk/ $mm^2$  a granzym B  $> 25$  buněk/ $mm^2$ ) měli lepší odpověď na chemoterapii. Vysvětlením může být použití 5-FU, který je součástí všech chemoterapeutických režimů. Tato látka inhibuje supresorové buňky myeloidní řady, a tak se může uplatnit efekt Tc lymfocytů [236]. V další studii tento autor neprokázal podstatné zastoupení Th1, Th2 ani Th17 lymfocytů v invazivních okrajích CLM, ale prokázal zde působky typické pro myeloidní řadu buněk, které atrahují T lymfocyty. Ty pak přes produkci chemokinu CCL5 mohou podporovat růst tumoru. Avšak blokáda příslušného receptoru pro CCL5 vedla nejen ke smrti buněk CLM, ale také přispěla ke změně mikroprostředí, kde došlo k repolarizaci makrofágů. Ty prošly fenotypovou přeměnou z M2 podtypu na podtyp M1. Tento podtyp pak byl schopný stimulovat T buňky k protinádorové odpovědi [237].

Berthel se zaměřil na stanovení denzity T lymfocytů u CLM v závislosti na vzdálenosti od invazivní hrany tumoru do jeho centra. Tumor ve vzdálenosti 100  $\mu m$  od invazivní hrany rozdělil do zón po 10  $\mu m$ . Zjistil, že ve vzdálenosti 20-30  $\mu m$  od hrany CLM se nachází menší množství  $CD3^+$  buněk oproti samotnému okraji a vzdálenější lokalizaci. Další analýzou zjistil, že v dané oblasti se nachází i menší množství  $CD8^+$  buněk, stejně tak je zde pokles i v jejich cytotoxické substanci Granzymu B. V daném úseku však prokázal vyšší zastoupení makrofágů ( $CD163^+$ ). Ty zde tvořily určitou bariéru, přes kterou mohly projít jen specifické typy T buněk. Pacienti, u kterých je však v prvních 10  $\mu m$  vysoká denzita jak  $CD3^+$ , tak i  $CD8^+$  buněk, mají lepší přežívání oproti nízkým denzitám T lymfocytů v dané oblasti. Stejně tak nízké zastoupení  $CD3^+$  buněk v zóně mezi 20 – 30  $\mu m$  bylo spojeno s lepším přežíváním pacientů. Tento efekt vysvětluje s odkazem na studii publikované Halamou, kde fenotypový přesmyk makrofágů do forem M1 mohl mít stimulační efekt na  $CD8^+$  buňky [238].

#### ***4.4.3.4 Zvláštní typy lymfocytů***

Do této skupiny lymfocytů můžeme zařadit T lymfocyty tvořené  $\gamma\delta$  řetězci ( $\gamma\delta$ -T Lymfocyty) a invariantní Natural Killer T lymfocyty (NKTs).

Označení  $\gamma\delta$ -T Lymfocyty je dáno podle  $\gamma\delta$  řetězců tvořících TCR. Jedná se o menšinou skupinu lymfocytů, která je schopna se vyvíjet mimo thymus a rozeznávat alternativní nativní antigení struktury, než jsou klasické MHC gp. Jsou však schopné rozpoznat i ligandy pro NKG2D. Svým chováním jsou někdy podobné klasickým NKs. Jsou aktivované při poranění buněk, uplatňují se v imunitě slizničních epitelů a v obraně proti mykobakteriím. V obraně proti CRC se jeví jako silný cytotoxický efektor. Stimulace těchto buněk tak může být jednou z cest protinádorové imunoterapie [38 s. 139-140, 239, 240].

NKTs na svém povrchu vykazují znaky, které můžeme pozorovat u T lymfocytů (TCR), ale také exprimují aktivační i inhibiční receptory typické pro NKs. Pomocí těchto receptorů rozeznávají lipidové struktury v buněčných membránách (např. bakteriální glykolipidy a fosfolipidy). Jednotlivé antigení struktury jsou obvykle prezentovány DCs na molekule CD1d (struktura podobná MHC gp I). V případě, že jsou NKTs stimulovány přes TCR receptor, prakticky okamžitě vyplavují celou řadu působků (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ ), kterými se podílejí na imunoregulaci, a jsou pojítkem mezi nespecifickou a specifickou imunitní reakcí.

NKTs jsou velmi heterogenní populace lymfocytů. Na základě rozdílnosti v  $\alpha$  řetězci TCR, přítomnosti povrchového markeru NK 1.1 a závislosti na CD1d lze NKTs dělit na typ NKTs I a NKTs II [38 s. 140, 241, 242]. NKTs I se prozatím jeví jako buňky s hojnou intratumorální akumulací. U pacientů s CRC jsou spojeny i s lepší prognózou onemocnění. Jejich efekt je daný navozením apoptózy cílových buněk cestou FasL, aktivací perforinů a granzymů a produkcí IFN- $\gamma$  [241]. Význam NKTs II je v současnosti nejvíce prostudován na myších modelech. NKTs II mají imunomodulační efekt na NKTs I, způsobují vyšší toleranci DCs, inhibují efektorové T buňky, aktivují B lymfocyty a jejich diferenciaci do plazmatických buněk. Ve střevech myši i lidí se projevují jako proinflamatorní elementy. V rámci tumorigeneze působí na zvířecích modelech jako imunosupresní a napomáhají k progresi nádorového onemocnění [243].

#### **4.4.3.5 Granzymy**

Granzymy jsou cytolytické enzymy, které imunitní buňky využívají k likvidaci postižených buněk. Granzymy jsou serinové proteázy. Nejvíce jsou zastoupeny v Tc lymfocytech a NKs, ale granzym B byl objeven také v DCs, mastocytech nebo basofilech.

Sporné jsou nálezy granzymů v neutrofilech. Granzymy mohou být přítomné také v jiných somatických buňkách (trofoblast, ovariální buňky, spermatocyty, chondrocyty, neurony apod.). U člověka se vyskytuje pět typů granzymů - A,B,H,K,M z celkových 12 typů granzymů. Tvorba granzymů je stimulována při aktivaci T buněk přes TCR současně za účasti cytokinů. Z cytokinů se uplatňují např. IL-2, IL-6, IL-15, IL-21, IL-27. Tyto cytokiny pak spouštějí transkripční pochody. Např. pro granzym B, který je nejvíce prozkoumaný, se uplatňují transkripční faktory STAT1, T-bet nebo Eomesodermin. Vytvořené signální peptidy jsou skladovány v endoplasmatickém retikulu. Odtud jsou uvolněny do Golgiho aparátu, kde po vazbě s manosa-6-fosfátem je proenzym přesunut do lysozomů. Lysozomy jsou skladovány v cytotoxických granulech, kde jsou N-terminální části štěpeny katepsinem C na dipeptidy. Aby se zamezilo vysoké proteolytické aktivitě, jsou granzymy v granulech uchovávány ve vazbě na serglycin v kyselém prostředí. Po aktivaci příslušných povrchových receptorů se cytolytická granula přiblíží k okraji imunokompetentní buňky. Granzymy jsou uvolněny ze serglycerinu a po splynutí cytolytických granul s cytolazmatickou membránou jsou uvolněny do tzv. imunologické synapse mezi imunokompetentní buňkou a cílovou buňkou. Na cílovou buňku se granzymy vážou elektrostatickou interakcí spolu s vazbou na specifický receptor. Díky pórům v buněčných membránách způsobených perforinem proniknou granzymy do cytosolu nebo jádra buněk a vyvolávají apoptózu. Granzym A vyvolává apoptózu zásahy do DNA a je nezávislý na blokádě kaspázy. Granzym B vyvolává apoptózu buněk rozštěpením kaspázy 3 a jejich substrátů. Granzym M aktivuje autofagii. Kromě cytotoxického účinku se granzymy podílejí i na aktivaci lokální zánětlivé odpovědi, podporují proteolýzu extracelulární matrix a omezují migraci nádorových buněk [244, 245, 246]. Pagés i Salama ve svých studiích prokázali, že granzym B a jeho nízká exprese jsou spojeny s časným metastazováním CRC [232, 247]. Vyšší zastoupení CD8<sup>+</sup> a Granzymu B v CRC je spojeno s nižším stádiem onemocnění a také s lepším OS [248].

#### **4.4.3.6 *Serpiny***

Imunokompetentní buňky, které uvolňují granzymy, jsou proti jejich účinku chráněny specifickými inhibitory, tzv. serpiny (inhibitor serinové proteázy), které blokují především granzym B. Blokádá je způsobena nevratnou kovalentní vazbou. Tento

inhibitor se nachází u lymfocytů, DCs, ale i v endoteliích nebo mesoteliálních buňkách. Zvýšená exprese serpinů je indukována estrogyeny a hypoxií. Efekt hypoxie na expresi serpinů byl popsán i v tumorech. Zvýšená přítomnost serpinů pak může být příčinou sníženého efektu granzymů a důvodem nádorové rezistence vůči imunokompetentním buňkám [244]. Trend vyšší exprese serpinu A3 ve tkáňových vzorcích byl pozorován u pacientů s diseminovaným onemocněním. Sérové hladiny serpinu A3 korelovaly se systémovou zánětlivou odpovědí, ale nezávisle na tíži nádorového postižení [249]. Long ve své metaanalýze neprokázal rozdíly v zastoupení serpinu A3 mezi jednotlivými stádii CRC. Ve své expresní studii však prokázal významnou downregulaci genové exprese pro serpin A3 u agresivních linií CRC. Publikaci uzavírá s tím, že je nezbytné další studium chování serpinu A3, protože může být potenciálním prognostickým a diagnostickým markerem [250].

#### **4.4.4 Význam stanovení tumor infiltrujících lymfocytů a imunoscore**

V současné době je tumor a jeho šíření klasifikován TNM systémem a na jeho podkladě stanoveno stádium onemocnění, které určuje další směřování především onkologické léčby. Řada pacientů ve stejném stádiu onemocnění vykazuje rozdílné biologické chování CRC. Určitým omezením TNM klasifikace je, že velmi málo predikuje odpověď na léčbu a současně podává omezenou informaci o prognóze pacienta. Sledováním imunitní reakce organismu proti nádoru se může tento stav změnit [14]. Z tohoto důvodu byla vytvořena metoda tzv. imunoskóre, která má za cíl kvantifikovat a detekovat typy imunokompetentních buněk, jejich hustotu a lokalizaci. V řadě studií již byl popsán význam jednotlivých složek imunitního systému na prognózu a přežití pacientů s CRC. V rámci histologického vyšetření je možné hodnotit počet, typ a lokalizaci TILs [215]. Klasické barvení hematoxylinem a eosinem umožňuje rozlišení lymfocytů od granulocytů. Dalšími specifickými barveními a imunohistochemickým stanovením pak lze detekovat zastoupení jednotlivých leukocytárních linií. Důležitá je i lokalizace TILs ve vztahu k tumoru. U TILs můžeme sledovat jejich zastoupení v samotném tumoru tzv. – intratumoralní lymfocyty, dále pak intrastromální lymfocyty nebo lymfocyty přítomné v invazivní části tumoru. Také můžeme pozorovat tzv. Crohn-like reakci lymfocytů [251]. Při Crohn like reakci dochází k agregaci lymfocytů uvnitř stěny střeva v muscularis propria

nebo v perikolické tukové a vazivové tkáni proti invazivní linii CRC. Harisson např. prokázal, že Crohn like reakce byla spojena s lepším 5 letým OS pacientů s CRC [252].

V rámci imunoskóre je hodnoceno zastoupení TILs na stupnici od 0 (nízká) do 4 (vysoká), a to jak v centru tumoru, tak i v jeho invazivních okrajích. V současné době se nejvíce validní jeví sledování zastoupení CD3/CD45R0, CD3/CD8 a CD8/CD45R0. Galon udává, že u pacientů s CRC ve stadiu I až III přináší imunoskóre informaci o jejich prognóze, protože je velmi významně spojen s DFI a OS pacientů. Vypovídá tak lépe o případné rekurenci nádorového onemocnění než samotná TNM klasifikace [14]. Před samotným zavedením imunoskóre do běžné klinické praxe je nutné prokázat reprodukovatelnost a proveditelnost tohoto vyšetření (v současné době se zkoumají možnosti počítačového odečtu CD3<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk), dále přesně stanovit prognostický dopad u pacientů s CRC a vyselektovat pacienty ve II. klinickém stádiu CRC, kteří mají vysoké riziko rekurence [14, 253].

## 5. Cíle

Cílem dizertační práce je:

1. Ověřit efekt aplikace SCs po PVE ve vztahu k nárůstu FLRV, nárůstu objemu CLM v období mezi PVE a resekčním výkonem, dosažení resekability CLM a u resekovaných pacientů vztah k DFI a OS.
2. Stanovení tumor infiltrujících lymfocytů u pacientů po resekcí jater pro CLM, u pacientů po PVE a pacientů po PVE s aplikací SCs ve vztahu k prognóze onemocnění, DFI, OS a výši rizika recidivy onemocnění
3. Stanovení transportérů ABCC10 a ABCC11 u pacientů po resekcí jater pro CLM ve skupinách primárně operabilních pacientů, pacientů po PVE a PVE s aplikací SCs a jejich vztah k DFI a OS.

## 6. Metodika

V rámci retrospektivní studie jsme hledali prognostické faktory PVE a PVE s aplikací SCs. Vzhledem k několika cílům této práce rozdělujeme metodiku podle jednotlivých cílů.

### 6.1 Studie sledování efektu PVE a PVE s aplikací SCs na FLRV a CLM

#### 6.1.1. Pacienti a metoda

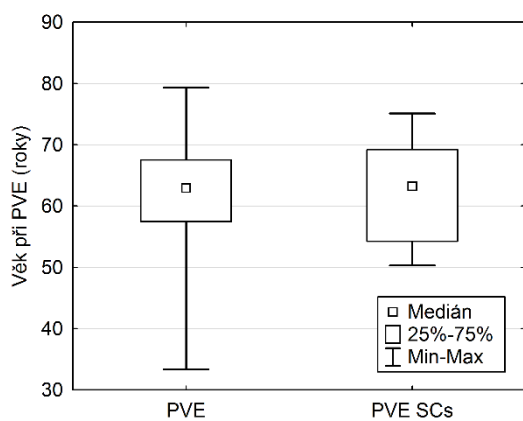
Do studie byli zahrnuti pacienti s primárně inoperabilními CLM za období od 1.1.2004 do 31.12.2015, kteří byli na Chirurgické klinice FN Plzeň indikováni k PVE (v období 2004 - 2015) nebo PVE s aplikací SCs (PVE SCs) (období 2010-2015).

Výše uvedené výkony byly v uvedených datech provedeny celkem u 63 pacientů. Před zařazením do studie pacienti podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena Etickou komisí FN Plzeň a Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy. Do skupiny s provedenou PVE bylo zařazeno 43 pacientů, ve skupině PVE SCs bylo zařazeno 20 pacientů. Z daných skupin jsme ještě vyčlenili pacienty, kteří měli vstupní FLRV menší než 30 %. Získali jsme tak skupinu PVE 30, kam bylo zařazeno 25 pacientů a skupinu PVE SCs 30, která obsahovala 8 pacientů (tab. 1). Věkový rozdíl mezi skupinami PVE a PVE SCs byl bez statisticky signifikantního rozdílu (Mann-Whitney U test,  $p=0,8535$ ) (obr. 18.), stejně tak i mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30 (Mann-Whitney U test,  $p=0,7848$ ) (obr. 19). Vstupní FLRV byl mezi sledovanými skupinami bez statisticky signifikantních rozdílů jak pro porovnání PVE a PVE SCs tak i pro PVE 30 a PVE SCs (Mann-Whitney U test,  $p=0,5303$  a  $p=0,2312$ ) (obr. 20 a 21). Průměrný vstupní FLRV byl u PVE 29,2 % (15,1 % – 47,3 %, medián 28,6 %), u PVE SCs 30,2 % (15,3 – 45,6 %, medián 30,7 %). Ve skupině PVE 30 byl průměrný vstupní FLRV 25,2 % (15,2 % - 29,9 %, medián 26,1 %) a průměrný vstupní FLRV ve skupině PVE SCs 30 byl 22,8 % (15,3 % - 29,5 %, medián 21,7 %).

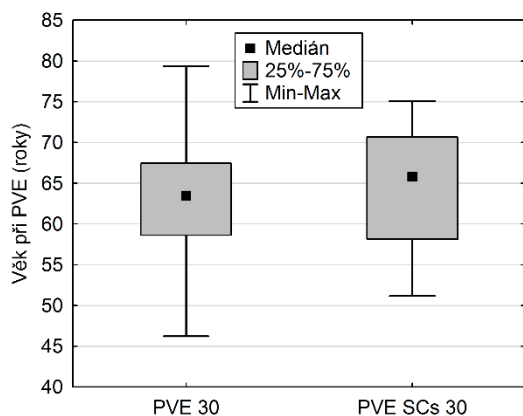


Tabulka č. 1	PVE	PVE SCs
	PVE 30	PVE SCs 30
Celkem	43	20
	25	8
Muži	34	17
	20	6
Ženy	9	3
	5	2
Průměrný věk (min–max) (roky)	61,9 (33–79)	62,8 (50–75)
	62,9 (46–79)	64,4 (51–75)

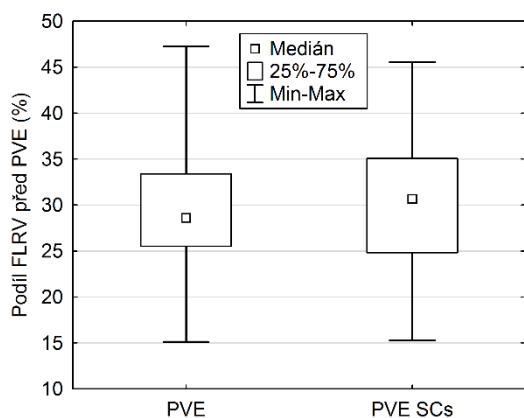
Tab.1: charakteristika souboru pacientů se stanovením FLRV



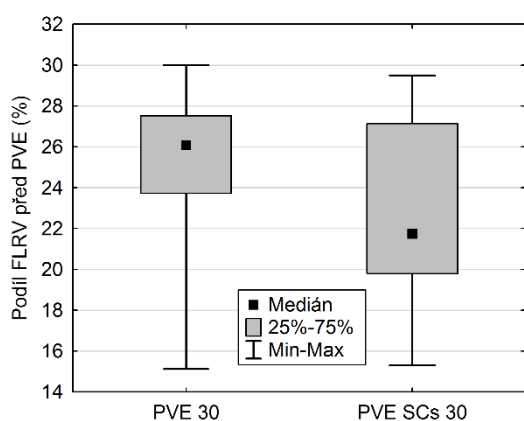
Obr. 18: rozložení pacientů dle věku mezi skupinami PVE a PVE SCs (Mann-Whitney U test,  $p=0,8535$ )



Obr. 19: rozložení pacientů podle věku mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30 (Mann-Whitney U test,  $p=0,7848$ )



Obr. 20: vstupní FLRV mezi skupinami PVE a PVE SCs v procentech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,5303$ )



Obr. 21: vstupní FLRV mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30 v procentech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,2312$ )

### 6.1.2 Indikace k PVE a PVE SCs

K PVE, resp. PVE SCs byli indikováni primárně inoperabilní pacienti, kteří podepsali informovaný souhlas s navrhovanou metodou léčby. Příčinou inoperability bylo buď nízké vstupní FLRV (méně než 30 %), nebo se jednalo o pacienty, u kterých jsme se obávali pooperačního selhání v důsledku prodloužené onkologické léčby před jaterní resekcí. Embolizační výkony byly prováděny u pacientů bez extrahepatálního metastatického rozsevu.

### 6.1.3 Provedení PVE

Všichni pacienti podstoupili PVE perkutánní transhepatální cestou. Pro samotnou embolizaci byla použita směs Histoacrylu (BBraun, Tutlingen, Německo) a Lipiodolu

Guerbert, Rennes, Francie) v poměru 1:10. U pacientů ve skupině PVE SCs byl s odstupem 24 hodin po PVE intraportálně podán derivát s kmenovými buňkami.

#### **6.1.4 Zisk, zpracování a aplikace kmenových buněk**

Kmenové buňky byly získány dvěma způsoby. Prvním byl odběr HSC z periferní krve. Druhým způsobem byl zisk HSC z kostní dřeně. Ze získaných derivátů bylo změřeno zastoupení CD133+ a CD34+ buněk

##### **6.1.4.1 Odběr kmenových buněk z periferní krve**

Odběr byl proveden celkem u 10 pacientů. Po dobu 4 dnů před PVE pacienti podstoupili stimulaci uvolnění SCs z kostní dřeně pomocí faktoru stimulující kolonie granulocytů (preparát Neupogen, Filgrastim, Amgen Europe B.V., Breda, Nizozemsko) v dávce 10ug/kg/den. Pátý den byla provedena aferéza a separace SCs na přístroji Cobe Spectra (BCT, Lakewood, CO, USA) a uchovány v citrátovém antikoagulans (ACD-A, Baxter, Deerfield, IL USA). Aplikace získaných SCs byla provedena v celkové anestezii 24 hodin po PVE.

##### **6.1.4.2 Odběr kmenových buněk z kostní dřeně**

Tento odběr byl proveden taktéž u 10 pacientů. Odběr probíhal 24 hodin po provedení PVE. Pacientům byla v celkové anestezii odebrána kostní dřeň z lopat kostí kyčelních. Kostní dřeň byla následně zpracována centrifugací v přístroji SynGenX™ Stem Cell Processing System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) na základě hmotnostních gradientů buněk. Produkt s SCs byl pacientům intraportálně aplikován ihned po zpracování v centrifugačním systému.

##### **6.1.4.3 Aplikace kmenových buněk**

Aplikace produktu s SCs probíhala v celkové anestezii. U pacientů s odběrem kostní dřeně byla aplikace provedena ve stejné celkové anestezii jako odběr kostní dřeně. Postup aplikace byl u obou typů produktů shodný. U pacienta byl zjednáán přístup do dutiny břišní střídavým řezem v pravém podbřišku. V ileocékální oblasti jsme vypreparovali žilní arkádu, přes kterou intervenční radiolog provedl katetrizaci neokludovaného portálního řečiště. Přes katetr jsme aplikovali produkty s SCs do

neokludovaného portálního řečiště. Žilní arkáda byla ošetřena opichovou ligaturou a dutinu břišní jsme uzavřeli po jednotlivých vrstvách.

### **6.1.5 Volumetrie jater a výpočetní tomografie**

Efekt PVE a PVE s aplikací SCs byl hodnocen pomocí opakované CT volumetrie jater, kde byly vypočítány celkový objem jater (Total Liver Volume, TLV), FLRV a objem metastáz (Volume of Liver Metastasis, VLM). CT volumetrie byly provedeny na přístroji Somatom Definition Flash (Siemens, Mnichov, Německo) a Somatom Sensation (Siemens, Mnichov, Německo) před PVE, a to v období nejdéle 1 měsíc před PVE. Další měření bylo provedeno 3 týdny po provedení PVE. CT volumetrie vyhodnocoval stejný tým radiologů semiautomatickým softwarem Syngo, Via Liver Analysis (Siemens, Mnichov, Německo).

### **6.1.6 Sledování pacientů**

U 5 pacientů (11,6 %) ze skupiny PVE bylo od chirurgického výkonu ustoupeno z důvodu jasné progresse maligního onemocnění na CT vyšetření (nárůst bilobárních jaterních metastáz, nově zjištěné metastázy plic a peritonea). Ostatní pacienti byli indikováni k operačnímu výkonu. Získaná data z CT volumetrií byla porovnána mezi skupinami PVE a PVE SCs. Spolu s těmito daty jsme získali i data z pravidelných kontrol při dispenzarizaci pacientů v pooperačním období. Obě sledované skupiny byly vzájemně porovnány ve vztahu k OS, DFI, rozvoje extrahepatálních metastáz a dosažení resekcčního výkonu. Sledovaná data byla samostatně vyhodnocena i u skupin PVE 30 a PVE SCs 30.

## 6.2 Stanovení tumor infiltrujících lymfocytů

V této práci byla při stanovení TILs využita metodika provedená v rámci studií Nováka a Vyčítala. Autoři se v těchto studích zabývali stanovením TILs u pacientů s primárním CRC [196, 251].

### 6.2.1 Pacienti a metoda

V rámci studie bylo stanoveno zastoupení TILs u pacientů po rozsáhlé (více než 3 segmenty) jaterní resekci pro CLM). Hodnoceny byly resekáty ze tří skupin pacientů: 1. primárně operabilní, 2. resekabilní po předchozí PVE a 3. resekabilní po předchozí PVE s aplikací SCs. Celkem byly hodnoceny vzorky od 101 pacientů (PVE 26 pacientů, PVE SCs 13 pacientů a primární resekce jater u 62 pacientů) (tab. 2). Exkluzivním kritériem byla duplicitní malignita v anamnéze. U 3 pacientů byl v době výkonu nález plicních metastáz, které však byly indikované k resekčnímu výkonu v druhé době. Pooperační sledování bylo prováděno v rámci běžné dispenzarizace pacientů.

Tabulka č. 2	PVE	PVE SCs	Primárně resekabilní
Celkem	26	13	62
Muži	21	11	37
Ženy	5	2	25
Průměrný věk	60,6	63,0	63,1

Tab.2: charakteristika souboru pacientů se stanovením TILs

### 6.2.2 Histopatologické vyšetření vzorků

Histopatologická vyšetření byla provedena na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy. K vyšetření byly použity tkáně jaterních resekátů, které byly fixované ve 4 % formaldehydu a následně zality do parafínových bloků. Z těchto vzorků byly vytvořeny preparáty pro mikroskopické vyšetření a to nařezáním na 5 $\mu$ m řezy s následným obarvením v hematoxilinu – eosinu. V těchto preparátech bylo hodnoceno zastoupení lymfocytů. Kvalitativní hodnocení bylo využito při stanovení lokalizace lymfocytů – infiltrace intratumorální ITL, intrastromální

(ISL), peritumorální (PTL) a Crohn like (Crohn – like). V rámci semikvantitativního hodnocení se hodnotila síla infiltrace v dané lokalizaci pomocí čtyřstupňové systému: 0 = žádná infiltrace, 1 = mírná infiltrace, 2 = střední infiltrace, 3 = závažná infiltrace.

### **6.2.3 Imunohistochemická vyšetření vzorků**

Pozitivní i negativní kontroly byly provedeny pomocí tkáně z palatinální lymfatické uzliny. Míra infiltrace lymfocytů byla hodnocena v pěti zorných polích v high power microscopical fields (HPF). Pro hodnocení byl opět použit semikvantitativní čtyřstupňový systém: 0 = žádná infiltrace, 1 = mírná infiltrace, 2 = střední infiltrace, 3 = závažná infiltrace. Značení primární protilátkou bylo provedeno supersenzitivním streptavidin-biotin peroxidázovým komplexem (Biogenex, San Ramon, Kalifornie, USA).

Ke stanovení TILs bylo využito barvení s protilátkami na CD4 (klon SP35, dále neředěno, Ventana, Rocklin, Kalifornie, USA) a CD8 (klon C8/144B, 1.50, Dako, Glostrup, Dánsko). K detekci T reg lymfocytů bylo využito barvení s protilátkami proti FoxP3 (klon mAbcam 450, 1:20, Abcam, Cambridge, Velká Británie) a CD25 (klon 4C9, dále neředěno, Ventana, Rocklin, Kalifornie USA). Z preparátů byly odečítány pozitivní lymfocyty.

Ke stanovení NKs bylo využito imunohistochemické barvení na CD57 (klon NK-1, dále neředěno, Ventana, Kalifornie, USA) s odečty pozitivních nenádorových buněk. Cytotoxická odpověď imunokompetentních buněk vůči nádorovým buňkám byla sledována barvením proti Granzymu B (klon 11F1, 1:30, Leica Biosystems, USA). V rámci tohoto barvení byla sledována pozitivita nenádorových buněk. Efekt inhibitorů granzymů byl u nádorových buněk sledován pomocí protilátek proti Serpinu B (klon P19-17, 1:100, Abcam, Cambridge, Velká Británie). Stimulační aktivita APC buněk byla sledována pomocí protilátek proti CD86 (klon EP1158Y, dále neředěno, Abcam, Cambridge, Velká Británie).

### **6.2.4 Sledování pacientů**

Zastoupení TILs u jednotlivých skupin bylo statisticky vyhodnoceno s daty získanými v rámci dispenzarizace pacientů, a to ve vztahu k DFI a OS. Byl sledován prognostický význam jednotlivých TILs u pacientů resekovaných pro CLM, včetně vztahu k použití PVE a PVE s apliakcí SCs před resekčním výkonem.

### 6.3 Stanovení ABCC10 a ABCC11

K imunohistochemickému stanovení ABC transportérů byla využita metodika provedená v rámci studie Křížkové [49], která sledovala zastoupení ABCC10 a ABCC11 transportérů u pacientů s CRC. Z předchozích prací vyplynulo, že právě tyto transportéry jsou u pacientů s CRC spojeny s rizikem recurence onemocnění a úmrtím pacientů [48,49]. Na základě výsledků těchto prací jsme se rozhodli zhodnotit ABCC10 a ABCC11 i u pacientů s CLM.

#### 6.3.1 Pacienti a metoda

Ke stanovení ABCC10 a ABCC11 byly použity vzorky od pacientů s CLM, kteří podstoupili rozsáhlou (více než 3 segmenty) jaterní resekci. Vzorky byly opět hodnoceny v rámci tří skupin. 1. primárně resekabilní, 2. resekabilní po předchozí PVE, 3. resekabilní po předchozí PVE s aplikací SCs. Celkem byly zhodnoceny vzorky od 86 pacientů (primárně operabilní 54 pacientů, PVE 23 pacientů, PVE SCs 9 pacientů) (tab. 3). Skupiny vycházejí ze souboru pacientů použitého pro hodnocení TILs. V důsledku horší kvality preparátů však nebylo možné provedení odečtů u většího počtu pacientů.

<b>Tabulka č. 3</b>	PVE	PVE SCs	Primárně resekabilní
Celkem	23	9	54
Muži	19	7	32
Ženy	4	2	22
Průměrný věk	60,8	61,4	63,3

Tab.3: charakteristika souboru pacientů se stanovením ABCC10 a ABCC11

#### 6.3.2 Histopatologické vyšetřené vzorků

Stanovení ABCC10 a ABCC11 bylo provedeno na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze. K vyšetření byly využity vzorky CLM fixované ve 4 % formaldehydu zalité do parafinových bločků. Následně byly 5 µm řezy získány vzorky k obarvení v heamtoxilinu – eosinu. Na těchto vzorcích bylo provedeno

imunohistochemické barvení pomocí protilátek proti ABCC10 (M71-3, 1:10, Abcam, Cambridge, Velká Británie) a ABCC11 (M81-74, 1:10, Abcam, Cambridge, Velká Británie).

K mikroskopickému vyšetření byl využit objektiv se 40 násobným zvětšením. Od každého pacienta byl vyšetřen 1 mikroskopický vzorek v 8 zorných polích. Kvantifikace ABCC10 a ABCC11 byla provedena pomocí stereologických metod softwarem Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovenská republika). Tato metoda počítá průsečíky mezi sledovanými body na stereologické mřížce, která je náhodně umístěna na mikroskopickém obrázku [254]. Ve sledovaných oblastech bylo průměrně stanoveno 243 průsečíků pro ABCC10 a 260 průsečíků pro ABCC11.

### **6.3.3 Sledování pacientů**

Míra zastoupení ABCC10 a ABCC11 u jednotlivých skupin byla statisticky vyhodnocena s daty získanými v rámci dispenzarizace pacientů, a to ve vztahu k DFI a OS. Byl sledován prognostický význam ABCC10 a ABCC11 u pacientů resekovaných pro CLM, včetně vztahu k použití PVE a PVE s aplikací SCs a vztahu k onkologické léčbě.



## 6.4 Statistická metoda

Statistické metody použité pro jednotlivé analýzy jsou konkrétně popsány v následujících podkapitolách. Všechny analýzy byly provedeny v programu Statistica (StatSoft, Inc. 2013. Verze 12 Cz. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)). Všechny uváděné p-hodnoty jsou oboustranné a hladina statistické významnosti byla stanovena na  $\alpha = 0.05$ .

### 6.4.1 Analýza vlivu aplikace SCs při PVE

V rámci této analýzy byly zkoumány následující ukazatele objemových poměrů v játrech a jejich změn:

- TLV před PVE (ml)
- FLRV před PVE (ml)
- Podíl FLRV před PVE ( %) =  $100 \% * \text{FLVR před PVE} / \text{TLV před PVE}$
- VLM před PVE (ml)
- TLV po PVE (ml)
- FLRV po PVE (ml)
- Podíl FLRV po PVE ( %) =  $100 \% * \text{FLVR po PVE} / \text{TLV po PVE}$
- VLM před PVE (ml)
- Nárůst TLV (ml) – rozdíl TLV (po-před)
- Nárůst FLRV (ml) – rozdíl FLRV (po-před)
- Nárůst podílu FLRV (proc. bod) = Podíl FLRV po PVE ( %) - Podíl FLRV před PVE ( %)  
(o kolik procentních bodů se změnil podíl FLRV)
- Nárůst VLM (ml) – rozdíl VLM (po-před)
- Rychlost růstu TLV (ml/den) = Nárůst TLV / trvání PVE
- Rychlost růstu FLRV (ml/den) = Nárůst FLRV / trvání PVE
- Rychlost růstu podílu FLRV (proc. bod / týden) = Nárůst podílu FLRV / trvání PVE
- Rychlost růstu VLM (ml/den) = Nárůst VLM / trvání PVE

Rozdíly těchto ukazatelů mezi skupinami PVE a PVE SCs (případně mezi PVE 30 a PVE SCs 30) byly testovány pomocí Mannova-Whitneyho U testu. Korelace byly testovány pomocí Spearmanovy pořadové korelace. U resekovaných pacientů byl stanoven disease-free interval (DFI, stanoven od data výkonu do data recidivy, úmrtí pacienta nebylo

považováno za recidivu) a celkové přežití (OS). Statistická významnost rozdílů v OS a DFI mezi skupinami PVE a PVE SCs (případně mezi PVE 30 a PVE SCs 30) byla testována Gehanovým-Wilcoxonovým testem. Bodové odhady časů a kvantilů přežití byly vypočteny z Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití lineární interpolací mezi ukončenými pozorováními. Odhad mediánu follow-up byl stanoven pomocí inverzní Kaplanovy-Meierovy metody [255]. Rozdíly v pozorovaných relativních četnostech (incidence extrahepatálních metastáz, četnost explorativních laparotomií) byly testovány Fischerovým přesným testem.

#### **6.4.2 Analýza TILs, ABCC10 a ABCC11**

Jako primární popis klinických výstupů léčby byly opět zvoleny ukazatele přežití: DFI a OS. Souvislost DFI a OS s intezitou a charakterem TILs infiltrace byla zkoumána v závislosti na charakteru nezávislé proměnné následujícím způsobem:

**1. Ukazatele měřené kvantitativně (vyjádřené jako x/HPF).** Vliv těchto kvantitativních veličin byl zkoumán dvojím způsobem. Spojitá souvislost (úměrnost) mezi hodnotou indikátoru a ukazateli přežití byla nejprve testována jednorozměrným Coxovým modelem proporcionálních rizik. U nálezů statisticky významných (nebo blízkých statistické významnosti) byly pacienti následně stratifikováni dle mediánu příslušného ukazatele pozorovaného v celém souboru a dvě takto vzniklé skupiny byly následně porovnány (Kaplanova-Meierova analýza, Gehanův-Wilcoxonův test, stanovení poměru rizika mezi skupinami pomocí jednorozměrného Coxova modelu proporcionálních rizik).

**2. Ukazatele semikvantitativní (na škále 0-3).** Tyto veličiny byly zkoumány jak pomocí jednorozměrného Coxova modelu proporcionálních rizik (který je bere jako škálu), tak pomocí vícevýběrového testování (které jednotlivé úrovně bere jako skupiny bez zřetele na jejich pořadí – Kaplanova-Meierova analýza a vícevýběrové rozšíření Gehanova-Wilcoxonova testu).

**3. Poměry kvantitativně měřených ukazatelů** byly vyhodnoceny stejně jako samotné kvantitativní ukazatele popsané v bodě 1 s tím rozdílem, že před analýzou Coxovým modelem byly hodnoty poměrů logaritmicky transformovány (zlogaritmovány se základem 2). Tím bylo dosaženo jednak symetričtější distribuce veličiny a jednak faktické ekvivalence výsledku analýzy pro daný poměr a poměr převrácený. Poměry s opačným

pořadím proto nebylo potřeba testovat zvlášť. S problematickými hodnotami bylo naloženo takto:

- Pokud pro daného pacienta hodnota jednoho nebo obou porovnávaných TIL chyběla, byla výsledkem opět chybějící hodnota.
- Pro poměr 0/0 byla výsledkem chybějící hodnota.
- Hodnoty logaritmu menší než -5 (tedy poměr 1/32), případně větší než 5 (tedy poměr 32/1) byly nahrazeny hodnotami -5 a 5 (v tomto pořadí).
- Za logaritmy poměrů 0/x, případně x/0 ( $x \neq 0$ ) byly opět dosazeny hodnoty -5 a 5 (v tomto pořadí)

Bodové odhady časů a kvantilů přežití byly vypočteny z Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití lineární interpolací mezi ukončenými pozorováními. Odhad mediánu follow-up byl stanoven pomocí inverzní Kaplanovy-Meierovy metody [255].

Rozdíly ukazatelů TIL mezi dvěma skupinami byly testovány pomocí Mannova-Whitneyho U testu, mezi třemi skupinami pak pomocí Kruskalovy-Wallisovy ANOVY. Rozdíly v zastoupení kategorií mezi skupinami byly testovány pomocí chí-kvadrát testu. Korelace byly testovány pomocí Spearmanovy pořadové korelace.

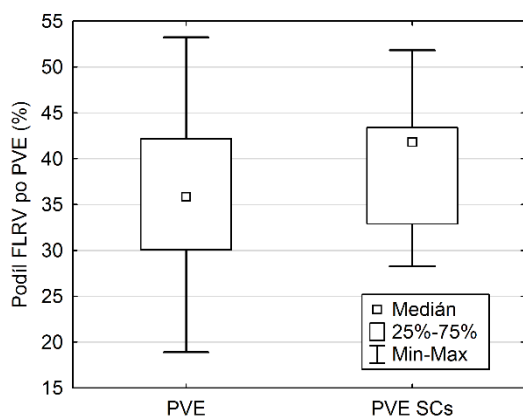
Rozdíly v plošném zastoupení ABCC10 a ABCC11 v závislosti na podání 5-FU byly testovány pomocí Mannova-Whitneyho U testu a dvoufaktorové analýzy rozptylu s interakcí.

## 7. Výsledky

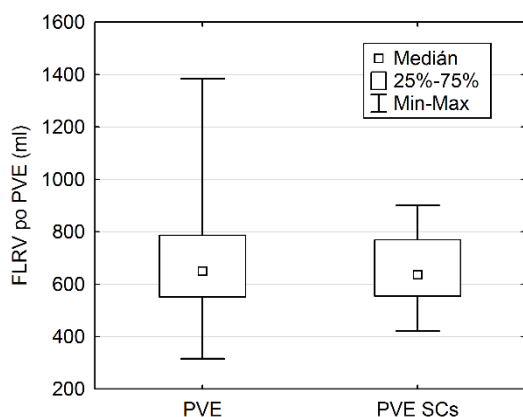
### 7.1 Efekt PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM

#### 7.1.1 Růst FLRV

Hodnocení nárůstu FLRV bylo provedeno po uplynutí 3 týdnů od provedené PVE. Porovnání skupin PVE a PVE SCs bylo bez statisticky signifikantních rozdílů. Průměrný FLRV byl u PVE 36,4 % (18,9 % - 53,3 %, medián 35,8 %) a u PVE SCs 39,6 % (28,3 % – 51,8 %, medián 41,8 %) (Mann-Whitney U test,  $p = 0,1348$ ) (obr. 22). Při vyjádření v mililitrech byl u PVE průměrný objem FLRV 666,5 ml (316 ml až 1385 ml, medián 650 ml) a u skupiny PVE SCs 651 ml (421 ml až 900 ml, medián 636 ml) (Mann-Whitney U test,  $p = 0,7977$ ) (obr. 23).

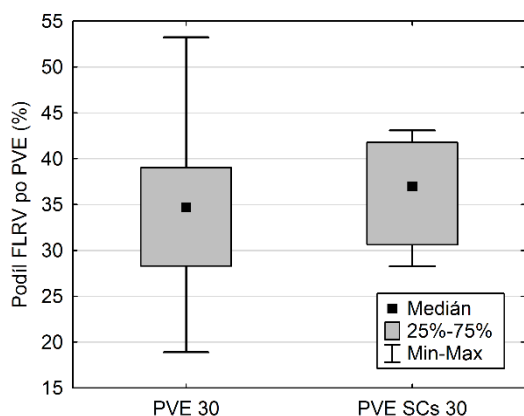


Obr. 22: FLRV po 3 týdnech od PVE, porovnání skupin PVE a PVE SCs v procentech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,1348$ )

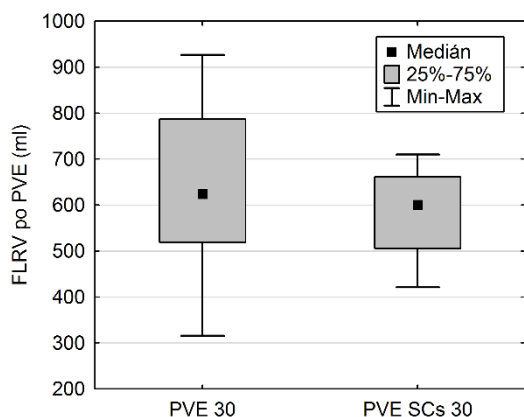


Obr. 23: FLRV po 3 týdnech od PVE, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,7797$ )

Statisticky nevýznamné byly i rozdíly v nárůstu FLRV mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30. U skupiny PVE 30 byl po 3 týdnech průměrný FLRV 34,9 % (18,9 % – 53,3 %, medián 34,7 %) a u PVE SCs 30 hodnoty 36,3 % (28,3 % – 43,1 %, medián 37,0 %) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,4447$ ) (obr. 24). Vyjádřením v mililitrech jsme u PVE 30 získali hodnoty průměrného FLRV 635,5 ml (316 ml – 927 ml, medián 624 ml). U PVE SCs 30 jsme dosáhli průměrného FLRV 583,5 ml (421,0 – 710 ml, medián 600,5 ml) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,4958$ ) (obr. 25).

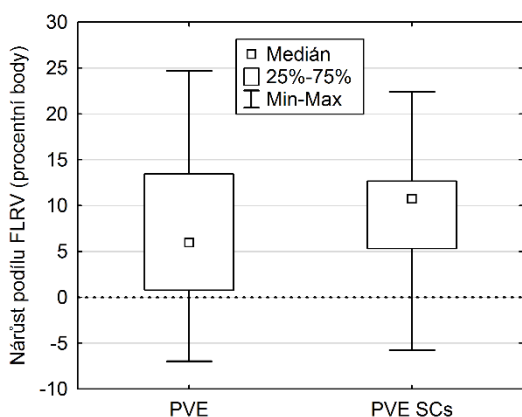


Obr. 24: FLRV po 3 týdnech od PVE, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v procentech (Mann-Whitney U test,  $p= 0,4447$ )

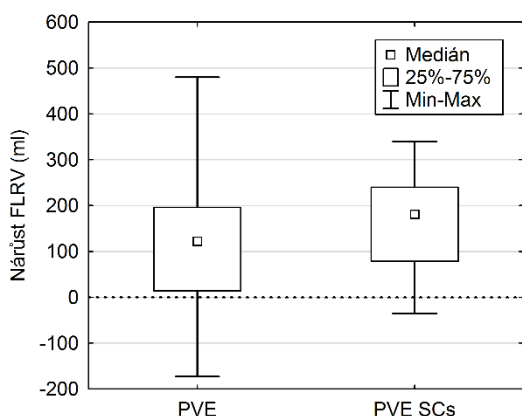


Obr. 25: FLRV po 3 týdnech od PVE, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p= 0,4958$ )

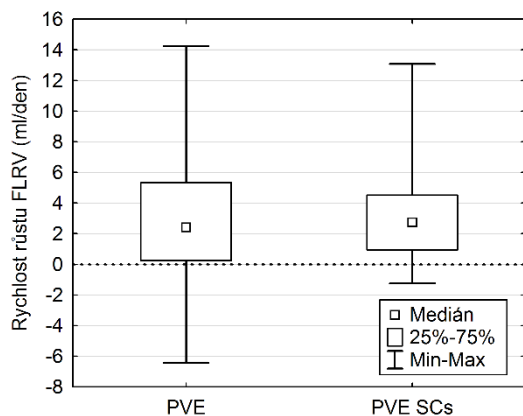
Po dobu 3 týdnů od provedení PVE byl průměrný nárůst FLRV u skupiny PVE o 7,2 procentních bodů (-7,0 – 24,7, medián 6,0 procentních bodů) a u PVE SCs o 9,4 procentních bodů (-5,8 – 22,4, medián 10,7 procentních bodů) (Mann-Whitney U test,  $p=0,2548$ ) (obr. 26.). Vyjádříme-li průměrný nárůst FLRV v mililitrech, pak u PVE jsme dosáhli průměrné hodnoty nárůstu o 121,2 ml (-173 ml – 480 ml, medián 122 ml) a u PVE SCs 157,4 ml (-35 ml – 340 ml, medián 181 ml) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,1830$ ) (obr. 27). Denní přírůstek FLRV byl u PVE v průměru 2,9 ml/den (-6,4 ml/den – 14,3 ml/den, medián 2,4 ml/den) a u PVE SCs a o 3,4 ml/den (-1,3 ml/den - 13,1 ml/den, medián 2,7 ml/den) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,6764$ ) (obr. 28). Výsledky nedosahují statistické významnosti.



Obr. 26: nárůst FLRV v průběhu 3 týdnů, porovnání skupin PVE a PVE SCs v procentních bodech (Mann-Whitney U test,  $p= 0,2548$ )

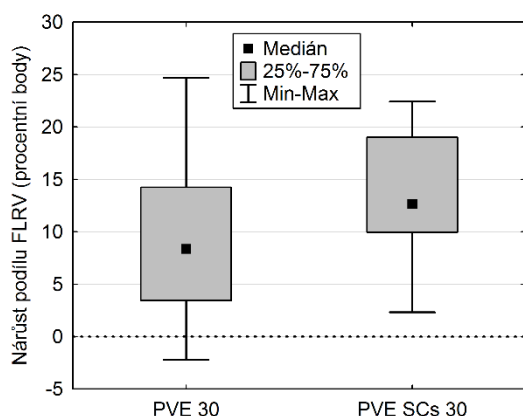


Obr. 27: nárůst FLRV v průběhu 3 týdnů, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p= 0,1830$ )

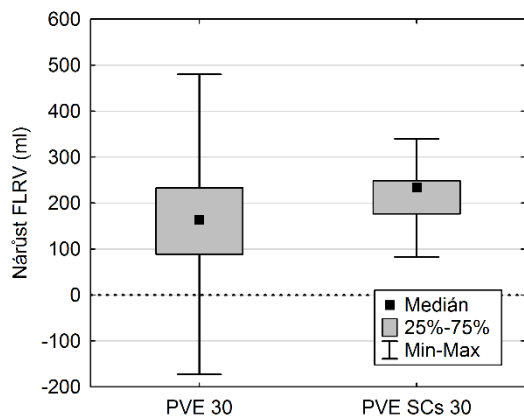


Obr. 28: denní nárůst FLRV, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech/den (Mann-Whitney U test,  $p=0,6764$ )

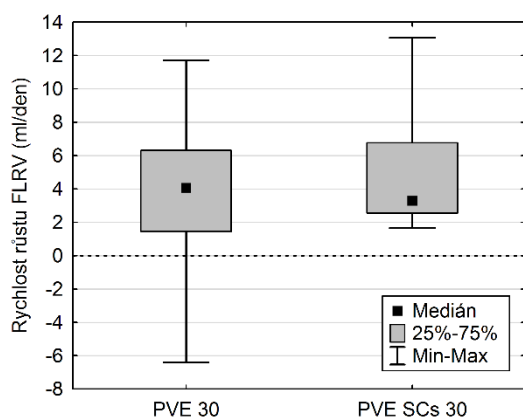
Průměrný nárůst FLRV v průběhu 3 týdnů od PVE byl u skupiny PVE 30 9,3 procentních bodů (-2,2 % – 24,7, medián 8,4 procentních bodů) a u PVE SCs 30 13,5 procentních bodů (2,3 – 22,4, medián 12,7 procentních bodů) (Mann-Whitney U test,  $p=0,1499$ ) (obr. 29). V mililitrech získáme u skupiny PVE 30 hodnoty průměrného nárůstu 167 ml (-173 ml – 480 ml, medián 164 ml) a u skupiny PVE SCs 30 byly hodnoty průměrného nárůstu 218 ml (83 ml – 340 ml, medián 235 ml) (Mann-Whitney U test,  $p=0,1897$ ) (obr. 30). Nárůst FLRV za den byl u PVE 30 v průměru 4,2 ml/den (-6,4 ml/den - 11,7 ml/den, medián 4,1ml/den), u PVE SCs 30 v průměru 5,0 ml/den (1,7 ml/den - 13,1 ml/den, medián 3,3) (Mann-Whitney U test,  $p=0,7890$ ) (obr. 31). Výsledky nevycházejí statisticky signifikantní.



Obr. 29: nárůst FLRV v průběhu 3 týdnů, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v procentních bodech (Mann-Whitney U test,  $p=0,1499$ )



Obr. 30: nárůst FLRV v průběhu 3 týdnů, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,1897$ )

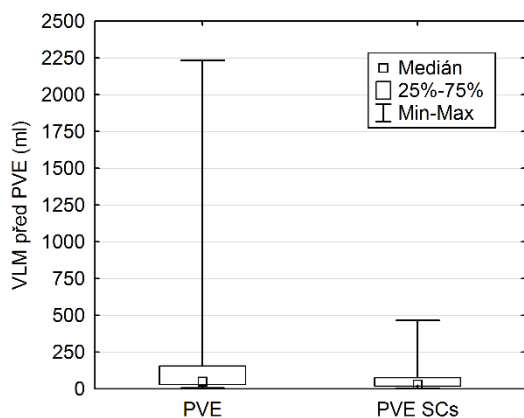


Obr. 31: denní nárůst FLRV, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech/den (Mann-Whitney U test,  $p = 0,7890$ )

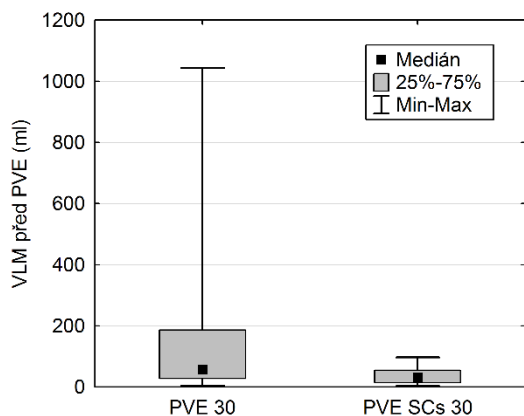
### 7.1.2 Růst jaterních metastáz a dopad na operabilitu nemocných

Statistická analýza vstupních VLM neprokázala signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami. Průměrný vstupní VLM byl u PVE 170,6 ml (5 – 2232ml, medián 50ml) a u PVE SCs 66,4ml (3,4 – 465ml, medián 31,5 ml) (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0598$ ) (obr. 32), u skupiny PVE 30 140,0 ml (5,0 – 1043,0 ml, medián 57 ml) a PVE SCs 30 37,6 ml (3,4 – 97,0 ml, medián 31,5 ml) (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0891$ ) (obr. 33).



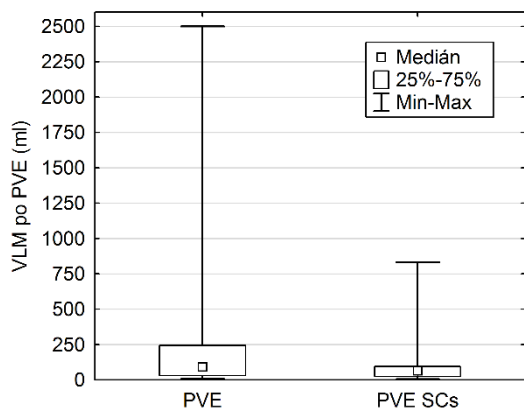


Obr. 32: vstupní VLM, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p=0,0598$ )

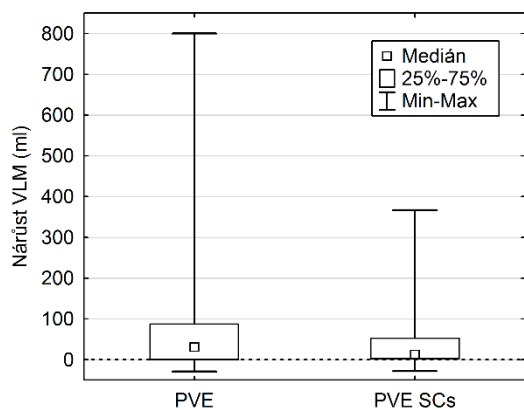


Obr. 33: vstupní VLM, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p=0,0891$ )

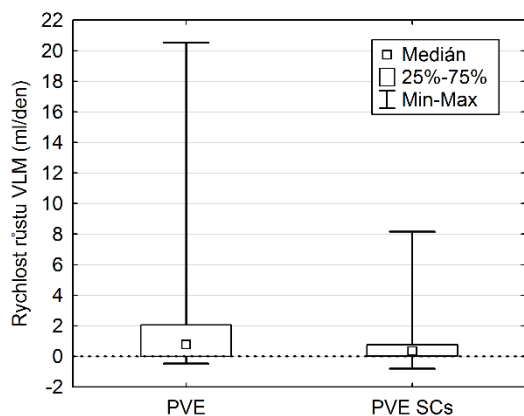
Průměrný VLM 3 týdny po PVE byl u PVE 261,1 ml (7ml – 2500ml, medián 91,5ml) a u PVE SCs 108 ml (5ml – 832,0 ml, medián 64,5ml) (Mann-Whitney U test,  $p=0,0651$ ) (obr. 34). Ve skupinách jsme tak v průběhu 3 týdnů mohli pozorovat nárůst VLM u PVE v průměru o 81,1ml (-29,0 – 800,0 ml, medián 30,6) a u PVE SCs 41,5 ml (-28,0 – 367,0 ml, medián 12,5) (Mann-Whitney U test,  $p=0,5180$ ) (obr. 35). V přepočtu na dny jsme sledovali přírůstek v průměru o 2,0 ml/den (-0,5 ml/den – 20,5 ml/den, medián 0,8 ml/den) u PVE a u skupiny PVE SCs 0,9 ml/den (-0,8 – 8,2 ml/den, medián 0,4 ml/den) (Mann-Whitney U test,  $p=0,2714$ ) (obr. 36). V nárůstu VLM nebyl mezi sledovanými skupinami statisticky signifikantní rozdíl.



Obr. 34: VLM po 3 týdnech od provedené PVE, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0651$ )

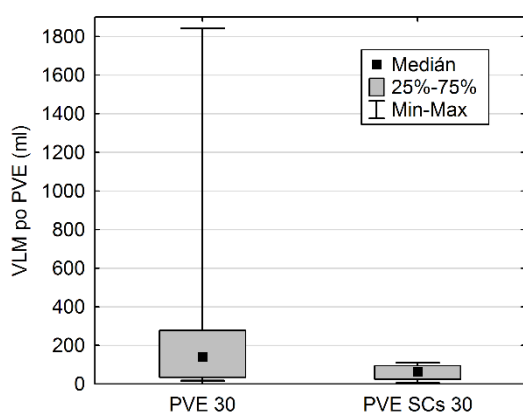


Obr. 35: nárůst VLM v průběhu 3 týdnů po provedené PVE, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p = 0,5180$ )

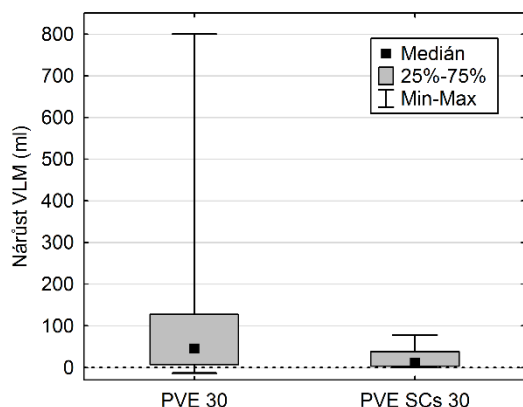


Obr. 36: nárůst VLM za den, porovnání skupin PVE a PVE SCs v mililitrech/den (Mann-Whitney U test,  $p = 0,2714$ )

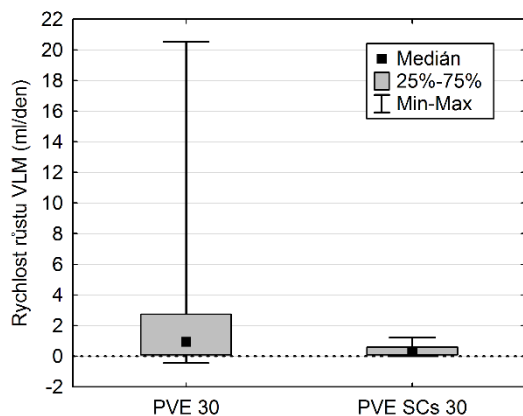
Ve skupinách se vstupním FLRV do 30 % bylo po 3 týdnech od provedené PVE dosaženo VLM 252,7 ml (18 ml – 1843 ml medián 141 ml) u skupiny PVE 30 a u PVE SCs 30 pak 60 ml (5ml – 110 ml, medián 64 ml) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,0563$ ) (obr. 37). Nárůst VLM v průběhu 3 týdnů od provedené PVE byl v průměru o 99,6 ml (-13ml - 800 ml, medián 46 ml) u PVE 30 a u PVE SCs 30 byl průměrný nárůst o 23 ml (0 ml – 78 ml, medián 11,5 ml) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,2563$ ) (obr. 38). V přepočtu na dny jsme sledovali přírůstek u PVE 30 v průměru o 2,4 ml/den (-0,4 - 20,5 ml/den, medián 0,9 ml/den) a u PVE SCs 30 byl průměrný růst VLM o 0,4 ml/den (0 ml/den – 1,2 ml/den, medián 0,3 ml/den) (Mann-Whitney U test,  $p= 0,1555$ ) (obr. 39). Ani zde nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl mezi sledovanými skupinami.



Obr. 37: VLM po 3 týdnech od provedené PVE, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p= 0,0563$ )

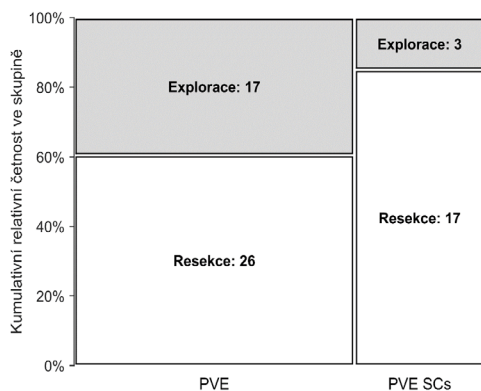


Obr. 38: nárůst VLM v průběhu 3 týdnů po provedené PVE, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech (Mann-Whitney U test,  $p= 0,2563$ )

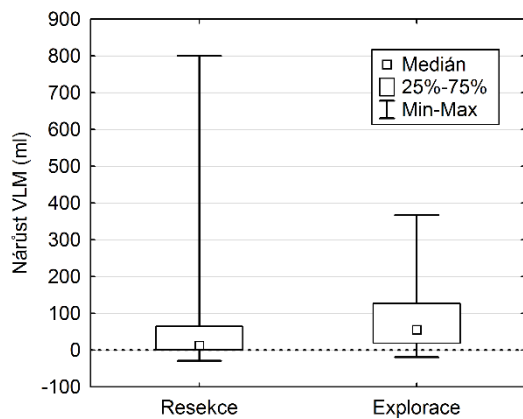


Obr. 39: nárůst VLM za den, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 v mililitrech/den (Mann-Whitney U test,  $p=0,1555$ )

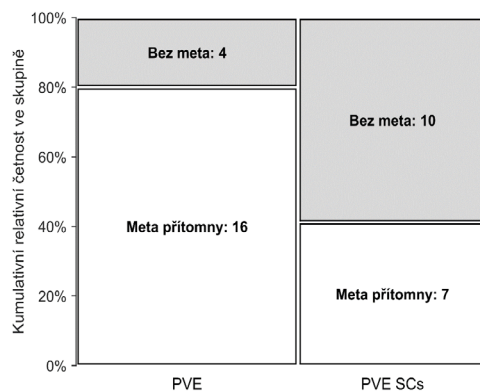
Explorativní laparotomie byla u pacientů po PVE s podanými SCs provedena u 3 pacientů z celkového počtu 20 pacientů (15 %) a u samotné PVE u 17 pacientů z celkového počtu 43 pacientů (39,5 %). Statisticky je však tento výsledek nesignifikantní (Fischerův přesný test,  $p=0,080$ ) (obr. 40). Statisticky významným faktorem ovlivňující odstoupení od resekcčního výkonu byla progrese metastáz (Mann-Whitney U test,  $p=0,0445$ ) (obr. 41). Výskyt extrahepatálních metastáz v pooperačním období byl statisticky signifikantně vyšší u skupiny PVE (Mann-Whitney U test,  $p=0,0210$ ) (obr. 42).



Obr. 40: explorativní laparotomie, porovnání skupin PVE a PVE SCs v % (Fischerův přesný test,  $p=0,0800$ )



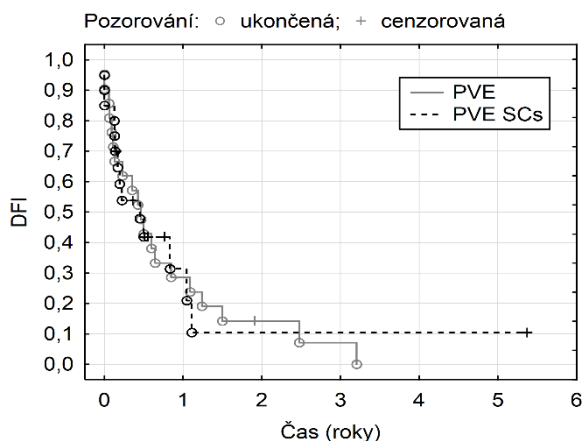
Obr 41: progrese metastáz ve vztahu k resekčním a exploračním výkonům (Mann-Whitney U test,  $p=0,0445$ )



Obr. 42: vyjádření počtu extrahepatálních metastáz, porovnání skupin PVE a PVE SCs (Mann-Whitney U test,  $p=0,0210$ )

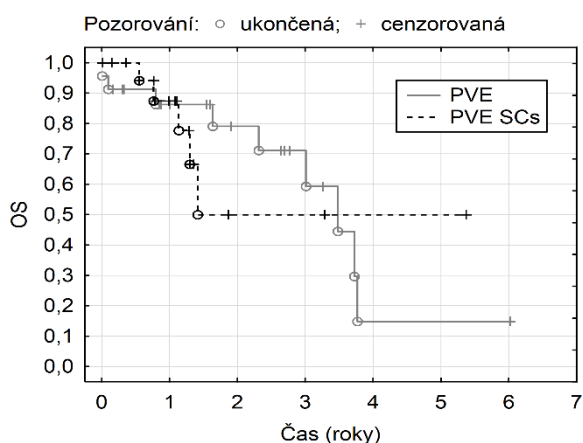
### 7.1.3 DFI a OS po resekčních výkonech u pacientů s provedenou PVE a PVE s aplikací SCs

DFI u resekovaných pacientů bylo mezi skupinami PVE a PVE SCs bez statisticky signifikantního rozdílu (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 1,0$ ). Ve skupině PVE bylo DFI 1. rok 25,6 %, 3. rok 2,0 %, 5. rok 0 %. Medián DFI u PVE byl 0,445 roku. U skupiny PVE SCs bylo DFI 1. rok 23,2 %, 3. rok 5,8-10,5 % (odhadované DFI), 5. rok 0,9-10,5 % (odhadované DFI). Medián DFI u PVE SC byl 0,367 roku (obr. 43).



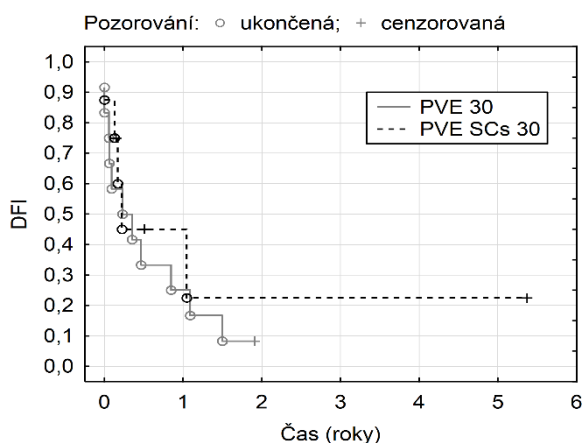
Obr. 43: DFI, porovnání skupin PVE a PVE SCs (Gehan-Wilcoxon test,  $p=1,0$ )

OS u pacientů po resekci bylo mezi skupinami PVE a PVE SCs bez statisticky signifikantního rozdílu. U skupiny PVE byl medián OS 3,3 roku. Pro skupinu PVE bylo OS 1. rok 84,5 %, 3. rok 59,4 %, 5. rok 6,7-14,7 % (odhadované OS). U PVE SCs byl medián pro OS 1,4 roku. U PVE SCs bylo OS 1. rok 81,3 %, 3. rok 29,9 % - 49,9 % (odhadované OS), 5. rok 4,7-49,9 % (odhadované OS) (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,7180$ ) (obr. 44). S přihlédnutím ke klinickým údajům můžeme konstatovat, že ze 40 pacientů u skupiny PVE přeživalo více jak 3 roky pouze 6 pacientů (1 pacient 3 roky, 3 pacienti 4 roky, 1 pacient 5 let a 1 pacient 6 let). Ve skupině PVE SCs ze 20 pacientů přežívali déle než 3 roky 2 pacienti (1 pacient 4 roky a 1 pacient 6 let. Tento pacient je stále naživu bez prokázané recidivy).



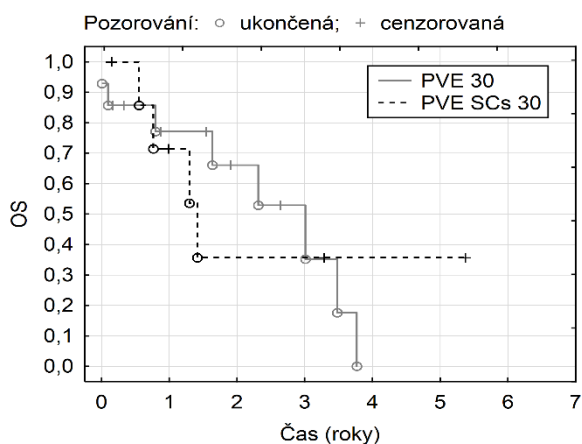
Obr. 44: OS, porovnání skupin PVE a PVE SCs (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,7180$ )

Mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30 bylo DFI bez statisticky signifikantních rozdílů. Ve skupině PVE 30 bylo DFI 1. rok 19,7 %. Pro 3. a 5. rok nebylo možné DFI pro cenzory definovat. Medián DFI u PVE 30 byl 0,23 roku. U PVE SCs 30 bylo DFI 1. rok 23,8 %, 3. rok 12,3 - 22,5 % (odhadované DFI), 5. rok 1,9 - 22,5 % (odhadované DFI). Medián byl u skupiny PVE SCs 30 0,21 roku (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,5880$ ) (obr. 45).



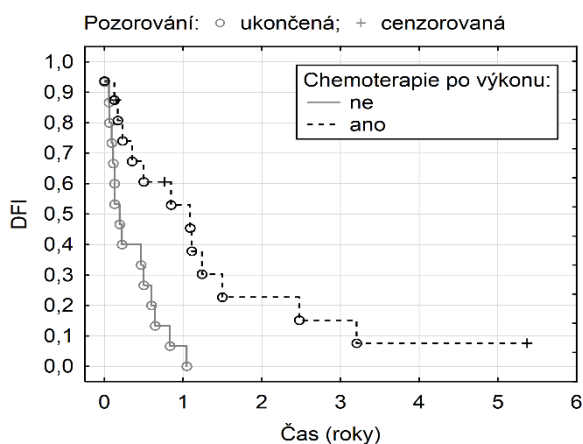
Obr 45: DFI, porovnání skupin PVE 30 a PVE HSC 30 (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,5880$ )

OS bylo mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30 bez statisticky signifikantních rozdílů. OS u skupiny PVE 30 bylo 1. rok 74,5 %, 3. rok 35,5 %, 5. rok nebylo možné pro cenzory definovat. Medián OS u PVE 30 činil 2,4 roky. U skupiny PVE SCs 30 bylo OS 1. rok 63,5 %, 3. rok 21,4 - 35,7 % (odhadované OS), 5. rok 3,3- 35,7 % (odhadované OS). Medián u OS byl u PVE SCs 30 1,3 roku (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,7670$ ) (obr. 46)



Obr. 46: OS, porovnání skupin PVE 30 a PVE SCs 30 (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,7670$ )

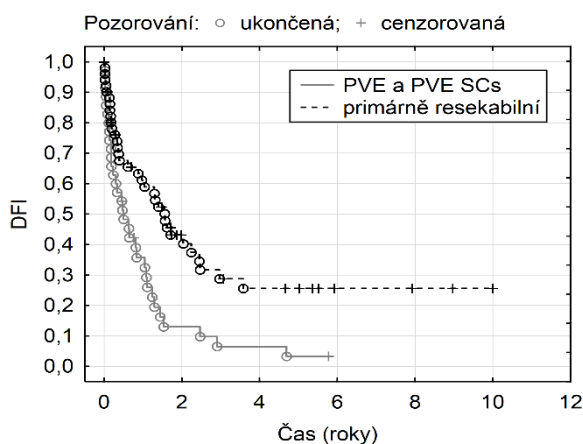
Významně rychlejší recidiva je prokazatelná u pacientů bez podané adjuvantní chemoterapie (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0086$ ) (obr. 47). Signifikantní výsledek jsme pozorovali i u skupiny PVE (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,042$ ), ale u skupiny PVE SCs nebyl tento výsledek signifikantní pro malý počet pacientů.



Obr. 47: porovnání DFI mezi pacienty s pooperačně podanou a nepodanou chemoterapií (Gehan-Wilcoxon test  $p= 0,0086$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,2379)

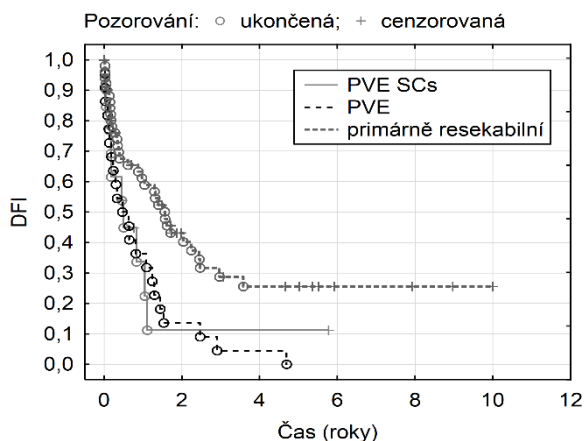
#### 7.1.4 OS, DFI a vztah k onkologické léčbě s 5-FU u pacientů s provedenými resekcními výkony

V této části výsledků jsme porovnávali skupiny PVE SCs, PVE a primárně resekcibilních pacientů. Mezi sledovanými skupinami byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v DFI (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0087$  a  $p= 0,0314$ ). Pacienti s provedenou PVE (skupina PVE SCs a PVE dohromady) měli kratší DFI oproti pacientům s primárně provedenou resekci. DFI pro pacienty s provedenou PVE bylo 1. rok 33,2 %, 3. rok 6,3 %, 5. rok nedefinováno. U pacientů s primárně provedenou resekci bylo DFI 1. rok 60,1 %, 3. rok 28,6 %, 5. rok nedefinováno (obr. 48 a 49).



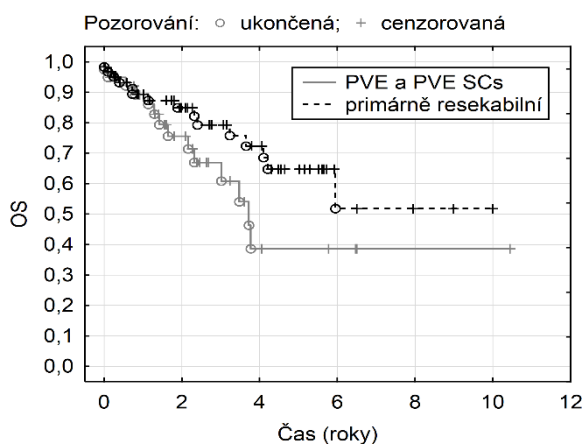
Obr. 48: DFI porovnání skupin PVE SCs a PVE (dohromady) versus primárně resekcibilní pacienti (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0087$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,4524)



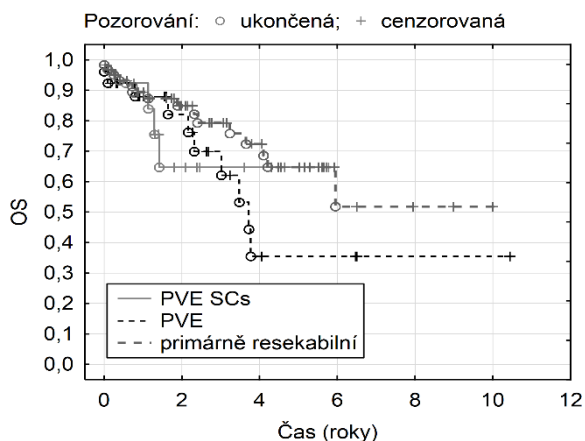


Obr. 49: porovnání DFI mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resektabilních pacientů (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0314$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,4524)

Statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíl v OS mezi sledovanými skupinami (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,2128$  a  $p= 0,4551$ ). U pacientů s provedenou PVE a PVE SCs bylo OS 1. rok 87,3 %, 3. rok 60,9 %, 5. rok nedefinováno. U primárně resektabilních pak bylo OS 1. rok 88,0 %, 3. rok 76,8 % a 5. rok 58,9 % (obr. 50 a 51)

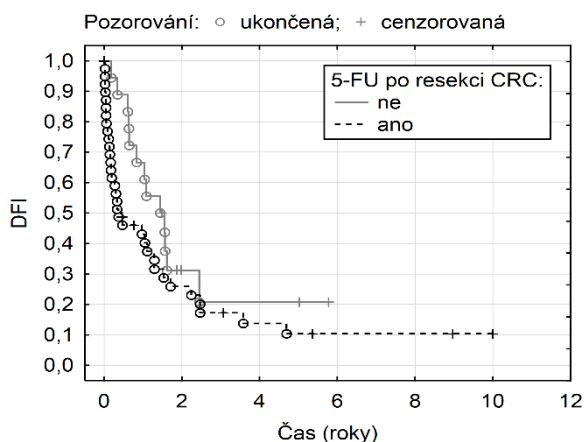


Obr. 50: porovnání OS mezi skupinami PVE SCs a PVE versus primárně resektabilní pacienti (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,2128$ )

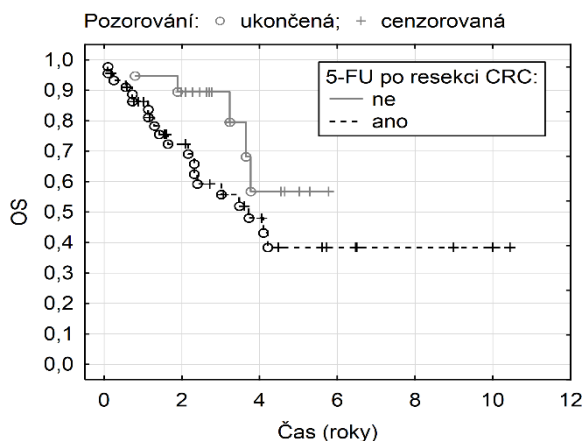


Obr. 51: porovnání OS mezi skupinami PVE SC, PVE a primárně resekabilních pacientů (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,4551$ )

Statistická analýza prokázala, že pacienti (hodnoceno u všech pacientů) s provedenou resekcí CLM měli lepší DFI, pokud měli po resekci primárního CRC podanou adjuvantní chemoterapii s 5-FU (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0228$ ) (obr. 52). Data pro OS byla statisticky nevýznamná (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0506$ ) (obr. 53).

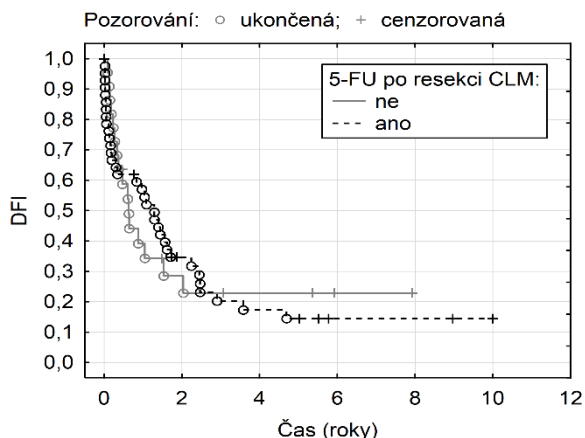


Obr. 52: porovnání DFI u pacientů po resekci jater v závislosti na podání adjuvantní léčby s 5-FU po resekci primárního CRC (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0228$ , poměr rizika mezi sledovanými skupinami 1,6187)

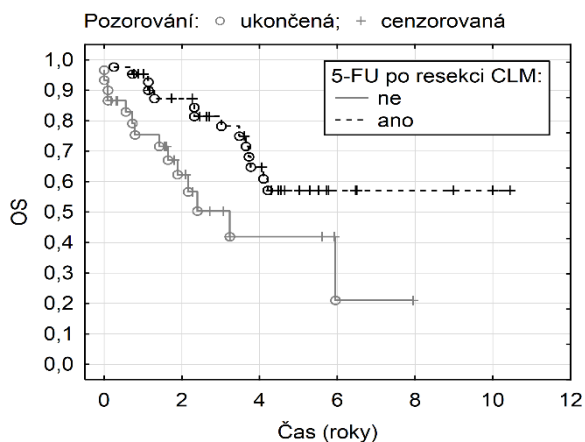


Obr. 53: porovnání OS u pacientů po resekcii jater v závislosti na podání adjuvantní léčby s 5-FU po resekcii primárního CRC (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0506$ )

Podání 5-FU v rámci onkologické léčby po resekcii CLM bylo statisticky nevýznamné pro DFI (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,9126$ ) (obr. 54), ale bylo spojeno s delším OS (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0116$ ) (obr. 55).



Obr. 54: DFI u pacientů s podanou adjuvantní onkologickou léčbou po resekcii CLM (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,9126$ )

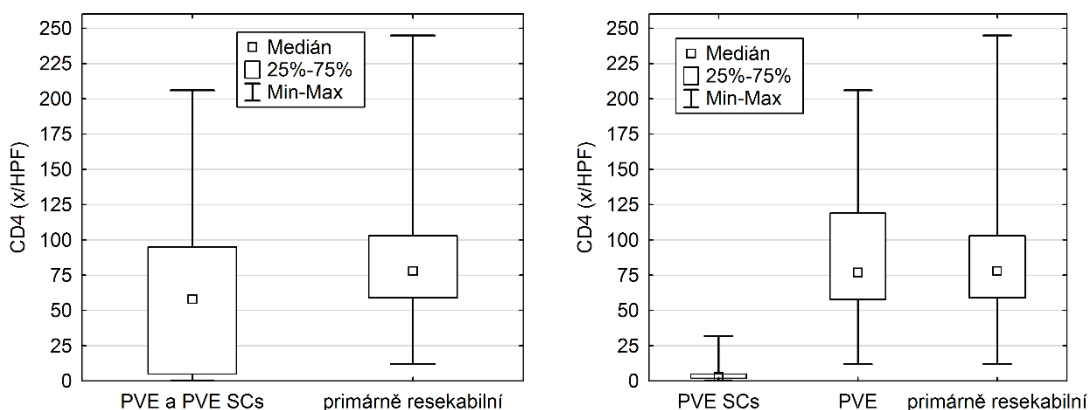


Obr. 55: OS u pacientů s podanou adjuvantní onkologickou léčbou po resekcii CLM (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0116$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,5418)

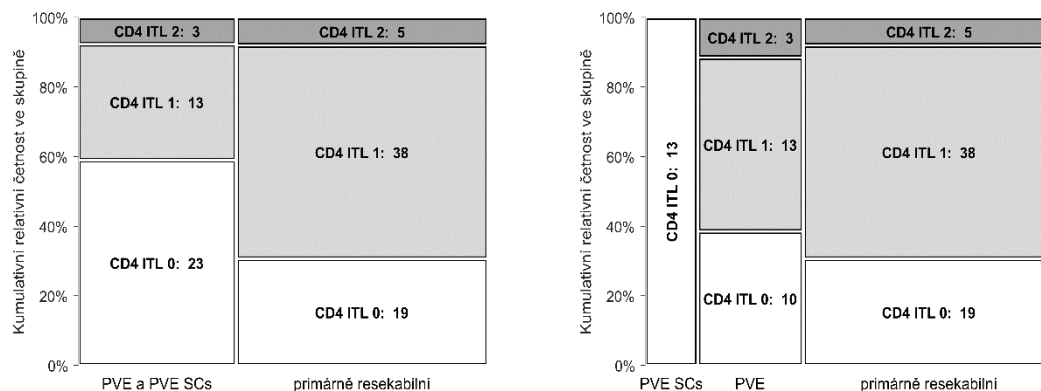
## 7.3 Výsledky stanovení TILs

### 7.3.1 Zastoupení jednotlivých TILs mezi sledovanými skupinami

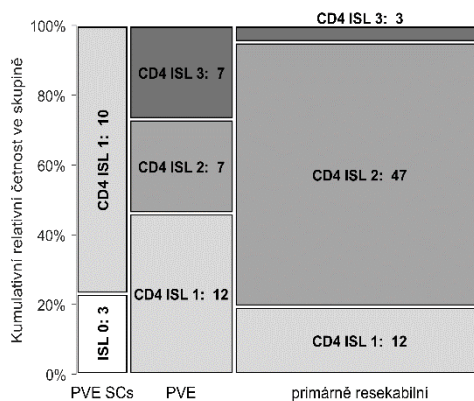
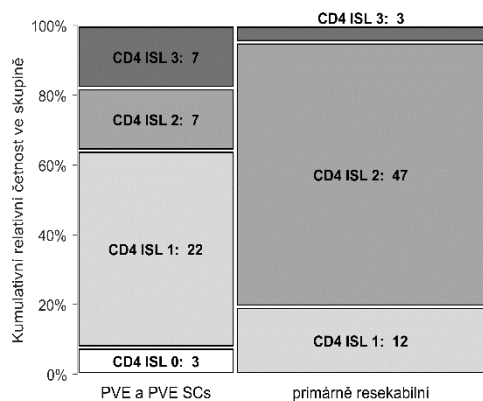
Při stanovení infiltrace CD4<sup>+</sup> lymfocytů u pacientů s resekci pro CLM byl mezi skupinami pozorován významný rozdíl ve všech sledovaných parametrech - v počtu CD4<sup>+</sup> buněk v HPF (Mann-Whitney U test,  $p=0,0126$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 56 a 57), ITL (Chí kvadrát test,  $p=0,0132$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0001$ ) (obr. 58 a 59), ISL (Chí kvadrát test,  $p=0,0016$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 60 a 61), PTL (Chí kvadrát test,  $p=0,009$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0059$ ) (obr. 62 a 63) a Crohn like infiltraci (Chí kvadrát test,  $p=0,0087$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0002$ ) (obr. 64 a 65). Jak dokazují přiložené grafy, je infiltrace CD4<sup>+</sup> lymfocyty významně nižší u skupiny PVE SCs. V případě PTL jsou patrné statisticky významně nižší hodnoty CD4<sup>+</sup> lymfocytů u skupiny PVE SCs a PVE.



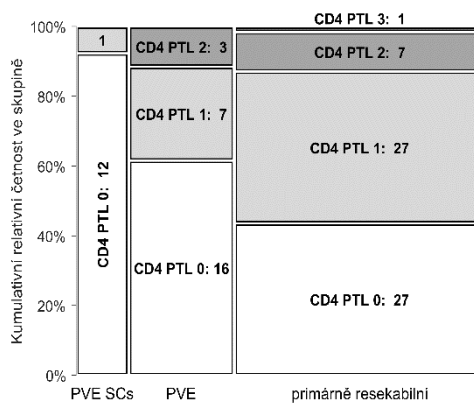
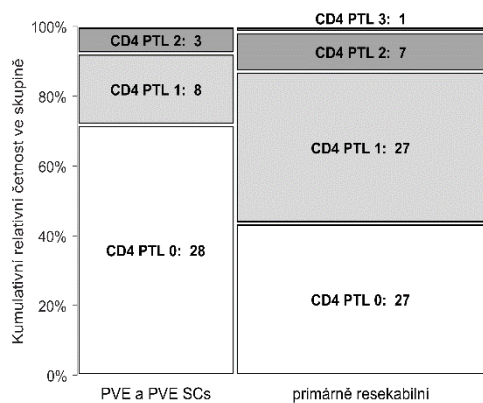
Obr. 56 a 57: zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekovatelních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0126$  a Kruskal-Wallis ANOVA  $p < 0,0001$ )



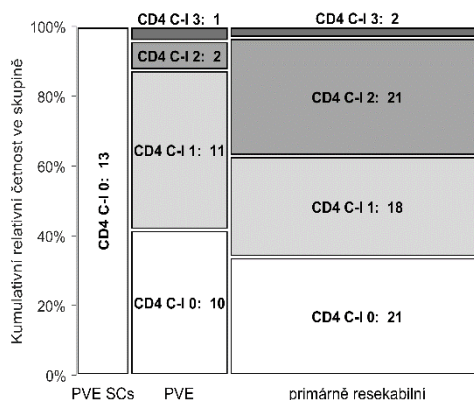
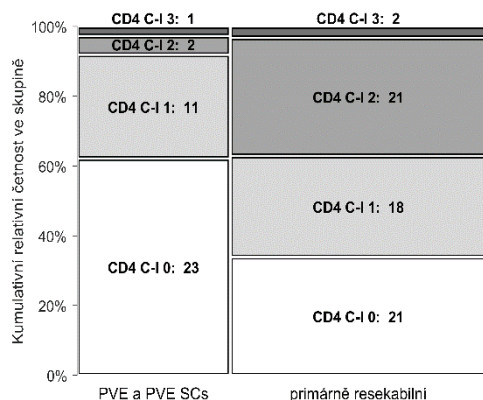
Obr. 58 a 59: zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk ITL mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekovatelních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0132$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0001$ )



Obr. 60 a 61: zastoupení CD4+ buněk v ISL mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Chí kvadrát test,  $p = 0,0016$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )

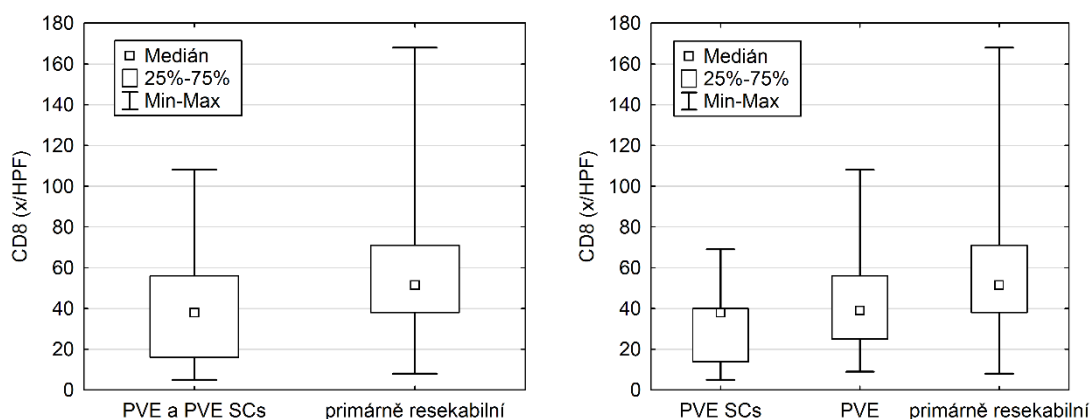


Obr. 62 a 63: zastoupení CD4+ buněk v PTL mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Chí kvadrát test,  $p = 0,0090$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0059$ )



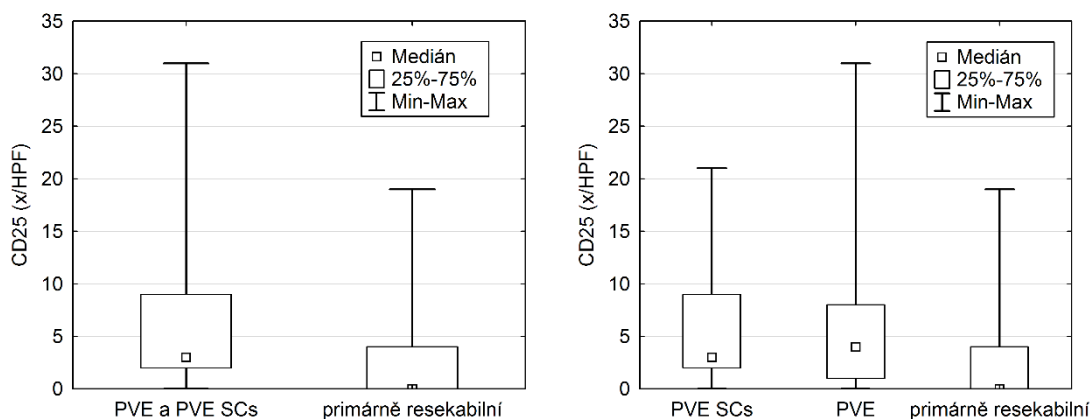
Obr. 64 a 65: zastoupení CD4+ buněk v Crohn like infiltraci mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Chí kvadrát test,  $p = 0,0087$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0002$ )

Při statistické analýze infiltrace CLM CD8<sup>+</sup> lymfocyty byl pozorován statisticky signifikantní výsledek pouze u počtu CD8<sup>+</sup> v HPF (Mann-Whitney U test,  $p=0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0046$ ) (obr. 66 a 67). Ostatní výsledky nebyly statisticky signifikantní. Vyšší infiltrace CD8<sup>+</sup> lymfocyty byla pozorována u pacientů primárně operabilních. Semikvantitativní hodnocení infiltrace CLM CD8<sup>+</sup> lymfocyty vyšlo bez statisticky signifikantních výsledků. Grafy nesignifikantních výsledků nejsou zobrazeny.

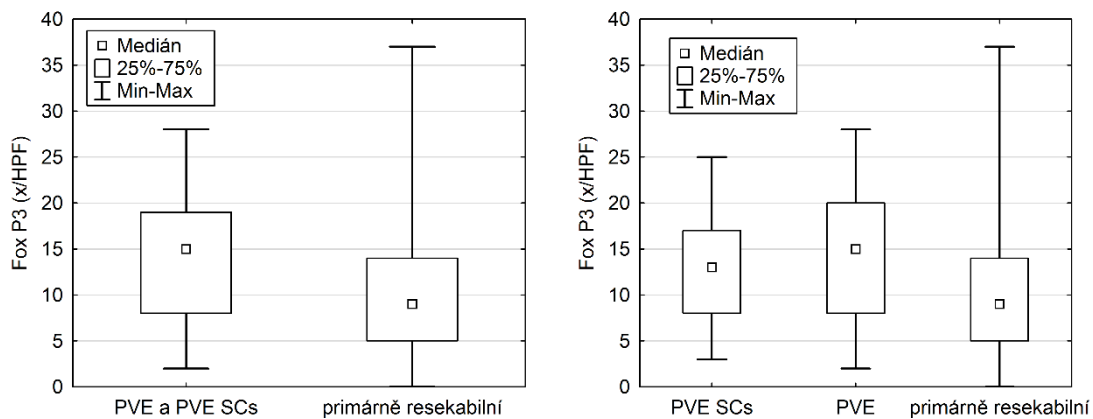


Obr. 66 a 67: zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0046$ )

Statistická analýza prokázala významně nižší zastoupení T reg ve skupině primárně resekalibilních pacientů, a to v celkovém počtu CD25<sup>+</sup> lymfocytů na HPF (Mann-Whitney U test,  $p=0,0019$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0080$ ) (obr. 68 a 69) a počtu FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů na HPF (Mann-Whitney U test,  $p=0,014$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0468$ ) (obr. 70 a 71). Semikvantitativní hodnocení infiltrace CLM T reg neprokázalo statisticky signifikantní výsledky. Grafy nesignifikantních výsledků nejsou zobrazeny.

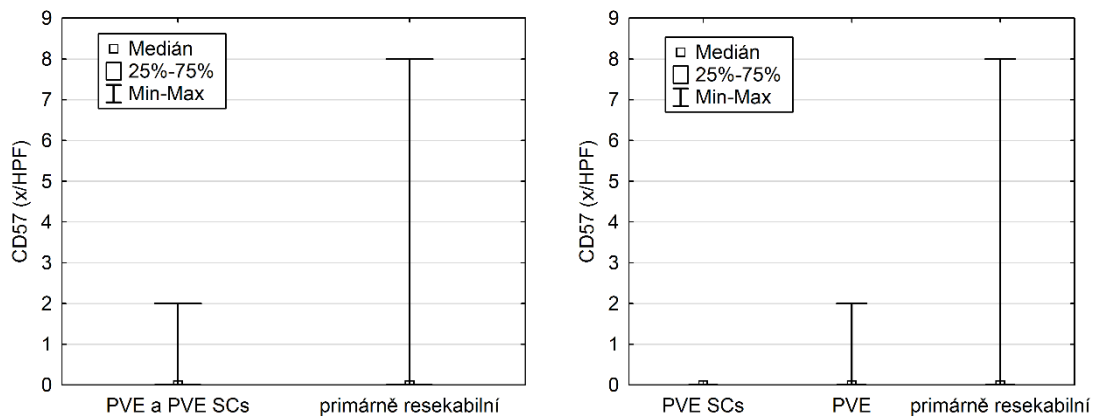


Obr. 68 a 69: zastoupení CD25<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0019$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0080$ )

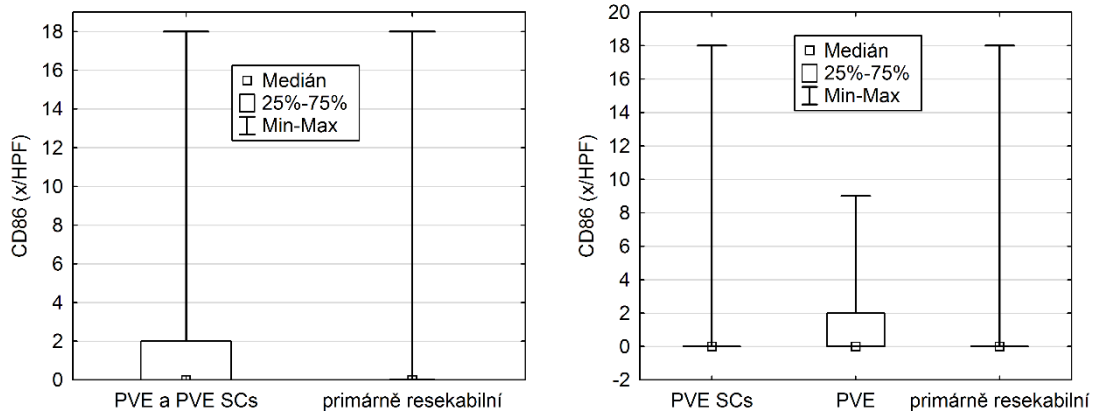


Obr. 70 a 71: zastoupení FoxP3<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,014$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0468$ )

Infiltrace CLM NKs (buňky CD57<sup>+</sup>) byla nízká u všech skupin a byla bez statisticky signifikantních rozdílů (obr. 72 a 73) (Mann-Whitney U test,  $p=0,0866$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,1838$ ). Bez statisticky signifikantních rozdílů byla i infiltrace DCs (buňky CD86<sup>+</sup>) (Mann-Whitney U test,  $p=0,097$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,2052$ ) (obr. 74 a 75). Taktéž stanovení granzymu B (Mann-Whitney U test,  $p=0,704$ ) a serpinů (Mann-Whitney U test,  $p=0,439$ ) neprokázalo statisticky signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami.

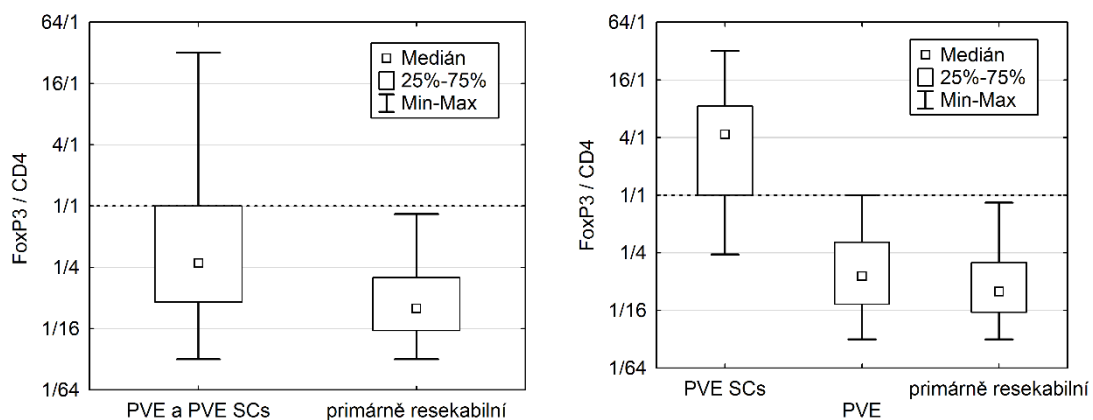


Obr. 72 a 73: zastoupení CD57<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0866$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,1838$ )



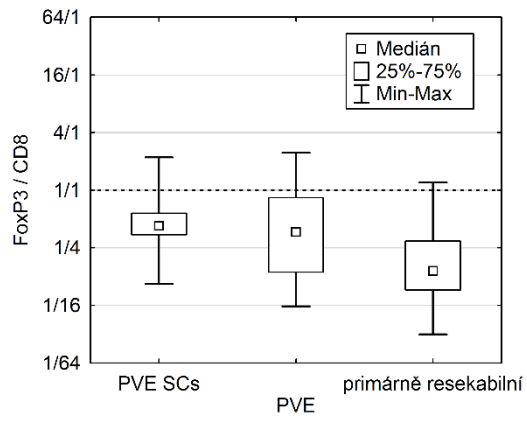
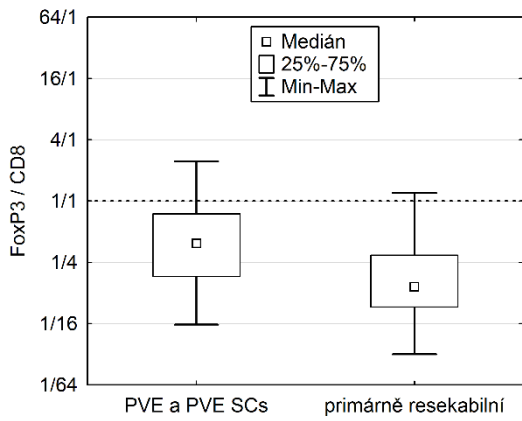
Obr. 74 a 75: zastoupení CD86<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p = 0,097$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,2052$ )

Při stanovení poměrů jednotlivých skupin TILs mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekoványými pacienty prokázala statistická analýza významný rozdíl u poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p < 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 76 a 77), FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p < 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0001$ ) (obr. 78 a 79), CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 80 a 81), CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0001$ ) (obr. 82 a 83), FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0120$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0359$ ) (obr. 84 a 85). U CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> byl signifikantní rozdíl pozorován až při porovnání PVE SCs proti PVE a primárně resekováným pacientům (Mann-Whitney U test,  $p = 0,8161$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 86 a 87). Z následujících grafů je patrné, že u skupin s PVE a především u skupiny PVE SCs převažuje vyšší zastoupení T reg.

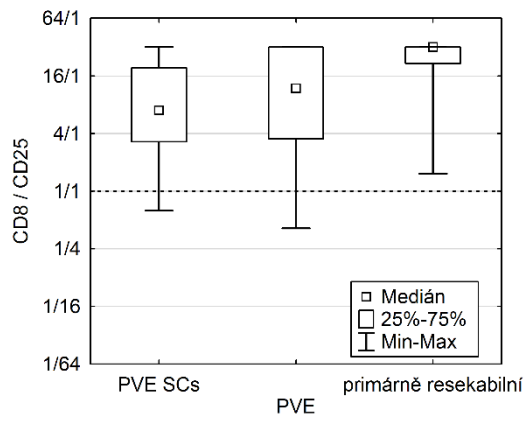
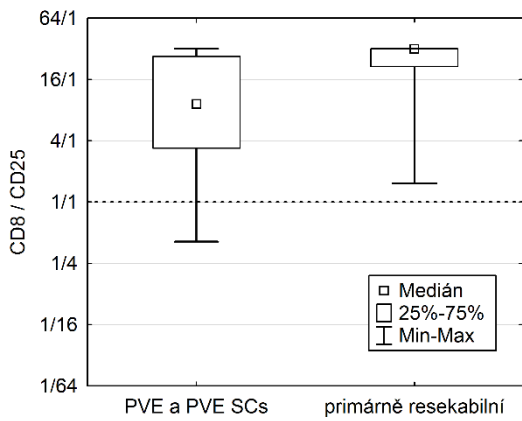


Obr. 76 a 77: poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p < 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )

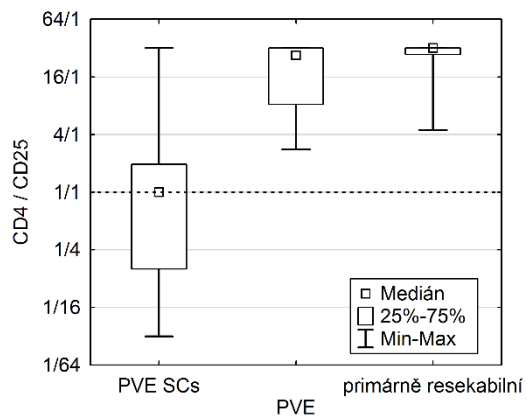
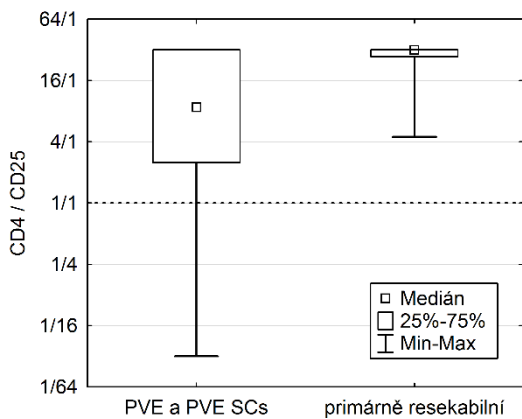




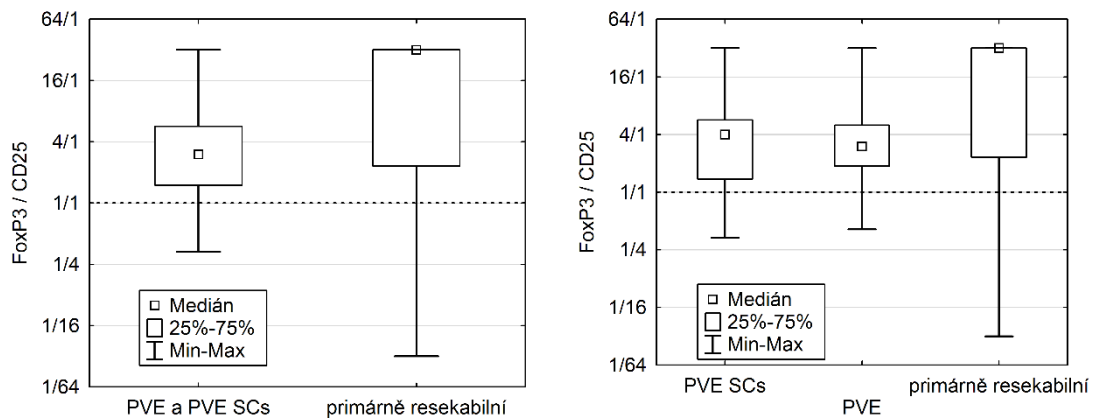
Obr. 78 a 79: poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p < 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )



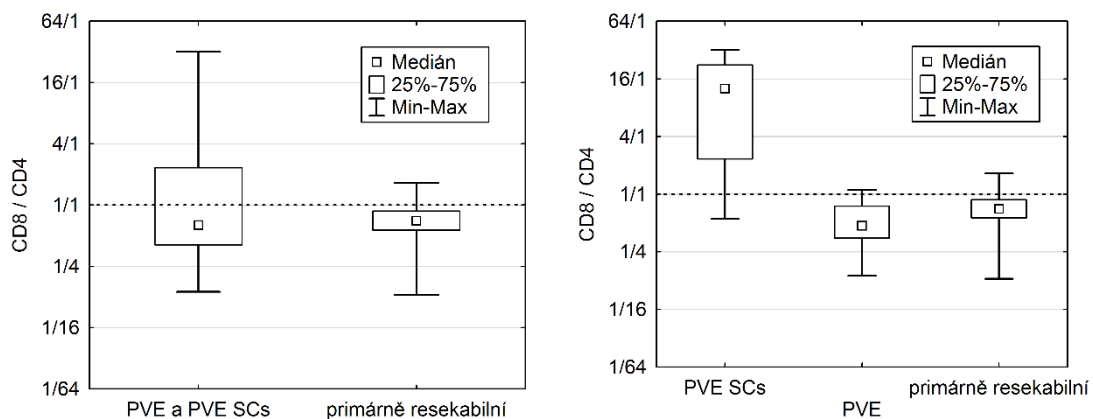
Obr. 80 a 81: poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )



Obr. 82 a 83: poměr buněk CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0001$ )



Obr. 84 a 85: poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test, p= 0,0120 a Kruskal-Wallis ANOVA, p= 0,0359)

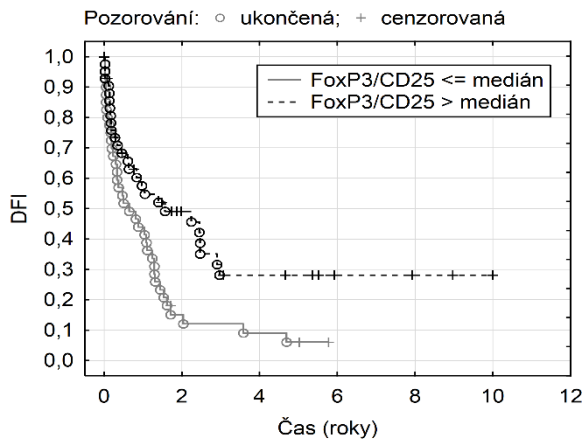


Obr. 86 a 87: poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test, p= 0,8161 a Kruskal-Wallis ANOVA, p< 0,0001)

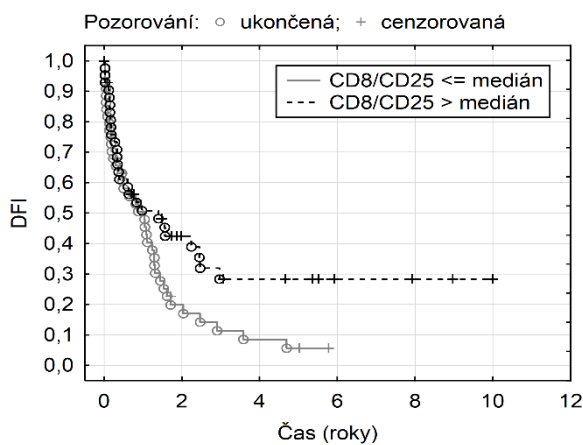
### 7.3.2 Vztah TILs k DFI a OS

Nejprve byl zkoumán vztah TILs k DFI a OS společně u všech skupin - pacienti po operačním výkonu pro CLM ve skupinách PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních dohromady. Statisticky signifikantní rozdíl byl pozorován u poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Coxův model, p= 0,0234) pro DFI a na hranici statistické významnosti jsme pozorovali poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Coxův model, p= 0,0499) pro DFI. Pro OS nevyšel žádný výsledek statisticky signifikantně. U poměrů buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> byl statistickou analýzou stanoven poměr rizika recidivy. Při zdvojnásobení hodnoty poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> klesá riziko recidivy na 87,5 % (Coxův model, p=0,0234) (obr. 88). U poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> klesá riziko recidivy na 85,9 % při zdvojnásobení hodnoty poměru (Coxův model, p=0,0499) (obr. 89). Vícevýběrový test prokázal statisticky

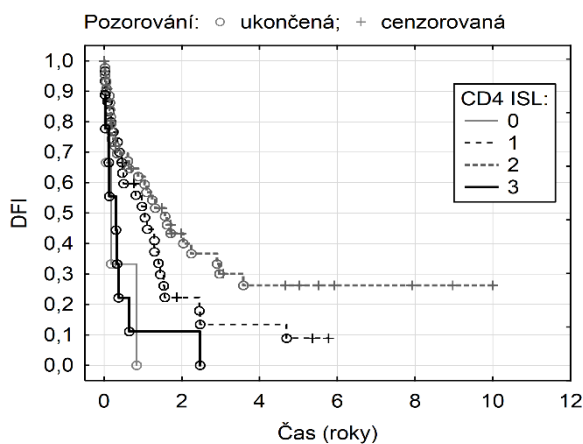
signifikantní výsledek vztahu  $CD4^+$  buněk ISL infiltrace a DFI (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0179$ ) (obr. 90).



Obr. 88: vztah poměru buněk FoxP3+/CD25+ k DFI (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,0412$ ; poměr rizika mezi skupinami 0,5075)

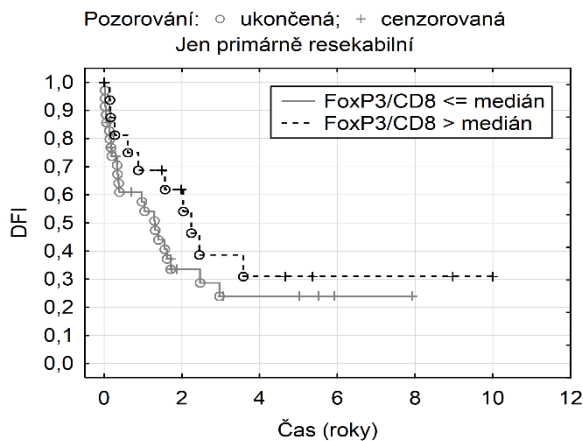


Obr. 89: vztah poměru buněk  $CD8^+/CD25^+$  k DFI (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,2140$  poměr rizika mezi skupinami 0,6051)

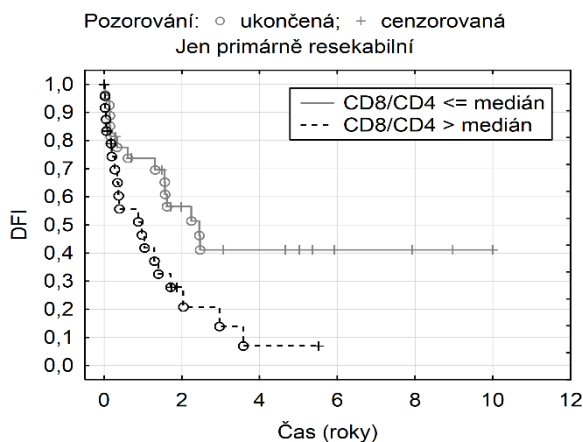


Obr.90: vztah  $CD4^+$  buněk u ISL infiltrace k DFI při společném hodnocení všech sledovaných skupin (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0179$ )

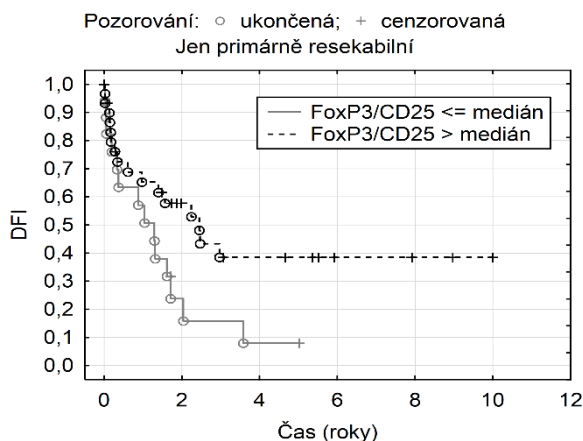
U skupiny pacientů primárně resekovaných pro CLM jsme ve vztahu k DFI pozorovali statisticky signifikantní rozdíl u poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Coxův model,  $p=0,0255$ ) a CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (Coxův model,  $p=0,0043$ ). Ve vztahu k OS nebyl získán signifikantní výsledek. Dále byly stanoveny poměry rizika recidivy pro poměry buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. U poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> klesá riziko recidivy o 27,9 % na 72,1 % při zdvojnásobení hodnoty poměru (Coxův model,  $p=0,022$ ) (obr. 91). Pro poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> platí, že při zdvojnásobení hodnoty poměru stoupá riziko recidivy 2,6x (Coxův model,  $p=0,0043$ ) (obr. 92). Zajímavým výsledkem je poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, který těsně nedosáhl statistické významnosti (Coxův model,  $p=0,0557$ ) (obr. 93). Zde jej uvádíme, protože při analýze daného poměru u všech operovaných pacientů vyšel tento vzh jako statisticky signifikantní (viz str. 122 a 123).



Obr. 91: vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekovaných pro CLM (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,1531$ ; poměr rizika mezi skupinami 0,6483)

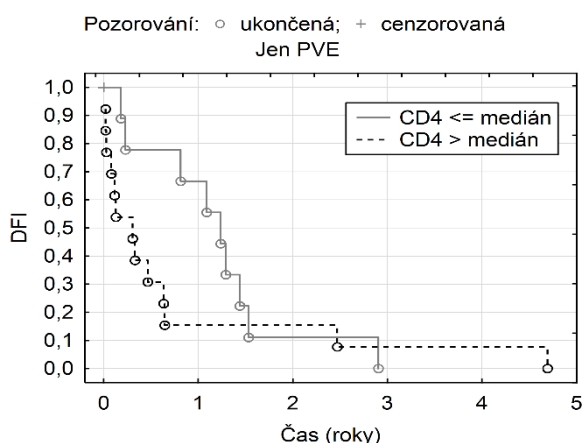


Obr. 92: vztah poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekovaných pro CLM (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,0439$ ; poměr rizika mezi skupinami 2,3472)

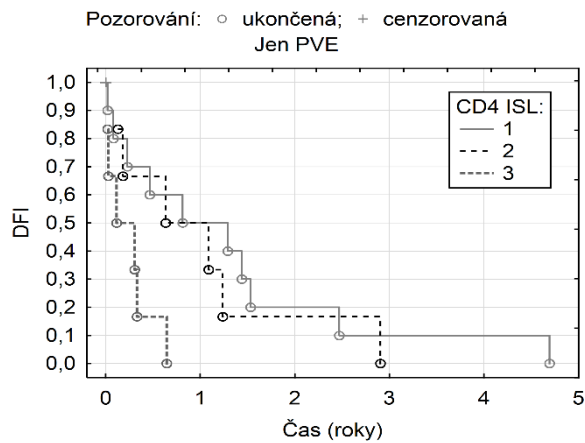


Obr. 93: vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resektovaných (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0154$ )

Další analyzovanou skupinou byla skupina pacientů, kteří podstoupili resekci CLM po předchozí PVE. Zde statistická analýza prokázala signifikantní vztah k DFI u počtu CD4<sup>+</sup> buněk v HPF (Coxův model,  $p= 0,0163$ ) a u ISL infiltrace CD4<sup>+</sup> buňkami (Coxův model,  $p= 0,0335$ ). Ve vztahu k OS nebyl prokázán statisticky signifikantní výsledek. U signifikantních výsledků byl opět stanoven poměr rizika recidivy onemocnění. Při zvýšení CD4<sup>+</sup> buněk o 1 bod v HPF stoupá riziko recidivy o 1,2 % (Coxův model,  $p= 0,0163$ ) (obr. 94). Při zvýšení ISL infiltrace CD4<sup>+</sup> buňkami o jeden stupeň semikvantativního hodnocení stoupá riziko recidivy téměř na dvojnásobek (Coxův model,  $p= 0,0335$ ) (obr. 95).



Obr. 94: vztah počtu CD4<sup>+</sup> buněk v HPF k DFI u pacientů resektovaných pro CLM po PVE (Gehan-Wilcoxon test  $p= 0,0398$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 1,723)

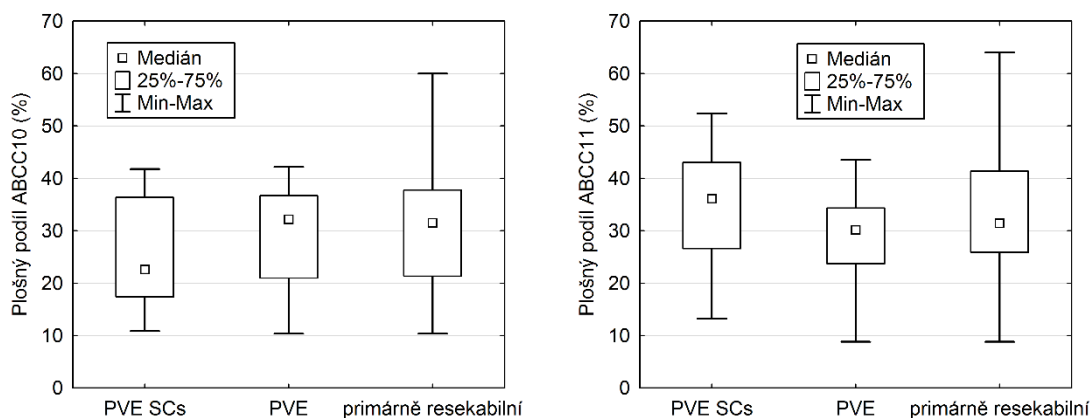


Obr. 95: vztah ISL infiltrace CD4<sup>+</sup> buňkami k DFI u pacientů resekovaných pro CLM po PVE (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,1288$ )

Statistická analýza DFI a OS u skupiny pacientů, kteří podstoupili resekci jater po předchozí PVE s aplikací SCs prokázala významný vztah CD86<sup>+</sup> buněk k OS ( $p=0,0230$ ). Poměr rizika byl u CD86<sup>+</sup> buněk stanoven na 17 % při zvýšení CD86<sup>+</sup> buněk o jeden bod semikvantitativního hodnocení. Při vícevýběrovém hodnocení však nebylo možné provést bližší stanovení z důvodu malého počtu pacientů a získaný výsledek tak nelze považovat za validní.

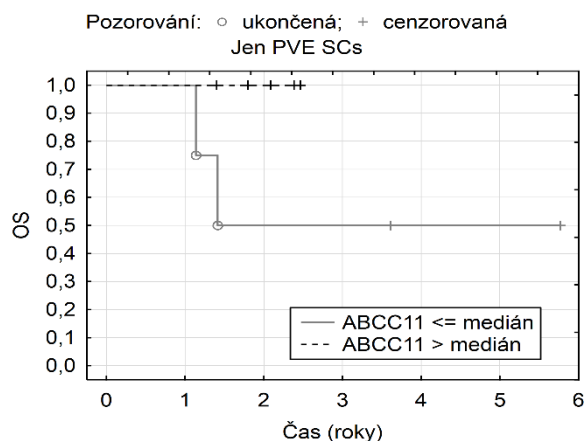
## 7.4 Stanovení ABCC10 a ABCC11

Porovnání plošných podílů ABCC10 a ABCC11 neprokázalo statisticky signifikantní rozdíl mezi sledovanými skupinami (obr.96 a obr.97) (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,1829$  a  $p= 0,1856$ ).



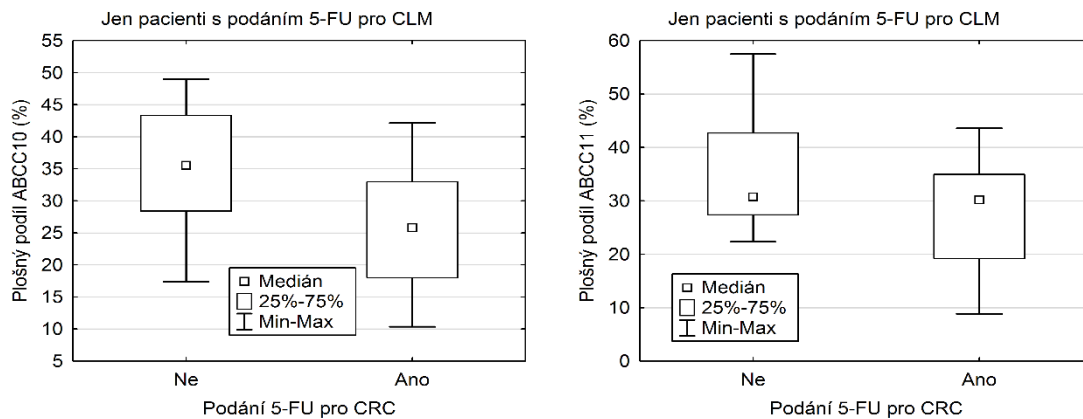
Obr. 96 a 97: zastoupení ABCC10 (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,1829$ ) a ABCC 11 (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p= 0,1856$ ) mezi sledovanými skupinami.

Mezi pacienty zařazenými do studie nebyl pozorován statisticky signifikantní výsledek ve vztahu ABCC10 a ABCC11 k DFI a OS. Mezi jednotlivými skupinami bylo možné pozorovat významný vztah ABCC11 k OS u skupiny PVE SCs (Coxův model,  $p= 0,0304$ ). Při bližším statistickém vyhodnocení vztahu ABCC11 a OS pomocí dvouvýběrového testu nevychází výsledek u skupiny PVE SCs jako statisticky významný (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,1309$ ). Důvodem je malý počet pacientů v dané skupině a výsledek tak může být falešně pozitivní (obr. 98).



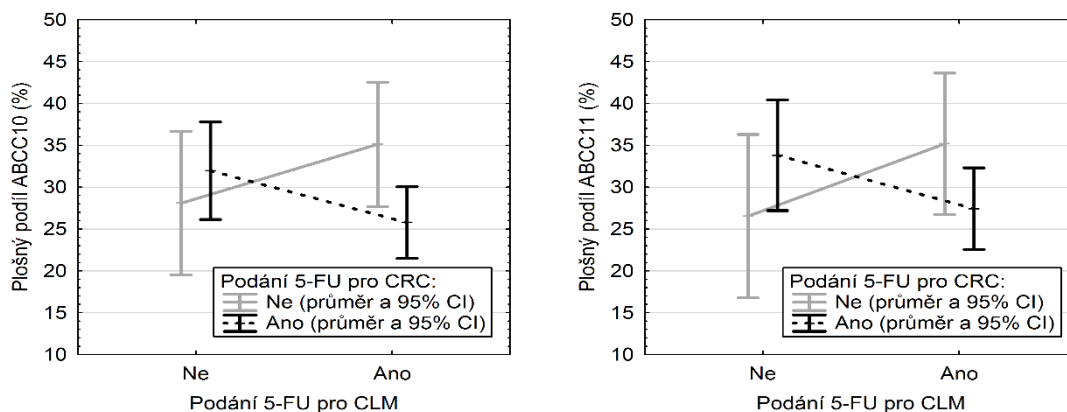
Obr. 98: Vztah ABCC11 k OS u skupiny PVE SCs (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,1309$ )

Ve studii byl zkoumán i vliv podaného 5-FU na plošný podíl ABCC10 a ABCC11. Podíl ABCC10 u pacientů po resekci CLM (hodnoceny všechny skupiny dohromady) byl vyšší u těch pacientů, kteří neměli po resekci primárního CRC do léčby zařazen 5-FU (Mann-Whitney U test,  $p= 0,0217$ ) (obr. 99). U ABCC11 byl výsledek za hranicemi statistické významnosti (Mann-Whitney U test,  $p= 0,1123$ ) (obr. 100).



Obr. 99 a 100: vztah plošného podílu ABCC10 (Mann-Whitney U test,  $p= 0,021$ ) a ABCC11 (Mann-Whitney U test,  $p=0,1123$ ) k léčbě 5-FU.

Při bližším porovnání pomocí vícefaktorové analýzy rozptylu jsou výsledky jak u ABCC10 (obr. 101) tak i u ABCC11 (obr. 102) těsně za hranicemi statistické významnosti (vícefaktorová ANOVA,  $p= 0,0542$  a  $p=0,0540$ ).



Obr. 101 a 102: vztah plošného podílu ABCC10 (vícefaktorová ANOVA,  $p= 0,0542$ ) a ABCC11 (vícefaktorová ANOVA,  $p=0,0540$ ) k léčbě 5-FU ve vícefaktorové analýze rozptylu



## 8. Diskuze

Cílem této práce je přispět k poznatkům na v současné době diskutovaná témata, jako jsou růst FLRV a progresse nádorového onemocnění po PVE s i bez aplikace SCs, vztah imunitního systému a maligního onemocnění u pacientů podstupujících resekce pro CLM a vztah ABCC10 a ABCC11 ve tkáni CLM k onkologické léčbě pomocí 5-FU. Naší snahou bylo ze získaných dat navrhnout vhodné prediktivní a prognostické faktory.

### 8.1. Diskuze k efektu PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM

FLRV je zásadní faktor, který ovlivňuje resekalibilitu CLM. V případě nízkého FLRV je pacient vystaven riziku akutního jaterního selhání. Jednou z možností, jak urychlit růst FLRV po PVE, je využití SCs aplikovaných do neokludovaného kmene portální žíly. Rizikem však je možné podpoření růstu maligního onemocnění [256]. V naší studii jsme sledovali efekt aplikace SCs po PVE na růst FLRV, růst VLM, výskyt extrahepatálního postižení, vztah k dosažení resekcčního výkonu a vztah k DFI a OS. Porovnávané soubory pacientů byly shodné vzhledem k věku, vstupnímu FLRV i VLM. Před PVE byli pacienti bez mimo jaterního postižení.

#### 8.1.1 Diskuze k růstu zbytkového jaterního objemu

V naší studii byl nárůst FLRV mezi sledovanými skupinami bez statisticky signifikantních rozdílů. Z grafů i výsledných dat však můžeme sledovat trend většího růstu FLRV u skupiny pacientů s aplikovanými SCs. Tento trend je umocněn především u skupiny PVE SCs 30. V grafu vstupního FLRV je patrné, že skupina měla oproti PVE 30 nižší FLRV, ale FLRV po 3 týdnech je vyšší. Tento fakt potvrzuje i průměrný nárůst FLRV, kde vidíme o v průměru 4 % vyšší růst FLRV u skupiny PVE SCs 30 oproti PVE 30. Rychlejší nárůst FLRV byl popsán v dříve publikovaných studiích, které využily SCs ke stimulaci růstu FLRV [12, 13, 153, 154]. Tyto studie však byly provedeny na heterogenním souboru pacientů. V naší studii byli k PVE s aplikací SCs indikováni i pacienti po prolongovaném podávání onkologické léčby. I tato prolongovaná onkologická léčba může mít negativní vliv na jaterní regeneraci a přispívá tak i k pomalejšímu růstu FLRV [126, 257]. To může být i jedním z důvodů, proč jsme v naší studii statisticky signifikantního růstu FLRV nedosáhli.

Druhým limitem této studie je malý počet pacientů, kteří byli do studie zařazeni. PVE s aplikací SCs je metoda vhodná jen pro malou skupinu pacientů s nízkým vstupním FLRV nebo kombinací nízkého FLRV a prolongovaného podávání onkologické léčby. Studie zcela jistě potřebuje vyhodnocení na větších skupinách pacientů.

### **8.1.2 Diskuze k progresi maligního onemocnění a dopadu na operabilitu nemocných po PVE a PVE s aplikací SCs**

Prozatím žádná z výše citovaných studií [12, 13, 153, 154] se nezmiňuje o progresi maligního onemocnění po PVE a aplikaci SCs. V této studii je na provedených CT scanech a volumetriích metastáz patrná progresie metastáz u všech sledovaných skupin. Růst však nebyl mezi porovnávanými skupinami statisticky signifikantní. V našem souboru pacientů tak aplikace SCs nevedla k rychlejší progresi metastáz oproti prosté PVE. Kombinace pomalé progresie růstu metastáz a urychleného FLRV je pak pro pacienty zcela klíčová, protože jim dává větší šanci podstoupit radikální resekcí výkon a snižuje procento explorativních výkonů [155]. Toto je vidět i v našem souboru pacientů, kde bylo procento explorativních laparotomií výrazně nižší u pacientů s aplikovanými SCs. Pozoruhodný je i fakt signifikantní progresie extrahepatálních metastáz u skupiny s prostou PVE. Využití SCs v léčbě maligního onemocnění nese určité riziko diseminace nádorového onemocnění nejen do jater, ale i dalších orgánů, např. plic [256]. V naší studii jsme však toto neprokázali, naopak extrahepatální diseminace byla častější u skupiny s prostou PVE, a to statisticky významně. V současné chvíli nejsme schopni tento efekt blíže vysvětlit. Malé soubory pacientů mohou být jedním z důvodů, ale daný fakt bude cílem našeho dalšího výzkumu se zaměřením na eventuelní protektivní efekt SCs.

### **8.1.3 Diskuze k DFI, OS a vztahu k onkologické léčbě po resekcích výkonech u pacientů po PVE, po PVE s aplikací SCs a pacientů primárně resekovatelných**

Hodnocení DFI a OS je v našem malém souboru pacientů po PVE a PVE s aplikací SCs obtížné vzhledem k velkému počtu statistických cenzorů. Jen malé množství pacientů jsme byli schopni sledovat po dobu delší než 3 roky. Proto v některých případech musíme uvádět pouze odhadované DFI a OS, nebo nejsme schopni DFI a OS definovat. Při

porovnání pouze pacientů ze skupin PVE a PVE SCs jsme nepozorovali statisticky signifikantní rozdíly jak v DFI, tak i v OS. Většina pacientů měla brzkou recidivu. Uvedená data svědčí pro velmi špatnou prognózu pacientů, kteří byli do studie zařazeni. Z naší studie vyplývá i zcela nezpochybnitelný efekt onkologické léčby po resekcčním výkonu. Při porovnání dat mezi skupinami s provedenou PVE a primárně resekalními pacienty je významný rozdíl u DFI. Je diskutabilní, jestli krátká doba DFI u pacientů po PVE je dána pokročilejší fází maligního onemocnění. V řadě případů jsou k PVE indikováni pacienti s bilobárním postižením nebo víceložiskovým postižením jater. Samotná tato postižení jsou významným negativním prognostickým faktorem, ale zároveň nejsou v dnešní době považována za kontraindikace chirurgických výkonů [71, 72]. Časná progresse onemocnění je pak závislá především na dodržení R0 resekce. Dalším důvodem časně recidivy je i mikrometastatické postižení, které není v době operace patrné [3]. Využití neoadjuvantní chemoterapie prodlužuje dobu do progresse onemocnění po resekcii CLM a snižuje i výskyt mikrometastatického postižení [258]. U pacientů s PVE je však v době přípravy pacienta k resekcčnímu výkonu, která může trvat i několik měsíců, riziko vzniku mikrometastatického postižení, které následně může zkrátit DFI po resekcii CLM. Tím se opět potvrzuje pravidlo nezbytné kombinace chirurgické a onkologické léčby a především její správné načasování ve smyslu neoadjuvantní terapie, resekce a pooperační chemoterapie.

V případě, že pacienti podstoupí resekcii jater pro CLM po předchozí přípravě s PVE nebo PVE s aplikací SCs dosahují stejných hodnot OS. Porovnání skupin s PVE a PVE SCs neprokázalo statisticky signifikantní rozdíl v OS. Oproti významnému rozdílu v DFI jsme v této studii neprokázali statistický významný rozdíl v OS mezi pacienty, kteří podstoupili PVE, a pacienty, kteří byli primárně resekalní. Díky dnešním možnostem paliativní léčby jsme schopni nabídnout i pacientům s časnou recidivou CLM alternativní možnosti jak prodloužit OS. U pacientů s recidivou v první době zvažujeme reoperaci s resekcčním výkonem. U pacientů po rozsáhlých resekcích na játrech jsme obvykle omezeni malým FLRV. U těchto pacientů se pak snažíme využívat destrukce CLM pomocí RFA (především perkutánních CT navigovaných výkonů), TACE a samozřejmě paliativní chemoterapií [50 s. 185, 259]. I v naší studii jsme prokázali, že podání 5-FU po resekcii jak primárního CRC, tak i CLM mělo významný vztah k DFI a OS.

Provedení PVE nabízí pacientům s dříve inoperabilním postižením jater možnost dosáhnout operabilního stádia a následně i OS, které je srovnatelné s pacienty primárně resekabilními. Aplikace SCs v naší studii přispěla k vyššímu procentu dosažených resekčních výkonů a měla nižší výskyt extrahepatální progresse onemocnění.

## **8.2 Diskuze k tumor infiltrujícím lymfocytů**

K predikci prognózy u pacientů s maligním onemocněním nám vsoučasné době slouží TNM klasifikace. U CRC však na jejím podkladě může dojít k podstážování pacientů, které má za následek nepodání adjuvantní onkologické léčby s následnou recidivou onemocnění. Proto jsou intenzivně zkoumány nové faktory, které by tyto, do daného stádia obtížně zařaditelné pacienty, odhalily. Jednou z možností je i imunoediting se stanovením TILs. U pacientů s CRC je již uvěřitelně řada studií, ale u pacientů s CLM je prozatím provedeno malé množství studií, které by ozřejmily vztahy mezi imunitním systémem a CLM. V naší studii nás zajímalo i to, zdali je provedení PVE a PVE s aplikací SCs schopné zastoupení TILs ovlivnit (např. použitím embolizačního materiálu a případně i vliv aplikovaných SCs).

### **8.2.1 Diskuze k zastoupení jednotlivých TILs mezi sledovanými skupinami**

Předešlé studie provedené na vzorcích CLM prokázaly CD8<sup>+</sup> buňky jako prognosticky příznivý faktor ve vztahu k OS. Naopak CD4<sup>+</sup> buňky a T reg jsou spojovány s kratším OS. Katz doporučuje stanovení poměrů jednotlivých typů lymfocytů, protože lépe vystihují biologické interakce mezi TILs [16].

#### ***CD8<sup>+</sup> lymfocyty***

Při porovnání zastoupení TILs mezi jednotlivými skupinami je patrné, že u pacientů po PVE s aplikací SCs a u pacientů po samotné PVE byl pozorován nižší počet CD8<sup>+</sup> buněk v HPF oproti pacientům primárně operabilním. Semikvantitativní hodnocení pak vyšlo bez statisticky signifikantních rozdílů.

Zvýšení CD8<sup>+</sup> buněk jako přímých cytotoxických efektorů je obecně spojováno s prognostickým benefitem [260]. U našich sledovaných skupin je patrné, že primárně operabilní pacienti mají vyšší zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk oproti pacientům s provedenou PVE. Předpokládáme, že tento stav je dán pokročilostí nádorového onemocnění. Pacienti, kteří byli indikováni k PVE, mají pokročilejší nález CLM. Vyšší zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk u primárně operabilních pacientů tak může svědčit o schopnosti organismu ještě vyvolat cytotoxickou reakci proti CLM, zatím co pacienti indikovaní k PVE již danou schopnost

ztratili. Tuto myšlenku podporují i výsledky Gulubové, která ve své studii pozorovala nižší zastoupení TILs a tedy i CD8<sup>+</sup> lymfocytů u pacientů s vícečetnými CLM [200]. Samotná přítomnost CD8<sup>+</sup> lymfocytů však ještě nemusí znamenat cytotoxický efekt. Nejprve je nutná tumor specifická aktivace CD8<sup>+</sup> buněk. Tato aktivace je dána kooperací CD8<sup>+</sup> lymfocytů s CD4<sup>+</sup> lymfocyty migrujícími do tumorózní tkáně. U CRC je vysoká aktivace CD8<sup>+</sup> buněk přítomna u nízkých stádií CRC a nízká aktivace u vysokých stádií onemocnění [261]. U CLM je tento efekt prozatím neověřen. Lze předpokládat, že tento efekt nastává i v případě CLM, kdy s pokročilostí onemocnění klesá aktivace, a tedy i cytotoxický efekt CD8<sup>+</sup> lymfocytů. V našem případě pro nízkou aktivaci CD8<sup>+</sup> lymfocytů svědčí i nízká hodnota u zastoupení Granzymu B, která se navíc nelišila mezi sledovanými skupinami.

Vzhledem k tomu, že zastoupení CD8<sup>+</sup> lymfocytů bylo významně nižší jak u skupiny PVE, tak i u skupiny PVE SCs oproti primárně resekalbním pacientům, nepředpokládáme, že by tento stav byl způsoben podáním SCs. Na rozdíl od jiných studií jsme neprokázali odlišné zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk ve vztahu k infiltraci konkrétní části tumorózní tkáně. Brunner udává význam PTL CD8<sup>+</sup> ve stromatu blízko tumoru a ve fibrotické kapsule kolem tumoru [262]. Berthel ve své analýze udává, že k prodloužení OS přispívají především CD8<sup>+</sup> lymfocyty lokalizované ve vzdálenosti 20-30  $\mu\text{m}$  od hranice metastázy [238].

V této studii jsme neprokázali statisticky signifikantní vztah CD8<sup>+</sup> lymfocytů k DFI a OS u žádné ze sledovaných skupin. Zde je naše studie v kontrastu s dříve publikovanými výsledky jiných autorů. Tyto studie však byly provedeny na větším vzorku pacientů, které byly až dvojnásobné při porovnání s naším souborem [15, 16, 17]. O tom může svědčit např. vztah CD8<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekováných, které vyšlo těsně za hranicí statistické významnosti. Je pravděpodobné, že při vyšším počtu pacientů bychom již získali statisticky signifikantní výsledek. Jako další faktor, který mohl negativně ovlivnit vztah CD8<sup>+</sup> k DFI a OS, je již výše diskutovaná nízká aktivace CD8<sup>+</sup> lymfocytů.

### ***CD4<sup>+</sup> lymfocyty***

V naší studii jsme u CD4<sup>+</sup> buněk pozorovali významně nižší zastoupení v jejich celkovém počtu na HPF u všech pacientů s provedenou PVE (skupina PVE a PVE SCs dohromady) oproti pacientům s primární resekci. Obdobné rozdíly jsme mohli pozorovat i u semikvantitativního hodnocení, kde byly významné rozdíly v zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v ITL,

ISL, PTL a Crohn-like infiltraci. Při bližším rozboru je však patrné, že tyto rozdíly byly dány především nízkým zastoupením CD4<sup>+</sup> lymfocytů v HPF, ITL, ISL a Crohn like infiltraci ve skupině pacientů s podanými SCs po PVE. Pouze u PTL byly hodnoty CD4<sup>+</sup> nízké jak u skupiny PVE SCs, tak i u skupiny PVE v porovnání se skupinou primárně operabilních pacientů. V současné době, není jasné, jaké chování SCs vykazují po jejich aplikaci a průchodu jaterním cévním řečištěm a jaterní tkání. Jednou z možností je i průchod systémovým řečištěm. Zde pak cestou a.hepatica dextra mohou projít jaterním parenchymem s okludovanou větví portální žíly a ovlivnit i buňky přítomné v tomto laloku. SCs mají díky tvorbě velké škály cytokinů a růstových faktorů potenciál ovlivnit CD4<sup>+</sup> buňky. To potvrzují i experimentální studie provedené na myších, kde SCs z kostní dřeně (především MSCs) byly schopné potlačit aktivaci CD4<sup>+</sup> lymfocytů a vedly k navýšení a diferenciaci T lymfocytů v T reg [263]. V humánní medicíně tento efekt SCs stojí za zmírněním projevů reakce štěpu proti hostiteli [264]. V korelaci s naší studií lze tímto dějem vysvětlit nízké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk a vyšší zastoupení T reg u pacientů s podanými SCs po PVE. V případě nízkého zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk u pacientů s provedenou PVE je nutné zmínit i možnost ovlivnění tohoto stavu onkologickou léčbou. Correale popisuje, že u pacientů s pokročilým CRC podstupujících chemoterapii nebo chemoimunoterapii pozoroval vyšší zastoupení T reg (FoxP3<sup>+</sup>) buněk [265]. Jednou skupinou pacientů, kteří byli indikováni k PVE, byli i pacienti s prolongovanou chemoterapií. V tomto případě nemůžeme vyloučit ani efekt podané onkologické léčby, která mohla stimulovat diferenciaci CD4<sup>+</sup> lymfocytů do FoxP3<sup>+</sup> buněk.

Vyšší zastoupení CD4<sup>+</sup> lymfocytů ve skupinách s PVE a primárně resekabilních pacientů podporuje naši hypotézu o snaze organismu vyvolat stimulaci CD8<sup>+</sup> buněk cytotoxickou reakcí vůči tumoru. CD4<sup>+</sup> buňky lze rozdělit na Th1, Th2 a T reg. V případě Th1 a Th2 lymfocytů byl popsán rozdílný účinek těchto dvou podskupin na CRC. Zvýšené počty Th1 lymfocytů a jejich cytokinů byly stanoveny jako prognosticky příznivé faktory z hlediska progresu onemocnění z adenomu do CRC, ale i ve vztahu k lepšímu DFI [217]. Progresi onemocnění naopak podporují Th2 lymfocyty a jejich působky [216]. Tento efekt je dán stimulačním efektem Th1 lymfocytů na CD8<sup>+</sup> lymfocyty a podporou jejich cytotoxické reakce [219]. V naší studii jsme prokázali významný negativní vztah CD4<sup>+</sup> lymfocytů k DFI u skupiny pacientů s provedenou PVE. CD4<sup>+</sup> buňky se zde projeví jako

negativní prognostický faktor, protože jejich přítomnost zvyšovala riziko recidivy. Katz udává, že pacienti, kteří měli vysoké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk, dosáhli kratšího OS. Tyto závěry svědčí spíše pro přítomnost Th2 lymfocytů, které mohou mít protumorigenní potenciál [16]. Prozatím není jasné, jaký mechanismus rozhoduje o aktivaci protumorigenní nebo již výše zmiňované cytotoxické reakce. Vybrané nádorové buňky se mohou adaptovat na přítomnost CD4<sup>+</sup> buněk a využít jejich prostimulační potenciál [16]. Uvažuje se, že samotné mikroprostředí tumoru atrahuje CD4<sup>+</sup> buňky, které následně působí jako akcelerátor nádorového růstu [218].

### ***T regulační lymfocyty***

Ve výsledcích naší studie je patrné, že u pacientů s provedenou PVE (a to jak prostou PVE, tak i PVE s aplikací SCs) bylo vyšší zastoupení T reg (CD25<sup>+</sup> a Foxp3<sup>+</sup> buněk) v HPF. Semikvantitativní rozdělení bylo bez statisticky významných rozdílů. Z grafů vyplývá, že zvýšení jak FoxP3<sup>+</sup>, tak i CD25<sup>+</sup> buněk v HPF bylo u všech pacientů s provedenou PVE bez statisticky signifikantního rozdílu mezi PVE a PVE SCs.

T reg jsou podskupinou CD4<sup>+</sup> buněk vykazující vysoký supresní potenciál na okolní buňky. Tento supresní efekt je dán konkrétním typem produkovaného cytokinu nebo růstového faktoru. Jedná se např. o IL 10 nebo TGF-β [207]. T reg produkující TGF-β potlačují funkci jak Th1 tak i Th2 lymfocytů. TGF-β však má i významný vliv na regeneraci hepatocytů. Zde je důležitým mitoinhibitorem, který ukončuje dělení hepatocytů a je schopen navodit apoptózu hepatocytů [93, 266]. Zvýšené hladiny T reg ve skupinách PVE a PVE SCs si vysvětlujeme jako důsledek provedení PVE. T reg produkující TGF-β podporují vyvolání apoptózy hepatocytů. Apoptóza je důležitým dějem u pacientů podstupujících PVE, kdy postupně dochází k atrofii laloku s okludovaným portálním řečištěm. Míra atrofie pak indukuje i míru kompenzatorní hypertrofie kontralaterálního jaterního laloku a podporuje růst FLRV.

Velmi diskutovaný je efekt T reg na progresi nádorového onemocnění. Imunosupresní efekt T reg je v první řadě cílen jako mechanismus imunotolerance organismu [205, 208]. V případě maligního nádorového onemocnění se tento efekt imunotolerance projeví jako negativní faktor, který snižuje antitumorózní imunitní reakci a tím zkracuje OS a DFI [207]. V případě prognostického významu T reg se publikované



studie jak pro CRC, tak i pro CLM rozcházejí [229]. Katz publikoval studii, kde bylo vysoké zastoupení T reg negativní prognostický faktor pro OS a DFI [17]. Na druhou stranu Nakagawa udává, že peritumorální přítomnost T reg buněk zlepšuje přežití u pacientů po resekcích jater pro CLM. Domnívá se, že přítomné T reg se orientují na snížení zánětlivé odpovědi v okolí tumoru a neovlivňují cytotoxickou reakci vyvolanou CD8<sup>+</sup> lymfocyty [267]. Naše studie neprokázala statisticky signifikantní vztah samostatně stanovených T reg k OS a DFI ani u jedné ze sledovaných skupin.

### ***Poměry zastoupení TILs***

TILs jsou známé svoji kooperací mezi jednotlivými skupinami lymfocytů. Důležitá je spolupráce především T reg a CD4<sup>+</sup> buněk s CD8<sup>+</sup> buňkami. Stanovení poměrů slouží k ozřejvení těchto vztahů. Katz udává, že poměry TILs mají větší prediktivní hodnotu než individuální stanovení TILs. Poměry jsou schopné lépe zhodnotit funkční dopad jednotlivých typů lymfocytů a v klinické praxi mohou mít více relevantní hodnotu [17]. I v této studii jsme využili poměrů, abychom si ověřili předpokládané vztahy jednotlivých TILs, které již byly zmíněny v diskuzi výše.

V naší studii byl mezi sledovanými skupinami patrný statisticky signifikantní rozdíl u poměrů buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Ve vztahu k DFI byl zazanamenán signifikantní vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u celého souboru pacientů. U pacientů primárně resektabilních pak byl významný vztah poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> k DFI. Ve vztahu k OS jsme v naší studii nepozorovali žádný statisticky signifikantní výsledek.

Z výsledků je patrné, že T reg byly zvýšené oproti CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buňkám, a to u skupin PVE a PVE SCs. Tento vztah tak opět může svědčit o aktivaci proapoptotické složky v jaterním parenchymu s provedenou PVE. U porovnání T reg s CD4<sup>+</sup> buňkami je také patrné, že CD4<sup>+</sup> buňky byly významně sniženy a FoxP3<sup>+</sup> buňky naopak zvýšené u pacientů s PVE SCs. Lze spekulovat, zdali tento nálezní vypovídá o možném přispění SCs při rozvoji apoptózy jaterních buněk a následné atrofii daného jaterního laloku jako důsledek konverze CD4<sup>+</sup> do T reg [231]. Při porovnání T reg s CD8<sup>+</sup> lymfocyty je patrný trend aktivace cytotoxické složky u primárně resektabilních pacientů s CLM. U pacientů primárně resektabilních jsme pozorovali i statisticky signifikantní vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

vůči DFI. Pokud tento poměr stoupá, snižuje se riziko recidivy. Tento výsledek je však v kontrastu s Katzovou studií, kde byly vyšší hodnoty poměrů buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> a FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> spojeny s horším celkovým přežitím [17]. Jinou studii, která by tento vztah u pacientů s CLM studovala, se nám nepodařilo dohledat. Infiltrace tumoru FoxP3<sup>+</sup> lymfocyty jsou u řady karcinomů (ovaria, plic, ledvin, žaludku, jater) popisovány jako negativní prognostické faktory. U CRC je však situace odlišná. Na jedné straně stojí studie např. Sinicropeho nebo Suzukiho, kteří uvádí vztah poměru buněk CD3<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> respektive CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> jako prognosticky významný pro DFI a OS [268]. Sinicrope také udává, že nízký poměr buněk CD3<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> a nízké zastoupení samotných CD3<sup>+</sup> buněk ovlivňují mikrometastazování. Tato situace platí pro intraepiteliální zastoupení TILs. Autor také upozorňuje, že u stromální infiltrace může být vztah už jiný [269]. Na druhé straně řada studií potvrdila, že intratumorální přítomost FoxP3<sup>+</sup> buněk u CRC zlepšuje prognózu [227, 270]. Correale studoval zastoupení FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů u pacientů s pokročilým CRC, kteří podstupovali chemoimunoterapii. U těchto pacientů pozoroval, že vysoké zastoupení FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů bylo významným prognostickým faktorem s lepší odpovědí na léčbu [265]. Pacienti s CLM často podstupují onkologickou léčbu před samotnou resekci jater, např. podání 6 cyklů onkologické léčby před chirurgickým výkonem. V případě skupiny PVE SCs byly pacienti často předlěčeni prolongovanou onkologickou léčbou. I tento faktor může hrát významnou roli, proč byli v naší studii FoxP3<sup>+</sup> lymfocyty vysoce zastoupené u pacientů s PVE SCs a proč vycházejí jako pozitivní faktor pro DFI u primárně resekabilních pacientů ve vztahu k CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> buňkám [265].

Zajímavý výsledek přináší porovnání CD8<sup>+</sup> s CD4<sup>+</sup> buňkami. Je z něj patrné, že nejnižší hodnoty poměru dosahují pacienti ve skupině PVE. U pacientů primárně resekováných je již poměr vyšší ve prospěch CD8<sup>+</sup> buněk a je tak v souladu s naším předpokladem vyšší aktivity cytotoxické složky u této skupiny pacientů. Překvapující je však poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> u skupiny PVE SCs, kde je patrné vysoké zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk a nízké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk. Nepředpokládáme, že by tento stav byl způsoben vyšší aktivací cytotoxické složky. Ve vztahu k ostatním výsledkům se přikláníme k názoru, že snížení CD4<sup>+</sup> (a jejich diferenciace v T reg) v důsledku podání SCs nebo v důsledku předoperační onkologické léčby bylo natolik výrazné, že ovlivnilo tento poměr ve prospěch CD8<sup>+</sup>. V rámci rekurence onemocnění byl pozorován statisticky signifikantní vztah poměru

buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resektabilních. Ve skupině PVE byl tento vztah k DFI těsně za hranicí statistické významnosti. V případě primárně resektabilních pacientů byl vzestup poměru spojen se vzestupem rizika recurence. Katz ve své studii využil poměr buněk CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> a udává, že vysoká hodnota tohoto poměru byla v korelaci s lepším OS a DFI [17]. Pro vyvolání cytotoxické reakce cestou CD8<sup>+</sup> buněk je nezbytná jejich předchozí aktivace pomocí CD4<sup>+</sup> buněk [261]. Poměr mezi buňkami CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> tak vypovídá o tomto vztahu. Zvýšení CD4<sup>+</sup> buněk, které je v případě těchto poměrů spojeno s lepším OS, nebo DFI může svědčit o vyšší aktivaci cytotoxické složky [17].

Dalším zajímavým výsledkem je poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>. Oba použité markery (FoxP3 i CD25) jsou markery T reg. Ve studii jsme pozorovali, že je tento poměr zvýšen u pacientů primárně resektabilních oproti pacientům ve skupinách PVE a PVE SCs. Také jsme pozorovali signifikantní vztah tohoto poměru k DFI u všech pacientů dohromady. Z poměru rizika recidivy vyplývá, že v případě, kdy se výsledné číslo poměru zvyšuje, snižuje se riziko vzniku recidivy. CD25 je povrchový receptor pro IL-2. Jeho aktivace je nezbytná k následné aktivaci FoxP3 [208]. Předpokládá se tedy, že existují různě vyžralé populace T reg. Poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> vypovídá o míře aktivace a procesu maturace T reg. Vyšší hodnoty poměru by tak ukazovaly na aktivaci vyžralějších forem T reg. Z naší studie vyplývá, že vyšší zastoupení vyžralých forem T reg je pozitivním faktorem vzhledem k riziku rozvoje recidivy u pacientů, kteří podstupují jakoukoliv resekcí jater pro CLM.

### ***Dendritické buňky, Natural Killers, granzym B a serpin B9***

V naší studii jsme neprokázali významné rozdíly v zastoupení DCs, NKs, granzymu B a serpinu B9 mezi skupinami PVE SCs, PVE a skupinou primárně resektabilních pacientů.

DCs (CD86<sup>+</sup> buňky) jsou hlavní složkou APCs. V minulosti byl popsán jejich vztah k CRC. Nízké zastoupení DCs u pacientů s CRC mělo vztah k metastazování do lymfatických uzlin [171, 173, 174]. V případě CLM byla popsána vazba mezi DCs a CD8<sup>+</sup>buněk. V případě vysoké infiltrace tumoru těmito imunocyty se snižuje růst CLM [175]. Na druhou stranu DCs jsou negativně ovlivňovány mikroprostředím tumoru, které v důsledku cytokinů snižuje denzitu DCs ve tkáni tumoru. U metastáz je zastoupení DCs až 6x nižší oproti tkáni CRC. Tím se snižuje i stimulace buněk specifické imunity, především efektorových CD8<sup>+</sup>

buněk [271]. Předpokládáme, že nízké zastoupení APCs mohlo být jednou z příčin, která se podílela na nízké cytotoxické reakci organismu proti CLM v našem souboru pacientů.

Také NKs jsou spojované s prodloužením OS a DFI u pacientů s CRC [172, 195, 196]. U pacientů s CLM je obvykle pozorované malé zastoupení NKs v okolí metastáz. Pokud jsou však přítomny, pak je to obvykle v korelaci s CD8<sup>+</sup> buňkami [200]. Důvodem, proč jsou NKs v CLM neefektivní, jsou vysoké hladiny TGF- $\beta$ 1, obvykle ze zvýšené produkce nádorovými buňkami. Tento růstový faktor zvyšuje apoptózu, narušuje funkci perforinů, Fas a snižuje expresi NKG2D receptorů [204]. TGF- $\beta$  je hlavním produktem T reg, které byly ve zvýšené míře pozorované i u našich pacientů s PVE a PVE SCs. Mimo samotného mikroprostředí tumoru tak T reg mohou snižovat zastoupení a efekt NKS, tak jak jsme pozorovali i u našich skupin pacientů. Faktor, který také ovlivňuje efektivitu NKs a CD8<sup>+</sup> buněk, jsou serpiny. Serpiny způsobují blokádu perforinů a granzymů uvolněných do extracelulárního prostředí (v našem případě serpinu B9 a granzymu B) [272]. V naší studii jsme u žádné skupiny nezaznamenali vysoké hodnoty serpinu B9. Na tomto faktu se mohlo podílet i nízké zastoupení Granzymu B, který tak nevyvolal protireakci v podobě uvolňování serpinu B9 z okolních buněk.

### 8.3 Diskuze k ABC transportétům

Onkologická léčba je nedílnou součástí komplexní péče o onkologicky nemocné. U řady pacientů však dochází k progresi onemocnění i přes podanou onkologickou léčbu. U řady tumorů (karcinom prsu, slinivky, ovaria) byl již popsán význam ABC transportérů v rámci rezistence k onkologické léčbě [273, 274, 275, 276]. Při terapii CRC jsou nejvíce využívány režimy na základě Oxaliplatinu a 5-FU. U pacientů s CRC nereagujících na onkologickou léčbu byla popsána souvislost s ABCC10 a ABCC11. V pracích, na kterých se podílelo i naše pracoviště, byl popsán vztah nízkých hladin ABCC11 a špatné odpovědi na paliativní léčbu. U pacientů s adjuvantní léčbou byl pozorován kratší DFI při nízkých transkripčních hladinách ABCC11 a stejně tak i nízká proteinová exprese ABCC11 zvyšovala riziko rekurence. Nízká transkripční hladina ABCC10 korelovala s gradingem tumoru a nízká proteinová exprese tohoto transportéru zvyšovala riziko úmrtí [48,49]. V naší studii jsme porovnávali zastoupení ABCC10 a ABCC11 mezi sledovanými skupinami a jejich vztah k DFI a OS. Mezi sledovanými skupinami jsme rozdíl v zastoupení jednotlivých transportérů neprokázali. Stejně tak nebyl prokázán vztah ABCC10 a ABCC11 k DFI a OS u žádné ze sledovaných skupin. Získané hodnoty ABCC transportérů u sledovaných skupin jsme neporovnávali se zdravou jaterní tkání, což je nedostatkem tohoto stanovení. V současné době je jen minimum studií, které se zabývají ABC transportéry u pacientů s CLM. Nanashima ve své studii nepozoroval korelaci mezi tzv. MRP (Multidrug Resistance Proteins – dřívější označení ABCC) a klinickopatologickými daty mezi pacienty s CRC a pacienty s CLM. Jednotlivé transportéry blíže nespecifikuje [277]. V naší studii jsme vyšli z předchozí zkušenosti s ABC transportéry u pacientů s CRC. Naše výsledky nevylučují, že se na rezistenci k onkologické léčbě nemohou podílet jiné typy ABC transportérů. Yamauchi udává vztah nízké hladiny ABCB1 u pacientů s časnou recidivou oproti pacientům bez rekurence [278]. ABCB1 je transportér obecně zodpovědný za lékové rezistence u jater [279]. U HCC je popisován vztah dediferencovaných tumorů a vaskulární mikroinvaze v případě nízkého zastoupení ABCB1. Exprese transportéru je také ovlivnitelná podanou chemoterapií, kdy při podání onkologické léčby stoupají zastoupení tohoto receptoru oproti pacientům s HCC bez podané onkologické léčby [280]. Trend ve změně povrchové exprese ABCC10 jsme pozorovali i u našeho souboru pacientů. Vzhledem k tomu, že výsledek vyšel těsně za

hranicí statistické významnosti, hovoříme o trendu, kdy pacienti, kteří měli po operaci primárního CRC podán 5-FU, vykazovali v resekovaných CLM nižší zastoupení ABCC10. Je zde patné, že ABCC10 a 5-FU se vzájemně ovlivňují, nicméně v našem případě tento vztah neměl korelaci k DFI ani OS. Tento vztah by se mohl projevit v případě většího souboru pacientů zavzatých do studie. V rodině ABCC transportérů byly u primárních tumorů popsány změny exprese v ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4 [279]. Např. zvýšené exprese ABCC1 byly pozorovány u poloviny pacientů s dediferencovaným HCC a mikrovaskulární expanzí. Zvýšená exprese byla popsána i u CHCC, ale bez korelace s klinickopatologickými daty [279]. Rodina ABCC transportérů spolu s ABCB1 mohou být zajímavým cílem dalšího výzkumu lékové rezistence u pacientů s tumory jater. Danou skupinu transportérů lze doplnit ještě o ABCG2, který také vykazoval změny ve své expresi u pacientů s HCC v závislosti na podání onkologické léčby [281].

## 9. Závěr

Tato studie neprokázala statisticky signifikantní rozdíl v nárůstu FLRV u pacientů po PVE s aplikací SCs oproti pacientům s prostou PVE. Trend nejrychlejšího nárůstu FLRV jsme mohli pozorovat u pacientů s PVE a aplikací SCs se vstupním FLRV menším než 30 %. Aplikace SCs neakcelerovala růst CLM po provedení PVE. Pacienti po provedené PVE a aplikaci SCs měli nižší procento explorativních laparotomií a statisticky signifikantně nižší výskyt extrahepatálních metastáz v poresekčním období. Tento fakt bude jistě zajímavým tématem dalšího výzkumu. Pacienti po provedené PVE a aplikaci SCs dosahovali shodného DFI a OS jako pacienti s provedenou prostou PVE. Obě tyto skupiny pacientů pak vykazují kratší DFI oproti pacientům primárně operabilním, ale ve vztahu k OS jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíly. Studie tak vypovídá o přínosu PVE a PVE s aplikací SCs, kdy je možné i u pacientů s pokročilým metastatickým postižením jater dosáhnout shodného OS jako u pacientů primárně operabilních. Prokazatelný je přínos podané adjuvantní onkologické léčby k OS.

V rámci stanovení TILs jsme nepozorovali aktivaci cytotoxické složky specifické imunity u sledovaných skupin. I přes vyšší počty CD8<sup>+</sup> buněk u pacientů s primárně operabilními CLM jsme nepozorovali jejich korelaci s DFI a OS. Ve studii jsme prokázali význam T reg u skupin PVE a především u skupiny PVE SCs, kde T reg mohly výrazně přispět k atrofii okludovaných jaterních laloků. Samotné stanovení T reg se neprojevalo jako významný prognostický faktor ve vztahu k DFI nebo OS. Vysoké zastoupení T reg především u skupiny PVE SCs bylo pravděpodobnou příčinou nízkého zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk. Vliv SCs na případnou diferenciaci CD4<sup>+</sup> buněk do T reg a následné ovlivnění atrofie jaterních laloků může být směrem, kam výsledky této studie dále rozvíjet.

U skupiny PVE vyšlo stanovení CD4<sup>+</sup> buněk v HPF a v ISL jako negativní prognostický faktor zkracující DFI. Z důvodu malého počtu pacientů nevyšel pro PVE SCs žádný ze sledovaných parametrů, jako prognosticky významný. NKs a DCs byly u pacientů zahrnutých do naší studie přítomny jen v malých počtech a neměly prognostický význam.

Pro lepší porozumění ve vztazích mezi jednotlivými TILs byly použity poměry jednotlivých imunocytů. Prokázali jsme signifikantní vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> k DFI, kdy vyšší hodnoty snižovali riziko rekurence u všech pacientů zařazených do studie. Tento poměr také nasvědčuje, že za snížením rizika rekurence stojí

především vyvrálé formy FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů. Růst poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> se u primárně operabilních pacientů projevil jako negativní prognostický faktor. Nález svědčí pro neúspěšnou aktivaci cytotoxické reakce.

V poslední části práce bylo sledováno zastoupení ABC transportérů. Zastoupení ABCC10 a ABCC11 bylo bez signifikantních rozdílů mezi sledovanými skupinami. Ve studii je však patrný vztah v minulosti podaného 5-FU na expresi ABCC10. Pozorovali jsme trend ve změně exprese těchto transportérů u pacientů v minulosti léčených 5-FU, kteří následně měli nižší zastoupení ABCC10 v CLM. Ve studii jsme neprokázali vztah ABCC10 a ABCC11 transportérů k DFI a OS.

Tato práce prokazuje vztah T reg k CLM, a to především u pacientů podstupujících PVE a PVE s aplikací SCs. Studium T reg může přispět k objasnění vztahů mezi PVE, atrofií jaterního parenchymu s okludovaným portálním řečištěm a kontralaterální kompenzatorní hypertrofií FLRV. Tyto vazby pak lze využít k navyšování počtu primárně inoperabilních pacientů, kteří jsou nakonec dovedeni k radikálnímu resekcčnímu výkonu.



## 10. Použitá literatura

1. DUŠEK, L. et al. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v mezinárodním srovnání. *Kolorektum.cz* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Institut biostatistiky a analýz, poslední aktualizace 10.12.2015 [cit. 2018-03-24]. ISSN 1804-0888. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-mezinarodnim-srovnani>
2. MAYO, S. C. et al. Shifting trends in liver-directed management of patients with colorectal liver metastasis: a population-based analysis. *Surgery* [online]. 2011, **150**(2), 204-216 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/j.surg.2011.06.013. ISSN 0039-6060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606011002960>
3. BHOGAL, R. H. et al. Predictors of early recurrence after resection of colorectal liver metastases. *World Journal of Surgical Oncology* [online]. 2015, **13**(1) [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1186/s12957-015-0549-y. ISSN 1477-7819. Dostupné z: <http://www.wjso.com/content/13/1/135>
4. SOBIN, L. H. a CH. WITTEKIND, ed. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*. 7. vyd. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2011. ISBN 978-80-904259-6-5.
5. LEE-KONG, S. a D. LISLE. Surgical Management of Complicated Colon Cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* [online]. 2015, **28**(04), 228-233 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1055/s-0035-1564621. ISSN 1531-0043. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1564621>
6. LOFFROY, R. et al. Preoperative portal vein embolization in liver cancer: indications, techniques and outcomes. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* [online]. 2015, **5**(5), 730-739 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4292.2015.10.04. ISSN 2223-4306. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4671969/>
7. HONJO, I. et al. Ligation of a branch of the portal vein for carcinoma of the liver. *American Journal of Surgery*. 1975, **130**(3), 296-302. ISSN 0002-9610.
8. ABDALLA, E. K. et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Annals of Surgery* [online]. 2004, **239**(6), 818-827 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1097/01.sla.0000128305.90650.71. ISSN 1528-1140. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1356290/>
9. SCHNITZBAUER, A. A. et al. Right Portal Vein Ligation Combined With In Situ Splitting Induces Rapid Left Lateral Liver Lobe Hypertrophy Enabling 2-Stage Extended Right Hepatic Resection in Small-for-Size Settings. *Annals of Surgery* [online]. 2012, **255**(3), 405-414 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31824856f5. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-201203000-00001>
10. JAECK, D. et al. A Two-Stage Hepatectomy Procedure Combined With Portal Vein Embolization to Achieve Curative Resection for Initially Unresectable Multiple and Bilobar Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgery* [online]. 2004, **240**(6), 1037-1051 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1097/01.sla.0000145965.86383.89. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200412000-00013>

11. OUSSOULTZOGLOU, E. et al. Right Portal Vein Embolization Before Right Hepatectomy for Unilobar Colorectal Liver Metastases Reduces the Intrahepatic Recurrence Rate. *Annals of Surgery* [online]. 2006, **244**(1), 71-79 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1097/01.sla.0000217609.26178.35. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200607000-00011>
12. AM ESCH, J. S. et al. Infusion of CD133+ Bone Marrow–Derived Stem Cells After Selective Portal Vein Embolization Enhances Functional Hepatic Reserves After Extended Right Hepatectomy. *Annals of Surgery* [online]. 2012, **255**(1), 79-85 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31823d7d08. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-201201000-00013>
13. FÜRST, G. et al. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology* [online]. 2007, **243**(1), 171-179 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1148/radiol.2431060625. ISSN 0033-8419. Dostupné z: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2431060625>
14. GALON, J. et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *The Journal of Pathology* [online]. 2014, **232**(2), 199-209 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1002/path.4287. ISSN 0022-3417. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4287>
15. NAITO, Y. et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research* [online]. 1998, **58**(16), 3491-3494 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1538-7445. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/16/3491.long>
16. KATZ, S. C. et al. T Cell Infiltrate Predicts Long-Term Survival Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2009, **16**(9), 2524-2530 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1245/s10434-009-0585-3. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-009-0585-3>
17. KATZ, S. C. et al. Regulatory T Cell Infiltration Predicts Outcome Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2013, **20**(3), 946-955 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1245/s10434-012-2668-9. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-012-2668-9>
18. FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* [online]. 2015, **136**(5), E359-E386 [cit. 2016-11-15]. DOI: 10.1002/ijc.29210. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210>
19. FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* [online]. 2013, **49**(6), 1374-1403 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.027. ISSN 0959-8049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913000075>
20. LIPSKÁ, L. a kol. *Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3026-4.
21. GREGOR, J. et al. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. *Kolorektum.cz* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Institut biostatistiky a analýz, poslední aktualizace 10. 12. 2014 [cit. 2018-03-24]. ISSN 1804-0888. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>

22. GUYOT, F. et al. Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer. *Annals of Oncology* [online]. 2005, **16**(5), 756-761 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1093/annonc/mdi151. ISSN 1569-8041. Dostupné z: <http://academic.oup.com/annonc/article/16/5/756/150213/Time-trends-in-the-treatment-and-survival-of>
23. MEYERHARDT, J. A. et al. Follow-Up Care, Surveillance Protocol, and Secondary Prevention Measures for Survivors of Colorectal Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2013, **31**(35), 4465-4470 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.7442. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.50.7442>
24. NOVÁK, P. et al. Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě. *Rozhledy v chirurgii* [online]. 2012, **91**(4), 219-222 [cit. 2018-03-22]. ISSN 0035-9351. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/rozhledy-v-chirurgii-clanek/klinicke-prognosticke-faktory-kolorektalniho-karcinomu-po-jeho-radikalni-lecbe-38396>
25. GIESSEN-JUNG, C. et al. Preoperative serum markers for individual patient prognosis in stage I–III colon cancer. *Tumor Biology* [online]. 2015, **36**(10), 7897-7906 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1007/s13277-015-3522-z. ISSN 1010-4283. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3522-z>
26. LIŠKA, V. *Prognostické faktory časné recidivy metastatického procesu kolorektálního karcinomu v játrech po jeho chirurgické léčbě*. Plzeň, 2008. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská Fakulta v Plzni, Chirurgická klinika. Vedoucí práce V. Třeška. Dostupné také z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/135796>
27. NEKULOVÁ, M., M. ŠIMÍČKOVÁ a D. VALÍK. Současné možnosti laboratorního vyšetřování pro onkologicky nemocné. *Onkologie* [online]. 2009, **3**(1), 48-52 [cit. 2018-03-20]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: <http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2009/01/10.pdf>
28. FIALA, O. et al. The Association of Serum Carcinoembryonic Antigen, Carbohydrate Antigen 19-9, Thymidine Kinase, and Tissue Polypeptide Specific Antigen with Outcomes of Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Bevacizumab: a Retrospective Study. *Targeted Oncology* [online]. 2015, **10**(4), 549-555 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s11523-015-0365-x. ISSN 1776-2596. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11523-015-0365-x>
29. YOKOTA, T. Are KRAS/BRAF Mutations Potent Prognostic and/or Predictive Biomarkers in Colorectal Cancers?. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **12**(2), 163-171 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.2174/187152012799014968. ISSN 1871-5206. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=12&issue=2&page=163>
30. ROBEŠOVÁ, B. et al. Molekulárně biologická diagnostika mutací genu KRAS a BRAF u pacientů s kolorektálním karcinomem – zkušenosti laboratorního pracoviště. *Klinická onkologie* [online]. 2013, **26**(1), 25-30 [cit. 2018-03-20]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/klinicka-onkologie-clanek/molekularne-biologicka-diagnostika-mutaci-genu-kras-a-braf-u-pacientu-s-kolorektalnim-karcinomem-zkusenosti-l-40014>

31. LIÈVRE, A. et al. KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2008, **26**(3), 374-379 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1200/JCO.2007.12.5906. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.12.5906>
32. FIALA, O. et al. G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumor Biology* [online]. 2016, **37**(5), 6823-6830 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s13277-015-4523-7. ISSN 1010-4283. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-4523-7>
33. SASTRE, J. et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Annals of Oncology* [online]. 2008, **19**(5), 935-938 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1093/annonc/mdm583. ISSN 0923-7534. Dostupné z: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdm583>
34. ECONOMOPOULOU, P., V. GEORGOULIAS a A. KOTSAKIS. Classifying circulating tumor cells to monitor cancer progression. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2016, **17**(2), 153-165 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1080/14737159.2017.1275572. ISSN 1473-7159. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2017.1275572>
35. ALLEN-MERSH, T. G. et al. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *British Journal of Surgery* [online]. 2007, **94**(1), 96-105 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1002/bjs.5526. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.5526>
36. ROGERS, A. C. et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* [online]. 2016, **115**(7), 831-840 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1038/bjc.2016.274. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bjc2016274>
37. WALDNER, M., C. C. SCHIMANSKI a M. F. NEURATH. Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2006, **12**(45), 7233-7238 [cit. 2018-03-21]. ISSN 2219-2840. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143936>
38. HOŘEJŠÍ, V. et al. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
39. SCHREIBER, R. D., L. J. OLD a M. J. SMYTH. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* [online]. 2011, **331**(6024), 1565-1570 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1126/science.1203486. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1203486>
40. ROCHA, R. et al. Impact of bowel resection margins in node negative colon cancer. *SpringerPlus* [online]. 2016, **5**(1) [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1186/s40064-016-3650-y. ISSN 2193-1801. Dostupné z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-3650-y>
41. GROFOVÁ, Z. Doporučené postupy ESPEN pro enterální a parenterální výživu v onkologii. *Medicína pro praxi* [online]. 2010, **7**(4), 196-198 [cit. 2018-03-21]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/04/11.pdf>

42. BOZZETTI, F. Rationale and indications for preoperative feeding of malnourished surgical cancer patients. *Nutrition* [online]. 2002, **18**(11-12), 953-959 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/S0899-9007(02)00988-7. ISSN 1873-1244. Dostupné z: [http://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007\(02\)00988-7/fulltext](http://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007(02)00988-7/fulltext)
43. HAMMOND, J. et al. The Burden of Gastrointestinal Anastomotic Leaks: an Evaluation of Clinical and Economic Outcomes. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2014, **18**(6), 1176-1185 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1007/s11605-014-2506-4. ISSN 1091-255X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11605-014-2506-4>
44. RAHBARI, N. N. et al. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: A proposal by the International Study Group of Rectal Cancer. *Surgery* [online]. 2010, **147**(3), 339-351 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/j.surg.2009.10.012. ISSN 0039-6060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606009006229>
45. HOCH, J. a F. ANTOŠ. *Koloproktologie: vybrané kapitoly*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4179-9.
46. HANNA, M. H., A. VINCI a A. PIGAZZI. Diverting ileostomy in colorectal surgery: when is it necessary?. *Langenbeck's Archives of Surgery* [online]. 2015, **400**(2), 145-152 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1007/s00423-015-1275-1. ISSN 1435-2443. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00423-015-1275-1>
47. SUN, X. et al. Gene signatures associated with drug resistance to irinotecan and oxaliplatin predict a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncology Letters* [online]. 2017, **13**(4), 2089-2096 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.3892/ol.2017.5691. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.5691>
48. HLAVATÁ, I. et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187-196 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1093/mutage/ger075. ISSN 1464-3804. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/ger075>
49. KŘÍŽKOVÁ, V. et al. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **78**(3), 595-603 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s00280-016-3114-7. ISSN 0344-5704. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-016-3114-7>
50. SKALICKÝ, T. et al. *Hepato-pankreato-biliární chirurgie*. Praha: Maxdorf, c2011. Jessenius. ISBN 978-80-7345-269-8.
51. VÁLEK, V., Z. KALA a I. KISS. *Maligní ložiskové procesy jater: diagnostika a léčba včetně minimálně invazivních metod*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0961-9.
52. GOLDBERG, S. N. et al. Image-guided Tumor Ablation: Standardization of Terminology and Reporting Criteria. *Radiology* [online]. 2005, **235**(3), 728-739 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1148/radiol.2353042205. ISSN 0033-8419. Dostupné z: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2353042205>
53. LARSEN, L. P. S. Role of contrast enhanced ultrasonography in the assessment of hepatic metastases: A review. *World Journal of Hepatology* [online]. 2010, **2**(1), 8-15 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.4254/wjh.v2.i1.8. ISSN 1948-5182. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v2/i1/8.htm>

54. BARTOLOTTA, T. V. et al. Contrast-Enhanced Ultrasound in Focal Liver Lesions: Where Do We Stand?. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* [online]. 2016, **37**(6), 573-586 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1053/j.sult.2016.10.003. ISSN 0887-2171. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887217116300956>
55. KORČÁKOVÁ, E. et al. Role peroperační ultrasonografie v léčbě jaterních metastáz kolorektálního karcinomu - srovnání s výsledky předoperačních zobrazovacích vyšetření. *Česká radiologie* [online]. 2015, **69**(1), 37-41 [cit. 2018-03-20]. ISSN 1210-7883. Dostupné z: [http://www.cesradiol.cz/dwnld/CesRad\\_1501\\_37\\_41.pdf](http://www.cesradiol.cz/dwnld/CesRad_1501_37_41.pdf)
56. BLUMGART, L. H. a J. BELGHITI. *Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, c2007. ISBN 1-4160-3256-8.
57. MÍRKA, H. et al. Perfuzní CT jater. *Česká radiologie* [online]. 2010, **64**(4), 281-289 [cit. 2018-03-20]. ISSN 1210-7883. Dostupné z: [http://www.cesradiol.cz/dwnld/CesRad\\_1004\\_281\\_289.pdf](http://www.cesradiol.cz/dwnld/CesRad_1004_281_289.pdf)
58. LIŠKA, V. et al. *Experimental surgery*. 1st ed. Plzeň: Nava, 2016. ISBN 978-80-7211-490-0.
59. SKALICKÝ, T. et al. Diagnostika nádorů jater. *Onkologie* [online]. 2008, **2**(4), 216-218 [cit. 2018-03-20]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: <http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/04/02.pdf>
60. LIM, M. C. et al. CT volumetry of the liver: Where does it stand in clinical practice?. *Clinical Radiology* [online]. 2014, **69**(9), 887-895 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.crad.2013.12.021. ISSN 0009-9260. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000992601400083X>
61. VAUTHEY, J.-N. et al. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: Methodology and clinical associations. *Surgery* [online]. 2000, **127**(5), 512-519 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1067/msy.2000.105294. ISSN 0039-6060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606000773995>
62. LODEWICK, T. M. et al. Fast and accurate liver volumetry prior to hepatectomy. *HPB* [online]. 2016, **18**(9), 764-772 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.hpb.2016.06.009. ISSN 1365-182X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X16317919>
63. JIŘÍK, M. et al. Stereological quantification of microvessels using semiautomated evaluation of X-ray microtomography of hepatic vascular corrosion casts. *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery* [online]. 2016, **11**(10), 1803-1819 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1007/s11548-016-1378-3. ISSN 1861-6410. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11548-016-1378-3>
64. ZYGOMALAS, A. et al. Computer-assisted liver tumor surgery using a novel semiautomatic and a hybrid semiautomatic segmentation algorithm. *Medical & Biological Engineering & Computing* [online]. 2016, **54**(5), 711-721 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1007/s11517-015-1369-5. ISSN 0140-0118. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11517-015-1369-5>
65. FOWLER, K. J., D. C. LINEHAN a C. O. MENIAS. Colorectal Liver Metastases: State of the Art Imaging. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2013, **20**(4), 1185-1193 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1245/s10434-012-2730-7. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-012-2730-7>



66. BARRAL, M. et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in colorectal cancer. *Journal of Visceral Surgery* [online]. 2016, **153**(5), 361-369 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.jviscsurg.2016.08.004. ISSN 1878-7886. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878788616301205>
67. KARAOSMANOGLU, A. D. et al. Magnetic Resonance Imaging of Liver Metastasis. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* [online]. 2016, **37**(6), 533-548 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1053/j.sult.2016.08.005. ISSN 0887-2171. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887217116300695>
68. TOMLINSON, J. S. et al. Actual 10-Year Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases Defines Cure. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2007, **25**(29), 4575-4580 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1200/JCO.2007.11.0833. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.11.0833>
69. LAM, V. W. T. et al. A systematic review of two-stage hepatectomy in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *HPB* [online]. 2013, **15**(7), 483-491 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1111/j.1477-2574.2012.00607.x. ISSN 1365-182X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X15314234>
70. SHINDOH, J. et al. Optimal Future Liver Remnant in Patients Treated with Extensive Preoperative Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2013, **20**(8), 2493-2500 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1245/s10434-012-2864-7. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-012-2864-7>
71. MISIAKOS, E. P., N. P. KARIDIS a G. KOURAKLIS. Current treatment for colorectal liver metastases. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2011, **17**(36), 4067-4075 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.3748/wjg.v17.i36.4067. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v17/i36/4067.htm>
72. FONG, Y. et al. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Annals of Surgery* [online]. 1999, **230**(3), 309-321 [cit. 2018-03-19]. ISSN 1528-1140. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493478>
73. ADAMS, R. B. et al. Selection for hepatic resection of colorectal liver metastases: expert consensus statement. *HPB* [online]. 2013, **15**(2), 91-103 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1111/j.1477-2574.2012.00557.x. ISSN 1365-182X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X15313745>
74. VODIČKA, J. et al. Surgical treatment of colorectal cancer pulmonary metastases: 12-year results. *Anticancer Research* [online]. 2014, **34**(8), 4239-4245 [cit. 2018-03-19]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/34/8/4239.long>
75. TŘEŠKA, V. et al. Liver Resections for Colorectal Metastases in Patients Aged Over 75 Years. *Anticancer Research* [online]. 2017, **37**(3), 1529-1534 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.21873/anticancer.11481. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/37/3/1529.abstract>
76. DIMITROULIS, D. et al. Indications, limitations and maneuvers to enable extended hepatectomy: Current trends. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(24), 7887-7893 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7887. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i24/7887.htm>

77. TOMÁŠEK, J. et al. Hodnocení jaterní funkce v onkologické praxi. *Klinická onkologie* [online]. 2012, **25**(6), 427-433 [cit. 2018-03-19]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/klinicka-onkologie-clanek/hodnoceni-jaterni-funkce-v-onkologicke-praxi-39484>
78. PAULI, E. M. et al. A Handy Tool to Teach Segmental Liver Anatomy to Surgical Trainees. *Archives of Surgery* [online]. 2012, **147**(8), 692-693 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1001/archsurg.2012.689. ISSN 0004-0010. Dostupné z: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archsurg.2012.689>
79. ALVAREZ, F. A. et al. Parenchymal-sparing liver surgery in patients with colorectal carcinoma liver metastases. *World Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2016, **8**(6), 407-423 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.4240/wjgs.v8.i6.407. ISSN 1948-9366. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1948-9366/full/v8/i6/407.htm>
80. CAPUSSOTTI, L. et al. Hepatic bisegmentectomy 7–8 for a colorectal metastasis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2006, **32**(4), 469-471 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.ejso.2006.01.004. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798306000175>
81. CADY, B. et al. Technical and biological factors in disease-free survival after hepatic resection for colorectal cancer metastases. *Archives of Surgery*. 1992, **127**(5), 561-569. ISSN 0004-0010.
82. HAMADY, Z. Z. et al. Resection margin in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis: A critical appraisal of the 1cm rule. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2006, **32**(5), 557-563 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.ejso.2006.02.001. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074879830600045X>
83. ELIAS, D. et al. Resection of liver metastases from colorectal cancer: the real impact of the surgical margin. *European Journal of Surgical Oncology*. 1998, **24**(3), 174-179. ISSN 0748-7983.
84. PAWLIK, T. M. et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Annals of Surgery* [online]. 2005, **241**(5), 715-724 [cit. 2018-03-19]. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=15849507>
85. SHIMADA, H. et al. Treatment for multiple bilobar liver metastases of colorectal cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* [online]. 2006, **391**(2), 130-142 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00423-005-0003-7. ISSN 1435-2443. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00423-005-0003-7>
86. ROUS, P. a L. D. LARIMORE. Relation of the portal blood to liver maintenance : a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *The Journal of Experimental Medicine*. 1920, **31**(5), 609-632.
87. CAPUSSOTTI, L. et al. Portal Vein Ligation as an Efficient Method of Increasing the Future Liver Remnant Volume in the Surgical Treatment of Colorectal Metastases. *Archives of Surgery* [online]. 2008, **143**(10), 978-982 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1001/archsurg.143.10.978. ISSN 0004-0010. Dostupné z: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archsurg.143.10.978>



88. DENYS, A. et al. Portal Vein Embolization: What Do We Know?. *CardioVascular and Interventional Radiology* [online]. 2012, **35**(5), 999-1008 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00270-011-0300-1. ISSN 0174-1551. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00270-011-0300-1>
89. MAKUUCHI, M. et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*. 1990, **107**(5), 521-527. ISSN 0039-6060.
90. TAKAYASU, K. et al. Hepatic lobar atrophy following obstruction of the ipsilateral portal vein from hilar cholangiocarcinoma. *Radiology*. 1986, **160**(2), 389-393. ISSN 0033-8419.
91. FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* [online]. 2004, **39**(6), 1477-1487 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1002/hep.20214. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20214>
92. FAUSTO, N. a K. J. RIEHLE. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* [online]. 2005, **12**(3), 181-189 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00534-005-0979-y. ISSN 0944-1166. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00534-005-0979-y>
93. MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2007, **213**(2), 286-300 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1002/jcp.21172. ISSN 0021-9541. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21172>
94. DUNCAN, A. W., C. DORRELL a M. GROMPE. Stem Cells and Liver Regeneration. *Gastroenterology* [online]. 2009, **137**(2), 466-481 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.05.044. ISSN 0016-5085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850900818X>
95. BEST, J. et al. Role of liver progenitors in acute liver injury. *Frontiers in Physiology* [online]. 2013, **4**(258) [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.3389/fphys.2013.00258. ISSN 1664-042X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2013.00258/full>
96. THAN, N. N. a P. N. NEWSOME. Stem cells for liver regeneration. *QJM* [online]. 2014, **107**(6), 417-421 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1093/qjmed/hcu013. ISSN 1460-2725. Dostupné z: <https://academic.oup.com/qjmed/article-lookup/doi/10.1093/qjmed/hcu013>
97. BOULTER, L. et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nature Medicine* [online]. 2012, **18**(4), 572-579 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1038/nm.2667. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nm.2667>
98. SAKAMOTO, T. et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* [online]. 1999, **29**(2), 403-411 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1002/hep.510290244. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.510290244>
99. FAUSTO, N. a J. S. CAMPBELL. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of Development* [online]. 2003, **120**(1), 117-130 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/S0925-4773(02)00338-6. ISSN 0925-4773. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925477302003386>

100. LIU, H. a S. ZHU. Present status and future perspectives of preoperative portal vein embolization. *The American Journal of Surgery* [online]. 2009, **197**(5), 686-690 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2008.04.022. ISSN 0002-9610. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961008008143>
101. MADOFF, D. C. et al. Portal Venous Interventions: State of the Art. *Radiology* [online]. 2016, **278**(2), 333-353 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1148/radiol.2015141858. ISSN 0033-8419. Dostupné z: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2015141858>
102. VAN GULIK, T. M. et al. Controversies in the Use of Portal Vein Embolization. *Digestive Surgery* [online]. 2009, **25**(6), 436-444 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1159/000184735. ISSN 0253-4886. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/184735>
103. KODAMA, Y. et al. Complications of percutaneous transhepatic portal vein embolization. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2002, **13**(12), 1233-1237. ISSN 1051-0443.
104. COVEY, A. M. et al. Safety and Efficacy of Preoperative Portal Vein Embolization with Polyvinyl Alcohol in 58 Patients with Liver Metastases. *American Journal of Roentgenology* [online]. 2005, **185**(6), 1620-1626 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.2214/AJR.04.1593. ISSN 0361-803X. Dostupné z: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.04.1593>
105. DENYS, A. et al. Portal Vein Embolization with N-Butyl Cyanoacrylate before Partial Hepatectomy in Patients with Hepatocellular Carcinoma and Underlying Cirrhosis or Advanced Fibrosis. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* [online]. 2005, **16**(12), 1667-1674 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1097/01.RVI.0000182183.28547.DC. ISSN 1051-0443. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1051044307607957>
106. IMAMURA, H. et al. One Thousand Fifty-Six Hepatectomies Without Mortality in 8 Years. *Archives of Surgery* [online]. 2003, **138**(11), 1198-1206 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1001/archsurg.138.11.1198. ISSN 0004-0010. Dostupné z: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archsurg.138.11.1198>
107. FERRERO, A. et al. Postoperative Liver Dysfunction and Future Remnant Liver: Where Is the Limit?. *World Journal of Surgery* [online]. 2007, **31**(8), 1643-1651 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1007/s00268-007-9123-2. ISSN 0364-2313. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-007-9123-2>
108. MEIER, R. P.H. et al. Improved liver function after portal vein embolization and an elective right hepatectomy. *HPB* [online]. 2015, **17**(11), 1009-1018 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1111/hpb.12501. ISSN 1365-182X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X15320098>
109. ZORZI, D. et al. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery* [online]. 2007, **94**(3), 274-286 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1002/bjs.5719. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.5719>
110. ELIAS, D. et al. Preoperative selective portal vein embolization before hepatectomy for liver metastases: long-term results and impact on survival. *Surgery*. 2002, **131**(3), 294-299. ISSN 0039-6060.

111. VAN LIENDEN, K. P. et al. Portal Vein Embolization Before Liver Resection: A Systematic Review. *CardioVascular and Interventional Radiology* [online]. 2013, **36**(1), 25-34 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00270-012-0440-y. ISSN 0174-1551. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00270-012-0440-y>
112. NAGINO, M. et al. Changes in hepatic lobe volume in biliary tract cancer patients after right portal vein embolization. *Hepatology*. 1995, **21**(2), 434-439. ISSN 0270-9139.
113. OKABE, H. al. Percentage of Future Liver Remnant Volume Before Portal Vein Embolization Influences the Degree of Liver Regeneration After Hepatectomy. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2013, **17**(8), 1447-1451 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1007/s11605-013-2237-y. ISSN 1091-255X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11605-013-2237-y>
114. YOKOYAMA, Y., M. NAGINO a Y. NIMURA. Mechanisms of Hepatic Regeneration Following Portal Vein Embolization and Partial Hepatectomy: A Review. *World Journal of Surgery* [online]. 2007, **31**(2), 367-374 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00268-006-0526-2. ISSN 0364-2313. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-006-0526-2>
115. IMAMURA, H. et al. Preoperative portal vein embolization: An audit of 84 patients. *Hepatology* [online]. 1999, **29**(4), 1099-1105 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1002/hep.510290415. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.510290415>
116. TRACY, T. F. et al. Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration. *Surgery*. 1991, **110**(2), 176-183. ISSN 0039-6060.
117. FICHTL, J. et al. Predictive Value of Growth Factors and Interleukins for Future Liver Remnant Volume and Colorectal Liver Metastasis Volume Growth Following Portal Vein Embolization and Autologous Stem Cell Application. *Anticancer Research* [online]. 2016, **36**(4), 1901-1907 [cit. 2018-03-13]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/36/4/1901.long>
118. PAMECHA, V. et al. Effect of portal vein embolisation on the growth rate of colorectal liver metastases. *British Journal of Cancer* [online]. 2009, **100**(4), 617-622 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604872. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/6604872>
119. HOEKSTRA, L. T. et al. Tumor Progression After Preoperative Portal Vein Embolization. *Annals of Surgery* [online]. 2012, **256**(5), 812-818 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3182733f09. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-201211000-00019>
120. POMMIER, R. et al. Colorectal Liver Metastases Growth in the Embolized and Non-Embolized Liver After Portal Vein Embolization: Influence of Initial Response to Induction Chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2014, **21**(9), 3077-3083 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1245/s10434-014-3700-z. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-014-3700-z>
121. SIMONEAU, E. et al. Portal vein embolization and its effect on tumour progression for colorectal cancer liver metastases. *British Journal of Surgery* [online]. 2015, **102**(10), 1240-1249 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1002/bjs.9872. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.9872>

122. DE GRAAF, W. et al. Induction of Tumor Growth After Preoperative Portal Vein Embolization: Is It a Real Problem?. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2009, **16**(2), 423-430 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1245/s10434-008-0222-6. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-008-0222-6>
123. NABESHIMA, K. et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces not only scattering but also cohort migration of human colorectal-adenocarcinoma cells. *International Journal of Cancer*. 1998, **78**(6), 750–759. ISSN 0020-7136.
124. BROZEK, W. et al. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: Relevance for tumour progression. *European Journal of Cancer* [online]. 2005, **41**(15), 2347-2354 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.07.014. ISSN 0959-8049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804905006143>
125. PAWLIK, T. M. et al. Preoperative Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases: Impact on Hepatic Histology and Postoperative Outcome. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2007, **11**(7), 860-868 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1007/s11605-007-0149-4. ISSN 1091-255X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11605-007-0149-4>
126. STURESSON, C., I. KEUSSEN a K.-G. TRANBERG. Prolonged chemotherapy impairs liver regeneration after portal vein occlusion – An audit of 26 patients. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2010, **36**(4), 358-364 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/j.ejso.2009.12.001. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798309005423>
127. FONG, Y. a D. J. BENTREM. CASH (Chemotherapy-Associated Steatohepatitis) Costs. *Annals of Surgery* [online]. 2006, **243**(1), 8-9 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1097/01.sla.0000193599.57858.9b. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200601000-00002>
128. GOÉRÉ, D. et al. Chemotherapy Does Not Impair Hypertrophy of the Left Liver After Right Portal Vein Obstruction. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2006, **10**(3), 365-370 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/j.gassur.2005.09.001. ISSN 1091-255X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1091255X0500675X>.
129. FISCHER, C. et al. Chemotherapy After Portal Vein Embolization to Protect Against Tumor Growth During Liver Hypertrophy Before Hepatectomy. *JAMA Surgery* [online]. 2013, **148**(12), 1103-1108 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1001/jamasurg.2013.2126. ISSN 2168-6254. Dostupné z: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamasurg.2013.2126>
130. BEAL, I. K. et al. Portal vein embolisation prior to hepatic resection for colorectal liver metastases and the effects of periprocedure chemotherapy. *The British Journal of Radiology* [online]. 2006, **79**(942), 473-478 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1259/bjr/29855825. ISSN 0007-1285. Dostupné z: <http://www.birpublications.org/doi/10.1259/bjr/29855825>
131. SHINDOH, J. et al. Analysis of the Efficacy of Portal Vein Embolization for Patients with Extensive Liver Malignancy and Very Low Future Liver Remnant Volume, Including a Comparison with the Associating Liver Partition with Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy Approach. *Journal of the American College of Surgeons* [online]. 2013, **217**(1), 126-133 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.03.004. ISSN 1072-7515. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751513002123>

132. SHINDOH, J. et al. Safety and Efficacy of Portal Vein Embolization Before Planned Major or Extended Hepatectomy: An Institutional Experience of 358 Patients. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2014, **18**(1), 45-51 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s11605-013-2369-0. ISSN 1091-255X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11605-013-2369-0>
133. SHINDOH, J. et al. Portal vein embolization improves rate of resection of extensive colorectal liver metastases without worsening survival. *British Journal of Surgery* [online]. 2013, **100**(13), 1777-1783 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1002/bjs.9317. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.9317>
134. ESHMUMINOV, D. et al. Meta-analysis of associating liver partition with portal vein ligation and portal vein occlusion for two-stage hepatectomy. *British Journal of Surgery* [online]. 2016, **103**(13), 1768-1782 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1002/bjs.10290. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.10290>
135. LINDNÉR, P. et al. Extended right-sided liver resection for colorectal liver metastases—impact of percutaneous portal venous embolisation. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2006, **32**(3), 292-296 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/j.ejso.2005.12.007. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798305003513>
136. VENNARECCI, G. et al. ALPPS for primary and secondary liver tumors. *International Journal of Surgery* [online]. 2016, **30**(June), 38-44 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/j.ijso.2016.04.031. ISSN 1743-9191. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743919116300619>
137. SCHADDE, E. et al. ALPPS Offers a Better Chance of Complete Resection in Patients with Primarily Unresectable Liver Tumors Compared with Conventional-Staged Hepatectomies: Results of a Multicenter Analysis. *World Journal of Surgery* [online]. 2014, **38**(6), 1510-1519 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1007/s00268-014-2513-3. ISSN 0364-2313. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-014-2513-3>
138. HÄUSSINGER, D., ed. *Liver regeneration*. Berlin: de Gruyter, ©2011. ISBN 978-3-11-025078-7.
139. RATAJCZAK, M. et al. A Novel View of the Adult Stem Cell Compartment From the Perspective of a Quiescent Population of Very Small Embryonic-Like Stem Cells. *Circulation Research* [online]. 2017, **120**(1), 166-178 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309362. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.309362>
140. FOROSTYAK, O., G. DAYANITHI a S. FOROSTYAK. CNS Regenerative Medicine and Stem Cells. *Opera Medica et Physiologica* [online]. 2016, **2**(1), 55-62 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.20388/OMP2016.001.0023. ISSN 2500-2287. Dostupné z: [http://www.operamedphys.org/sites/default/files/pdf/OMP\\_2016\\_01\\_0023.pdf](http://www.operamedphys.org/sites/default/files/pdf/OMP_2016_01_0023.pdf)
141. Adultní kmenové buňky. In: UNIVERZITA KARLOVA. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav histologie a embryologie. *On-line atlas kmenových buněk a vybraných diferenačních postupů* [online]. Plzeň: LF UK, ©2012 [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: <http://kmenovabunka.webnode.cz/kmenove-bunky/adultni-kmenove-bunky/>
142. MOORE, K. A. a I. R. LEMISCHKA. Stem Cells and Their Niches. *Science* [online]. 2006, **311**(5769), 1880-1885 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1126/science.1110542. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110542>

143. SHI, Y. et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2017, **16**(2), 115-130 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1038/nrd.2016.245. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrd.2016.245>
144. ČERNÝ, D. a A. DOLEŽAL, ed. *Etické a právní aspekty výzkumu kmenových buněk: sborník z konference konané dne 18.5.2013 v Praze*. Praha: Ústav státu a práva AV ČR, 2013. Edice Kabinetu zdravotnického práva a bioetiky. ISBN 978-80-87439-12-8.
145. HART, C. A. et al. Stem cells of the lower limb: Their role and potential in management of critical limb ischemia. *Experimental Biology and Medicine* [online]. 2013, **238**(10), 1118-1126 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1177/1535370213503275. ISSN 1535-3702. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213503275>
146. REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* [online]. 2001, **414**(6859), 105-111 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1038/35102167. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35102167>
147. PANCH, S. R. et al. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2017, **23**(8), 1241-1249 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.05.003. ISSN 1083-8791. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879117304500>
148. ALMEIDA-PORADA, G., E. D. ZANJANI a C. D. PORADA. Bone marrow stem cells and liver regeneration. *Experimental Hematology* [online]. 2010, **38**(7), 574-580 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.04.007. ISSN 0301-472X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X10001505>
149. KHAN, A. A. et al. Safety and Efficacy of Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation Through Hepatic Artery for the Treatment of Chronic Liver Failure: A Preliminary Study. *Transplantation Proceedings* [online]. 2008, **40**(4), 1140-1144 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.03.111. ISSN 0041-1345. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134508003497>
150. GAIA, S. et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *Journal of Hepatology* [online]. 2006, **45**(1), 13-19 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.02.018. ISSN 0168-8278. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827806001759>
151. DE SILVESTRO, G. et al. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology*. 2004, **51**(57), 805-810. ISSN 0172-6390.
152. ZOCCO, M. A. et al. CD133+ stem cell mobilization after partial hepatectomy depends on resection extent and underlying disease. *Digestive and Liver Disease* [online]. 2011, **43**(2), 147-154 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.dld.2010.06.008. ISSN 1590-8658. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S159086581000229X>
153. HAN, H. S. et al. Autologous stem cell transplantation for expansion of remnant liver volume with extensive hepatectomy. *Hepatogastroenterology*. 2014, **61**(129), 156-161. ISSN 0172-6390.



154. CANEPA, M. C. et al. Autologous CD133+ cells augment the effect of portal embolization. *Minerva Chirurgica*. 2013, **68**(2), 163-168. ISSN 0026-4733.
155. TŘEŠKA, V. et al. Portal Vein Embolisation with Application of Haematopoietic Stem Cells in Patients with Primarily or Non-resectable Colorectal Liver Metastases. *Anticancer Research* [online]. 2014, **34**(12), 7279-7285. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/34/12/7279.full>
156. DAHLKE, M. H. et al. Stem cell therapy of the liver? Fusion or fiction?. *Liver Transplantation* [online]. 2004, **10**(4), 471-479 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1002/lt.20121. ISSN 1527-6465. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.20121>
157. PROCKOP, D. J. a S. D. OLSON. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood* [online]. 2007, **109**(8), 3147-3151 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1182/blood-2006-03-013433. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-03-013433>
158. LIŠKA, V. et al. Intraportal injection of porcine multipotent mesenchymal stromal cells augments liver regeneration after portal vein embolization. *In Vivo* [online]. 2009, **23**(2), 229-235 [cit. 2013-03-07]. ISSN 1791-7549. Dostupné z: <http://iv.iijournals.org/content/23/2/229.long>
159. WU, X.-Z. a X.-H. YU. Bone marrow cells: The source of hepatocellular carcinoma?. *Medical Hypotheses* [online]. 2007, **69**(1), 36-42 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.mehy.2006.10.064. ISSN 0306-9877. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030698770600898X>
160. WONG, R. S. Y. Mesenchymal Stem Cells: Angels or Demons?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2011, **2011**(459510), 1-8 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1155/2011/459510. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/459510/>
161. RAMASAMY, R. et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* [online]. 2007, **21**(2), 304-310 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1038/sj.leu.2404489. ISSN 0887-6924. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/2404489>
162. LIŠKA, V., V. TŘEŠKA a M. KORABEČNÁ. Nádorová kmenová buňka - nový pohled v onkologii?. *Rozhledy v chirurgii*. 2007, **86**(10), 547-552. ISSN 0035-9351.
163. HAURA, E. B. Is repetitive wounding and bone marrow-derived stem cell mediated-repair an etiology of lung cancer development and dissemination?. *Medical Hypotheses* [online]. 2006, **67**(4), 951-956 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.12.050. ISSN 0306-9877. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987706002143>
164. SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2009, **86**(5), 1065-1073 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1189/jlb.0609385. ISSN 0741-5400. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0609385>
165. PATRAS, L. et al. Dual role of macrophages in the response of C26 colon carcinoma cells to 5-fluorouracil administration. *Oncology Letters* [online]. 2016, **12**(2), 1183-1191 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.3892/ol.2016.4708. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.4708>

166. ISIDRO, R. A. a C. B. APPELYARD. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 2016, **311**(1), G59-G73 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1152/ajpgi.00123.2016. ISSN 0193-1857. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00123.2016>
167. ENGSTRÖM, A. et al. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *International Journal of Oncology* [online]. 2014, **44**(2), 385-392 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.3892/ijo.2013.2203. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2013.2203>
168. FORSELL, J. et al. High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 2007, **13**(5), 1472-1479 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2073. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-2073>
169. ERRENI, M., A. MANTOVANI a P. ALLAVENA. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenvironment* [online]. 2011, **4**(2), 141-154 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1007/s12307-010-0052-5. ISSN 1875-2292. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12307-010-0052-5>
170. GIAKOUSTIDIS, A., S. MUDAN a T. HAGEMANN. Tumour Microenvironment: Overview with an Emphasis on the Colorectal Liver Metastasis Pathway. *Cancer Microenvironment* [online]. 2015, **8**(3), 177-186 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s12307-014-0155-5. ISSN 1875-2292. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12307-014-0155-5>
171. NAKAYAMA, Y. et al. Relationships between S-100 protein-positive cells and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2003, **23**(6a), 4423-4426. ISSN 0250-7005.
172. LIŠKA, V. et al. Infiltration of Colorectal Carcinoma by S100<sup>+</sup>Dendritic Cells and CD57<sup>+</sup>Lymphocytes as Independent Prognostic Factors after Radical Surgical Treatment. *Anticancer Research* [online]. 2012, **32**(5), 2129-2132 [cit. 2018-03-01]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/32/5/2129.long>
173. GULUBOVA, M. V. et al. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 2012, **27**(2), 159-169 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1007/s00384-011-1334-1. ISSN 0179-1958. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00384-011-1334-1>
174. SCHWAAB, T. et al. Dendritic cell infiltration in colon cancer. *Journal of Immunotherapy* [online]. 2001, **24**(2), 130-137 [cit. 2018-03-01]. ISSN 1537-4513. Dostupné z: [https://journals.lww.com/immunotherapy-journal/Abstract/2001/03000/Dendritic\\_Cell\\_Infiltration\\_in\\_Colon\\_Cancer.7.aspx](https://journals.lww.com/immunotherapy-journal/Abstract/2001/03000/Dendritic_Cell_Infiltration_in_Colon_Cancer.7.aspx)
175. KITO, A. et al. Tumor doubling time and local immune response to hepatic metastases from colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* [online]. 2007, **96**(6), 525-533 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1002/jso.20806. ISSN 0022-4790. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jso.20806>



176. MALIETZIS, G. et al. Prognostic Value of the Tumour-Infiltrating Dendritic Cells in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cell Communication & Adhesion* [online]. 2014, **22**(1), 9-14 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.3109/15419061.2015.1036859. ISSN 1541-9061. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15419061.2015.1036859>
177. SAKKAL, S. et al. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Current Medicinal Chemistry*. 2016, **23**(7), 650-666. ISSN 0929-8673.
178. PICCARD, H., R. J. MUSCHEL a G. OPDENAKKER. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2012, **82**(3), 296-309 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.06.004. ISSN 1040-8428. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842811001624>
179. NEVILLE, M. E. et al. In vivo inhibition of tumor growth of B16 melanoma by recombinant interleukin 1 $\beta$ . *Cytokine* [online]. 1990, **2**(6), 456-463 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1016/1043-4666(90)90055-X. ISSN 1043-4666. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/104346669090055X>. Cit. In: PICCARD, H., R. J.
180. MCLEAN, M. H. et al. The Inflammatory Microenvironment in Colorectal Neoplasia. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(1) [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0015366. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015366>
181. RAO, H.-L. et al. Increased Intratumoral Neutrophil in Colorectal Carcinomas Correlates Closely with Malignant Phenotype and Predicts Patients' Adverse Prognosis. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(1), [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0030806. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030806>
182. DROESER, R. A. et al. High Myeloperoxidase Positive Cell Infiltration in Colorectal Cancer Is an Independent Favorable Prognostic Factor. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(5) [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0064814. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064814>
183. TSAI, Po-Li et al. Neutrophil-lymphocyte ratio and CEA level as prognostic and predictive factors in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* [online]. 2016, **12**(2) [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.4103/0973-1482.144356. ISSN 0973-1482. Dostupné z: <http://www.cancerjournal.net/text.asp?2016/12/2/582/144356>
184. FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M. J. et al. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* [online]. 2000, **88**(7), 1544-1548 [cit. 2018-02-21]. ISSN 1097-0142. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000401\)88:7%3C1544::AID-CNCR7%3E3.0.CO;2-S/full#](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0142(20000401)88:7%3C1544::AID-CNCR7%3E3.0.CO;2-S/full#)
185. HARBAUM, L. et al. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Modern Pathology* [online]. 2015, **28**(3), 403-413 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1038/modpathol.2014.104. ISSN 0893-3952. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/modpathol2014104>
186. VIVIER, E. et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* [online]. 2011, **331**(6013), 44-49 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1126/science.1198687. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1198687>

187. VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*[online]. 2008, **9**(5), 503-510 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1038/ni1582. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ni1582>
188. AMAND, M. et al. Human CD56dimCD16dim Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8**(699) [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00699. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00699/full>
189. BÉZIAT, V. et al. NK Cell Terminal Differentiation: Correlated Stepwise Decrease of NKG2A and Acquisition of KIRs. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(8) [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1371/journal.pone.0011966. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011966>
190. BJÖRKSTRÖM, N. K. et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* [online]. 2010, **116**(19), 3853-3864 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281675. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-04-281675>
191. LOPEZ-VERGÈS, S. et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* [online]. 2010, **116**(19), 3865-3874 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282301. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-04-282301>
192. LE GARFF-TAVERNIER, M. et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* [online]. 2010, **9**(4), 527-535 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x. ISSN 1474-9718. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x>
193. DESBOIS, M. et al. Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. *Frontiers in Immunology* [online]. 2012, **3**(395) [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00395. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00395/abstract>
194. MENON, A. G. et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Laboratory Investigation* [online]. 2004, **84**(4), 493-501 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1038/labinvest.3700055. ISSN 0023-6837. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/3700055>
195. CHAPUT, N. et al. Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II–III colorectal cancer. *British Journal of Cancer* [online]. 2013, **109**(4), 1013-1022 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1038/bjc.2013.362. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bjc2013362>
196. VYČÍTAL, O. *Molekulárně biologické mechanismy progresu kolorektálního karcinomu ve vztahu k individualizované onkochirurgické léčbě*. Plzeň, 2017. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Chirurgická klinika. Vedoucí práce V. Liška. Dostupné také z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/86625>
197. SCONOCCHIA, G. et al. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncotarget* [online]. 2014, **3**(8) [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.4161/21624011.2014.952197. ISSN 2162-402x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/21624011.2014.952197>

198. SCONOCCHIA, G. et al. Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *International Journal of Cancer* [online]. 2011, **128**(11), 2663-2672 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1002/ijc.25609. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25609>
199. SANDEL, M.H. et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Molecular Immunology* [online]. 2005, **42**(4), 541-546 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.07.039. ISSN 0161-5890. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589004003141>
200. GULUBOVA, M. et al. Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS* [online]. 2009, **117**(12), 870-879 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x. ISSN 0903-4641. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x>
201. KASPER, H. U. et al. Dominance of CD4+ alpha/beta T-cells and inferior role of innate immune reaction in liver metastases. *Anticancer Research*. 2003, **23**(4), 3175-3181. ISSN 0250-7005.
202. DOUBROVINA, E. S. et al. Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *The Journal of Immunology* [online]. 2003, **171**(12), 6891-6899 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6891. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.12.6891>
203. GHARAGOZLOO, M. et al. The decrease in NKG2D+ Natural Killer cells in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer. *Bratislava Medical Journal* [online]. 2015, **116**(5), 296-301 [cit. 2018-02-21]. ISSN 1336-0345. Dostupné z: [http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=4243&category\\_id=118&option=com\\_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1](http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=4243&category_id=118&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1)
204. LEE, J. C. et al. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of Immunology* [online]. 2004, **172**(12), 7335-7340 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.4049/jimmunol.172.12.7335. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/172/12/7335.long>
205. ZHU, J. a W. E. PAUL. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* [online]. 2008, **112**(5), 1557-1569 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1182/blood-2008-05-078154. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-05-078154>
206. ZHU, J., H. YAMANE. a W. E. Paul. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*[online]. 2010, **28**(1), 445-489 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
207. COOLS, N. et al. Regulatory T Cells and Human Disease. *Clinical and Developmental Immunology* [online]. 2007, **2007**(89195), 1-10 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1155/2007/89195. ISSN 1740-2522. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2007/089195/abs/>
208. TRIPLETT, T. A. et al. Defining a functionally distinct subset of human memory CD4+ T cells that are CD25POS and FOXP3NEG. *European Journal of Immunology* [online]. 2012, **42**(7), 1893-1905 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1002/eji.201242444. ISSN 0014-2980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201242444>

209. MARSON, A. et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* [online]. 2007, **445**(7130), 931-935 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1038/nature05478. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature05478>
210. JOSEFOWICZ, S. Z., L.-F. LU a A. Y. RUDENSKY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology* [online]. 2012, **30**(1), 531-564 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
211. JOFFRE, O. P. et al. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2012, **12**(8), 557-569 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1038/nri3254. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri3254>
212. KYAW, T. et al. Cytotoxic lymphocytes and atherosclerosis: significance, mechanisms and therapeutic challenges. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2017, **174**(22), 3956-3972 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1111/bph.13845. ISSN 0007-1188. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.13845>
213. WATT A. G. a A. K. HOUSE. Colonic carcinoma: a quantitative assessment of lymphocyte infiltration at the periphery of colonic tumors related to prognosis. *Cancer*. 1978, **41**(1), 279-282. ISSN 0008-543X.
214. HOUSE, A. K. a A. G. WATT. Survival and the immune response in patients with carcinoma of the colorectum. *Gut*. 1979, **20**(10), 868-874. ISSN 0017-5749. Dostupný také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1412722/>
215. GALON, J. et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* [online]. 2006, **313**(5795), 1960-1964 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1126/science.1129139. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1129139>
216. NAKAYAMA, H. et al. Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2000, **30**(7), 301-5. ISSN 0368-2811.
217. EVANS, C. F. M. et al. The effect of colorectal cancer upon host peripheral immune cell function. *Colorectal Disease* [online]. 2010, **12**(6), 561-569 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2009.01819.x. ISSN 1462-8910. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1318.2009.01819.x>
218. CUI, G. a J. FLORHOLMEN. Polarization of cytokine profile from Th1 into Th2 along colorectal adenoma-carcinoma sequence: implications for the biotherapeutic target? *Inflammation & Allergy Drug Targets*. 2008, **7**(2), 94-7. ISSN 0368-2811.
219. TOSOLINI, M. et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(4), 1263-1271 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2907. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>

220. PAGÈS, F. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* [online]. 2010, **29**(8), 1093-1102 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1038/onc.2009.416. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/onc2009416>
221. HOU, N. et al. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2013, **439**(4), 471-476 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.101. ISSN 0006-291X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X13014599>
222. OSAWA, E. et al. Predominant Thelper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *International Journal of Cancer* [online]. 2006, **118**(9), 2232-2236 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1002/ijc.21639. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21639>
223. FIGUEIREDO, J. C. et al. Genome-Wide Diet-Gene Interaction Analyses for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genetics* [online]. 2014, **10**(4), e1004228 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004228. ISSN 1553-7404. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004228>
224. YOSHIDA, N. et al. A High ROR $\gamma$ T/CD3 Ratio is a Strong Prognostic Factor for Postoperative Survival in Advanced Colorectal Cancer: Analysis of Helper T Cell Lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cells). *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2016, **23**(3), 919-927 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1245/s10434-015-4923-3. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-015-4923-3>
225. SHARP, S. P. et al. Local and systemic Th17 immune response associated with advanced stage colon cancer. *Journal of Surgical Research* [online]. 2017, **208**, 180-186 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.jss.2016.09.038. ISSN 0022-4804. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480416304218>
226. LING, K. L. et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immunity* [online]. 2007, **7**, 7-13 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1424-9634. Dostupné z: <https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2935744/>
227. SALAMA, P. et al. Tumor-Infiltrating FOXP3 + T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2009, **27**(2), 186-192 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7229. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.18.7229>
228. NOSHO, K. et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *The Journal of Pathology* [online]. 2010, **222**(4), 350-366 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1002/path.2774. ISSN 0022-3417. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.2774>
229. DELEEUW, R. J. et al. The Prognostic Value of FoxP3+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. *Clinical Cancer Research* [online]. 2012, **18**(11), 3022-3029 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3216. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-3216>

230. SVENSSON, H. et al. Accumulation of CCR4+ CTLA-4hi FOXP3+CD25hi Regulatory T Cells in Colon Adenocarcinomas Correlate to Reduced Activation of Conventional T Cells. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(2), e30695 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1371/journal.pone.0030695. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030695>
231. PERNOT, S. et al. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(14), 3738-3750 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3738. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i14/3738.htm>
232. PAGÈS, F. et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **353**(25), 2654-2666 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1056/NEJMoa051424. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051424>
233. MLECNIK, B. et al. Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated With the State of the Local Immune Reaction. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2011, **29**(6), 610-618 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.5425. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.30.5425>
234. HAGLAND, H. R. et al. Correlation of Blood T-Cells to Intratumoural Density and Location of CD3+ and CD8+ T-Cells in Colorectal Cancer. *Anticancer Research* [online]. 2017, **37**(2), 675-684 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.21873/anticancer.11363. ISSN 0250-7005. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/37/2/675.abstract>
235. WAGNER, P. et al. Detection and Functional Analysis of Tumor Infiltrating T-Lymphocytes (TIL) in Liver Metastases from Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2008, **15**(8), 2310-2317 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1245/s10434-008-9971-5. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-008-9971-5>
236. HALAMA, N. et al. Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(17), 5670-5677 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0268. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-0268>
237. HALAMA, N. et al. Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell* [online]. 2016, **29**(4), 587-601 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.005. ISSN 1535-6108. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610816300873>
238. BERTHEL, A. et al. Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncot Immunology* [online]. 2017, **6**(3), e1286436 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1286436. ISSN 2162-402X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2017.1286436>
239. CORVAISIER, M. et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *Journal of immunology* [online]. 2005, **175**(8), 5481-5488 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/175/8/5481.long>



240. ZOCCHI, M. R. et al. Zoledronate can induce colorectal cancer microenvironment expressing BTN3A1 to stimulate effector  $\gamma\delta$  T cells with antitumor activity. *Oncology* [online]. 2017, **6**(3), e1278099 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1278099. ISSN 2162-402X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2016.1278099>
241. TACHIBANA, T. et al. Increased Intratumor V 24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas. *Clinical Cancer Research* [online]. 2005, **11**(20), 7322-7327 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0877. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-0877>
242. MACCALLI, C., S. SCARAMUZZA a G. PARMIANI. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2009, **58**(5), 801-808 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s00262-008-0635-x. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-008-0635-x>
243. DHODAPKAR, M. V. a V. KUMAR. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *The Journal of Immunology* [online]. 2017, **198**(3), 1015-1021 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.4049/jimmunol.1601399. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601399>
244. CHOWDHURY, D. a J. LIEBERMAN. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annual Review of Immunology* [online]. 2008, **26**(1), 389-420 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404>
245. VAHEDI, F. et al. Human granzymes: Related but far apart. *Medical Hypotheses* [online]. 2014, **83**(6), 688-693 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.09.019. ISSN 0306-9877. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987714003442>
246. VOSKOBOINIK, I., J. C. WHISSTOCK a J. A. TRAPANI. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2015, **15**(6), 388-400 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1038/nri3839. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri3839>
247. SALAMA, P. et al. Low expression of Granzyme B in colorectal cancer is associated with signs of early metastatic invasion. *Histopathology* [online]. 2011, **59**(2), 207-215 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03915.x. ISSN 0309-0167. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2011.03915.x>
248. PRIZMENT, A. E. et al. Cytotoxic T Cells and Granzyme B Associated with Improved Colorectal Cancer Survival in a Prospective Cohort of Older Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [online]. 2017, **26**(4), 622-631 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0641. ISSN 1055-9965. Dostupné z: <http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-16-0641>
249. DIMBERG, J. et al. Expression of the serine protease inhibitor serpinA3 in human colorectal adenocarcinomas. *Oncology Letters* [online]. 2011, **2**(3), 413-418 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.3892/ol.2011.280. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2011.280>

250. LONG, N. P. et al. Novel Biomarker Candidates for Colorectal Cancer Metastasis: A Meta-analysis of In Vitro Studies. *Cancer Informatics* [online]. 2016, **15**(Suppl 4), 11-17 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.4137/CIN.S40301. ISSN 1176-9351. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5034882/>
251. NOVÁK, P. *Tumor infiltrující lymfocyty jako prognostický faktor prognózy kolorektálního karcinomu po radikální chirurgické léčbě*. Plzeň, 2015. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Chirurgická klinika. Vedoucí práce J. Vodička. Dostupné také z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/105793>
252. HARRISON, J. C. et al. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Human Pathology*. 1995, **26**(1), 31-38. ISSN 0046-8177.
253. ZÁVADOVÁ, E. et al. Immunoscore a jeho prediktivní hodnota u kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie* [online]. 2015, **28**(Suppl 4), 4S82-4S85 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.14735/amko20154S82. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4854/>
254. TONAR, Zbyněk et al. Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. In: *Microscopy: science, technology, applications and education*. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. s. 926-935. ISBN 978-84-614-6190-5.
255. SCHEMPER, M. a T. L. SMITH. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Controlled Clinical Trials*. 1996, **17**(4), 343-346. ISSN 0197-2456.
256. HERBERTS, C. A, M. S. G. KWA a H. P. H. HERMSEN. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2011, **9**(1) [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1186/1479-5876-9-29. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-29>
257. MORRIS-STIFF, G., Y.-M. TAN a J. N. VAUTHEY. Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2008, **34**(6), 609-614 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/j.ejso.2007.07.007. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074879830700279X>
258. NORDLINGER, B. et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* [online]. 2013, **14**(12), 1208-1215 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70447-9. ISSN 1470-2045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204513704479>
259. KONOPKE, R. et al. Colorectal liver metastases: an update on palliative treatment options. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* [online]. 2012, **21**(1), 83-91 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1842-1121. Dostupné z: <http://www.jgld.ro/2012/1/14.html>
260. CURTIS, N. J. et al. The adaptive immune response to colorectal cancer: From the laboratory to clinical practice. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2012, **38**(10), 889-896 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1016/j.ejso.2012.05.011. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798312003368>



261. KOCH, M. et al. Tumor Infiltrating T Lymphocytes in Colorectal Cancer. *Annals of Surgery* [online]. 2006, **244**(6), 986-993 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1097/01.sla.0000247058.43243.7b. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200612000-00019>
262. BRUNNER, S. M. et al. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *British Journal of Surgery* [online]. 2014, **101**(13), 1681-1691 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1002/bjs.9627. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.9627>
263. LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. 2013, **4**(3) [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1186/scrt216. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <http://stemcellres.com/content/4/3/65>
264. AGGARWAL, S. a M. F. PITTENGER. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* [online]. 2005, **105**(4), 1815-1822 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-04-1559>
265. CORREALE, P. et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell Tumor Infiltration Is a Favorable Prognostic Factor in Advanced Colon Cancer Patients Undergoing Chemo or Chemoimmunotherapy. *Journal of Immunotherapy* [online]. 2010, **33**(4), 435-441 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181d32f01. ISSN 1524-9557. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002371-201005000-00010>
266. FABREGAT, I. et al. TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *The FEBS Journal* [online]. 2016, **283**(12), 2219-2232 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1111/febs.13665. ISSN 1742-464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13665>
267. NAKAGAWA, K. et al. Low Infiltration of Peritumoral Regulatory T Cells Predicts Worse Outcome Following Resection of Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2015, **22**(1), 180-186 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1245/s10434-014-3974-1. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-014-3974-1>
268. SUZUKI, H. et al. Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer immunology and immunotherapy* [online]. 2010, **59**(5), 653-651 [cit. 2018-04-05]. ISSN 1432-0851. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00262-009-0781-9>
269. SINICROPE, F. A. et al. Intraepithelial Effector (CD3+)/Regulatory (FoxP3+) T-Cell Ratio Predicts a Clinical Outcome of Human Colon Carcinoma. *Gastroenterology* [online]. 2009, **137**(4), 1270-1279 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.053. ISSN 0016-5085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850901138X>
270. LADOIRE, S., F. MARTIN a F. GHIRINGHELLI. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2011, **60**(7), 909-918 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1007/s00262-011-1046-y. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-011-1046-y>

271. LEGITIMO, A. et al. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2014, **10**(11), 3224-3235 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.4161/hv.29857. ISSN 2164-5515. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/hv.29857>
272. MEDEMA, J. P. et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(20), 11515-11520 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1073/pnas.201398198. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201398198>
273. HLAVÁČ, V. et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* [online]. 2013, **14**(5), 515-529 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.2217/pgs.13.26. ISSN 1462-2416. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.13.26>
274. DOMANITSKAYA, N. et al. Abcc10 status affects mammary tumour growth, metastasis and docetaxel treatment response. *British Journal of Cancer* [online]. 2014, **111**(4), 696-707 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1038/bjc.2014.326. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bjc2014326>
275. MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B. et al. Differences in Transcript Levels of ABC Transporters Between Pancreatic Adenocarcinoma and Nonneoplastic Tissues. *Pancreas* [online]. 2013, **42**(4), 707-716 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318279b861. ISSN 0885-3177. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00006676-201305000-00022>
276. HEDDITCH, Ellen L., Bo GAO, Amanda J. RUSSELL, et al. ABCA Transporter Gene Expression and Poor Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2014, **106**(7) [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1093/jnci/dju149. ISSN 0027-8874. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dju149>
277. NANASHIMA, A. et al. Expression of multidrug resistance protein in metastatic colorectal carcinomas. *Journal of Gastroenterology* [online]. 1999, **34**(5), 582-588 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1007/s005350050376. ISSN 0944-1174. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s005350050376>
278. YAMAUCHI, K. et al. Prediction of Early Recurrence After Curative Resection of Colorectal Liver Metastasis and Subsequent S-1 Chemotherapy. *Anticancer Research* [online]. 2016, **36**(5), 2175-2179. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iarjournals.org/content/36/5/2175.long>
279. WLCEK, K. a B. STIEGER. ATP-binding cassette transporters in liver. *BioFactors* [online]. 2014, **40**(2), 188-198 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1002/biof.1136. ISSN 0951-6433. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1136>
280. VANDERBORGHT, S. et al. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. *Liver International* [online]. 2008, **28**(10), 1370-1380 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01889.x. ISSN 1478-3223. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1478-3231.2008.01889.x>
281. SUN, Z. et al. Relevance of two genes in the multidrug resistance of hepatocellular carcinoma: in vivo and clinical studies. *Tumori*. 2010, **96**(1), 90-96. ISSN 2038-2529.

## 11. Souhrn

V dizertační práci *Význam tumor infiltruujících lymfocytů jako prognostických faktorů u pacientů po embolizaci portální žíly (PVE) a po PVE s aplikací autologních kmenových buněk* autor popisuje tuto problematiku:

**1. V literárním přehledu charakterizuje:** epidemiologii a dispenzarizaci pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC), diagnostické a terapeutické postupy u pacientů s metastázami kolorektálního karcinomu do jater (CLM), význam zbytkového jaterního objemu (FLRV) a etapových jaterních resekcí. Dále shrnuje poznatky o kmenových buňkách (SCs), významu imunitní odpovědi v rámci protinádorové reakce a význam ABCC transportérů u buněk CRC.

**2. V metodice je prezentováno:** efekt SCs na růst FLRV po PVE byl zkoumán na souboru 63 pacientů (43 pacientů s PVE a 20 pacientů s PVE a aplikací SCs). Z CT vyšetření byly stanoveny FLRV, objemy CLM. Byl sledován jejich růst, vztah k operabilitě, bezpříznakovému období (DFI) a celkovému přežití (OS). Na souboru 101 pacientů, kteří podstoupili resekci jater pro CLM bylo hodnoceno zastoupení tumor infiltruujících lymfocytů (TILs) (PVE 26 pacientů, PVE SCs 13 pacientů, primárně resekovatelných 62 pacientů). Byla sledována míra zastoupení a lokalizace TILs – peritumorální (PTL), intratumorální (ITL), intrastromální (ISL), a Crohn like. Imunohistochemicky byly stanoveny CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> a FoxP3<sup>+</sup> lymfocyty, dále CD57<sup>+</sup> a CD86<sup>+</sup> buňky a granzym B. U nádorových buněk pak byl stanoven serpin B. Byly sledovány i poměry jednotlivých TILs. Histopatologické vyšetření a mikroskopické zhodnocení transportérů ABCC10 a ABCC11 bylo provedeno a u 86 pacientů (23 pacientů u PVE, 9 u PVE a SCs a 54 u primárně resekovatelných).

**3. Ve výsledkové části autor uvádí:** studie neprokázala efekt SCs na růst FLRV. Trend rychlejšího růstu byl pozorován u pacientů se vstupním FLRV do 30 %. Růst CLM nebyl aplikací SCs ovlivněn. Pacienti po PVE s SCs měli nižší procento explorativních laparotomií a extrahepatálních metastáz v pooperačním sledování. DFI a OS bylo shodné s pacienty primárně operabilními. Při stanovení TILs jsme neprokázali efekt cytotoxické složky. Pacienti s provedenou PVE měli vyšší počet T regulačních lymfocytů (CD25<sup>+</sup> a FoxP3<sup>+</sup>) (T reg). U skupiny s PVE SCs bylo nižší zastoupení CD4<sup>+</sup>. Rozdíly byly pozorovány i v případě ITL, ISL, a Crohn like infiltrace. U PTL byl pokles u všech pacientů s provedenou PVE. U pacientů s provedenou PVE bylo vysoké zastoupení CD4<sup>+</sup> a ISL infiltrace spojeno s časnější recidivou onemocnění. Stanovení poměrů TILs prokázalo vysoké zastoupení vyzrálých FoxP3<sup>+</sup> T reg u všech pacientů s provedenou PVE. Vysoký poměr FoxP3/CD25 snižoval riziko rekurence u všech resekováných pacientů. CD8/CD4 byl negativním prognostickým faktorem u primárně operabilních pacientů, kdy jeho zvýšení snížilo DFI. Stanovení ABCC10 a ABCC11 neprokázalo rozdíly mezi sledovanými skupinami.

**4. Závěr:** PVE přináší jasný benefit primárně inoperabilním pacientům s CLM. Pacienti s intraportální aplikací SCs dosáhli vyšší resekovatelnosti a měli nižší výskyt extrahepatálních metastáz. Příčina tohoto jevu je vhodným cílem další studie. Studie neprokázala aktivaci cytotoxické imunity u CLM. T reg mohou být faktorem podporujícím atrofii jaterního laloku s okludovanou větví portální žíly. Zvýšený poměr podskupin T reg (FoxP3/CD25) se u resekováných pacientů projevil jako prognostický faktor snižující riziko recidivy. U pacientů s PVE byla negativním prognostickým faktorem vysoká infiltrace CD4<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> ISL infiltrace.

**5. Literární seznam:** obsahuje 281 citací a přehled publikací autora

**6. Klíčová slova:** kolorektální karcinom, metastázy jater, embolizace portální žíly, future liver remnant volume, kmenové buňky, tumor infiltruující lymfocyty, ABCC transportéry

## 12. Summary

In this thesis *Relevance of tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factors at patients with portal vein embolisation (PVE) and patients with PVE and administration of autologous stem cells* the author deals with following issues:

**1. In the literature overview:** the author characterizes the epidemiology and dispenzarization of the patients with colorectal cancer (CRC), diagnostics and treatment of colorectal liver metastases (CLM), importance of future liver remnant volume (FLRV) and two step liver surgery. The author summarizes general knowledges about stem cells (SCs), response of the immune system against cancer and relevance of ABCC transporters at CRC cells.

**2. The methodological section characterizes the following:** intraportal administration of SCs after PVE and their effect was explored in a group of 63 patients (43 patients with PVE alone, 20 in the group PVE with SCs). FLRV and volume of CLM were assessed from CT scans. Their growth was observed also in relation with resectability, disease free interval (DFI) and overall survival (OS). The cohort of 101 patients was used for assesement of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) (PVE 26 patients, PVE and SCs 13 patients, 62 patients with primarilly resectable CLM). We assessed numbers and localization of TILs – peritumoral (PTL), intratumoral (ITL), intrastromal (ISL) and Crohn like infiltration were assessed. Immunohistological staining for CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes (TILs) and for CD57<sup>+</sup> and CD86<sup>+</sup> cells and Granzym B was used. Serpin B was assessed in the cancer cells. The ratio between TILs was also focused. Histological examination and microscopical evaluation for ABCC10 and ABCC11 transporters were performed in 86 patients (23 with PVE, 13 with PVE and SCs and 54 with primarily resectable)

**3. In the final section the author demonstrates that:** study did not prove significant acceleration of FLRV growth after SCs administration. The fastest growth was observed in patients with initial FLRV lower than 30 %. Growth of VLM was not accelerated. Patients with administered SCs had lower number of explorative laparotomies and extrahepatal metastases during follow up. OS after resection was comparable to patients with PVE and primarily resected. The TILs assesement did not prove activation of cytotoxic reaction. Patients with PVE had higher levels of regulatory T cells lymphocytes (CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) (T reg). We observed lower levels of CD4<sup>+</sup> in the patients with PVE and SCs administration. The diferences were also observed in ITL, ISL and Crohn like infiltration. CD4<sup>+</sup> PTL infiltration was lower in all patients with PVE. High infiltration of CD4<sup>+</sup> and ISL infiltration were connected with early recurrency of the disease in all patients with PVE. TILs ratio showed higher infiltration of maturated T reg in all patients with PVE. Higher ratio FoxP3/CD25 decreased risk of recurrency in all resected patients. CD8/CD4 was a negative prognostic factor of the primarily resectable patients, because increasing ratio decreased DFI. Assesement of ABCC10 and ABCC11 did not prove significant diferences between observed groups.

**4. Conclusion:** PVE is still beneficial for patients with primarily unresectable CLM. Patients with intraportal administration of SCs had lower number of exploratory laparotomies and extrahepatal metastases during follow up. The cause of this situation would be the object of further research. Study did not prove activation of cytotoxic immunity at CLM. T reg could be a supporting factor factor for liver atrophy in the liver lobe, where the occlusion of the portal vein was performed. Higher ratio FoxP3/CD25 was a positive prognostic factor that increased DFI in patients with liver resection for CLM.

**5.** The thesis provides an **overview of literature** which includes 281 sources of references and a list of author's publication.

**6. Key words:** colorectal cancer, liver metastases, portal vein embolization, future liver remnant volume, stem cells, tumor infiltrating lymphocytes, ABCC transporters

## 13. Přílohy

### Publikace autora

FIALA, O., P. PITULE, P. HOŠEK, V. LIŠKA, O. ŠOREJS, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL. T. BUCHLER, A. POPRACH, O. TOPOLČAN a J. FÍNEK. The association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression profiles with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumour Biology* [online]. 2017, **39**(7). DOI: 10.1177/1010428317709283. ISSN 1423-0380. IF 2,926.

LUDVÍK, J., P. DURAS, V. TŘEŠKA, T. MATOUŠKOVÁ, J. BRŮHA, J. FICHTL, D. LYSÁK, J. FERDA a J. BAXA. Portal vein embolization with contralateral application of stem cells facilitates increase of future liver remnant volume in patients with liver metastases. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2017, **40**(5), 690-696. DOI: 10.1007/s00270-017-1566-8. ISSN 0174-1551. IF 2,191

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, T. SKALICKÝ, J. FICHTL, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, O. TOPOLČAN, R. PÁLEK, J. ROSENDORF, J. POLÍVKA a L. HOLUBEC. Evaluation of Tumor Markers and Their Impact on Prognosis in Gallbladder, Bile Duct and Cholangiocellular Carcinomas - A Pilot Study. *Anticancer Research*. 2017, **37**(4), 2003-2009. ISSN 0250-7005. IF 1,414.

TŘEŠKA, V., J. FICHTL, J. BRŮHA, V. LIŠKA, S. KORMUNDA a J. FÍNEK. Liver Resections for Colorectal Metastases in Patients Aged Over 75 Years. *Anticancer Research*. 2017, **37**(3), 1529-1533. ISSN 0250-7005. IF 1,414.

KŘÍŽOVÁ, V., M. DUBOVÁ, S. SUSOVÁ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, M. SKALA, V. LIŠKA, O. DAUM a P. SOUČEK. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **78**(3), 595-603. DOI: 10.1007/s00280-016-3114-7. ISSN 0344-5704. IF 2,824.

TŘEŠKA, V., J. FERDA, O. DAUM, V. LIŠKA, T. SKALICKÝ a J. BRŮHA. Intrahepatic biliary cystadenoma - diagnosis and treatment options. *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2016. **27**(3), 252-256. doi: 10.5152/tjg.2016.15447. ISSN 1300-4948. IF 0,932.

EBERLOVÁ, L., V. LIŠKA, H. MÍRKA, T. GREGOR, Z. TONAR, R. PÁLEK, M. SKÁLA, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, K. KALUSOVÁ, S. HAVIAR, M. KRÁLÍČKOVÁ a A. LAMETSCHWANDTNER. Porcine liver vascular bed in biodur E20 corrosion casts. *Folia Morphologica*, 2016, **75**(2), 154-161. ISSN 0015-5659. IF 0,3.

KUNICKÁ, T., P. PROCHÁZKA, I. KRUS, P. BENDOVIÁ, M. PROTIVOVÁ, S. ŠŮSOVÁ, V. HLAVÁČ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, M. SCHNEIDEROVÁ., P. PITULE, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, P. VODIČKA a P. SOUČEK. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*[online]. 2016, **16**(1). DOI: 10.1186/s12885-016-2826-8. ISSN 1471-2407. IF 3,362.

BRŮHA J., O. VYČÍTAL, Z. TONAR, H. MÍRKA, L. HAIDINGEROVÁ, J. BENEŠ, R. PÁLEK, M. SKÁLA, V. TŘEŠKA a V. LIŠKA. Monoclonal Antibody Against Transforming Growth Factor Beta 1 Does Not Influence Liver Regeneration After Resection in Large Animal Experiments. *In Vivo*. 2015, **29**(3), 327-340. ISSN 0258-851X. IF 1,148.

TŘEŠKA, V., V. LIŠKA, J. FICHTL, D. LYSÁK, H. MÍRKA, J. BRŮHA, P. DURAS, I. TŘEŠKOVÁ, J. NÁHLÍK, V. ŠIMÁNEK, O. TOPOLČAN. Portal vein embolisation with application of haematopoietic stem cells in patients with primarily or non-resectable colorectal liver metastases. *Anticancer Research*. 2014. **34**(12), 7279-85. ISSN 0250-7005. IF 1,826.

FLANAGAN, L., J. SCHMID, M. EBERT, P. SOUČEK, T. KUNICKÁ, V. LIŠKA, J. BRŮHA, P. NEARY, N. DEZEEUW, M. TOMMASINO, M. JENAB, J.H. PREHN a D.J. HUGHES. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014. **33**(8), 1381-90. DOI: 10.1007/s10096-014-2081-3. ISSN 0934-9723. IF 2,668.

TŘEŠKA, V., M. ČERNÁ, V. LIŠKA, I. TŘEŠKOVÁ, A. ŇARŠANSKÁ a J. BRŮHA. Surgery for breast cancer liver metastases - factors determining results. *Anticancer Research*. 2014. **34**(3), 1281-1286. Erratum in: *Anticancer Research*. 2014. **34**(5), 2687. ISSN 0250-7005. IF 1,826.

PITULE, P., O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. NOVÁK, P. HOŠEK, V. TŘEŠKA, I. HLAVATÁ, P. SOUČEK, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. LIŠKA. Differential expression and prognostic role of selected genes in colorectal cancer patients. *Anticancer Research* 2013, **33**(11), 4855-4865. ISSN 0250-7005. IF 1,725.

HLAVATÁ, I., B. MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, R. VÁCLAVÍKOVÁ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, L. HOLUBEC, V. TŘEŠKA, P. VODIČKA a P. SOUČEK. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187-196 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1093/mutage/ger075. ISSN 0267-8357. IF 3,983.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, J. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK, J. BENEŠ, L. HOLUBEC. Inhibition of Transforming Growth Factor Beta-1 Augments Liver Regeneration after Partial Portal Vein Ligation in a Porcine Experimental Model. *Hepatogastroenterology*. 2012, **59**(113), 235-240. ISSN 0172-6390. IF 0,9.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, J. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BRŮHA, O. FIALA, O. VYČÍTAL, A. CHLUMSKÁ, L. HOLUBEC, S. KORMUNDA, L. TREFIL, J. RACEK J. a M. MATĚJOVIČ. Tumour Necrosis Factor-Alpha Stimulates Liver Regeneration in Porcine Model of Partial Portal Vein Ligation. *Hepatogastroenterology*, 2012, **59**(114), 496-500. ISSN 0172-6390. IF 0,9.

LIŠKA, V., O. VYČÍTAL, O. DAUM, P. NOVÁK, V. TŘEŠKA, J. BRŮHA, P. PITULE a L. HOLUBEC. Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+ lymphocytes as independent prognostic factor after radical surgical treatment. *Anticancer Research*, 2012, **32**(5), 2129-2132. ISSN 0250-7005. IF 1,414.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. BENEŠ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK, L. TREFIL, J. FÍNEK a L. HOLUBEC. Immediately Preoperative use of Biological Therapy Does not Influence Liver Regeneration after Large Resection - Porcine Experimental Model with Monoclonal Antibody against Epidermal Growth Factor. *In Vivo*. 2012, **26**(4), 683-691. ISSN 0258-851X. IF 1,159.

LIŠKA, V., L. HOLUBEC, V. TŘEŠKA, J. VRZALOVÁ, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, S. KORMUNDA, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, J. FÍNEK, M. PEŠTA, L. PECEN a O. TOPOLČAN. Evaluation of tumor markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer. *Anticancer Research*, 2011, **31**(4), 1447-1451. ISSN 0250-7005. IF 1,43.

PEŠTA, M., V. KULDA, R. KUČERA, M. PEŠEK, J. VRZALOVÁ, V. LIŠKA, L. PECEN, V. TŘEŠKA, J. ŠAFRÁNEK, M. PRAŽÁKOVÁ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, L. HOLUBEC a O. TOPOLČAN. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 2011, **31**(11), 4031-4038. ISSN 0250-7005. IF 1,43.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, R. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BRŮHA, O. FIALA, O. VYČÍTAL, A. CHLUMSKA, L. HOLUBEC a M. MATĚJOVIČ. Interleukin-6 Augments Activation of Liver Regeneration in Porcine Model of Partial Portal Vein Ligation. *Anticancer Research*. 2009, **29**(6), 2371-2377. ISSN 0250-7005. IF 1,604.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, T. SKALICKÝ, H. MÍRKA, J. KOBR, R. SÝKORA, A. SUTNAR, J. BRŮHA, O. FIALA, O. VYČÍTAL, A. CHLUMSKÁ, L. HOLUBEC L. a M. MATĚJOVIČ. Cytokines and liver regeneration after partial portal vein ligation in porcine experimental model. *Bratislavské lékařské listy*. 2009, **110**(8), 447-453. ISSN 0006-9248. IF 0,047.

#### **Publikace v ostatních periodících**

TŘEŠKA, V., T. SKALICKÝ, V. LIŠKA, J. FICHTL, J. BRŮHA, M. SKÁLA, J. ŠEBEK a P. DURAS. Hemangiomy jater – kdy je indikovat invazivní léčbu?. *Rozhledy v chirurgii*. 2017.96(4), 151 - 155. ISSN 0035-9351

TŘEŠKA, V., T. SKALICKÝ, I. TŘEŠKOVÁ, V. LIŠKA, J. FICHTL, J. BRŮHA a E. KORČÁKOVÁ. Jaterní metastázy maligního melanomu – mají resekce nebo radiofrekvenční ablace smysl?. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, 95(10). 350-353. ISSN 0035-9351

BRŮHA, J., V. LIŠKA, R. PÁLEK, H. MÍRKA, P. HOŠEK, E. KORČÁKOVÁ, K. BAJCUROVÁ, J. FICHTL, T. SKALICKÝ a V. TŘEŠKA. Porovnání perkutánní a otevřené radiofrekvenční ablace metastáz kolorektálního karcinomu ve FN Plzeň v letech 2001 – 2015. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, **95**(3), 107-111. ISSN 0035-9351.

MOLÁČEK, J., J. BRŮHA, J. BAXA, V. OPATRNÝ a V. TŘEŠKA. Extragenitální maligní Müllerianý karcinosarkom infiltrující dolní dutou žílu – kazuistika. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, **95**(1), 45-47. ISSN 0035-9351.

BRŮHA, J., V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, T. SKALICKÝ, J. FICHTL a O. HES. Granulomatózní záněty v diferenciální diagnostice malignit hepatobiliárního traktu – kazuistiky. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, **95**(1), 40-44. ISSN 0035-9351.



TŘEŠKA, V., P. DURAS, H. MÍRKA, T. SKALICKÝ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, V. OPATRŇY, V. LIŠKA a A. SUTNAR. Transarteriální chemoembolizace pomocí „drug eluting beads“ (TACE DEB) u nemocných s radikálně neodstranitelným hepatocelulárním karcinomem (HCC). *Rozhledy v chirurgii*. 2014, **93**(2), 63-69. ISSN 0035-9351.

TŘEŠKA, V., J. VODIČKA, V. ŠPIDLEN, T. SKALICKÝ, J. FICHTL, V. ŠIMÁNEK, J. ŠAFRÁNEK, A. SUTNAR a J. BRŮHA. Jaterní a plicní metastázy kolorektálního karcinomu – zkušenosti chirurgické kliniky FN v Plzni. *Rozhledy v chirurgii*. 2013, **92**(9), 488-493. ISSN 0035-9351.

NOVÁK, P., V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, J. KOPALOVÁ, O. VYČÍTAL a J. BRŮHA. Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě. *Rozhledy v chirurgii*. 2012, **91**(4), 219-222. ISSN 0035-9351.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BENEŠ, J. KOBR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK J. a J. TREFIL. Liver parenchyma regeneration in connction with extended surgical procedure – experiment on large animal. *ScienceMed*. 2011, **2**(5), 461-467. ISSN 2039-4632.

TŘEŠKA, V., V. LIŠKA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, D. ŠMÍD, A. ŇARŠANSKÁ, M. VACHTOVÁ, I. TŘEŠKOVÁ, J. BRŮHA a O. VYČÍTAL. Jaterní metastázy jiného než kolorektálního původu. *Rozhledy v chirurgii*. 2010, **89**(3), 488-493. ISSN 0035-9351.

VYČÍTAL, O., J. BRŮHA, V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, R. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK, L. TREFIL L. a J. BENEŠ. Novel use of biological therapy in acceleration of liver regeneration after partial portal vein ligation in a porcine experimental model. *Plzeňský lékařský sborník*. 2009, (75), 17-27. ISSN 0551-1038.

#### ***Knihy – kapitoly v knihách***

HOCH, J., F. ANTOŠ, Koloproktologie. Vybrané kapitoly. Mladá fronta a.s. 2017. 239 stran. ISBN 9788020441799, spoluautor kapitoly 11

LIŠKA, V., ed. Experimental surgery. 1st edition. Plzeň: Nava, 2016. 541 stran. ISBN 978-80-7211-490-0. Kapitoly 1, 2, 4, 5.

LIŠKA, V., D. GLANC, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, J. KOPALOVÁ, R. PÁLEK a V. TŘEŠKA. Interleukin-6 inhibitors as novel generation of treatment strategies. In: D'AQUINO, J. et al. *Interleukin-6: Genetics, Clinical Applications and Role in Disease*. New York: Nova, 2013, 1-60. ISBN 978-1-62417-592-3.

LIŠKA, V., P. NOVÁK, O. DAUM, V. TŘEŠKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA a P. PITULE. Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis of colorectal cancer after radical surgical treatment. In: ETTARH, R., ed. *Colorectal Cancer Biology: From Genes to Tumor*. Rijeka: Intech, 2012, 413-428. ISBN 978-953-307-707-9.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, J. KOPALOVÁ, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BENEŠ, J. KOBR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK a L. TREFIL. Liver parenchyma regeneration in connection with extended surgical procedure: experiment on large animal. In: BAPTISTA, P., ed. *Liver Regeneration*. Rijeka: Intech, 2012, 151-174. ISBN 979-953-307-163-2.

### **Knihy - kapitoly ve skriptech**

LIŠKA, V., a J. ROSENBERG, eds. *Experimentální chirurgie - nové technologie v medicíně. I. díl, Experimentální chirurgie*. Plzeň: Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni, 2013. 188 s. ISBN 978-80-260-4795-7. Kapitoly 1.2, 3.1, 3.5, 3.6.

### **Seznam přednášek autora**

BRŮHA, J., O. VYČÍTAL, V. LIŠKA, P. NOVÁK, V. TŘEŠKA, Perforovaný Grasserův divertikl jako neobvyklá příčina náhlé příhody břišní. XII. dny mladých chirurgů Prof. MUDr. Stanislava Čárského, DrSc, Seč u Chrudimi, 7.6.-8.6.2012

BRŮHA, J., O. VYČÍTAL, V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, Ovlivnění regenerace zbytkového jaterního parenchymu postiženého toxickou steatofibrózou monoklonální protilátkou proti Transforming Growth Factoru Beta-1 – experiment na praseti domácím. Pracovní den sekce mladých chirurgů ČCHS, naše chyby a omyly VI. Olomouc 22.11.2012

BRŮHA, J., V. LIŠKA, A. SUTNAR, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, Poranění jater- kazuistika. XIII. dny mladých chirurgů Prof. MUDr. Stanislava Čárského, DrSc, Senec, Slovensko, 7.6.-8.6. 2013

BRŮHA, J., K. RUPERT, V. LIŠKA, O. DAUM, V. TŘEŠKA, Vaskulitida v diferenciální diagnostice náhlé příhody břichní – kazuistika. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 4.2. – 6.2.2014

BRŮHA, J., V. TŘEŠKA, T. SKALICKÝ, V. LIŠKA, J. FICHTL, H. MÍRKA, D. GLANC, P. HOŠEK, RFA (radiofrekvenční ablace) metastáz kolorektálního karcinomu do jater ve FN Plzeň. Večer Chirurgické kliniky Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni, Večery spolku lékařů JEP v Plzni, Plzeň, 13.5.2015

BRŮHA, J., D. GLANC, V. LIŠKA, P. HOŠEK, H. MÍRKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, Faktory prognózy radiofrekvenční ablace jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. 55. studentská vědecká konference Lékařské fakulty v Plzni 22.4.2015.

BRŮHA, J., D. GLANC, V. LIŠKA, P. HOŠEK, H. MÍRKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, RFA (radiofrekvenční ablace) metastáz kolorektálního karcinomu do jater ve FN Plzeň. 7. Kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu, Plzeň, 15.6.-16.6.2015

BRŮHA, J., V. LIŠKA, P. HOŠEK, H. MÍRKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, Comparison of percutaneous and open approach of radiofrequency ablation for colorectal liver metastases in Teaching hospital Pilsen in years 2001 – 2015. 12th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové, 26.11. – 27.11.2015

BRŮHA, J., V. LIŠKA, P. HOŠEK, H. MÍRKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, Radiofrekvenční ablace metastáz kolorektálního karcinomu do jater ve FN Plzeň. Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 9.2. – 11.2.2016

BRŮHA, J., V. LIŠKA, J. LUDVÍK, H. MÍRKA, P. DURAS, K. BAJCUROVÁ, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, D. LYSÁK, V. TŘEŠKA, Vliv selektivní embolizace portální žíly a intraportální aplikace kmenových buněk na progresi jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. 56. studentská vědecká konference Lékařské fakulty v Plzni, Plzeň, 13.4.2016

BRŮHA, J., V. LIŠKA, P. HOŠEK, H. MÍRKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, Radiofrekvenční ablace metastáz kolorektálního karcinomu do jater ve FN Plzeň. XVI. dny mladých chirurgů Prof. MUDr. Stanislava Čárského, DrSc, Seč u Chrudimi 9.6.-10.6.2016

BRŮHA, J., V. LIŠKA, P. HOŠEK, H. MÍRKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, V. TŘEŠKA, Effect of selective portal vein embolization and intraportal administration of stem cells on the progression of colorectal cancer metastases in the liver. 13th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové 24.11. – 25.11.2016

BRŮHA, J., V. KŘÍŽKOVÁ, M. DOLEJŠOVÁ, L. VIŠTĚJNOVÁ, M. ŠLAJEROVÁ, M. HOLUBOVÁ, D. LYSÁK, V. LIŠKA, J. FICHTL, T. SKALICKÝ, H. MÍRKA, P. DURAS, Small dormant stem cells u pacientů po embolizaci portální žíly a stimulaci růstu zbytkového jaterního parenchymu autologními kmenovými buňkami z kostní dřeně – pilotní studie. 57. studentská vědecká konference Lékařské fakulty v Plzni, Plzeň, 17.5.2017

BRŮHA J., V. LIŠKA, M. JIŘÍK, L. EBERLOVÁ, V. TŘEŠKA, Approaches to simple tumors of hepatobiliary system, common problems during the surgery and complications in post-surgical period. 1. Learning – Teaching – Training Activities (LTT), Ankara, Turkey, 10.-14.1.2018

BRŮHA J., V. LIŠKA, M. JIŘÍK, L. EBERLOVÁ, V. TŘEŠKA, Advanced techniques for achieving liver resectability. 1. Learning – Teaching – Training Activities (LTT), Ankara, Turkey, 10.-14.1.2018

BRŮHA J., V. LIŠKA, M. JIŘÍK, L. EBERLOVÁ, V. TŘEŠKA, Pancreatic surgery Our objectives with LISA. 1. Learning – Teaching – Training Activities (LTT), Ankara, Turkey, 10.-14.1.2018

## **Kopie publikací se vztahem k tématu dizertační práce**

FIALA, O., P. PITULE, P. HOŠEK, V. LIŠKA, O. ŠOREJS, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL. T. BUCHLER, A. POPRACH, O. TOPOLČAN a J. FÍNEK. The association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression profiles with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumour Biology* [online]. 2017, **39**(7). DOI: 10.1177/1010428317709283. ISSN 1423-0380. IF 2,926.

## The association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression profiles with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab

Ondrej Fiala<sup>1,2</sup>, Pavel Pitule<sup>2</sup>, Petr Hosek<sup>2</sup>, Vaclav Liska<sup>2,3</sup>, Ondrej Sorejs<sup>1</sup>, Jan Bruha<sup>3</sup>, Ondrej Vycital<sup>3</sup>, Tomas Buchler<sup>4</sup>, Alexandr Poprach<sup>5</sup>, Ondrej Topolcan<sup>6</sup> and Jindrich Finek<sup>1</sup>

### Abstract

MicroRNAs regulate the expression of genes involved in several important cancer-related processes including cell adhesion, proliferation, and tumour angiogenesis. Bevacizumab is routinely used in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer, but, so far, no reliable biomarker predicting response to bevacizumab has been established. The aim of our retrospective study was to evaluate the association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p tumour expression levels with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. The study included 63 patients. For the assessment of microRNA expression, gene-specific TaqMan assays were used. The median progression-free survival and overall survival for patients with low tumour expression of miR-126-3p were 8.8 and 20.6 months versus 13.5 months and median overall survival was not reached for patients with high expression ( $p=0.0064$  and  $p=0.0027$ ), respectively. The median progression-free survival and overall survival for patients with low tumour expression of miR-126-5p were 9.0 and 22.2 months versus 12.0 and 23.4 months for patients with high expression ( $p=0.2113$  and  $0.6858$ ), respectively. The median progression-free survival and overall survival for patients with low tumour expression of miR-664-3p were 9.1 and 22.5 months versus 8.8 and 23.4 months for patients with high expression ( $p=0.2542$  and  $p=0.1922$ ), respectively. The multivariable Cox proportional hazards model revealed that miR-126-3p expression was significantly associated with progression-free survival (hazard ratio=0.28,  $p=0.0053$ ) and also with overall survival (hazard ratio=0.18,  $p=0.0046$ ). In conclusion, the results of this study suggest that the expression of miR-126-3p in the tumour tissue was associated with outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab.

### Keywords

Colorectal cancer, bevacizumab, chemotherapy, microRNA, miR-126-3p, miR-126-5p, miR-664-3p

Date received: 21 March 2017; accepted: 19 April 2017

<sup>1</sup>Department of Oncology and Radiotherapeutics, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup>Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Oncology and First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>6</sup>Department of Nuclear Medicine, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

### Corresponding author:

Ondrej Fiala, Department of Oncology and Radiotherapeutics, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, alej Svobody 80, Pilsen 30100, Czech Republic.  
Email: [fiala.o@centrum.cz](mailto:fiala.o@centrum.cz)



## Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer-related causes of morbidity and mortality in developed countries.<sup>1,2</sup> The introduction of targeted agents based on monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor (VEGF) or epidermal growth factor receptor (EGFR) significantly improved survival of patients with metastatic CRC (mCRC). The mechanism of action of bevacizumab is based on blockade of angiogenesis by inhibition of the most important angiogenic growth factor, VEGF. The efficacy and safety of bevacizumab in the treatment of patients with mCRC have been proved in randomized phase III clinical trials as well as observational studies previously,<sup>3–7</sup> but, so far, no reliable biomarker predicting response to bevacizumab has been established. Several candidate predictive biomarkers, including angiopoietin-2, soluble VEGFR-1 and intratumoral expression of VEGFR-2, circulating levels of short VEGF-A isoforms, specific *KRAS* mutation types or serum carcinoembryonic antigen (CEA), have been studied but not sufficiently validated for routine clinical use.<sup>8–12</sup>

MicroRNAs (miRs) are small noncoding RNAs (containing approximately 22 nucleotides) emerging as new players in epigenetic regulation of gene expression at post-transcriptional level. MiRs regulate the expression of genes involved in several important cancer-related processes including cell adhesion, proliferation, and tumour angiogenesis.<sup>13</sup> During recent years, many efforts were made to explore the association between various miRs and cancer diagnostics, prognosis, and treatment response in order to find potential biomarkers to be used in clinical practice.<sup>14–16</sup>

The aim of our retrospective study was to evaluate the association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression levels with outcomes of patients with mCRC treated with bevacizumab.

MiR-126-3p has multiple functions with important roles in angiogenesis, tumour growth and invasion and vascular inflammation. It is encoded by intron 7 of the epidermal growth factor (EGF)-like domain 7 (*Egfl7*) gene, and its expression appears to be highly enriched in endothelial cells.<sup>17–19</sup> Because of this endothelial-specific expression, miR-126-3p is one of the commonly studied miRs in angiogenesis, and it is considered essential to the regulation of blood vessel integrity.<sup>18,19</sup> The VEGF-A messenger RNA (mRNA) is a miR-126-3p target and previous studies have suggested its role in regulation of VEGF-A-mediated signal transduction.<sup>18–21</sup> MiR-126 is downregulated in several malignant tumours and is often referred to as a tumour suppressor.<sup>22–25</sup> MiR-126-5p plays roles that are relevant to cancer progression like promotion of endothelial proliferation or regulation of leukocyte adhesion and transmigration.<sup>26,27</sup> MiR-664-3p has been shown to be involved in several aspects of carcinogenesis

including angiogenesis. Among its most important targets is neuropilin 1, which plays an important role in regulation of angiogenesis. Recently, neuropilin and its binding partner neurexin have been shown to be widely expressed in the vascular system and involved in angiogenesis.<sup>28,29</sup>

## Patients and methods

### Patients and treatment

We retrospectively analysed clinical data of 63 adult patients with histologically confirmed mCRC treated with bevacizumab-based therapy between years 2009 and 2015 at Department of Oncology and Radiotherapeutics, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Czech Republic. Bevacizumab (Avastin; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) was administered in combination with chemotherapy or as a single agent in a standard approved doses (5.0 mg/kg every 14 days or 7.5 mg every 21 days). The chemotherapy consisted of following schedules: fluorouracil and leucovorin in combination with oxaliplatin (FOLFOX) or irinotecan (FOLFIRI) or alone (FUFA), capecitabine alone, oxaliplatin alone and irinotecan alone. None of the patients had previously received antiangiogenic therapies. The protocol of our study was approved by the independent ethics committee of the Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen and complied with the International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects, Good Clinical Practice Guidelines, the Declaration of Helsinki and local laws. The patients signed informed consent with the inclusion and subsequent analysis of their data.

### Clinical monitoring

Clinical data were obtained retrospectively from the hospital information system. Physical examination and routine laboratory tests were performed every 2 weeks; computed tomography (CT) or positron emission tomography (PET; PET/CT) was performed every 3 months of the treatment. The objective tumour response was assessed by the attending physician using Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST).<sup>30</sup>

### Assessment of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression

Matched samples of tumour and macroscopically healthy mucosa from the same resected part of colon (sampled as far from the tumour site as possible) underwent total RNA isolation by TRI Reagent® RT (MRC, Cincinnati, OH, USA) using manufacturer's protocol. Total RNA concentration was measured by Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the samples were diluted to 2 ng/ $\mu$ L for reverse transcription.



For the assessment of miR expression, gene-specific TaqMan assays (Thermo Fisher Scientific) were used. Targets for the analysis were hsa-miR-126-3p (assay ID 002228), hsa-miR-126-5p (000451), hsa-miR-664-3p (002897), hsa-miR-16 (000391) and hsa-miR-345 (002186), with the last two miRs used as reference genes based on the previously published data<sup>31</sup> and analysis of expression stability using our data and combination of four algorithms (BestKeeper, NormFinder, Genorm and Comparative Delta Ct method).<sup>32–35</sup> Reverse transcription was done separately for each miR using the target-specific primers from individual TaqMan Assays in combination with TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Relative expression of miRs was measured in triplicates in 10  $\mu$ L reactions on the CFX96 real-time polymerase chain reaction (PCR) system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Thermo Fisher Scientific). All reactions were tested for nonspecific signals.

### Statistical analysis

Standard frequency tables and descriptive statistics were used to characterize sample data set. Changes of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression in tumour tissue (relative to healthy tissue) were tested for statistical significance using Wilcoxon signed-rank test. Correlations between relative miR expressions were assessed by means of Spearman's correlation coefficient. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were estimated using the Kaplan–Meier method, and all point estimates were accompanied by 95% confidence intervals. PFS was determined from the date of bevacizumab initiation until the date of first documented progression or death. OS was determined from the date of bevacizumab initiation until the date of death, regardless of its cause. Patients who had not progressed or had not died were censored at the date of last follow-up with respect to their PFS or OS, respectively. Point estimates of observed survival times (or survival quantiles) were calculated from the Kaplan–Meier estimates of the survival functions using linear interpolation between the complete observations to the required time (or proportion surviving). Estimates of median follow-up were calculated using the inverse Kaplan–Meier method.<sup>36</sup> Statistical significance of the differences in Kaplan–Meier estimates according to miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression was assessed using the log-rank test. Multivariable Cox proportional hazards model was then used to evaluate the effect of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression in the context of other potential prognostic factors of PFS and OS. All reported  $p$  values are two-tailed and the level of statistical significance was set at  $\alpha=0.05$ . Statistical processing and testing were

performed using STATISTICA data analysis software system (Version 12; StatSoft, Inc, 2013; www.statsoft.com).

## Results

### Patient characteristics

The study included 63 patients. The median age was 62.5 (range=39.1–78.7) years. Of them, 43 (68.3%) patients were male, 36 (57.1%) had a primary tumour localized in the colon, 41 (65.1%) had metastatic disease at diagnosis, and 48 (76.2%) received the bevacizumab-containing regimen in the first line. The baseline patient characteristics are summarized in Table 1. The median PFS of the whole cohort was 9.1 months (95% CI=7.9–10.8), and the median OS was 23.4 months (95% CI=18.6–31.0). In the whole sample, 55 complete and 8 censored observations were present with respect to PFS, and 47 terminated and 17 censored observations concerning OS. Median follow-up with respect to OS was 47.6 months.

### Expression of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p in the tumour tissue

Low tumour expression of miR-126-3p and miR-126-5p in comparison with healthy tissue was assessed in 51 (80.9%) and 53 (84.1%) patients, respectively ( $p<0.0001$  and  $p<0.0001$ ). Low tumour expression of miR-664-3p in comparison with healthy tissue was assessed in 23 (36.5%) patients ( $p=0.0132$ ). The expression of assessed miRs is shown in Figure 1. Relative tumour expressions of miR-126-3p and miR-126-5p were significantly and strongly correlated (Spearman's  $r_s=0.711$ ,  $p<0.0001$ ), while only weak correlation was observed between miR-664-3p and miR-126-3p ( $r_s=0.274$ ,  $p=0.0297$ ), and no significant correlation between miR-664-3p and miR-126-5p ( $r_s=0.107$ ,  $p=0.4058$ ). The results of correlation analysis are shown in Figure 2.

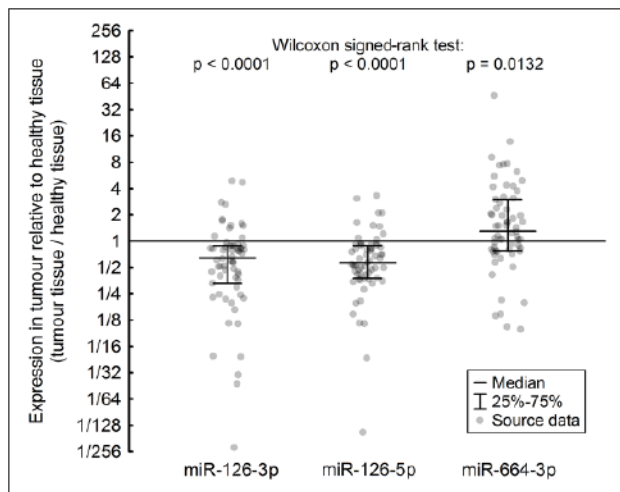
### Association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression with survival

The median PFS for patients with low tumour expression of miR-126-3p was 8.8 months compared to 13.5 months for patients with high expression ( $p=0.0064$ ; Figure 3(a)). The median OS for patients with low tumour expression of miR-126 was 20.6 months, while the median OS was not reached for patients with high expression ( $p=0.0027$ ; Figure 3(d)). The median PFS and OS for patients with low tumour expression of miR-126-5p were 9.0 and 22.2 months compared to 12.0 and 23.4 months for patients with high expression ( $p=0.2113$  and  $p=0.6858$ , respectively; Figure 3(b) and (e), respectively). The median PFS and OS for patients with low tumour expression of miR-664-3p were 9.1 and 22.5 months compared to 8.8 and 23.4 months for

**Table 1.** Baseline characteristics of patients.

Characteristic	Category	n (%)
Gender	Female	20 (31.7)
	Male	43 (68.3)
Age	<70 years	48 (76.2)
	≥70 years	15 (23.8)
Localization of primary tumour	Rectum	26 (41.3)
	Colon	36 (57.1)
	Sigma	1 (1.6)
Line of therapy	1	48 (76.2)
	2	9 (14.3)
	3	1 (1.6)
	4	2 (3.2)
	Missing data	3 (4.8)
	Resectability	Non-resectable
Potentially resectable		11 (17.5)
Missing data		20 (31.7)
Objective response rate	PR	23 (36.5)
	CR	7 (11.1)
	SD (at least 6 weeks)	14 (22.2)
	PD	11 (17.5)
	Not assessed or missing data	8 (12.7)
KRAS mutation status	Non-mutated (WT-KRAS)	17 (27.0)
	Mutated (MT-KRAS)	21 (33.3)
	Not assessed or missing data	25 (39.7)

PR: partial response; CR: complete response; SD: stable disease; PD: progressive disease.

**Figure 1.** Expression of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p in the tumour tissue.

patients with high expression ( $p=0.2542$  and  $p=0.1922$ , respectively; Figure 3(c) and (f), respectively). The PFS and OS data are summarized in Tables 2–4.

Baseline clinical parameters were assessed together with miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression in multivariable model. The multivariable Cox

proportional hazards model revealed that miR-126-3p expression was significantly associated with PFS (hazards ratio (HR)=0.28,  $p=0.0053$ ) and also with OS (HR=0.18,  $p=0.0046$ ; Table 5).

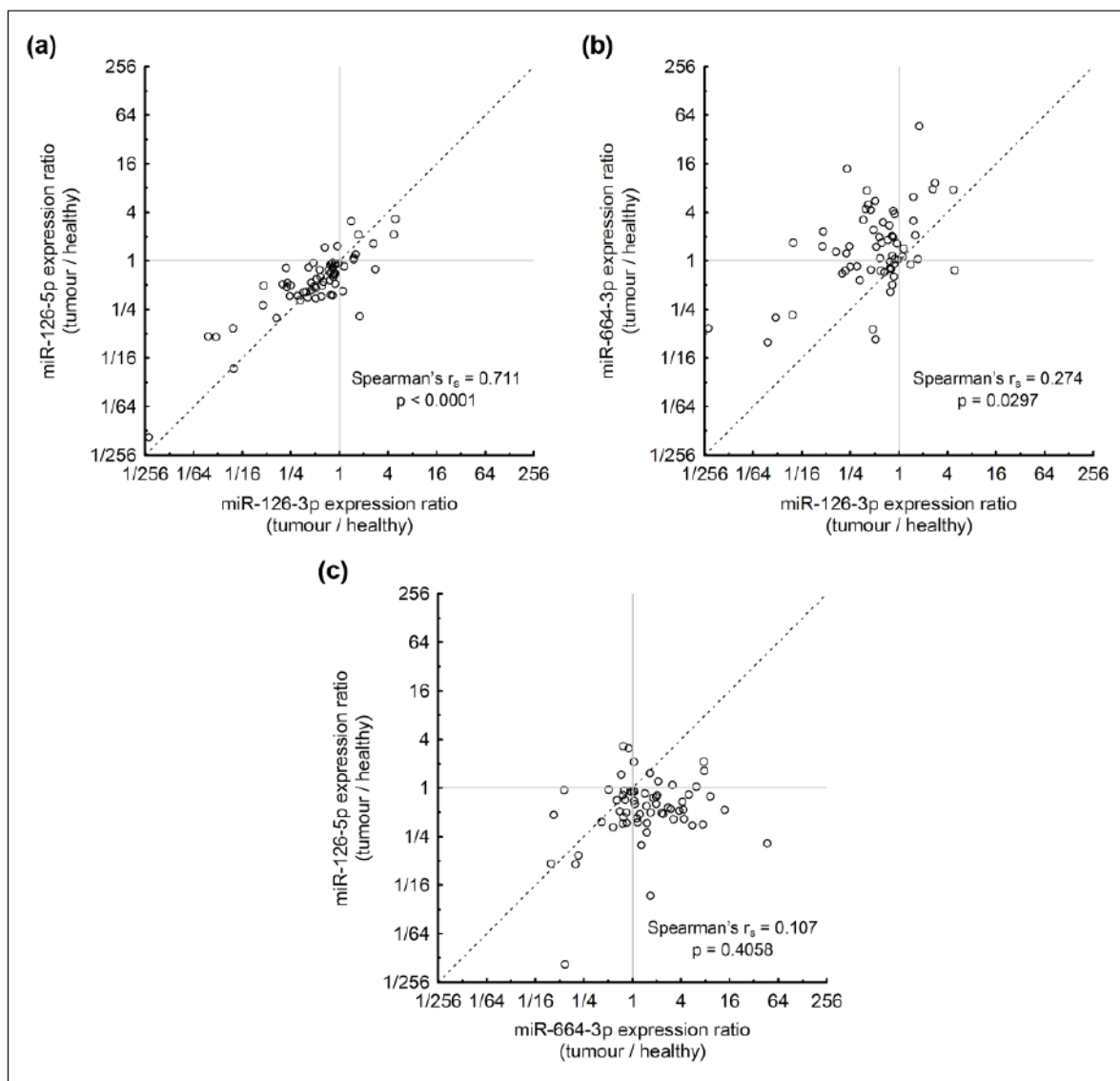
## Discussion

MiRs have emerged as important endogenous regulators of tumorigenesis, disease progression and metastasis in various cancers, including CRC.<sup>37</sup> They function as inhibitors of target genes activity by binding to their mRNAs and hindering their translation.<sup>38</sup> Each miR achieves functional specificity by targeting a core network of genes and has potential effects on multiple signalling pathways.<sup>39</sup> Increasing evidence suggests that aberrant miR expression is clearly associated with the initiation and progression of certain cancers, and miRs may act as oncogenes and/or tumour suppressor genes *via* regulation of expression of genes involved in crucial cancer-related processes including cell adhesion, proliferation, and also tumour angiogenesis.<sup>13</sup> In the present retrospective study, we focused on the association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression levels with outcomes of patients with mCRC treated with bevacizumab.

Even though, the prognostic role of miR-126-3p expression in patients with CRC has been recently suggested, little is known about its possible predictive role in patients with mCRC treated with antiangiogenic therapies, including bevacizumab.<sup>40,41</sup> In our study, we observed a significantly shorter PFS and also OS for patients with low expression of miR-126-3p in the tumour tissue compared to those with high expression ( $p=0.0064$  and  $p=0.0027$ , respectively). The multivariable Cox proportional hazards model revealed that miR-126-3p expression was significantly associated with PFS (HR=0.28,  $p=0.0053$ ) and also with OS (HR=0.18,  $p=0.0046$ ), being evaluated as the most significant prognostic factor with respect to both survival indicators. Similar results have been recently published by Hansen et al.,<sup>42</sup> who reported significantly shorter PFS for patients with low tumour expression of miR-126-3p in a translational analysis performed on previously untreated mCRC patients enrolled in a phase III Nordic ACT trial. Based on our results, together with those reported by Hansen et al., we suggest that the aberrant activation of angiogenesis mainly mediated by VEGF in tumours with high miR-126-3p expression could promote high sensitivity to VEGF-targeted agents represented by bevacizumab.

Compared to the miR-126-3p, very little is known about the miR-126-5p, which is processed from the same precursor. To our knowledge, there is no relevant study of miR-126-5p effect on the CRC progression, and in our set of patients, we did not observe any differences among patients with opposite change of miR-126-5p relative expression. High correlation of miR-126-3p and





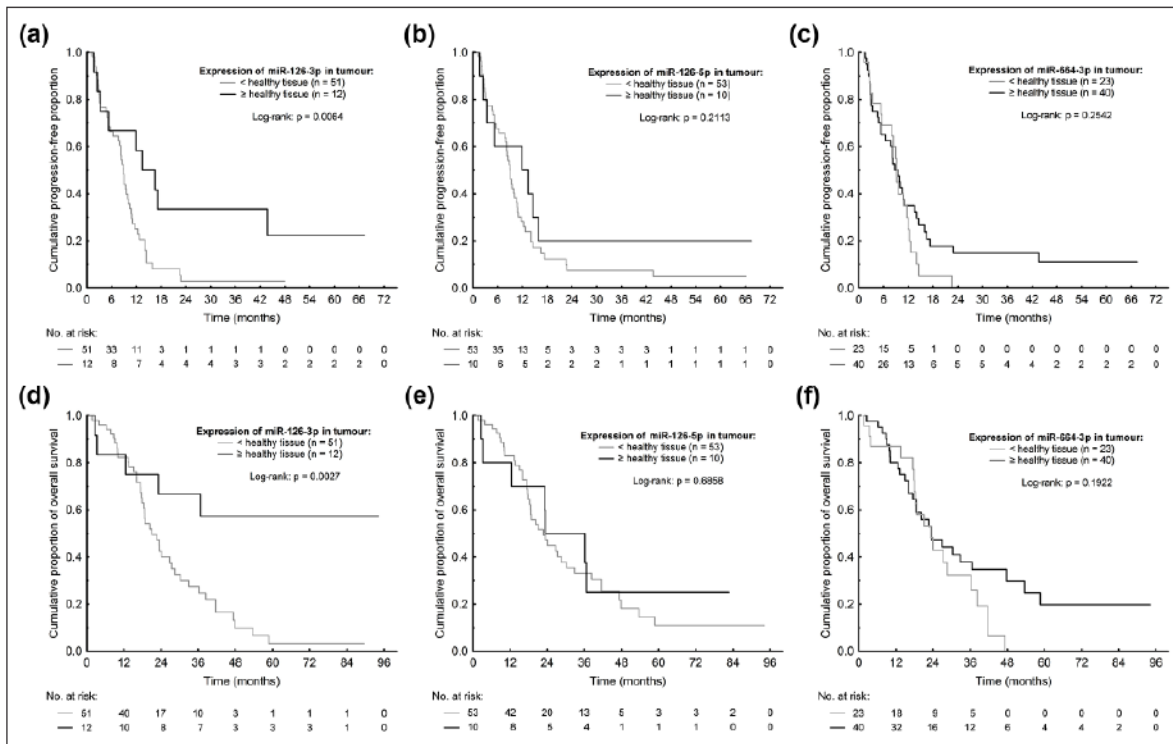
**Figure 2.** Correlation analysis of the expression of miR-126-3p and miR-126-5p (a), miR-126-3p and miR-664-3p (b), and miR-664-3p and miR-126-5p (c). Grey lines correspond to an expression ratio of 1, that is, no expression change between the tumour tissue and healthy tissue. Dashed line represents identity of expression ratios on both axes ( $y = x$ ).

miR-126-5p expression but different relation to clinical parameters may show the specific effects of miR-126-3p on OS and PFS, although this implication is somewhat limited by the size of our cohort.

Very little data have been published also about miR-664-3p in the field of CRC. In our study, we did not observe any difference in PFS nor OS in association with miR-664-3p expression. The results of our study did not confirm the data published by Boisen et al.,<sup>43</sup> who reported improved outcome of CAPEOX plus bevacizumab in patients with high tumour expression of miR-664 in a retrospective study.

The principal limitations of this study are the retrospective nature and limited number of patients with resulting heterogeneity, especially regarding chemotherapy backbone regimens. This study also did not include a control group

not treated with bevacizumab, and therefore, it cannot be concluded with certainty whether the expression change of miR-126-3p in tumour tissue is a predictive factor exclusively for bevacizumab-based therapy or a prognostic factor associated with mCRC in general. This question should be answered in prospective randomized trials in the future. Nevertheless, it is the first study focusing on the role of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p, all related to regulation of angiogenesis, in patients with mCRC treated with bevacizumab. In conclusion, the results of the present retrospective study suggest that the expression of miR-126-3p in the tumour tissue was significantly associated with survival of mCRC patients treated with bevacizumab-based therapy. We have not demonstrated association of expression of miR-126-5p or miR-664-3p in the tumour tissue with patients' outcome. Prospective studies on the



**Figure 3.** Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) according to (a and d) miR-126-3p, (b and e) miR-126-5p and (c and f) miR-664-3p expression.

**Table 2.** Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) according to miR-126-3p expression.

	Expression of miR-126-3p in tumour		$p$ value (log-rank test)
	< Healthy tissue (n = 51)	≥ Healthy tissue (n = 12)	
Median PFS (95% CI)	8.8 months (7.1–10.0)	13.5 months (3.4–38.2)	0.0064
3-month PFS (95% CI)	79.8% (68.8–90.8)	78.7% (44.7–96.1)	
6-month PFS (95% CI)	65.5% (52.4–78.6)	65.8% (39.0–92.6)	
12-month PFS (95% CI)	24.0% (12.0–36.1)	58.1% (30.2–86.0)	
Median OS (95% CI)	20.9 months (17.8–27.2)	Not reached	0.0027
12-month OS (95% CI)	81.0% (70.2–91.8)	75.5% (51.2–99.8)	
24-month OS (95% CI)	40.1% (25.8–54.5)	66.1% (39.3–92.9)	
36-month OS (95% CI)	24.9% (11.8–38.0)	57.6% (29.1–86.2)	

CI: confidence interval.

**Table 3.** Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) according to miR-126-5p expression.

	Expression of miR-126-5p in tumour		$p$ value (log-rank test)
	< Healthy tissue (n = 53)	≥ Healthy tissue (n = 10)	
Median PFS (95% CI)	9.0 months (7.9–10.4)	12.0 months (2.9–15.4)	0.2113
3-month PFS (95% CI)	80.5% (69.9–91.2)	74.5% (47.7–100)	
6-month PFS (95% CI)	66.8% (54.1–79.5)	58.9% (28.5–89.4)	
12-month PFS (95% CI)	27.1% (14.8–39.3)	49.7% (18.8–80.7)	
Median OS (95% CI)	22.2 months (18.1–29.7)	23.4 months (6.9–36.8)	0.6858
12-month OS (95% CI)	81.7% (71.3–92.2)	70.6% (42.5–98.8)	
24-month OS (95% CI)	44.9% (30.8–59.1)	49.4% (18.4–80.5)	
36-month OS (95% CI)	31.5% (17.9–41.1)	37.7% (6.3–69.2)	

CI: confidence interval.

**Table 4.** Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) according to miR-664-3p expression.

	Expression of miR-664-3p in tumour		p value (log-rank test)
	< Healthy tissue (n=23)	≥ Healthy tissue (n=40)	
Median PFS (95% CI)	9.1 months (5.7–11.6)	8.8 months (5.4–11.0)	0.2542
3-month PFS (95% CI)	81.8% (66.1–97.6)	79.2% (66.7–91.8)	
6-month PFS (95% CI)	68.4% (49.2–87.6)	63.4% (48.5–78.3)	
12-month PFS (95% CI)	24.4% (5.8–43.0)	33.9% (19.2–48.6)	
Median OS (95% CI)	22.5 months (17.8–31.6)	23.4 months (17.2–38.1)	0.1922
12-month OS (95% CI)	82.9% (67.3–98.5)	78.1% (65.3–90.9)	
24-month OS (95% CI)	43.3% (21.8–64.7)	46.7% (30.5–62.8)	
36-month OS (95% CI)	26.0% (6.0–46.0)	35.3% (19.4–51.2)	

CI: confidence interval.

**Table 5.** Multivariable Cox proportional hazards model for progression-free and overall survival.

Parameter	Category	Progression-free survival (p=0.0157)		Overall survival (p=0.0054)	
		HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
miR-126-3p expression in tumour	< Healthy tissue	1	0.0053	1	0.0046
	≥ Healthy tissue	0.28 (0.11–0.69)		0.18 (0.05–0.59)	
miR-126-5p expression in tumour	< Healthy tissue	1	0.6329	1	0.1606
	≥ Healthy tissue	0.81 (0.34–1.94)		2.10 (0.75–5.90)	
miR-664-3p expression in tumour	< Healthy tissue	1	0.8633	1	0.8326
	≥ Healthy tissue	0.95 (0.51–1.75)		1.08 (0.52–2.23)	
Gender	Female	1	0.0316	1	0.3432
	Male	2.03 (1.06–3.88)		1.38 (0.71–2.69)	
Age	<70 years	1	0.1781	1	0.0991
	≥70 years	1.61 (0.80–3.22)		1.87 (0.89–3.94)	
Line of therapy	First line	1	0.2240	1	0.0184
	Second or higher line	1.57 (0.76–3.29)		2.76 (1.19–6.41)	
Localization of primary tumour	Rectum or sigma	1	0.2036	1	0.5562
	Colon	1.46 (0.81–2.62)		1.21 (0.64–2.28)	

HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

predictive role of miR expression profile should be performed to confirm these results.

### Acknowledgements

The authors would like to thank all patients voluntarily taking part in the study.

### Declaration of conflicting interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: J.F. has received honoraria from Astra Zeneca, Roche and Novartis for consultations and lectures unrelated to this project. T.B. has received honoraria from Roche for consultations and lectures unrelated to this project. A.P. has received honoraria from GSK, Roche and Bayer for consultations and lectures unrelated to this project. O.F., P.P., P.H., V.L., J.B., O.V., O.T. and O.S. declare that they have no actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence this work.

### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by the National Sustainability Program I (NPU I; No. LO1503) provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by the grant of Ministry of Health of the Czech Republic – Conceptual Development of Research Organization (Faculty Hospital in Pilsen – FNPI, 00669806).

### References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69–90.
2. Ferlay J, Parkin DM and Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765–781.
3. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 250: 2335–2342.



4. Kabbinar FF, Hambleton J, Mass RD, et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3706–3712.
5. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013–2019.
6. Kozloff M, Yood MU, Berlin J, et al. Investigators of the BRiTE study Clinical outcomes associated with bevacizumab-containing treatment of metastatic colorectal cancer: the BRiTE observational cohort study. *Oncologist* 2009; 14: 862–870.
7. Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol* 2009; 20: 1842–1847.
8. Goede V, Coutelle O, Neuneier J, et al. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *Br J Cancer* 2010; 103: 1407–1414.
9. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, et al. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1219–1230.
10. Zhang W, Azuma M, Lurje G, et al. Molecular predictors of combination targeted therapies (cetuximab, bevacizumab) in irinotecan-refractory colorectal cancer (BOND-2 study). *Anticancer Res* 2010; 30: 4209–4217.
11. Fiala O, Buchler T, Mohelnikova-Duchonova B, et al. G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumour Biol* 2016; 37: 6823–6830.
12. Fiala O, Finek J, Buchler T, et al. The association of serum carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19–9, thymidine kinase, and tissue polypeptide specific antigen with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab: a retrospective study. *Target Oncol* 2015; 10: 549–555.
13. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281–297.
14. Cappellesso R, Nicolò L, Caroccia B, et al. Young investigator challenge: microRNA-21/MicroRNA-126 profiling as a novel tool for the diagnosis of malignant mesothelioma in pleural effusion cytology. *Cancer Cytopathol* 2016; 124: 28–37.
15. Fiore D, Donnarumma E, Roscigno G, et al. miR-340 predicts glioblastoma survival and modulates key cancer hallmarks through down-regulation of NRAS. *Oncotarget* 2016; 7: 19531–19547.
16. Bacci M, Giannoni E, Fearn A, et al. miR-155 drives metabolic reprogramming of ER+ breast cancer cells following long-term estrogen deprivation and predicts clinical response to aromatase inhibitors. *Cancer Res* 2016; 76: 1615–1626.
17. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1516–1521.
18. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008; 15: 261–271.
19. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. MiR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 2008; 15: 272–284.
20. Parker LH, Schmidt M, Jin SW, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature* 2004; 428: 754–758.
21. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126. *Development* 2008; 135: 3989–3993.
22. Guo C, Sah JF, Beard L, et al. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signalling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 939–946.
23. Li JJ, Yang XM, Wang SH, et al. Prognostic role of epidermal growth factor-like domain 7 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2011; 125: 1152–1157.
24. Meister J and Schmidt MH. MiR-126 and miR-126\*: new players in cancer. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 2090–2100.
25. Schepeler T, Holm A, Halvey P, et al. Attenuation of the beta-catenin/TCF4 complex in colorectal cancer cells induces several growth-suppressive microRNAs that target cancer promoting genes. *Oncogene* 2012; 31: 2750–2760.
26. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med* 2014; 20: 368–376.
27. Poissonnier L, Villain G, Soncin F, et al. MiR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 436–447.
28. Bottos A, Destro E, Rissone A, et al. The synaptic proteins neuexins and neuroligins are widely expressed in the vascular system and contribute to its functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20782–20787.
29. Rissone A, Foglia E, Sangiorgio L, et al. The synaptic proteins beta-neurexin and neuroligin synergize with extracellular matrix-binding vascular endothelial growth factor during zebrafish vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1563–1572.
30. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumours. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 3: 205–216.
31. Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 173.
32. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004; 26: 509–515.
33. Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245–5250.

34. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.
35. Silver N, Best S, Jiang J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 33.
36. Schemper M and Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials* 1996; 17: 343–346.
37. Garzon R, Calin GA and Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 167–179.
38. Fabian MR, Sonenberg N and Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 351–379.
39. Esquela-Kerscher A and Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259–269.
40. Schepeler T, Reinert JT, Ostefeld MS, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6416–6424.
41. Hansen TF, Soerensen FB, Lindebjerg J, et al. The predictive value of microRNA-126 in relation to first line treatment with capecitabine and oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 83.
42. Hansen TF, Christensen RD, Andersen RF, et al. MicroRNA-126 and epidermal growth factor-like domain 7 – an angiogenic couple of importance in metastatic colorectal cancer. Results from the Nordic ACT trial. *Br J Cancer* 2013; 109: 1243–1251.
43. Boisen MK, Dehlendorff C, Linnemann D, et al. Tissue microRNAs as predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first line capecitabine and oxaliplatin with or without bevacizumab. *PLoS One* 2014; 9: e109430.

LUDVÍK, J., P. DURAS, V. TŘEŠKA, T. MATOUŠKOVÁ, J. BRŮHA, J. FICHTL, D. LYSÁK, J. FERDA a J. BAXA. Portal vein embolization with contralateral application of stem cells facilitates increase of future liver remnant volume in patients with liver metastases. *Cardiovascular and Interventional Radiology*. 2017, **40**(5), 690-696. DOI: 10.1007/s00270-017-1566-8. ISSN 0174-1551. IF 2,191



# Portal Vein Embolization with Contralateral Application of Stem Cells Facilitates Increase of Future Liver Remnant Volume in Patients with Liver Metastases

Jaroslav Ludvík<sup>1,4</sup> · Petr Duras<sup>1</sup> · Vladislav Třeška<sup>2</sup> · Táňa Matoušková<sup>1</sup> · Jan Brůha<sup>2</sup> · Jakub Fichtl<sup>2</sup> · Daniel Lysák<sup>3</sup> · Jiří Ferda<sup>1</sup> · Jan Baxa<sup>1</sup>

Received: 3 July 2016 / Accepted: 2 January 2017 / Published online: 13 January 2017

© Springer Science+Business Media New York and the Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe (CIRSE) 2017

## Abstract

**Objectives** This study aimed to evaluate the progress of future liver remnant volume (FLRV) in patients with liver metastases after portal vein embolization (PVE) with the application of hematopoietic stem cells (HSCs) and compare it with a patients control group after PVE only.

**Methods** Twenty patients (group 1) underwent PVE with contralateral HSC application. Subsequently, CT volumetry with the determination of FLRV was performed at weekly intervals, in total three weeks. A sample of twenty patients (group 2) who underwent PVE without HSC application was used as a control group.

**Results** The mean of FLRV increased by 173.2 mL during three weeks after the PVE/HSC procedure, whereas by 98.9 mL after PVE only ( $p = 0.015$ ). Furthermore, the mean daily growth of FLRV by 7.6 mL in group 1 was significantly higher in comparison with 4.1 mL in group 2 ( $p = 0.007$ ).

**Conclusions** PVE with the application of HSC significantly facilitates growth of FLRV in comparison with PVE only. This method could be one of the new suitable approaches to increase the resectability of liver tumours.

**Keywords** Future liver remnant volume · Portal vein embolization · Hematopoietic stem cells · CT liver volumetry · Liver resection

## Introduction

At present, several options are available for the treatment of liver metastases. Surgical treatment involving radical resection of the affected part of the liver is still virtually the only procedure with potentially curative effects [1, 2]. Unfortunately, liver metastases cannot be removed by primary surgery in about 70–80% of patients [3]. The main cause of non-resectability of hepatic metastases is insufficient future liver remnant volume (FLRV), i.e. the expected liver residue after the resection. For nearly three decades, PVE has been a widely used technique, one that causes a compensatory enlargement of the contralateral liver lobe [4, 5]. In our experience, however, up to one-third of patients after PVE fail to achieve a sufficient increase in FLRV over an acceptable time period to permit radical surgery [6]. For this reason, there is a need to explore new ways for more progressive increase of FLRV before the resection. Based on several previous laboratory and clinical studies, the use of autologous hematopoietic stem cells (HSCs) may support the effect of PVE on the growth of the liver tissue [7–9]. At present, stem cells are being tested in various medical fields in more or less successful tissue regeneration experiments. The support of liver regeneration might be a promising indication.

✉ Jaroslav Ludvík  
ludvikj@fnplzen.cz

<sup>1</sup> Department of Imaging Methods, University Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Surgery, University Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Haemato-Oncology, University Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup> alej Svobody 80, 30460 Plzeň, Czech Republic

## Materials and Methods

### Study Design and Patient Selection

A prospectively conducted study was performed in 2009–2015 and included patients with primarily unresectable liver metastases of colorectal cancer (CRC), who were referred for PVE. Based on our previous experience with liver resections, we considered insufficient FLRV if <30% of the total liver size in the healthy liver tissue and FLRV <40% of the total liver size in patients with liver parenchyma damaged by previous chemotherapy or molecularly targeted therapy. In addition to FLRV, liver function was also evaluated by both laboratory and indocyanine green retention tests. Patients were randomly selected for PVE with HSC application (group 1) or standard PVE without HSC application (group 2). A baseline CT volumetry of the liver was performed on average 26 days before the procedure. Next, CT examinations of the liver were obtained during a period of three weeks after PVE with HSC application. The mean interval between the PVE/HSC application and the last follow-up CT was 23 days. With sufficient growth in FLRV, a right-sided hepatectomy or extended right-sided hepatectomy is indicated in patients.

Sixteen patients from group 1 (PVE with HSC) and 14 patients from group 2 were administered by systemic chemotherapy before the procedure. Systemic adjuvant chemotherapy with targeted therapy by FOLFOX 6 + bevacizumab was given after PVE (or PVE with HSC) and liver surgery. The symptomatic therapy was used in extensive metastatic involvement.

The study was approved by the local ethics committee. Each patient was informed in detail about the proposed therapeutic procedure and about the potential risks of the procedure, in particular in terms of the risk of cancer progression. All patients participating in the study signed the informed consent form.

### PVE and Stem Cell Application

Based on the literature and our previous experiments, we used the administration of HSC after contralateral PVE in an attempt to support the growth in patients with insufficient FLRV as part of staged procedures on the liver [6, 7].

The first step was portal vein embolization of the right liver lobe by the transhepatic way, using a mixture of Histoacryl (Braun, Melsungen AG, Germany) and Lipiodol (Cedex, Liege, France) at a 1:10 ratio (Fig. 1A, B). Stem cells expressing surface receptors CD133+ and CD34+ were obtained from peripheral blood after the administration of G-CSF (filgrastim, Neupogen, Amgen Europe BV,

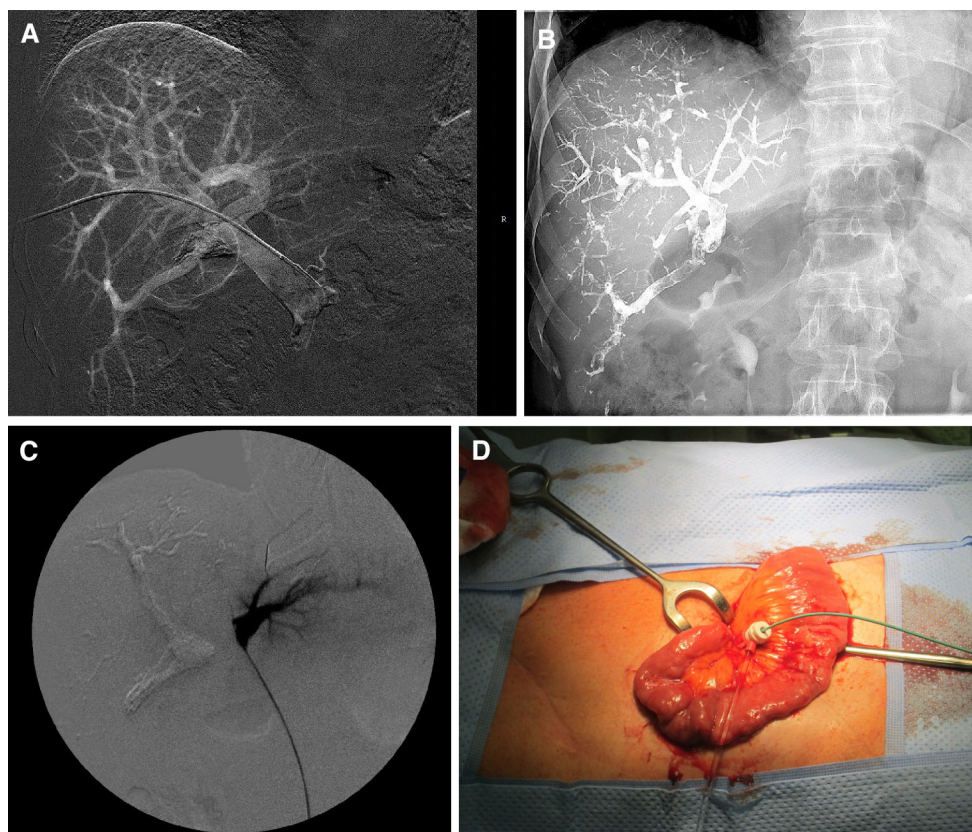
Breda, the Netherlands), which was administered subcutaneously in a dose of 10 µg/kg/day for five days prior to apheresis. On the day before the administration of HSC, leukapheresis was performed through a dialysis catheter in the femoral vein. In the cell therapy laboratory, a product with the following pre-set parameters was prepared: sterility, volume, total leucocyte count, platelet count and RBC count, and in particular, the number and viability of the CD133+ CD34+ cells. The minimum allowable number of CD34+ cells in 200 mL of the product is  $10^7$ . The product should be stored in the refrigerator at 2–8 °C one day before administration. The second option for HSC acquisition was the direct collection of about 300 mL of bone marrow from the hip bones, followed by processing in a centrifuge (Legend XT, Thermo Scientific, USA) directly in the operating room. This option of HSC acquisition is less time-consuming because the collection and the administration of HSC can be performed during the same operation and general anaesthesia. In one or two days after PVE, HSCs were administered through an endovascular catheter into the left branch of the portal vein using an open access through the ileocolic vein in the right hypogastrium (Fig. 1C, D).

### CT Examination and FLRV Calculation

The baseline CT scan to determine the total volume of the liver and the FLRV value was performed prior to PVE. The prediction of FLRV and an accurate position of the virtual resection line were created in collaboration with surgeons before measuring the baseline CT. The virtual resection line was managed in healthy liver parenchyma out of tumour margin. Over three weeks after the PVE/HSC procedure, changes in FLRV, in total liver volume and in the size and number of tumour foci, were monitored at weekly intervals using CT volumetry with manual segmentation (Syngo Volume, Siemens, Erlangen, Germany). All measurements were taken by one board-certified radiologist in a blinded fashion. Control analysis was also performed blindly by one board-certified radiologist. The inter-rater agreement was analysed in the MedCalc statistical software (version 12.7.8).

### Statistical Evaluation

The IBM SPSS statistical software (version 22.0) was used for the statistical evaluation of the results. Methods of descriptive statistics (means with standard deviation), the nonparametric Mann–Whitney test, were used for the description of the study population. A *p* value of  $\leq 0.05$  was chosen to assess the statistical significance.



**Fig. 1** Transhepatic PVE (portal vein embolization) to the right liver lobe (A, B) with subsequent contralateral portal catheterization via ileocolic vein by open access in right hypogastrium and the

application of hematopoietic stem cells (HSCs) to the non-embolized left liver lobe (C, D)

## Results

A total of 20 patients were included in group 1 (17 men, 3 women, mean age 62.9 years, age range 50–75 years). The control group (group 2) consisted of 20 patients, who underwent PVE without stem cell administration using the same indication criteria as in the first group. The baseline characteristics are presented in Table 1, and no significant difference in the most important values of liver function was proved. Indocyanine green retention test also did not show any unsatisfactory liver condition in all the patients.

FLRV grew up mean by  $173.2 \pm 102.1$  mL in group 1 three to four weeks after PVE + HSC administration, whereas by  $98.9 \pm 77.6$  mL during the same period after PVE only in group 2 (15 men, 5 women, mean age 63.5 years, age range 37–79 years) (Fig. 2). The mean daily growth of FLRV was  $7.6 \pm 4.4$  mL in group 1 and  $4.1 \pm 3.5$  mL in group 2. There are statistically significant differences between these two groups in total and also in daily growth of FLRV ( $p = 0.015$  and  $p = 0.007$ , respectively). Table 2 summarizes results for both groups—initial and final FLRV after three weeks and mean daily and total growth of FLRV.

A statistically significant higher growth of total FLRV was found in a subset of patients in group 1 with HSC from peripheral blood ( $226.7 \pm 105.7$  mL,  $n = 10$ ) compared to a subset of patients with HSC from bone marrow ( $119.7 \pm 67$  mL,  $n = 10$ ) ( $p = 0.009$ ) (Fig. 3).

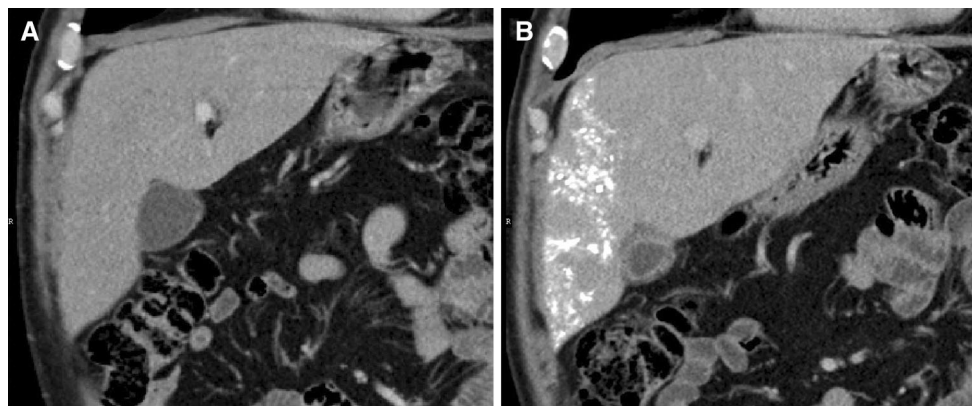
There was a significant increase of the total volume of liver metastases in the majority of patients in both groups ( $n = 18$  (90%) in group 1,  $n = 15$  (75%) in group 2) during the monitored period, an increase by mean  $41.5 \pm 82.8$  mL in group 1 as compared with  $62.5 \pm 75.3$  mL. However, no significant differences have been proven between the groups neither in total ( $p = 0.588$ ) nor in daily ( $p = 0.550$ ) growth of liver metastases (Fig. 4).

The weighted kappa of inter-rater agreement was 0.921—that is the highest level of the concordance strength.

No serious complications appeared after PVE with HSC administration or after PVE only. All patients in group 1 had sufficient FLRV and were allowed to undergo the liver resection; however, only exploration was possible in three cases—once due to very fragile liver parenchyma with the danger of exsanguination and considerable volume

**Table 1** Baseline characteristics

Variables	Group 1 (PVE + HSC) <i>n</i> = 20	Group 2 (PVE only) <i>n</i> = 20	<i>p</i> value
Female, <i>n</i> (%)	3 (15)	5 (25)	
Male, <i>n</i> (%)	17 (85)	15 (75)	
Age, years, median (range)	65.3 (50–75)	64.1 (37–79)	0.843
Total blood protein, mean, g/L (range)	74.5 (71–78)	70.02 (56.1–81.4)	0.579
Albumin, mean, g/L (range)	41.5 (36–47)	45.5 (45–46)	0.297
Total blood bilirubin, mean, mmol/L (range)	10.8 (6–20)	10.75 (5–17)	0.966
INR, mean (range)	1.12 (0.9–1.3)	1.11 (1–1.4)	0.712
Volume of liver metastasis, mL (range)	66.4 (3–465)	153.6 (7–652)	0.054
Localization of primary tumour (colorectal cancer)	9× colon sigmoideum 5× rectum 2× colon caecum 2× colon transversum 1× colon ascendens 1× colon descendens	10× colon sigmoideum 3× rectum 2× colon caecum 2× colon transversum 2× colon ascendens 2× hepatal flexure	



**Fig. 2** Two examples of the left liver lobe growth three weeks after the PVE/HSC procedure. Coronal plane, CT examination of the liver before the procedure (A); coronal plane, CT examination of the liver 3 weeks after the procedure (B)

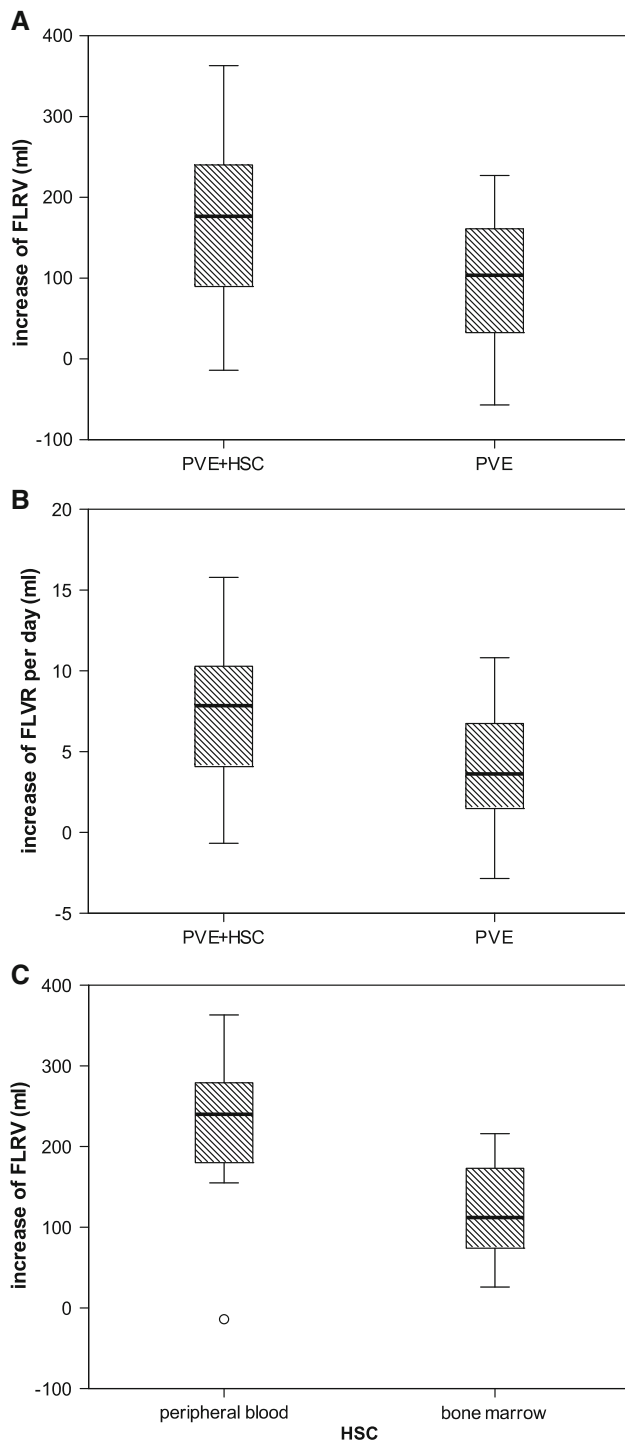
**Table 2** Results of FLRV (future liver remnant volume) evaluation

	Group I (PVE + HSC)	Group II (PVE)	<i>p</i> values
Initial FLRV (mL)	509 ± 149.6	510.2 ± 199.8	0.841
Initial FLRV (%)	30.9 ± 7	27.3 ± 7	–
Final FLRV (mL)	682.2 ± 139.3	609.1 ± 198.9	0.201
Final FLRV (%)	41.1 ± 5.6	35.5 ± 10.3	–
Daily growth of FLRV (mL)	7.6 ± 4.4	4.1 ± 3.5	0.007
Total growth of FLRV (mL)	173.2 ± 102.1	98.9 ± 77.6	0.015

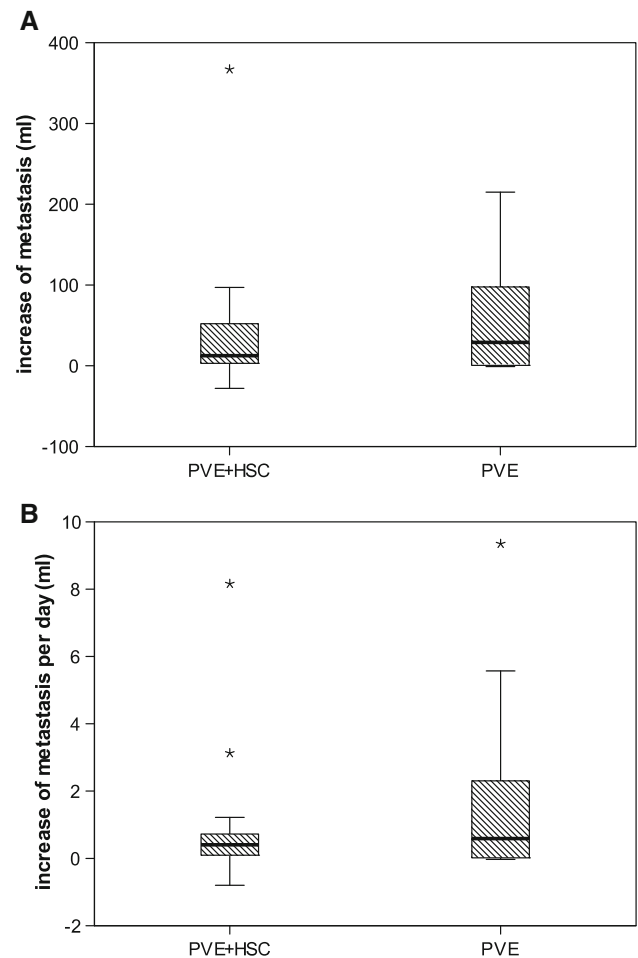
The summary of mean values of the significant data with standard deviations in both groups  
*PVE* portal vein embolization, *HSC* hematopoietic stem cells

increase of liver metastases in two cases. The other patients underwent a right-sided (RH, *N* = 11) or extended right-sided (ERH, *N* = 6) hepatectomy. Two patients from group 2 were not allowed to undergo the liver resection

because of insufficient FLRV, and exploration only was performed in seven patients for extensive progression of liver metastases. The other patients from this group underwent 5× RH and 6× ERH.



**Fig. 3** Boxplots demonstrating a significantly higher mean total ( $p = 0.015$ ) (A) and daily ( $p = 0.007$ ) (B) increase of FLRV (future liver remnant volume) in group 1 (PVE/HSC) compared to group 2 (PVE). Boxplot showing a statistically significant higher increase of total FLRV in a subset of patients in group 1 with HSC from peripheral blood compared to a subset of patients with HSC from bone marrow ( $p = 0.009$ ) (C)



**Fig. 4** There was a conspicuous increase of the total volume of liver metastases in the vast majority of patients in both groups during the monitored period. However, no significant differences have been proven between the studied groups neither in total ( $p = 0.588$ ) (A) nor in daily increase ( $0.550$ ) (B)

## Discussion

### Cellular Background of Liver Regeneration

Liver regeneration and growth are stimulated following a liver injury as well as surgical interventions on the liver. Multiple mechanisms are involved in this process. Proliferation of hepatocytes following a liver insult (e.g. partial hepatectomy) is conditional on the interactions between many cellular receptors [10, 11]. The regenerative potential of the liver tissue could be impaired by various agents, such as chemotherapy. The main cause of reduced replicative activity of hepatocytes in these circumstances is a “replicative senescence” [12]. If liver regeneration through mature hepatocytes is impaired, oval cells become



increasingly important [10]. These are bipotential stem cells that can develop into both hepatocytes and cholangiocytes. They are activated due to the action of a wide range of cytokines and growth factors [13]. At present, discussed issues include not only the role of oval cells in liver regeneration, but also their importance in stimulating carcinogenesis in primary and secondary liver malignancies [14].

### HSC in Liver Regeneration

So far, little is known about the effects of hematopoietic stem cell transplants in the regeneration of altered liver tissue. These cells show differentiation plasticity, enabling the development into various cell types in the body. To date, there has been little general consensus on the question of the mutual relationships between hepatocytes, oval cells and HSC. It is certain that they interact with a great number of cytokines and growth factors. HSCs likely have an effect on liver regeneration by supporting generation and activation of oval cells, from which hepatocytes themselves are subsequently formed [10, 15]. A question that remains unclear is the mechanism of transformation of multipotent stem cells into mature hepatocytes. There may be either a transdifferentiation, which transforms stem cells in a suitable microenvironment to a completely different tissue cell line. Another alternative is the mechanism of transformation via cell fusion, in which combining a “normal” HSC and hepatocytes should result in the formation of a functional polynuclear hepatocyte.

In the past, several experimental studies on animal models have examined with varying success of the effects of stem cell transplantation to regenerate damaged liver tissue. In his work, Jang et al. [16] show a rapid improvement of liver function and reduced fibrosis in acute liver failure in rats after the administration of HSC into the liver via portal circulation. Conversely, some other works are not as optimistic. Cantz et al. [17] demonstrated little or no effect of intrasplenic bone marrow transplants using G-CSF-mobilized HSC on the regeneration of the liver damaged by CC14. Equally discouraging results were achieved in the work of Kanazawa and Verma [18]. Previous experimental studies demonstrated the good effect of multipotent mesenchymal cell administration into the portal vein of the opposite liver lobe after previous ligation of the right-sided branches of the portal vein [7].

Despite some contradictory results in preclinical experiments, a substantial number of variously modified clinical trials were conducted in which BMSCs (bone marrow stem cells) were administered via the portal and systemic venous system or via the hepatic artery in patients with liver cirrhosis [19–21]. The results of this work have

provided promising conclusions about the effects of stem cells, but have also raised a number of questions.

A similar procedure to our study was also used with encouraging results by Esch et al. [8] and Canepa et al. [9]. Both studies characterized by a small number of respondents show a significantly greater daily gain and an overall increase in FLRV in the group of patients after PVE and HSC compared to the control PVE group. In some sub-steps, the procedure used by these authors differed from our method. In contrast to our study, HSCs were obtained only by the direct collection of bone marrow from the bone [8]. However, the results of their work do not differ greatly from those of our studies that show a significantly greater daily and overall increase in FLRV in the group of patients after PVE and HSC compared to the control PVE group.

For reasons that are unclear, within patients who received stem cells we found a significantly greater increase in FLRV in the subgroup that received HSCs contained in the product separated from peripheral blood. It could be induced by a hitherto unknown factor or obscure specific properties of HSC from peripheral blood. Another unclear question is the relationship of the administered stem cells to the progression of tumour growth. An increase in the total volume of metastases after PVE with contralateral administration of HSC was found in nearly all patients. However, the progression of metastases was not statistically significant compared to the control group of patients after PVE who received no HSC. Tumour progression is more likely caused by arterial buffer response, a phenomenon often occurring after PVE, which was performed in both groups of patients. This is an increase in arterial blood flow in the liver after partial closure of the portal vasculature.

We did not notice any serious side effects—only temporary concerns after the administration of HSC or PVE. In group 1 there was one patient with temporary hypokalemia, one with temporary paresis of the right upper limb and two patients with inflammatory complications, such as pneumonia and catheter infection, that required antibiotic therapy. In group 2 there was temporary elevation of liver markers in the blood in two patients and one patient vomited after the procedure.

### Alternative Ways for FLRV Growth

At present, administration of stem cells is not the only way to support liver regeneration for increasing the resectability of liver tumours. In 2012, the first experience with APPLS (associated partition liver and portal vein ligation for staged hepatectomy) was published [22]. During this method, ligation of the right branch of the portal vein and in situ splitting of the anatomical left lobe and right side of the liver are performed in the first stage. Within seven to ten days, a

sharp increase in FLRV will occur, permitting an extended right-sided hepatectomy. This method has its supporters and persistent opponents, who point especially to the high morbidity and mortality of this procedure [23]. Only after gaining sufficient experience with these innovative techniques will it be possible to determine whether and to what extent these techniques will be applicable in routine clinical practice and what will be the use of stem cells.

### Limitations

Several limiting factors also occurred in our work. The most important of these factors are various time intervals between baseline CT and PVE in the two groups. The average time period (26 days) was the same in the both groups. In an extreme case, the interval of the baseline CT and subsequent PVE was 134 days in the control group and 75 days in the HSC group. This may affect the calculations of the daily and total volume of metastases. Other limitations are the relatively small number of patients in the group and the relatively short duration of the study.

### Conclusions

It can be concluded that the combination of PVE and contralateral administration of hematopoietic stem cells facilitate an increase of FLRV compared to the control group of patients who only underwent PVE. CT volumetry plays a key role in the verification of volume changes. This method has the potential to become a future commonly used approach for increasing the resectability of primarily inoperable liver tumours.

**Acknowledgements** This research was supported by the Charles University Research Fund (Project Number P36) and by the Ministry of Health, Czech Republic—the project of conceptual development of research organization (Faculty Hospital in Pilsen—FNPI, 00669806).

### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

1. Laporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg.* 2006;93:465–74.
2. Akgül Ö, Çetinkaya E, Ersöz Ş, Tez M. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World J Gastroenterol.* 2014;20:6113–22.
3. Adam R, Wicherts DA, de Haas RJ, Ciaccio O, Lévi F, et al. Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J Clin Oncol.* 2009;27:1829–35.

4. Azoulay D, Castaing D, Smail A, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg.* 2000;231:480–6.
5. Liu H, Zhu S. Present status and future perspectives of preoperative portal vein embolization. *Am J Surg.* 2009;197:686–90.
6. Treska V, Skalicky T, Sutnar A, et al. Prognostic importance of some clinical and therapeutic factors for the effect of portal vein embolization in patients with primarily inoperable colorectal liver metastases. *AMS.* 2013;9(1):47–54.
7. Liska V, Slowik P, Eggenhofer E, Treska V, Renner P, Popp FC, et al. Intraportal injection of porcine multipotent mesenchymal stromal cells augments liver regeneration after portal vein embolization. *In Vivo.* 2009;23:229–35.
8. Esch JS, Schmelzle M, Fürst G, Robson SC, Krieg A, Duhme C, et al. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann Surg.* 2012;11:79–85.
9. Canepa MC, Quaretti P, Perotti C, Vercelli A, Rademacher J, Peloso A, et al. Autologous CD133+ cells augment the effect of portal embolization. *Minerva Chir.* 2013;68(2):163–8.
10. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* 2004;39:1477–87.
11. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Pathol.* 2010;176(1):2–13.
12. Paradis V, Youssef N, Dargere D, Ba N, Bonvoust F, Deschattrette J, et al. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C and hepatocellular carcinomas: management of patients with low-replicative HBeAg-negative chronic hepatitis B and normal liver enzymes. *Hum Pathol.* 2001;32(3):129–34.
13. Best J, Manka P, Syn W-K, Dollé L, van Grunsven LA, Canbay A. Role of liver progenitors in liver regeneration. *Hepatob Surg Nutr.* 2015;4(1):48–58.
14. Sell S, Leffert HL. Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2800–5.
15. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2012;57(3):692–4.
16. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol.* 2004;6:532–9.
17. Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP, et al. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant.* 2004;13:659–66.
18. Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(1):11850–3.
19. Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, Helmy S, Jiao LR, Levicar N, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1952–8.
20. Esrefoglu M. Role of stem cells in repair of liver injury: experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol.* 2013;19(40):6757–73.
21. Saito T, Tomita K, Haga H, Okumoto K, Ueno Y. Bone marrow cell-based regenerative therapy for liver cirrhosis. *World J Methodol.* 2013;3(4):65–9.
22. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg.* 2012;255(3):405–14.
23. Bertens KA, Hawel J, Lung K, Suzana Buac S, Pineda-Solis K, Hernandez-Alejandro R. ALPPS: challenging the concept of unresectability—a systematic review. *Int J Surg.* 2015;13:280–7.

KŘÍŽOVÁ, V., M. DUBOVÁ, S. SUSOVÁ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, M. SKALA, V. LIŠKA, O. DAUM a P. SOUČEK. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **78**(3), 595-603. DOI: 10.1007/s00280-016-3114-7. ISSN 0344-5704. IF 2,824.



# Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients

V. Krizkova<sup>1</sup> · M. Dubova<sup>2</sup> · S. Susova<sup>3</sup> · O. Vycital<sup>3,4</sup> · J. Bruha<sup>3,4</sup> · M. Skala<sup>3,4</sup> · V. Liska<sup>3,4</sup> · O. Daum<sup>2</sup> · P. Soucek<sup>3</sup>

Received: 31 March 2016 / Accepted: 22 July 2016 / Published online: 28 July 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

## Abstract

**Purpose** This study investigated the prognostic importance of protein expression of ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCC10 and ABCC11 in colorectal cancer.

**Methods** Protein content of ABCC10 and ABCC11 was assessed in tumor tissue blocks of 140 colorectal cancer patients and associated with survival of patients with regard to 5-fluorouracil-based therapy.

**Results** Low ABCC10 protein content in tumors increased hazard ratio of patient's death more than three times in comparison with high ABCC10-expressing tumors ( $P = 0.004$ ). In contrast, the low ABCC11 content increased the hazard ratio of cancer recurrence in patients almost four times ( $P = 0.016$ ). Analysis of patients treated with regimens based on 5-fluorouracil revealed that patients with low ABCC11 content in their tumors had shorter disease-free interval than those with higher content ( $P = 0.024$ ).

**Conclusions** The present study shows for the first time that the protein expression of ABCC10 significantly associates with overall survival and the expression of ABCC11 with disease-free interval of colorectal cancer patients and provides strong impulse for further validation of their prognostic value in colorectal cancer.

**Keywords** Colorectal cancer · Immunohistochemistry · Protein · Prognosis

## Introduction

Colorectal cancer (C18-21, OMIM: 114500) is the third most often diagnosed malignancy and the fourth leading cause of death in the adult population globally, with one of the highest incidence recorded in Central Europe [1].

There are many obstacles to the treatment of this serious disease. One of the most important causes is the resistance of tumor cells to chemotherapy modulated, among other reasons, also by overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters [2].

The family of human ABC transporters comprises 48 proteins divided into seven subfamilies (ABCA to G) and transports a variety of physiological substrates and xenobiotics including anticancer drugs [3]. ABCB1/p-glycoprotein (OMIM: 171050) [4], ABCC1/multidrug resistance protein 1 (OMIM: 158343) [5], and ABCG2 (OMIM: 603756) [6] are the most studied mediators of resistance to anticancer drugs from this family. These transporters perform efflux of anticancer drugs from cancer cells across the membrane into the extracellular space, and thus they reduce the cytotoxic effect and confer drug resistance [3].

Current knowledge suggests that other ABC transporters are important for cancer biology (colorectal cancer [7];

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00280-016-3114-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ P. Soucek  
pavel.soucek@lfp.cuni.cz

<sup>1</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Pathology, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

<sup>3</sup> Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Surgery, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

pancreatic cancer [8]; breast cancer [9]). Except drug transport, physiological roles, e.g., transport of cholesterol, fatty acids, and hormones, contribute to the mechanism of action of these transporters in cancer development and progression. Currently, the role of such transporters in tumorigenesis and tumor cell response to anticancer treatment needs precise elucidation with potential implication for the design of effective targeted therapies.

In the previous small-scale pilot study, we have found that intratumoral transcript levels of ABCC11 (OMIM: 607040) significantly associated with the response of colorectal cancer patients to palliative chemotherapy and with a disease-free interval (DFI) of patients treated by adjuvant chemotherapy [7]. Moreover, ABCC10 (OMIM: 612509) expression also associated with the grade of colorectal tumors.

The main goal of the present study was to validate on the protein level the previously suggested putative prognostic role of both ABC transporters for colorectal cancer patients. Thus, we determined the protein content of these markers in a larger cohort of colorectal cancer patients and compared it with the patient's DFI and overall survival (OS). The observed associations suggest the need for further functional studies on revealing the mechanism of action of these new targets.

## Materials and methods

### Patients

In total, archival formalin-fixed, paraffin-embedded samples from 140 patients with histologically confirmed diagnosis of colorectal carcinoma were retrospectively included in the study and clinical follow-up. All patients underwent surgery and oncological treatment at the Department of Surgery and Oncology, Faculty Hospital in Pilsen, between the years 2008 and 2011.

The following data on patients were retrieved from medical records: age, sex, date of diagnosis, date of surgery, tumor size, lymph node metastasis, clinical stage, histological type and grade, treatment regimen, and survival. Clinical characteristics of patients are described in Table 1. In patients treated with adjuvant therapy after radical surgical resection R0, the DFI served as a measure of the treatment outcome. Therefore, for the DFI analysis, just patients without distant metastases, i.e., those with complete tumor removal during surgery entered the analysis. The DFI was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection and disease recurrence or death. The OS was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection or start of palliative therapy and death from any cause.

**Table 1** Clinical data of CRC patients included in this study

Characteristics	N = 140
Age (median ± SD)	67 ± 10
Gender	
Female	42
Male	98
UICC stage	
Stage 2	82
Stage 3	32
Stage 4	26
Tumor size	
pT2	6
pT3	116
pT4	18
Lymph node metastasis	
pN0	86
pN1	33
pN2	19
Not available	2
Distant metastasis	
cM0	114
cM1	26
Grade	
G1	21
G2	101
G3	16
Not available	2
Localization	
Colon	74
Rectosigmoideum	25
Rectum	41
Chemotherapy based on 5-fluorouracil	
Yes	76
No	64

The study protocol was approved by the Ethical Commission of the Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Pilsen, Czech Republic.

### Immunochemical staining

Tissue for light microscopy was fixed in 4 % formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five-micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin. The immunohistochemical study was performed using Ventana Benchmark XT automated staining system (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ) with the following primary antibodies: ABCC10 (M7I-3, 1:10, Abcam, Cambridge, UK) and ABCC11 (M8I-74, 1:10, Abcam, Cambridge,

UK). Heat-induced epitope retrieval was performed, and buffer Dako Target Retrieval Solution pH 9.0 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) was used. Appropriate positive and negative control slides were employed. Quantitative estimates were done using stereological methods and the Ellipse software (ViDiTo, Košice, Slovakia) as previously established and described [10]. The detailed description of sampling of histological sections and microscopic image fields for the estimation of quantitative parameters (ABCC10 and ABCC11) of each tumor specimen ( $n = 140$ ) in comparison with matched adjacent non-tumor tissues in subset of patients ( $n = 30$ ) is presented in Supplementary Table S1.

### Data analysis

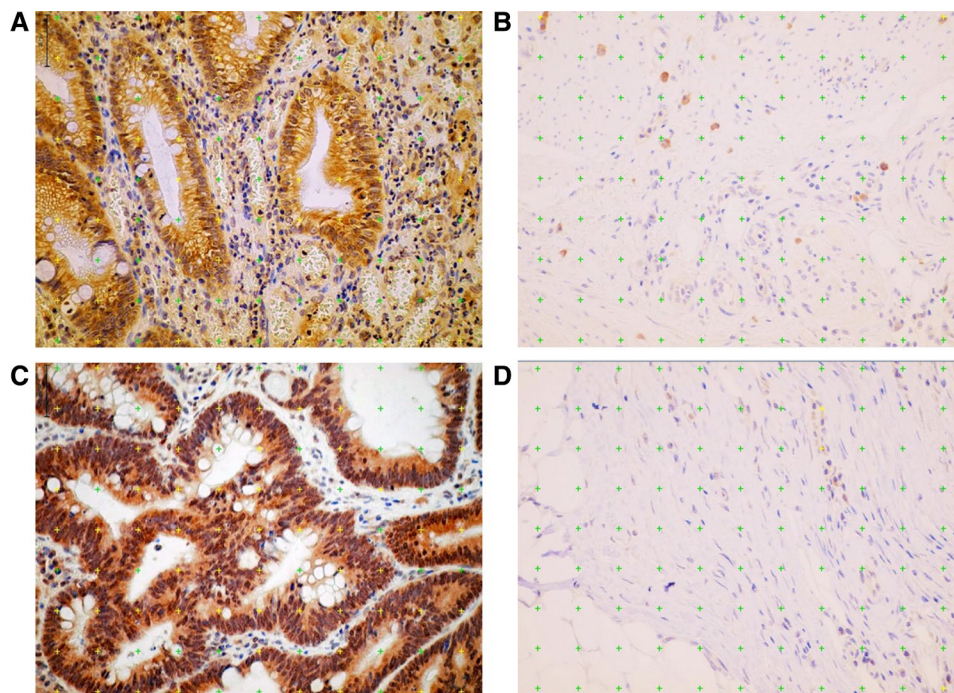
All statistical analyses were performed using SPSS version 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences in protein content between groups of patients stratified by clinical data were assessed by the ANOVA and the Pearson tests. Receiver operator curve (ROC) analysis was performed for evaluation of the power of ABCC10 and

ABCC11 to discriminate the patients with different clinical features. For DFI analysis, protein content was divided by median and by the cutoff calculated using ROC analysis by the help of Cutoff Finder version 2.1 [11]. DFI was evaluated by the Kaplan–Meier method with the log-rank test used for comparison of subgroups of patients. Stage- and chemotherapy-adjusted analysis was performed by the Cox regression. All  $P$  values were calculated from two-sided tests.  $P$  values lower than 0.05 were considered statistically significant.

### Results

Protein content (resp. area per area, dimensionless ratio) of ABCC10 and ABCC11 was assessed in formalin-fixed paraffin-embedded sections of 140 colorectal cancer patients (clinical data in Table 1). The representative results of the protein content assessment of both proteins in the analyzed samples are on Fig. 1.

The percentage of protein content in tumor components was  $35.5 \pm 10.6$  % for ABCC10 and  $36.7 \pm 11.4$  % for



**Fig. 1** Quantitative histopathology—immunohistochemistry of the ABCC transporters. The area fraction  $A_A$  of the ABCC10 and ABCC11 (separately) detected components was estimated by the method based on counting intersections of ABCC10 and ABCC11. Positive structures with stereological grids randomly superposed on the micrographs, counting points hitting the *highlighted* profiles are demonstrated as *yellow* crosses (non-hitting points *green* crosses). Points hitting the mentioned positive profiles (*yellow*) were counted. Their sum was then

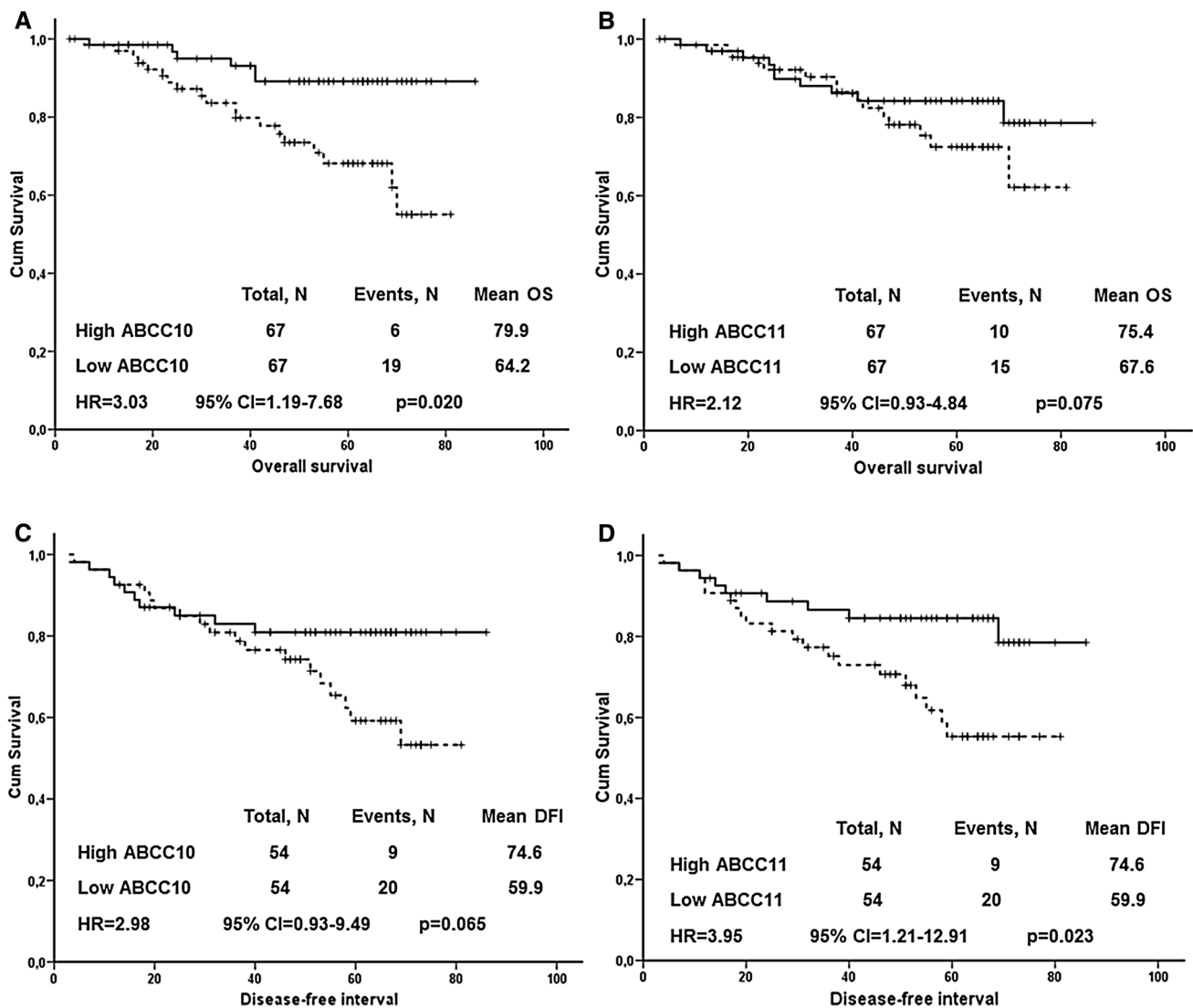
multiplied by the area corresponding to each point. The reference area (total area sampled in each specimen) was determined in the same way. The relation between the area of ABCC positive structures and reference area was calculated. The figure demonstrates counting intersection of ABCC10 positive structures with stereological grid within the intestinal wall in colorectal cancer and its stroma (**a**) and in adjacent non-tumor tissues (**b**) and the same for ABCC11 (**c**—colorectal cancer and its stroma and **d**—adjacent non-tumor tissues). Scale bar 50  $\mu$ m

ABCC11 (mean  $\pm$  S.D., see Supplementary Figure S1 for value distribution). The percentage of protein content in a subset of matched adjacent non-tumor tissues was  $6.4 \pm 2.6$  for ABCC10 and  $6.2 \pm 2.9$  for ABCC11 ( $n = 30$ ). Associations between clinical data and ABCC10 and ABCC11 content have been evaluated: no significant associations of ABCC10 or ABCC11 protein content with gender and age of the patients, tumor size (pT), presence of local (pN) and distant (cM) metastasis, tumor grade, and stage have been observed ( $P > 0.05$ ). Suggestive association between the ABCC11 content and localization of the tumor ( $P = 0.042$ , higher content

in colon or sigma compared with rectum) was found. Such association was not observed for ABCC10 ( $P = 0.229$ ).

For each clinical feature ROC curve analysis was also performed. The area under the curve (AUC) for prediction of poor prognosis factors (pT4, pN1, cM1, grade 3 or rectal tumor localization) together with ROC curves are in Supplementary Figure S2.

We then divided the patients into two groups according to the median of ABCC10 and ABCC11 content in sections for the survival analysis. Six patients lost to follow-up were excluded from the OS analysis. The analysis of the



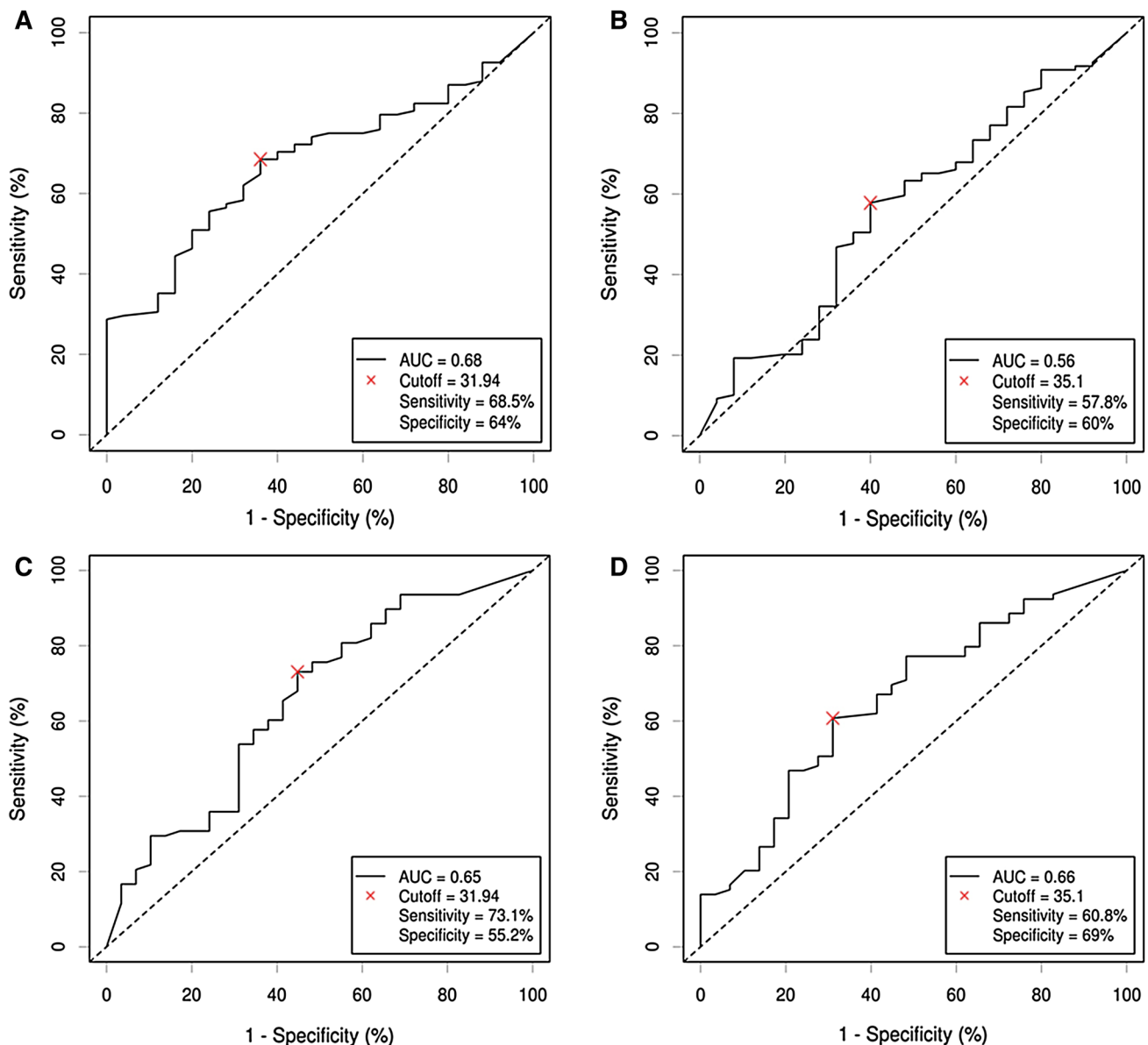
**Fig. 2** Associations between ABCC10 and ABCC11 protein content and the survival of colorectal cancer patients. Kaplan–Meier survival curves were plotted for the OS ( $n = 134$ ) or the DFI ( $n = 108$ ) of patients divided into two groups by the median of the intratumoral protein content of ABCC10 or ABCC11. *Dashed line* represents the group with lower protein content, *solid line* the group with higher protein content than the median. **a** Shows the results of analysis of

ABCC10 versus the OS and plot **b** that for ABCC11. **c** Shows the results of analysis of ABCC10 versus the DFI and plot **d** that for ABCC11. Differences between groups were compared using the log-rank test. *HR* hazard ratio and *95 % CI* 95 % confidence intervals were calculated using the Cox regression adjusted for stage and chemotherapy

whole set ( $n = 134$ ) has shown a significant association of the ABCC10 content with the OS of the patients ( $P = 0.004$ , Fig. 2a). On the other hand, the ABCC11 content did not associate with the OS ( $P = 0.251$ , Fig. 2b). Stage- and chemotherapy-adjusted analysis has confirmed these results (hazard ratios, 95 % confidence intervals, and  $P$  values are presented in the respective figures). Patients with lower than the median protein content of ABCC10 in their tumors had more than three times increased hazard ratio of death compared with high ABCC10-expressing ones ( $P = 0.020$ ). The association of ABCC11 with the OS was suggestive, but nonsignificant ( $P = 0.075$ ). The ABCC10 content did not associate

with the DFI ( $n = 108$ ,  $P = 0.075$ , Fig. 2c). In contrast, the ABCC11 content significantly associated with the DFI of the patients ( $P = 0.016$ , Fig. 2d). The stage- and chemotherapy-adjusted DFI analysis confirmed this trend ( $P = 0.065$  for ABCC10 and  $P = 0.023$  for ABCC11). Patients with lower than the median protein content of ABCC11 in their tumors had almost four times increased hazard ratio of recurrence compared with high ABCC11-expressing ones.

Additionally to the median cutoff method, we applied ROC curve analysis to set optimal cutoff values considering the best sensitivity and specificity of both markers to discriminate prognosis of the patients based on their



**Fig. 3** ROC curves plotted for survival of patients using immunohistochemical protein expression of ABCC10 and ABCC11. ROC curves are plotted for the OS, according to ABCC10 (a) or ABCC11 (b)

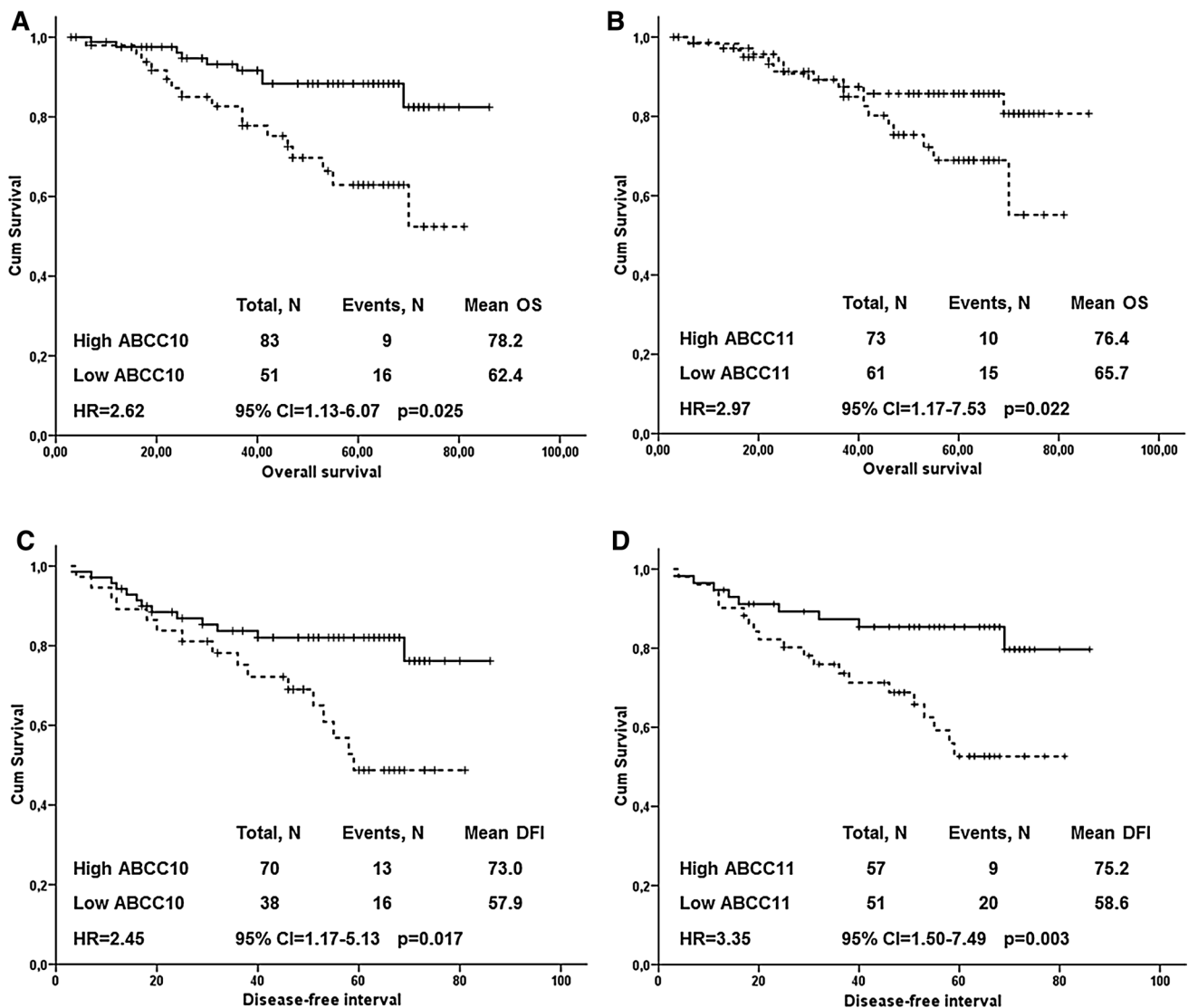
expression and for the DFI according to ABCC10 (c) or ABCC11 (d) expression. *AUC* area under the curve. Crosses indicate the optimal cutoff point used for survival analysis



survival (Fig. 3). The analysis of the whole set has shown a significant association of the ABCC10 content with the OS of the patients (ABCC10,  $P = 0.003$ , Fig. 4a), but a lack of significance for ABCC11 ( $P = 0.072$ , Fig. 4b). In DFI analyses ( $n = 108$ ), both the ABCC10 and ABCC11 content significantly associated with the DFI ( $P = 0.012$ , Fig. 4c for ABCC10 and  $P = 0.005$ , Fig. 4d for ABCC11). The stage- and chemotherapy-adjusted survival analysis confirmed these trends except association of ABCC11 expression with the OS ( $P = 0.022$ , Fig. 4b).

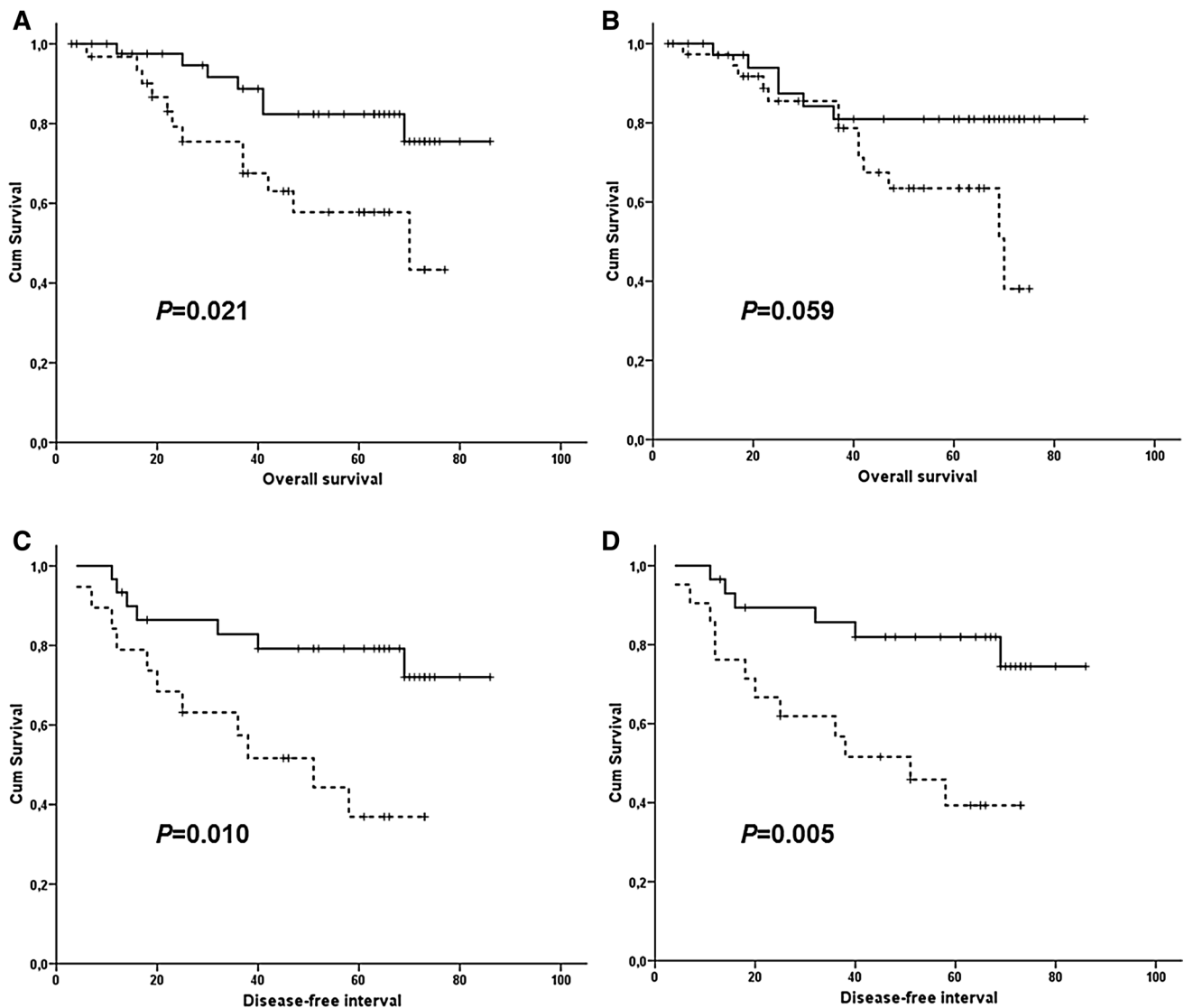
Stratified analyses of patients treated with regimens based on 5-fluorouracil have not revealed significant

associations of ABCC10 or ABCC11 content with the OS ( $n = 78$ ,  $P = 0.106$  and  $P = 0.059$ , respectively) and ABCC10 with the DFI ( $n = 50$ ,  $P = 0.143$ ). However, the association of ABCC11 content with the DFI was significant ( $P = 0.024$ ). Patients with low ABCC11 content had poorer DFI than those with higher content. The ROC analysis (Supplementary Figure S3) suggested, that ABCC10 ( $P = 0.021$ , Fig. 5a), but not ABCC11 expression significantly associate with the OS ( $P = 0.059$ , Fig. 5b). On the other hand, both ABCC10 and ABCC11 content significantly associated with the DFI of 5-fluorouracil-treated patients ( $P = 0.010$  and  $P = 0.005$ , respectively, Fig. 5c, d).



**Fig. 4** Associations between ABCC10 and ABCC11 protein content and the survival of colorectal cancer patients based on ROC analysis. Kaplan–Meier survival curves were plotted for patients divided into two groups by the cutoff showed in Fig. 3. Dashed line represents the group with lower protein content, solid line the group with higher protein content than the cutoff. OS analysis is presented for ABCC10

(a) and ABCC11 (b). DFI analysis is presented for ABCC10 (c) and ABCC11 (d). Differences between groups were compared using the log-rank test. HR hazard ratio and 95 % CI 95 % confidence intervals were calculated using the Cox regression adjusted for stage and chemotherapy



**Fig. 5** Associations between ABCC10 and ABCC11 protein content and the survival of 5-fluorouracil-treated subgroups of colorectal cancer patients based on ROC analysis. Kaplan–Meier survival curves were plotted for the OS ( $n = 76$ ) or DFI ( $n = 50$ ) of patients divided into two groups by the cutoff (ROC analysis in Supplementary Figure S3). *Dashed line* represents the

group with lower protein content, *solid line* the group with higher protein content than the cutoff. OS analysis is presented for ABCC10 (a) and ABCC11 (b). DFI analysis is presented for ABCC10 (c) and ABCC11 (d). Differences between groups were compared using the log-rank test. Adjusted analysis was not performed due to the low numbers of patients in the compared groups

## Discussion

Based on the previously observed associations of transcript levels of two less often studied ABC transporters with clinical factors of colorectal cancer [7], we analyzed the prognostic significance of their protein content in a larger study. Our data clearly show that protein expression of ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients.

The association of low ABCC10 protein content with shorter OS of colorectal cancer patients observed in the present study suggests that the low ABCC10 expression

presents a poor prognosis factor. ABCC10 discovered 15 years ago [12] is upregulated in pancreatic adenocarcinoma and its transcript level is significantly lower in tumors with angiogenesis (i.e., with worse prognosis) compared to those without it [8]. Prognostic power of ABCC10 transcript expression (together with that of ABCB6 and ABCC3) for prostatic cancer progression was recently demonstrated [13]. ABCC10 protein modulates tumor resistance to taxanes, e.g., docetaxel [14], and nucleoside analogs such as gemcitabine [15]. The present study brings discrepant data about the role of 5-fluorouracil-based treatment in the prognostic meaning of ABCC10. ABCC10 protein level

significantly associated with both OS and DFI when evaluated using the cutoff set by ROC analysis, but remained insignificant in analyses by the median expression levels. This controversy could be due to the sample size effect.

ABCC11 expression did not associate with the OS, but with the DFI in analysis based on both ROC cutoff and median levels. ABCC11 (first reported by Bera et al. [16]) is able to efflux nucleoside analogs [17] and confers resistance to 5-fluorouracil in vitro [18]. Immunohistochemically detected protein overexpression of ABCC11 demonstrated in the most aggressive HER2+ and triple-negative tumor subtypes of breast cancer was significantly associated with worse disease-free survival of patients [19]. A novel functional *ABCC11* allele (c.1637C > T; T546M), previously associated with 5-fluorouracil toxicity [20] was recently identified in silico and confirmed in vitro. This alteration is frequent among European and American populations with major allele frequency exceeding 10 % [21]. The present association between ABCC11 protein expression and the DFI of colorectal cancer patients thus brings another interesting evidence for the putative prognostic role of this transporter.

Despite both transporters are known to perform outward transport of nucleoside analogs used for the treatment of colorectal cancer, their associations with survival observed in the present study were not affected by the adjustment to stage and chemotherapy. The DFI of 5-fluorouracil-treated patients was significantly modified by the ABCC11 (and by ABCC10 only in ROC analysis) protein expression. However, the direction of the association had opposite trend, i.e., low expression and presumably lower efflux was found in patients with poor DFI suggesting that this interaction is likely not functional in terms of 5-fluorouracil treatment. The present study is the first one addressing this point in colorectal cancer patients. Although protein expression of both transporters was not predictive for 5-fluorouracil-based treatment here, follow-up studies in larger patient cohorts shall decisively answer this question.

We are aware of some limitations of our study. First, the sample size may be seen as one of the study limitations. Second, we cannot offer precise mechanistic explanation for the observed complex prognostic role of both transporters in colorectal cancer tissue. Third, our quantification used two-dimensional sections only. It is necessary to conduct next studies to confirm present results.

Taken together, our results present the first indication about the prognostic role of ABCC10 and ABCC11 transporters in colorectal cancer that needs further validation and functional analysis.

**Acknowledgments** This work was supported by projects of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, No.: NT14329-3 (to V.L.), the Czech Science Foundation No.: P303/12/G163 (to

P.S.), the National Sustainability Program I (NPU I) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic, no.: LO1503 (to V.L. and P.S.).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108
2. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR Jr et al (2015) The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat* 18:1–17
3. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ et al (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 10:147–156
4. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152–162
5. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH et al (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650–1654
6. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV et al (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15665–15670
7. Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R et al (2012) The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 27:187–196
8. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Oliverius M et al (2013) Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and non-neoplastic tissues. *Pancreas* 42:707–716
9. Hlavac V, Brynychova V, Vaclavikova R et al (2013) The expression profile of ABC transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14:515–529
10. Tonar Z, Witter K, Krizkova V et al (2010) Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. In: Méndez-Vilas A, Díaz J (eds) *Microscopy: science, technology, applications and education. applications in biology and medicine*. Formatex Research Centre, Badajoz, 926–935
11. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV et al (2012) Cutoff finder: a comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS ONE* 7:e51862
12. Hopper E, Belinsky MG, Zeng H et al (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* 162:181–191
13. Karatas OF, Guzel E, Duz MB et al (2016) The role of ATP-binding cassette transporter genes in the progression of prostate cancer. *Prostate* 76:434–444
14. Chen Z-S, Hopper-Borge E, Belinsky MG et al (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 63:351–358
15. Hopper-Borge E, Xu X, Shen T et al (2009) Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res* 69:178–184
16. Bera TK, Lee S, Salvatore G et al (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med* 7:509–516



17. Turriziani O, Schuetz JD, Foher F et al (2002) Impaired 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine accumulation in T-lymphoblastoid cells as a mechanism of acquired resistance independent of multidrug resistant protein 4 with a possible role for ATP-binding cassette C11. *Biochem J* 368:325–332
18. Oguri T, Bessho Y, Achiwa H et al (2007) MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol Cancer Ther* 6:122–127
19. Yamada A, Ishikawa T, Ota I et al (2013) High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 137:773–782
20. Magdy T, Arlanov R, Winter S et al (2013) ABCC11/MRP8 polymorphisms affect 5-fluorouracil-induced severe toxicity and hepatic expression. *Pharmacogenomics* 14:1433–1448
21. Arlanov R, Lang T, Jedlitschky G et al (2016) Functional characterization of common protein variants in the efflux transporter ABCC11 and identification of T546 M as functionally damaging variant. *Pharmacogenomics J* 16:193–201

TŘEŠKA, V., V. LIŠKA, J. FICHTL, D. LYSÁK, H. MÍRKA, J. BRŮHA, P. DURAS, I. TŘEŠKOVÁ, J. NÁHLÍK, V. ŠIMÁNEK, O. TOPOLČAN. Portal vein embolisation with application of haematopoietic stem cells in patients with primarily or non-resectable colorectal liver metastases. *Anticancer Research*. 2014. **34**(12), 7279-85. ISSN 0250-7005. IF 1,826.

# Portal Vein Embolisation with Application of Haematopoietic Stem Cells in Patients with Primarily or Non-resectable Colorectal Liver Metastases

VLADISLAV TRESKA<sup>1</sup>, VACLAV LISKA<sup>1</sup>, JAKUB FICHTL<sup>1</sup>, DANIEL LYSAK<sup>2</sup>, HYNEK MIRKA<sup>3</sup>, JAN BRUHA<sup>1</sup>, PETR DURAS<sup>3</sup>, INKA TRESKOVA<sup>1</sup>, JAKUB NAHLIK<sup>1</sup>, VACLAV SIMANEK<sup>1</sup> and ONDREJ TOPOLCAN<sup>4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Surgery and <sup>2</sup>Hematooncology, <sup>3</sup>Radiodiagnostic Clinic, and

<sup>4</sup>Laboratory of Immunoanalysis, University Hospital, Faculty of Medicine in Pilsen, Pilsen, Czech Republic

**Abstract.** *Background:* Insufficient future liver remnant volume (FLRV) is the main cause of low resectability of liver metastases from colorectal cancer (CLMs). One option for enhancing FLVR growth is the use of portal vein embolisation (PVE) with the application of autologous haematopoietic stem cells (HSCs). *Patients and Methods:* PVE with the application of HSCs was used in 11 patients (group 1) with primarily non-resectable CLMs due to insufficient FLRV without signs of extrahepatic metastases. The control group (group 2) consisted of 14 patients in whom only PVE was performed. We evaluated the product quality, FLRV growth, CLM volume, median survival and progression-free survival (PFS). *Results:* Product quality was achieved in all collections. In all group-1 patients, sufficient FLRV growth occurred within three weeks. In the first and second weeks, FLRV increased optimally in most patients ( $p < 0.006$ ). In 13 out of the 14 group-2 patients, optimum FLVR growth was observed within three weeks following PVE ( $p < 0.002$ ). More rapid FLVR growth was observed in group 1 patients ( $p < 0.01$ ). CLM volume was significantly increased in both the group-2 ( $p < 0.0005$ ) and group-1 ( $p < 0.008$ ) patients at the time of liver resection. There was no significant difference in the growth of the CLM volume between the groups ( $p < 0.18$ ). The median survival was 7.3 and 6.8 months for group 1 and 2 patients, respectively, and the two-year PFS was 28% and 22% ( $p < 0.18$ ), respectively. *Conclusion:* PVE with HSC application is a promising method for effectively stimulating FLRV growth in patients with primarily non-resectable CLMs.

*Correspondence to:* Professor Vladislav Treska, MD, Ph.D., Department of Surgery, University Hospital, Faculty of Medicine, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 37710 4270, Fax: +420 377103965, e-mail: treska@fnplzen.cz

*Key Words:* Colorectal liver metastases, future liver remnant volume, portal vein embolisation, haematopoietic stem cells.

Tissue regeneration using stem cells has become a recent trend in medicine and is currently used as a therapy employed by a wide range of clinical specialties (1, 2). Stem cells acquired from the bone marrow or stimulated peripheral blood are considered an appropriate source of cells for regenerative medicine given their relatively easy availability in sufficient amounts (3).

Colorectal liver metastases (CLMs) are quite frequent in the setting of colon carcinoma. Approximately 25% of patients with colorectal carcinoma have synchronous CLMs at the time of diagnosis, and 60% exhibit metachronous CLMs. CLMs develop over varying periods after surgery for the primary tumor. Multimodal treatment procedures, the basis of which is the surgical resection of CLMs, offer a 5-year survival rate of between 25% and 74%. Nevertheless, only 15-20% of patients have primarily resectable CLMs. The remaining patients have no chance of successful radical resection for various reasons; insufficient future liver remnant volume (FLRV) plays a crucial role in this condition (4, 5).

One of the possibilities for increasing the FLRV volume is portal vein embolisation (PVE). Once the volume of the contralateral liver lobe increases, curative liver resection can be performed. Nevertheless, in some patients, the increase in FLRV is very low and only lasts for four to eight weeks; therefore, there is a risk of further progression of the malignancy in the liver parenchyma or associated lymph nodes. A specific possibility for increasing the regeneration rate of the liver parenchyma is the use of the regenerative and differentiation capacity of stem cells combined with PVE. The aim of our report is to present the first data on the use of PVE with the application of haematopoietic stem cells (HSCs) in patients with primarily non-resectable CLMs.

## Patients and Methods

We used the PVE method with the application of HSCs for the first time in September 2010 after approval by the Ethics Committee of the University Hospital in Pilsen (No. 25/2010). By March 2014, we had

performed the procedure in 11 patients with primarily non-resectable CLMs (group 1). The patients included nine men and two women with an average age of 62.1 (range=51-75) years. The study included patients with primarily non-resectable CLMs due to insufficient FLRV and no evidence of extrahepatic spreading of the tumor based on ultrasonography (USG), computed tomography (CT), positron-emission CT (PET-CT), or magnetic resonance imaging (MRI).

We determined that an insufficient FLRV was a volume less than 30% of the total volume of the healthy hepatic tissue. For patients whose liver parenchyma was damaged by the primary disease (e.g. steatosis and cirrhosis), or who underwent chemotherapy/biological treatment, we considered an insufficient FLRV to be a volume less than 40% of the total liver volume. We performed liver volumetry at study entry for the determination of FLRV (Somatom Definition; Siemens, Munich, Germany). The average baseline FLRV was 30.5% (range=21.4-38.6%). We evaluated the function of the liver parenchyma according to clinical and laboratory parameters and using an indocyanine green retention test (Limon; Pulsion Medical Systems AG, Eschborn, Germany). All patients were thoroughly informed about the proposed treatment procedure with warnings about any potential risks (in particular, progression of the tumour) and provided their written informed consent. The indication for the operation was determined by a multi-disciplinary team.

Briefly, the procedure methodology was as follows. HSCs were obtained *via* the apheresis method from peripheral blood. We achieved the stimulation of the HSCs in the bone marrow and their release into the peripheral blood using granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim; Neupogen, Amgen Europe B.V., Breda, the Netherlands) at a dosage of 10 µg/kg/day applied subcutaneously in one daily dose for four days. From day 4 after the application of filgrastim, the stem cells circulating in the peripheral blood were monitored [detected with flow cytometry as cluster of differentiation 34<sup>+</sup> (CD34<sup>+</sup>) cells. On day 5 after the mobilisation, leukapheresis was performed using a dialysis catheter introduced into the femoral vein and connected to a Cobe Spectra continuous blood cell separator (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) using a programme that was specific for mononuclear leukocytes (The MNC Programme, software version 6.1, Retain International, London, UK). Approximately two volumes of the patient's blood were processed, and an anti-coagulant solution based on citrate and citric acid (ACD-A; Baxter, Deerfield, IL, USA) was used at a ratio of 1:12-1:14 to whole blood. For the prevention of citrate toxicity, all patients underwent calcium supplementation to ensure that the calcium levels were within normal limits (in fractions for a total dose of 10-20 ml CaCl<sub>2</sub>). The obtained product was analysed in the laboratory, and the basic quality parameters were specified: volume; concentration and absolute white blood cell count, CD34<sup>+</sup> and CD 133<sup>+</sup> cell counts; erythrocyte and thrombocyte counts; viability of CD34<sup>+</sup> and CD 133<sup>+</sup> cells; and sterility. The minimum requirement for the number of stem cells in the product was ≥1×10<sup>7</sup> CD34<sup>+</sup> in the total volume of 200 ml of the product. Samples for the determination of all tests were taken within a closed system. Before the mobilisation, all patients were also examined to eliminate blood-borne diseases (e.g. Acquired Immune Deficiency Syndrome, hepatitis B and C, and syphilis). The product was not further handled, and it was stored until the next day at 2-8°C with continuous monitoring of the storage conditions. The following day, the product was transported from the laboratory to the operating room for use in the procedure.

The day before leukapheresis, we performed PVE transperietally using a mixture of Histoacryl (Braun, Melsungen AG, Germany) and Lipiodol (Cedex, Liege, France) at a 1:10 ratio. The day after

Table I. *Product quality parameters.*

Product parameter	Median (range)
Volume	116 (103-142) ml
WBC	300 (106-501) ×10 <sup>9</sup> /l
PLT	1,907 (1,404-2,459) ×10 <sup>9</sup> /l
CD34 <sup>+</sup>	0.27% (0.08-0.61%)
CD34 <sup>+</sup>	10.97 (2.96-23.30) ×10 <sup>7</sup> *
CD133 <sup>+</sup>	0.19% (0.03-0.50%)
	5.83 (1.19-19.10) ×10 <sup>7</sup> *

WBC: White blood cells; PLT: platelets; CD: cluster of differentiation; \*In total preparation.

the leukapheresis, under general anaesthesia, we created an incision in the right hypogastrium, introduced a catheter *via* the *vena ileocolica* into the contralateral branch of the portal vein and applied the obtained HSC product. We monitored growth in the contralateral liver lobe using CT liver volumetry at weekly intervals after the PVE HSC procedure.

The control group comprised 14 patients who underwent PVE only within the same time interval based on the same indication criteria, i.e. with primarily non-resectable CLMs (group 2). This group included 10 men and four women with an average age of 60.1 (range=46-74) years.

Statistical analysis was performed using SW SAS 9.4 software (SAS Institute Inc., Cary, USA). The primary endpoint was the rate of FLRV growth, the secondary endpoint was the CLMs volume growth.

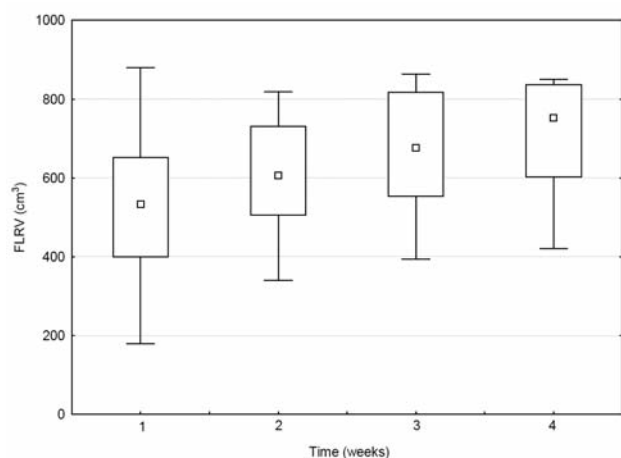
## Results

The HSCs were extracted and applied without complications, as planned for all 11 patients. Following leukapheresis, mild citrate toxicity occurred in some patients; 10 lt of blood was processed (6-12 l) with an extraction duration of 138 min (129-154 min). The required HSC dose was achieved in 100 % of the collections. The product quality parameters are summarised in Table I.

PVE was performed in both groups of patients without complications. The average total volume of liver (TLV) and FLRV in group 1 before the procedure was 1698.8±381.0 and 533.3±186.1 cm<sup>3</sup>, respectively. The average volume of CLMs before the procedure was 86.6±128.6 cm<sup>3</sup>. The average TLV and FLRV in group 2 before the procedure was 1892.0±509.1 cm<sup>3</sup> and 559.1±191.3 cm<sup>3</sup>, respectively. The average volume of CLMs before the procedure was 112.9±150 cm<sup>3</sup>.

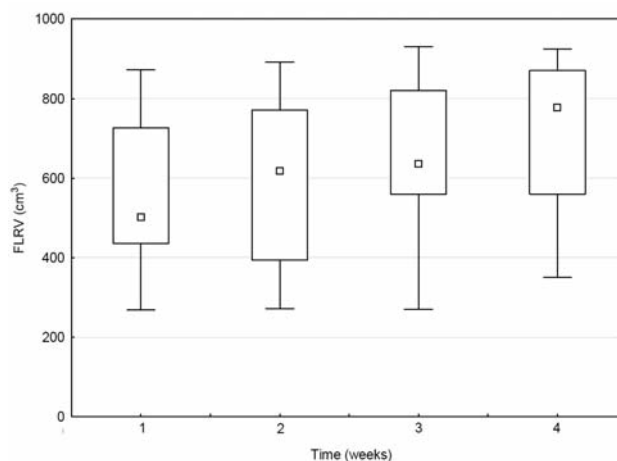
In all 11 (100%) patients of group 1, the required FLRV growth was achieved within three weeks after the procedure; however, the optimum FLRV growth was achieved in most patients by week 1 or 2 (*p*<0.006) (Figure 1).

We were able to perform liver resection in 8 of the group-1 patients (four right hepatectomies and four extended right hepatectomies). The procedure could not be performed in



FLRV (time - week)	Average rank	Sum of ranks	Mean	SD
FLRV 0	1.3	15.0	533.3	186.1
FLRV 1	2.0	24.0	612.4	147.3
FLRV 2	3.0	36.0	673.8	150.7
FLRV 3	3.8	45.0	715.4	142.1

Figure 1. Future liver remnant volume (FLRV) growth after portal vein embolization with hematopoietic stem cells application.



FLRV (time - week)	Average rank	Sum of ranks	Mean	SD
FLRV 0	2.1	15.0	614.6	249.7
FLRV 1	2.0	14.0	613.0	242.8
FLRV 2	2.3	16.0	639.3	226.3
FLRV 3	3.6	25.0	702.9	232.5

Figure 2. Rate of future liver remnant volume (FLRV) growth after portal vein embolization.

three patients; in two patients, CLM progression occurred, and in one patient, despite a sufficient increase in FLRV, resection was not possible due to the presence of severe intra-abdominal adhesions following previous surgeries. In these patients, adjuvant oncological treatment was continued.

In 13 out of the group-2 patients, sufficient FLRV growth was achieved within three weeks after PVE ( $p < 0.002$ ); none of the group-2 patients had optimum growth in the first two weeks after the procedure (Figure 2).

We performed liver resection in seven of the group-2 patients (two right hepatectomies, for extended right hepatectomies, and one right hepatectomy combined with radiofrequency ablation). The planned surgery was not performed in seven patients (50%). Six patients experienced dissemination of their underlying disease despite sufficient FLRV growth; in one patient, sufficient FLRV growth had not occurred even eight weeks after the procedure.

By comparing the two groups of patients, faster FLRV growth was observed in the group 1 patients ( $p < 0.01$ ) (Figures 3).

The CLM volume in groups 1 and 2 had increased significantly at the time of the indication for hepatectomy compared with the baseline values ( $p < 0.0005$  and  $p < 0.008$ , respectively). A comparison of both groups of patients revealed that there was no significant difference in the growth of the CLM volume ( $p < 0.18$ ) (Figures 4, 5 and 6).

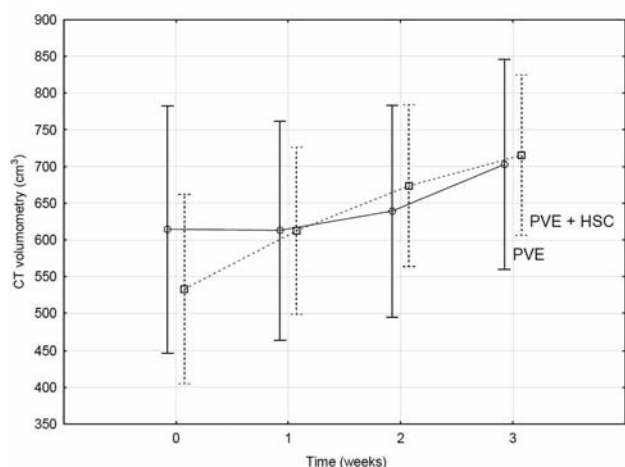
The median survival time was 7.3 and 6.8 months in group 1 and 2 patients, respectively. In addition, the two-year progression-free survival was 28% and 22%, respectively.

## Discussion

The expected incidence of colorectal carcinoma in the USA was 42.5/100,000 inhabitants in 2013. In the same year, the expected occurrence of new cases of this disease was estimated to be 140,000. If we assume the occurrence of CLMs in more than 80% of patients with colorectal carcinoma, the total number of patients with CLMs is also highly significant. Unfortunately, despite diagnostic and treatment advancements, CLMs can be surgically resolved in only approximately one-fourth of all patients (6, 7).

One of the main causes of non-resectability of CLMs is a low FLRV. Generally, we recommend that at least 30% healthy tissues should be preserved after resection. In patients with primary liver disease or in patients after previous chemotherapy or a combination of chemotherapy with biological treatment, we require preservation of at least 40%. In these patients, it is preferable not to rely on the determination of the residual volume of the liver alone; functional examination of the liver should also be performed, particularly before a large liver resection (of more than three liver segments) (8).

Currently, there are a few ways to achieve FLRV growth, including the so-called stage procedures that use a range of techniques to achieve an increase in the healthy liver tissue volume on one hand and methods for reducing CLM volume on the other. The former methods include PVE with subsequent liver resection and repeated resections, often in



Factor	F	p-Value
GROUP	0.0	0.9
FLRV (progress in time)	22.0	0.0
FLRV (progress in time) - comparison of both groups	4.2	0.0

Figure 3. Rate of future remnant liver volume (FLRV) growth in both patient groups.

combination with thermoablation methods and recently developed ALLPS procedure (associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy). Chemo-biological oncological neoadjuvant therapy uses downsizing of the CLMs with the option for subsequent liver resection (9-13).

Our Department has been using the PVE method for long-term increases in FLRV. In total, we have resolved this issue in 52 patients and were able to perform a major (more than three liver segments) liver resection in 70% of the patients. PVE was first implemented by Makuuchi *et al.* in 1982 during the successful treatment of hilar cholangiocellular carcinoma (14). Since then, there have been several reports (15-18) addressing the efficacy of PVE in staging procedures for primarily non-resectable liver tumors. The principle of PVE is based on increasing the flow-rate of portal blood in a non-embolised liver lobe. The arterial liver blood flow is also increased as a compensatory mechanism, creating the so-called hepatic arterial buffer response. The complex process of atrophy-hypertrophy develops. PVE results in increased proliferation of hepatocytes in the contralateral lobe supported in particular by the entire range of cytokines (19), including growth factors, the production of which is increased with PVE.

The major problem with PVE is insufficient FLRV growth, which may occur in diabetics, as a consequence of the re-canalisation of the embolised branch of the vena portae and in the hepatic parenchyma damaged, *e.g.*, by

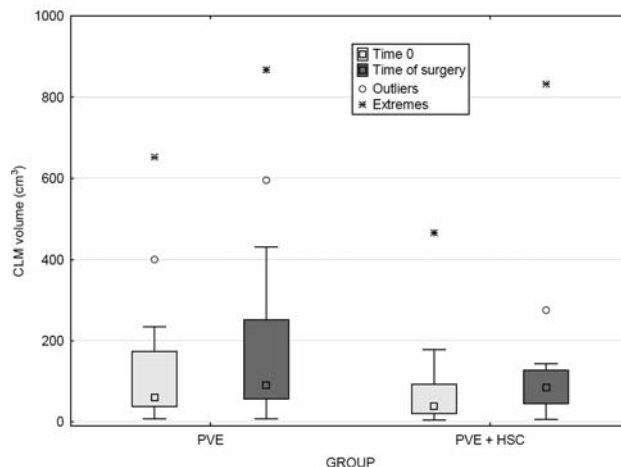


Figure 4. The final FLRV in both patient groups.

previous oncological treatment. In most cases, however, the cause is unknown (20, 21). FLRV regeneration following PVE occurs normally within an interval of four to eight weeks and is associated with an increased risk of growth of micrometastases in the liver. Kokudo *et al.* demonstrated an increased proliferative activity of CLMs based on an increase in the Ki-67 index in CLMs following PVE (22). A similar finding was described by Hayashi *et al.* (23) when measuring the growth in a primary liver tumor following PVE. They determined a significant growth in tumor volume after PVE compared with the condition before PVE (2.37 cm<sup>3</sup>/day compared with 0.59 cm<sup>3</sup>/day).

Given the somewhat casuistic information in previous publications (24-26), we decided to implement the method in clinical practice based on our very positive experience with the application of autologous stem cells in an experiment with piglets (27, 28). The reason for choosing to implement the method was extensive experience with the collection and use of autologous stem cells in the treatment of patients with lymphoproliferative disorders.

Stem cells have been identified in a variety of organs and play a critical role in tissue maintenance and repair. The hepatic parenchyma is able to ensure its own self-regeneration to an extent using its own hepatocytes. Adult hepatocytes exhibit a very low level of cell turnover; however, they possess the ability to proliferate in response to liver damage. However, as soon as this ability is insufficient, differentiation of the so-called hepatic progenitor cells is warranted; these cells are localised in the area of the canals of Hering – oval cells that are able to differentiate into mature hepatocytes and bile duct cells (29). Nevertheless, their regenerative capacity is not substantial, and only 0.15% of all new hepatocytes are developed at the time of liver regeneration (30-33). The ability for liver



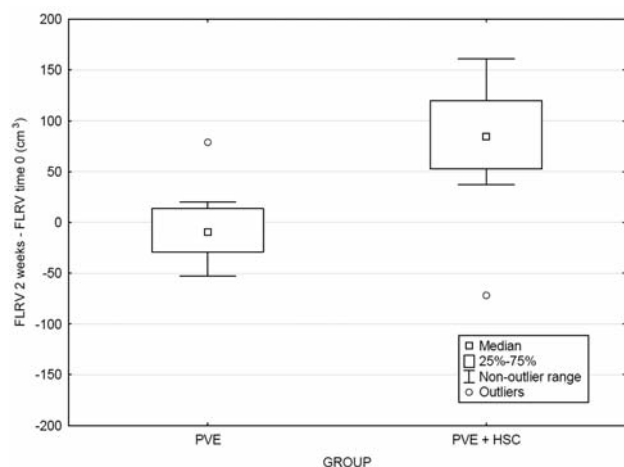


Figure 5. Growth of colorectal liver metastases (CLM) volume in the embolized liver lobe in both patient groups.

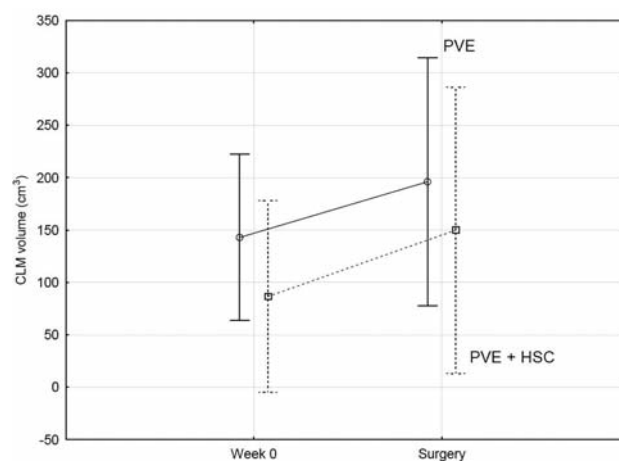


Figure 6. Colorectal liver metastases (CLM) volume in both patient groups at week 0 and at time of surgery.

regeneration fails in some liver diseases and during injury to the liver parenchyma by previous chemotherapy.

Bone marrow or blood-derived stem cells are a potential cell source that can support liver regeneration (34). The bone marrow contains two distinct stem cell populations: HSCs and mesenchymal (MSCs) cells. Both these types contribute to the regeneration of hepatic tissue. Damage to the liver results in the mobilisation of HSCs (or possibly also MSCs), which may occur *via* blood flow to the liver. Their transdifferentiation into hepatocytes is a rare event (35). Only very small numbers of transdifferentiated cells are detected in the injured liver. If the reparative process has already started in the liver, HSCs may provide support for endogenous stem cell-mediated repair of the liver. The secretion of various cytokines, suppression of the immune reaction, increase in angiogenesis, inhibition of apoptosis and enhancement of tissue proliferation are some of the mechanisms of regeneration stimulation mediated by bone marrow stem cells (36).

In our study, we verified that a combination of PVE with HSC application is safe for patients, without any immediate side-effects. In those patients, there was significantly faster FLRV growth compared to the group of patients treated with PVE only. Therefore, it was possible to perform radical liver resection sooner. This combined treatment most likely also had an effect on the CLM volume growth and occurrence of new CLMs in both the embolized and non-embolized parts of the liver parenchyma; the CLM volume growth was higher in patients following PVE, which required a longer time for optimum FLRV growth.

Within the scope of this study, the problem of an increase in the CLM volume in the embolized part of the liver parenchyma after both PVE and PVE with HSC application needs to be discussed. This issue is associated with the

unresolved problem of the possible risk of the proliferation of non-detectable micrometastases, not only in the liver but throughout the body, related to the method used for FLRV stimulation. As apparent in our population of patients, the stimulation of tumor growth occurred particularly in patients post-PVE. Therefore, some protective effect of HSCs against the development of metastases in the liver is hypothetically possible. Nevertheless, the progression of CLMs was also observed in the group of patients that underwent HSC application. The tumour tissue contains a large number of stimulating substances (*e.g.*, growth factors, matrix metalloproteinases, and cytokines), which may lead to the migration of HSCs to the tumour tissue, where they may subsequently stimulate the growth and spread of the tumour. The mechanism of the interaction of stem cells with tumour cells is not yet precisely known. There is most likely stimulation of neoangiogenesis with immunosuppression and apoptosis inhibition (37-39). A probable mechanism that supports the growth of metastases in the liver is the differentiation of mesenchymal cells in the tumour into the so-called carcinoma-associated fibroblast-like cells, which then support tumour growth. Tumor growth may also be supported by the regenerative mechanisms of the hepatic tissue post-PVE when the whole range of growth factors, matrix metalloproteinases and cytokines develops in the liver, which may stimulate and concurrently enable proliferation of the tumour tissue (40). Most likely, the arterial buffer response after PVE also plays an important role in tumour development. The possibility of the differentiation of autologous stem cells into tumour cells under the metastatic environment remains an unresolved issue. The mechanism of CLM progression is unclear, and obviously, evaluating a number of clinical and laboratory

parameters in a large number of patients will be necessary to determine the risk of tumor progression after the PVE alone and in combination with HSC application.

We are aware that our study has several fundamental limitations. Above all, it contains a low number of patients and a short duration of monitoring. Another limitation is that an optimum method for the detection of HSCs in the liver tissue parenchyma has not yet been developed. In addition, the above-mentioned possibility of the stimulation of carcinogenesis in the liver parenchyma in connection with this method remains an unresolved issue.

Nevertheless, despite the aforementioned limiting factors, we assume that the PVE method combined with HSC application has potential for patients with primarily non-resectable CLMs. The mobilisation, collection and subsequent application of HSCs are well tolerated and are not associated with major complications. To finally confirm the method as a treatment option, a larger population of patients will be needed, optimally in multicentre studies, as well as for longer monitoring durations.

### Acknowledgements

This research was supported by Charles University Research Project P 36, IGA grant project NT 13660 and NT 11017.

### References

- Michalopoulos GK: Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213: 286-300, 2007.
- Duncan AW, Dorrell and Grompe M: Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137(2): 466-481, 2009.
- Esrefoglu M: Role of stem cells in repair of liver injury: Experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol* 19(40): 6757-6773, 2013.
- Adam R, De Gramont A, Figueras J, Guthrie A, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Tabernero J, Van Cutsem E and Vauthey JN: The OncoSurgery Approach to Managing Liver Metastases from Colorectal Cancer. A Multidisciplinary International Consensus. *Oncologist* 17(10): 1225-1239, 2012.
- Adams RB, Aloia TA, Loyer E, Pawlik TM, Taouli B and Vauthey JN: Selection for hepatic resection of colorectal liver metastases: expert consensus statement. *HPB (Oxford)* 15(2): 91-103, 2013.
- Spolverato G, Ejaz A, Azad N and Pawlik TM: Surgery for colorectal liver metastases: The evolution of determining prognosis. *World J Gastrointest Oncol* 5(12): 207-221, 2013.
- Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh MA, Mowat FS, Alexander DD, Choti MA and Poston G. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol* 4: 283-301, 2012.
- Treska V, Safranek J, Lysak D, Mirka H, Skalicky T, Slauf F and Hes O: A complex oncosurgical approach to increasing the resectability of colorectal cancer metastases – a case report. *Biomed Pap Med* 158(1): 154-157, 2014.
- Shindoh J, D Tzeng CW and Vauthey JN: Portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 1(3-4): 159-167, 2012.
- Ribero D, Amisano M, Bertuzzo F, Langella S, Lo Tesoriere R, Ferrero A, Regge D and Capussotti L: Measured versus estimated total liver volume to preoperatively assess the adequacy of the future liver remnant: Which method should we use? *Ann Surg* 258(5): 801-806, 2013.
- Okabe H, Beppu T, Nakagawa S, Yoshida M, Hayashi H, Masuda T, Imai K, Mima K, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Yamashita Y and Baba H: Percentage of future liver remnant volume before portal vein embolization influences the degree of liver regeneration after hepatectomy. *J Gastrointest Surg* 17(8): 1447-1451, 2013.
- Ratti F, Cipriani F, Gagliano A, Catena M, Paganelli M and Aldrighetti L: Defining indications to ALPPS procedure: technical aspects and open issues. *Updates Surg* 66(1): 41-49, 2014.
- Fiorentini G, Aliberti C, Mulazzani L, Coschiera P, Catalano V, Rossi D, Giordani P and Ricci S: Chemoembolization in colorectal liver metastases: The rebirth. *Anticancer Res* 34(2): 575-584, 2014.
- Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunvén P, Yamazaki S, Hasegawa H and Ozaki H: Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 107(5): 521-527, 1990.
- Huang SY, Aloia TA, Shindoh J, Ensor J, Shaw CM and Loyer EM: Efficacy and safety of portal vein embolization for two-stage hepatectomy in patients with colorectal liver metastasis. *J Vasc Interv Radiol* 25(4): 608-617, 2014.
- Kasai Y, Hatano E, Iguchi K, Seo S, Taura K, Yasuchika K and Mori A: Prediction of the remnant liver hypertrophy ratio after preoperative portal vein embolization. *Eur Surg Res* 51(3-4): 129-137, 2013.
- Shindoh J, Tzeng CW, Aloia TA, Curley SA, Zimmiti G, Wei SH, Huang SY, Gupta S, Shibata T and Uemoto S: Portal vein embolization improves rate of resection of extensive colorectal liver metastases without worsening survival. *Br J Surg* 100(13): 1777-1783, 2013.
- Fischer C, Melstrom LG, Arnaoutakis D, Jarnagin W, Brown K, D'Angelica M, Covey A, DeMatteo R, Allen P, Kingham TP, Tuorto S, Kemeny N and Fong Y: Chemotherapy after portal vein embolization to protect against tumor growth during liver hypertrophy before hepatectomy. *JAMA Surg* 148(12): 1103-1108, 2013.
- Liska V, Treska V, Mirka H, Kobr J, Sykora R, Skalicky T, Sutnar A, Bruha J, Fiala O, Vyxcital O, Chlumska A, Holubec L, Kormunda S, Trefil L, Racek J and Matejovic M: Tumour necrosis factor-alpha stimulates liver regeneration in porcine model of partial portal vein ligation. *Hepatogastroenterology* 59(114): 496-500, 2012.
- Mihara K, Sugiura T, Okamura Y, Kanemoto H, Mizuno T, Moriguchi M, Aramaki T and Uesaka K: A predictive factor of insufficient liver regeneration after preoperative portal vein embolization. *Eur Surg Res* 51(3-4): 118-128, 2013.
- Treska V, Skalicky T, Sutnar A, Vaclav L, Fichtl J, Kinkorova J, Vachtova M and Narsanska A: Prognostic importance of some clinical and therapeutic factors for the effect of portal vein embolization in patients with primarily inoperable colorectal liver metastases. *Arch Med Sci* 9(1): 47-54, 2013.



- 22 Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Ohta K, Yamaguchi T, Matsubara T, Takanashi T, Nakajima T, Muto T, Ikari T, Yanagisawa A and Kato Y: Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolisation. *Hepatology* 34: 267-272, 2001.
- 23 Hayashi S, Baba Y and Ueno K: Acceleration of primary liver tumor growth rate in embolised hepatic lobe after portal vein embolisation. *Acta Radiol* 48: 721-727, 2007.
- 24 Esch JS II, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschlader M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Haussinger D and Hosch SB: Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: A novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 23: 463-470, 2005.
- 25 Canepa MC, Quaretti P, Perotti C, Vercelli A, Rademacher J, Peloso A, Barbieri L, Franchi E, Briani L, Gaspari A, Brugnatelli S, Pedrazzoli P, Dionigi P and Maestri M: Autologous CD133+ cells augment the effect of portal embolization. *Minerva Chir* 68(2): 163-168, 2013.
- 26 Ghodsizad A, Fahy BN, Waclawczyk S, Liedtke S, Gonzalez Berjon JM, Barrios R, Mehrabi A, Karck M, Ruhparwar A and Kogler G: Portal application of human unrestricted somatic stem cells to support hepatic regeneration after portal embolization and tumor surgery. *ASAIO J* 58(3): 255-261, 2012.
- 27 Liska V, Slowik P, Eggenhofer E, Treska V, Renner P, Mirka H, Kobl J, Sykora R, Schlitt HJ, Holubec L, Chlumska A, Skalicky T, Matejovic M and Dahlke MH: Intraportal injection of porcine multipotent mesenchymal stromal cells augments liver regeneration after portal vein embolization. *In Vivo* 23: 229-236, 2009.
- 28 Avritscher R, Abdelsalam ME, Javadi S, Ensor J, Wallace MJ, Alt E, Madoff DC and Vykoukal JV: Percutaneous intraportal application of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using a balloon occlusion catheter in a porcine model of liver fibrosis. *J Vasc Interv Radiol* 24(12): 1871-1878, 2013.
- 29 Best J, Dollé L, Manka P, Coombes J, van Grunsven LA and Syn WK: Role of liver progenitors in acute liver injury. *Front Physiol* 4: 258, 2013.
- 30 Rehman K, Iqbal MJ, Zahra N and Akash MS: Liver stem cells: from preface to advancements. *Curr Stem Cell Res Ther* 9(1): 10-21, 2014.
- 31 Papp V, Rókus A, Dezső K, Bugyik E, Szabó V, Pávai Z, Paku S and Nagy P: Expansion of hepatic stem cell compartment boosts liver regeneration. *Stem Cells Dev* 23(1): 56-65, 2014.
- 32 Chen L, Zhang W, Zhou QD, Yang HQ, Liang HF, Zhang BX, Long X and Chen XP: HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. *Cell Biochem Funct* 30(7): 588-596, 2012.
- 33 Ogawa S and Miyagawa S: Potentials of regenerative medicine for liver disease. *Surg Today* 39: 1019-1025, 2009.
- 34 Tögel F and Westenfelder C: Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dynamics* 236: 3321-3331, 2007.
- 35 Lin H, Otsu M and Nakauchi H: Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Phil Trans R Soc B* 368: 20110334, 2012.
- 36 Franchi E, Canepa MC, Peloso A, Barbieri L, Briani L, Panyor G, Dionigi P and Maestri M: Two-stage hepatectomy after autologous CD133+ stem cells administration: a case report. *World J Surg Oncol* 11(1): 192, 2013.
- 37 Williamson JM, Thairu N, Katsoulas N, Stamp G, Ahmad R, du Potet E, Levicar N, Gordon M, Stebbing J, Habib NA and Jiao LR: Impact of portal vein embolization on expression of cancer stem cell markers in regenerated liver and colorectal liver metastases. *Scand J Gastroenterol* 45(12): 1472-1479, 2010.
- 38 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY and Ng IO: Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132: 2542-2556, 2007.
- 39 Pachos KA and Bird NC: Liver regeneration and its impact on post-hepatectomy metastatic tumor recurrence. *Anticancer Research* 30: 2161-2170, 2010.
- 40 Simoneau E, Aljiffry M, Salman A, Abualhassan N, Cabrera T, Valenti D, El Baage A, Jamal M, Kavan P, Al-Abbad S, Chaudhury P, Hassanain M and Metrakos P: Portal vein embolization stimulates tumour growth in patients with colorectal cancer liver metastases. *HPB (Oxford)* 14(7): 461-468, 2012.

Received July 22, 2014

Revised September 1, 2014

Accepted September 5, 2014

PITULE, P., O.VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. NOVÁK, P. HOŠEK, V. TŘEŠKA, I. HLAVATÁ, P. SOUČEK, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. LIŠKA. Differential expression and prognostic role of selected genes in colorectal cancer patients. *Anticancer Research* 2013, **33**(11), 4855-4865. ISSN 0250-7005. IF 1,725.

## Differential Expression and Prognostic Role of Selected Genes in Colorectal Cancer Patients

PAVEL PITULE<sup>1,2</sup>, ONDREJ VYCITAL<sup>3</sup>, JAN BRUHA<sup>3</sup>, PETR NOVAK<sup>3</sup>, PETR HOSEK<sup>1,4</sup>, VLADISLAV TRESKA<sup>3</sup>, IVONA HLAVATA<sup>5</sup>, PAVEL SOUCEK<sup>1,5</sup>, MILENA KRALICKOVA<sup>1,2</sup> and VACLAV LISKA<sup>1,3,6</sup>

<sup>1</sup>Biomedical Center, <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology and <sup>6</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic;

<sup>3</sup>Department of Surgery, Teaching Hospital and Medical School, Pilsen, Czech Republic;

<sup>4</sup>Department of Biomedical Informatics, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Kladno, Czech Republic;

<sup>5</sup>Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

**Abstract.** Aim: Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant diseases. The aim of our study was to describe the expression status of 12 selected candidate genes, by comparing paired samples of healthy colon mucosa and tumour tissues and to correlate obtained data with clinical and pathological features, with the goal of revealing associations for individual gene expressions and tumour behaviour. Materials and Methods: Samples from 53 patients with CRC were analyzed. Patients were divided into two groups based on the presence or absence of distant metastases at the time of primary tumour surgery. Expression levels were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Results: We found changes in the expression of 10 out of 12 analyzed genes. Four genes were significantly up-regulated in tumour tissues: leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5;  $p < 0.001$ ), collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1;  $p < 0.001$ ), visinin-like 1 (VSNL1;  $p < 0.001$ ) and versican (VCAN;  $p = 0.001$ ). Six genes were down-regulated: destrin (DSTN;  $p = 0.004$ ), mesoderm induction early response 1, family member 3 (MIER3;  $p < 0.001$ ), acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (ACSL5;  $p = 0.002$ ), mitogen-activated protein kinase 1/ERK (MAPK1;  $p < 0.001$ ), claudin 23 (CLDN23;  $p < 0.001$ ) and solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (SLC26A2;  $p < 0.001$ ). We recorded longer overall survival (OS) in the group of patients with higher expression of VSNL1 ( $p = 0.032$ ). Patients with more pronounced down-

regulation of CLDN23 had shorter OS ( $p = 0.045$ ). In the group of patients without distant metastases, longer OS and disease-free interval (DFI) were found for patients with higher SLC26A2 expression in tumour tissues ( $p = 0.036$  and  $p = 0.011$ , respectively). In the same group, lower expression of VSNL1 in healthy tissue corresponded to a longer DFI ( $p = 0.020$ ), smaller decrease of SLC26A2 and ACSL5 meant longer DFI ( $p = 0.041$  and  $p = 0.040$ , respectively), as did greater increase of LGR5 expression ( $p = 0.026$ ). Conclusion: We identified differences in the expression of 10 genes in colorectal cancer tissue compared to healthy colon mucosa, and found prognostic significance for these changes which could be used for the development of a disease risk scoring system.

The incidence of colorectal cancer (CRC) is increasing and globally, this malignant disease has the third highest incidence (after breast and lung cancer) and the fourth highest mortality rate (after lung, liver and stomach cancer) (1). In the first stages of its development, CRC can be treated by surgical intervention. In later stages, it has a high capacity to form secondary tumours, mainly in the liver and lungs (2). Therefore it is necessary to combine surgery and chemotherapy to achieve higher efficacy of treatment.

The selection for optimal treatment is also complicated by the high heterogeneity of CRC, which can be divided into three main subtypes: type with chromosomal instability, type with microsatellite instability and type with CpG island methylator phenotype (3). Individual subtypes differ in disease prognosis and prediction, and their identification is often crucial for the effective eradication of residual disease by oncological treatment.

Currently, there are several chemotherapeutic regimens and the possibility of biological treatment also exists. The most commonly used chemotherapeutics are 5-fluorouracil,

Correspondence to: Pavel Pitule, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Karlovarská 48, 301 00 Pilsen, Czech Republic. E-mail: pitulep@seznam.cz

Key Words: Colorectal cancer, prognostic markers, gene expression.

Table I. Summary of genes selected for the study.

GeneID	Symbol	Full name	mRNA RefSeq
7447	<i>VSNL1</i>	Visinin-like 1	NM_003385.4
11034	<i>DSTN</i>	Dextrin (actin-depolymerizing factor)	NM_006870.3
154075	<i>SAMD3</i>	Sterile alpha motif domain containing 3	NM_001017373.2
8549	<i>LGR5</i>	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5	NM_003667.2
1462	<i>VCAN</i>	Versican	NM_004385.4
5594	<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1/ERK	NM_002745.4
1836	<i>SLC26A2</i>	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	NM_000112.3
137075	<i>CLDN23</i>	Claudin 23	NM_194284.2
166968	<i>MIER3</i>	Mesoderm induction early response 1, family member 3	NM_152622.3
11132	<i>CAPN10</i>	Calpain 10	NM_023083.3
51703	<i>ACSL5</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	NM_016234.3
115908	<i>CTHRC1</i>	Collagen triple helix repeat containing 1	NM_138455.2

oxaliplatin and irinotecan, usually in various combinations (4). Biological treatment is targeted against the epidermal growth factor receptor (EGFR) or vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR). Two categories of agents acting against EGFR exist: small tyrosine kinase inhibitors (gefitinib, erlotinib) and monoclonal antibodies (panitumumab and cetuximab) (5). The most complicated step in the treatment is the selection for the appropriate agent for each patient individually.

At present, only a few predictive and prognostic markers are used in CRC therapy and several others are in the phase of experimental validation. Two of these predictive markers are related to the use of biological treatment, the expression status of the EGFR and the mutational status of the EGFR proximal effector, the small G-protein Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) (6, 7). Only patients who have tumours positive for EGFR expression and have a wild-type allele for the *KRAS* gene can be treated by anti-EGFR treatment, but there is still a substantial proportion of patients who meet the eligibility criteria but lack treatment benefit (8). Other markers are being studied, namely the mutational status of other *RAS* family genes, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (*BRAF*) and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (*PI3K*) or the expression of phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) protein (negative regulator of the *PI3K* pathway) (9, 10). Markers predicting the efficacy of classical chemotherapy are also studied, for example the excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (*ERCC1*) polymorphisms in the oxaliplatin treatment (11) or DNA topoisomerase 1 (*TOP1*) expression level in irinotecan treatment (12). Markers with prognostic function are of particular interest because on their potential to inform about disease aggressiveness and for their possible contribution to follow-up optimization.

Despite the number of studied genes, there is still a need to identify for novel markers whose mutation or expression status would provide additional information that would be useful for more precise patient selection, with the final goal of individualized medicine. Therefore, here, we have selected potentially interesting candidate genes according to their known or possible function in diverse aspects of tumour progression, *i.e.* angiogenesis, metabolism or cell adhesion, and tried to relate their altered expression with clinical behaviour of primary CRC.

## Materials and Methods

**Selection of studied genes.** The selection of studied genes was based on a search through the dataset from the high-throughput studies focused on colorectal cancer (13, 14). Our aim was to find genes whose expression change was already identified in the large-scale analysis, but was never confirmed by different approaches. Our search finally narrowed down 12 candidate genes whose names and identifiers are summarised in Table I.

Two of the genes - leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (*LGR5*) and mitogen-activated protein kinase 1/ERK (*MAPK1*) - were selected as control genes with known and verified expression change in CRC. Selection of reference genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A (*POLR2A*) was based on the data from our collaborators (15) and our own laboratory practice.

**Primer design.** Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) primers for the selected genes were designed using Primer-3 software (16) with focus on having similar annealing temperatures and lengths of the PCR product. Primer sequences are listed in Table II. Primers were synthesised by Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO USA) using their custom oligo synthesis service.

**Collection of tissue samples.** Samples for the analysis were collected during surgery for the colorectal tumour. Within 20 min after the removal of the tumour tissue from the patient, small samples of

Table II. List of primer sequences, annealing temperatures and amplicon lengths. *tm*, Melting temperature; *a.l.*, amplicon length.

Name	Sequence 5'-3'	tm	a.l.	Name	Sequence 5'-3'	tm	a.l.
<i>F_hVSNL1</i>	agaactgttgagttttatcatttcg	59	90	<i>F_hMAPK1</i>	ccgtgacctcaagccttc	59	72
<i>R_hVSNL1</i>	caggggcccagtttgctatt	60		<i>R_hMAPK1</i>	gccaggccaagtacacag	60	
<i>F_hDSTN</i>	cctggcatcttggaatcat	59	99	<i>F_hSLC26A2</i>	ggtggcagcactgtaacct	60	64
<i>R_hDSTN</i>	aaagcagattacaatgtagccctaa	59		<i>R_hSLC26A2</i>	cacttgaagaagcccacgc	60	
<i>F_hSAM3</i>	catgcaaacagaagcagctc	59	96	<i>F_hCLDN23</i>	ttgcatcaatataattattgggttt	59	66
<i>R_hSAM3</i>	tttccagctggatagaagatgg	59		<i>R_hCLDN23</i>	agtttgcattggcaaggagtt	59	
<i>F_hLGR5</i>	aatcccctgccagctc	60	74	<i>F_hCAPN10</i>	tgccagaggaggatgtg	60	73
<i>R_hLGR5</i>	ccctgggaatgtatgtcaga	59		<i>R_hCAPN10</i>	gctcgtaggaccatggac	60	
<i>F_hVCAN</i>	gcacctgtgtgccaggata	60	70	<i>F_hACSL5</i>	ttcctgtctcttcataaagggt	59	95
<i>R_hVCAN</i>	cagggattagagtacattcatca	60		<i>R_hACSL5</i>	ccaattcggagatgatccac	60	
<i>F_hMIER3</i>	ttgaggaaggaaataatgattggt	60	113	<i>F_hCTHRC1</i>	ccaaggggaagcaaaagg	60	74
<i>R_hMIER3</i>	caccaaaagtaactggtcttcgt	59		<i>R_hCTHRC1</i>	ccctgtaagcacattccatta	59	

tumour and healthy mucosa (anatomically the most distant tissue which was macroscopically healthy, usually in the range of 15-20 cm from the tumour location) were collected. Samples were immediately frozen in cryotubes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Isolation of RNA and quality validation.** RNA was isolated from frozen samples using the standard protocol for the RT Trisol Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). The tissue was removed from the cryotube and placed in liquid nitrogen in a mortar. The tissue was pulverized and transferred into an Eppendorf tube with 1ml of chilled Trisol RT and total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol. Total isolated RNA was dissolved in nuclease-free water (Ambion, Carlsbad, CA, USA). RNA concentration was assessed by absorbance measurement using the Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland) in the NanoQuant setting. Only samples with a 230 nm/260 nm ratio  $>1.7$  and samples with proper bands without degradation on agarose gel electrophoresis were used for further analysis. Selected samples were additionally analysed by measurement of RNA integrity number (RIN) using a 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

**Reverse transcription (DNase, PCR control).** cDNA was synthesised using 500 ng of total RNA in 20  $\mu\text{l}$  reaction by RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Before reverse transcription, isolated RNA was treated for 5 min at room temperature with DNaseI (Top-Bio, Vestec, Czech Republic) to remove potential traces of genomic DNA. For priming of reverse transcription, we used a combination of oligo(dT)<sub>18</sub> and random hexamer primers each at 2.5  $\mu\text{M}$  final concentration. The quality of cDNA and possible contamination by genomic DNA was assessed by control PCR reaction (*GAPDH* amplification, 40 cycles) and agarose gel electrophoresis.

**Quantitative real-time PCR.** For the quantitative PCR we used Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). cDNA was diluted to final concentration of 0.5 ng/ $\mu\text{l}$  and 4  $\mu\text{l}$  of cDNA were used in each reaction. Optimal cycling parameters and annealing temperatures were assessed by the

measurement of sensitivity, specificity and efficiency of individual quantitative PCR reactions. After this initial analysis, genes were divided into two groups based on their ideal annealing temperature ( $58^{\circ}\text{C}$  for *CLDN23*, *SLC26A2*, *VSNL1*, *CAPN10*, *VCAN* and *MAPK1*;  $60^{\circ}\text{C}$  for *LGR5*, *DSTN*, *MIER3*, *ACSL5*, *CTHRC1* and *SAMD3*). The instrument used for the analysis was 7500 Fast (Life Technologies). Cycling parameters were: initial hold at  $50^{\circ}\text{C}$  for 20 s and initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min followed by 42 cycles consisting of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and annealing and polymeration at  $58^{\circ}\text{C}$  ( $60^{\circ}\text{C}$ ) for one minute. Results were analysed by the 7500 instrument software and basic statistical analysis was carried out using the REST2009 software (Qiagen, Hildesheim, Germany).

**Collection of clinical information.** Clinical data were retrieved from the patient's records. We focused on the pathological examination of the samples (pTNM classification, grading and histological type of tumour) and on the patient's data (gender, age, date of diagnosis and surgical intervention and date of the last follow-up examination, recurrence, death). All data were anonymised.

**Statistical analysis.** Since the normality of the measured expression levels is not certain, nor can it be reliably tested given the limited sample size, non-parametric statistical methods, which do not require any assumption regarding the distribution shape, were preferred during the analysis.

First the differences in the candidate genes expressions between tumorous and healthy tissue were tested for significance using the Wilcoxon signed-rank test.

Then a series of two-sample survival analyses was performed in order to investigate possible relations between the expression data (healthy tissue expression level, tumorous tissue expression level and tumorous/healthy tissue expression ratio for each candidate gene) and patient survival (calculated from the day of surgery). The two patient groups to be compared were formed independently for each variable based on its median value. In cases where patients were later removed from the analysis due to missing data or when only a subset of patients was analyzed, the median value used to divide patients into two groups was kept at its original value. The relation between the expression variables and overall survival (OS) time was analyzed for all the patients and also in the subsets of

Table III. *Clinical and pathological description of the analysed group.*

	Group A (palliative) n=25	Group B (adjuvant) n=28	p-Value	Test
Gender (males/females)	17/8	19/9	1	Fisher's exact
Age at diagnosis (years)			0.485	Mann-Whitney <i>U</i>
Median	65	63.5		
Interquartile range	7	12		
Tumour size			0.989	Pearson Chi-square
T2	1	1		
T3	19	21		
T4	5	6		
Lymph node involvement			0.681	Pearson Chi-square
N0	7	11		
N1	11	10		
N2	7	7		
M Classification			<0.001	Fisher's exact
M0	0	28		
M1	25	0		
Grade			0.101	Pearson Chi-square
G1	4	3		
G2	20	18		
G3	1	7		
Primary tumour localization			0.025	Fisher's exact
Colon	9	19		
Rectosigmoideum or rectum	16	8		

adjuvantly and palliatively treated patients separately. In the group of patients treated adjuvantly, the correspondence between the expression data and the disease-free interval (DFI) after surgery was also investigated. The date of disease recurrence was determined as the average of the date of the last negative and the first positive examination if the interval between the examinations was 180 days or less. In cases of a longer examination interval, the recurrence date was set 90 days before the first positive examination based on previous methodology (17). During each analysis, Kaplan-Meier curves were plotted for the two patient groups based upon the variable of interest and the significance of the survival (or DFI) difference was tested by Gehan-Wilcoxon, Cox-Mantel and "log-rank" test.

To examine the possible relation between tumour localisation and candidate gene expression, the patients were first divided into two groups according to tumour localization (first group with the CRC of the colon, second group with CRC of the rectum and rectosigmoid). The candidate gene expression levels (in both tumour and healthy tissue) and expression ratios were then tested for significant differences between the groups using Mann-Whitney *U*-test.

Correlations of expression variables were investigated using Spearman's correlation coefficient with appropriate significance test.

All the analyses were performed in STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## Results

In the present study, we analysed the expression of 12 genes in a sample set of 53 patients. Patients were divided into two groups, palliative and adjuvant (25 and 28 patients,

respectively), depending on the presence or absence of distant macrometastases at the time of surgery. Clinical and pathological description of both groups is summarised in Table III. Both groups differed clinically in overall survival, with patients of the adjuvant group having longer survival than those in the palliative group.

*Different RNA expression between tumour tissue and healthy mucosa.* In the set of 12 selected genes, 10 exhibited a difference in expression level between tumour and normal tissue in the group of all patients. Four (*LGR5*, *CTHRC1*, *VSNL1* and *VCAN*) were up-regulated in tumour, six (*DSTN*, *MIER3*, *ACSL5*, *MAPK1*, *CLDN23* and *SLC26A2*) were down-regulated (Figure 1). Expression differences in both subgroups were similar to those obtained for the whole set of patients, except for *DSTN*, the expression of which was not different in the palliative group, but was down-regulated in the adjuvant group.

*Correlation between candidate gene expressions and clinical data.* Dependence of clinical characteristics on relative expression levels of candidate genes was statistically analyzed by the tests described above. We did not find any significant result at a *p*-value of 0.05 for correlation with age, individual parameters of TNM classification and tumour grading.



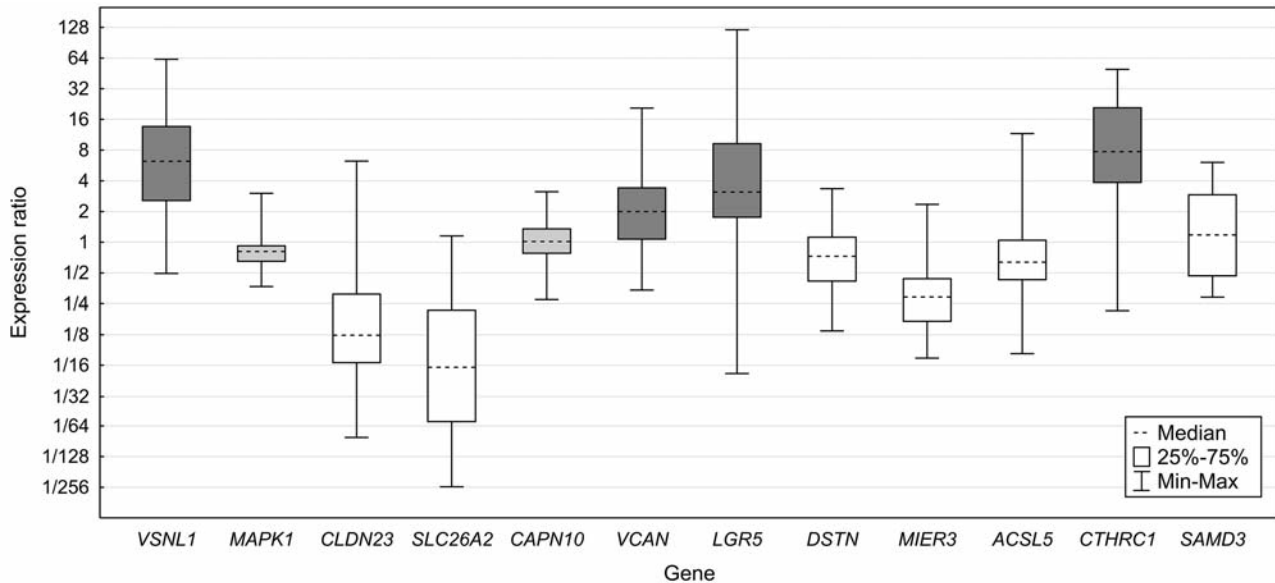


Figure 1. Expression of candidate genes in tumour tissue relative to healthy tissue. Genes in dark grey were up-regulated in tumour tissue, genes in light grey did not change in expression and genes in white were down-regulated in tumour tissue.

When investigating the dependence of overall survival and disease-free survival on relative gene expression, in the overall group of patients, we found correlation of *VSNL1* expression with OS (significantly longer OS was observed among patients with *VSNL1* expression level in tumour tissues above the median value; Cox-Mantel  $p=0.033$  and log rank  $p=0.032$ ) (Figure 2A).

In the adjuvant group, patients with *SLC26A2* expression above the tumour tissue median had a longer OS than those with an expression level below the median (Cox-Mantel  $p=0.036$ ) (Figure 2B). In the case of DFI, patients with *VSNL1* expression in the healthy tissue below the median had a longer DFI than patients with higher expression (Cox-Mantel  $p=0.022$ , log-rank  $p=0.020$ ) (Figure 2C). The opposite trend was observed for *SLC26A2* (Cox-Mantel  $p=0.012$ , Wilcoxon  $p=0.014$  and log-rank  $p=0.011$ ) (Figure 2D).

Then we analyzed the OS and DFI of the patients with respect to the difference in candidate gene expression between healthy and tumour tissues. In the overall group of patients, we found that the greater the down-regulation of *CLDN23* expression in tumour, the worst the outcome for the patient in terms of shorter OS (Wilcoxon  $p=0.045$ ) (Figure 2E). In the adjuvant group, a smaller decrease of *SLC26A2* and *ACSL5* expression in tumour led to a longer DFI (Wilcoxon  $p=0.046$ , Cox-Mantel  $p=0.045$  and log-rank  $p=0.041$  for *SLC26A2*, and Wilcoxon  $p=0.040$  for *ACSL5*) (Figure 2F and 2G) as did a greater increase of *LGR5* expression (Wilcoxon  $p=0.046$ , Cox-Mantel  $p=0.028$  and log-rank  $p=0.026$ ) (Figure 2H).

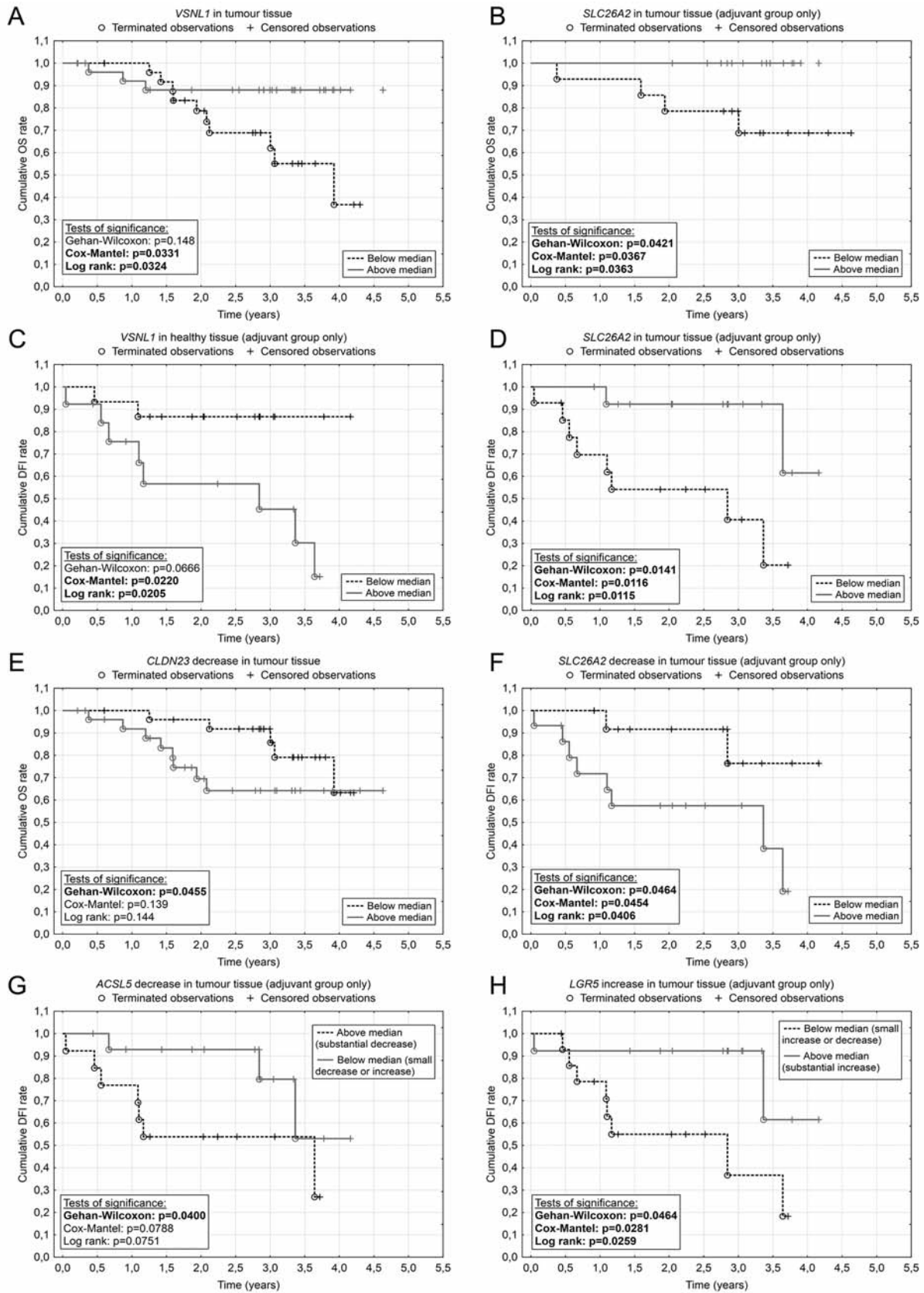
#### Impact of tumour location on candidate gene expression.

Patients were divided into two groups according to the location of the primary CRC and gene expression was analysed using the Mann-Whitney *U*-test. The groups did not exhibit any significant difference in candidate gene expression in tumour tissue, but we found differential expression of *MAPK1* ( $p=0.032$ ), *LGR5* ( $p=0.003$ ), *MIER3* ( $p=0.026$ ) and *CTHRC1* ( $p=0.042$ ) in healthy mucosa. All of these genes were expressed more highly in the group of patients with tumours localised in the colon. Regarding the difference in expression, we found a significant difference in *VCAN* expression change between patients with colon localisation (smaller increase) and those with rectosigmoid/rectum-localised tumours (greater increase) ( $p=0.031$ ).

## Discussion

The relationship between the change of gene expression and potential functional effects is not usually straightforward. In the following paragraphs, we briefly summarise present knowledge about the individual genes analyzed here and discuss our results with respect to current literature, focusing on possible explanations of the role of these expression changes on the clinical behaviour of colorectal tumours. Because of the heterogeneity of the selected genes, we discuss individual genes separately.

*VSNL1*. This gene encodes neuronal calcium sensor protein which can modulate the activity of adenylate cyclase (18) and





has been described to be a prognostic marker in Alzheimer's disease (19, 20). *VSNL1* is also considered to be a potentiator of invasiveness and inhibitor of proliferation of neuroblastoma cells (21), a tumour suppressor in non-small cell lung carcinomas (22), and an inhibitor of epithelial-to-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells (23).

In colon cancer, *VSNL1* was found to be down-regulated after selenomethionine-induced growth arrest of the colon cancer cell line HCT116 (24) and it was described to be a putative marker for identification of circulating tumour cells in peripheral blood (25). We did not observe the correlation of *VSNL1* overexpression with lymph node metastasis that was described earlier (26), but we confirmed overexpression of *VSNL1* in tumour tissue compared to healthy mucosa, and, more importantly, we found a relation between higher expression of *VSNL1* in tumour tissue and longer survival of patients, hence our results should support the possible function of *VSNL1* as tumour suppressor as reported for other types of tumour (22, 27). The opposite effect of *VSNL1* expression in healthy tissue on DFI is the subject of further investigation.

**VCAN.** Versican protein, encoded by the *VCAN* gene, is one of the major components of the extracellular matrix (ECM) with various functions in the regulation of cell migration (28), proliferation (29) and cell adhesion (30). *VCAN* was shown to play a role in many types of cancer, including gastric (28), pancreatic (31) and colorectal (32).

We found an up-regulation of *VCAN* mRNA in tumour, which is in agreement with previously described changes of expression on the protein level, which was accompanied by altered post-translation modifications (32, 33). The level of up-regulation found here was different depending on the tumour location (colon *versus* rectosigmoid/rectum).

**LGR5.** Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled

receptor 5 protein is a wingless-type MMTV integration site family (WNT) signaling target and a marker of intestinal (34) and liver stem cells (35). Expression of *LGR5* is increased in intestinal tumours, and can be found in cancer cells with stem cell properties (36, 37).

In our study, we observed an up-regulation of *LGR5* expression in tumour tissue, and a greater increase of expression in tumour tissue compared to healthy tissue correlated significantly with a longer DFI in adjuvantly treated patients, which is contradictory to previously published data, where overexpression in malignant tissue was shown to have adverse effects on disease outcome in CRC and other types of tumours (38, 39, 40). This finding needs to be further evaluated.

**CTHRC1.** *CTHRC1* exhibited the highest up-regulation in tumour tissue among the genes we analyzed. *CTHRC1* gene encodes a protein involved in vascular remodeling (41) and an expression change has been described in many types of solid tumours (42), including CRC (43). Recently, the expression status of *CTHRC1* was identified as being a predictor of poor prognosis in CRC patients (44). We confirmed the expression change, but we were not able to significantly prove the prognostic role of *CTHRC1* expression at a *p*-value below 0.05. Nevertheless, we identified a trend for shorter survival of patients with higher *CTHRC1* expression levels in tumour tissues.

**SLC26A2.** In mammals, there are 11 genes of the SLC26 family, which function as anion exchangers or channels. The main role of SLC26A2 is to transport  $\text{SO}_4^{2-}$  anions and its altered function was related to several types of chondrodysplasias (45).

Lower expression of *SLC26A2* was related to enhanced proliferation of colon cancer cells *in vitro* (46). A decrease of expression was also observed in bioptic samples (47), and we detected a severe down-regulation of *SLC26A2* in tumour tissue. Based on these data, we can conclude that *SLC26A2* down-regulation is also important for tumour propagation *in vivo*. The expression level of *SLC26A2* was associated with the decrease of OS and DFI in the adjuvantly treated group of patients. A probable effect of down-regulation of *SLC26A2* is disorganisation of the ECM by improper sulfation of ECM proteins, therefore helping tumour cells to migrate through the tissue.

**CLDN23.** This gene belongs to the claudin family of 24 genes encoding proteins with four transmembrane domains involved in formation of tight junctions among adjacent cells (48). *CLDN23* itself was described to be down-regulated in intestinal-type gastric cancer (49), but there are no studies focused on this gene in a larger set of patients with colon cancer.

←

Figure 2. Kaplan-Meier curves of statistically significant associations between gene expression and disease-free survival (DFI)/overall survival (OS). Relation of the gene expression in the tumour (TT) and healthy (HT) tissue to the DFI and OS (A-D). Relation of gene expression change to the DFI and OS (E-H). Patients were divided by the median of the expression change. In the case of *ACSL5*, one group consisted of patients with substantial decrease of *ACSL5* expression and the second group consisted of patients with slight decrease or increase of *ACSL5* expression. Similarly, for *LGR5*, we grouped patients with small increase or decrease of expression and compared them with patients with a substantial increase in *LGR5* mRNA. A: Visinin-like 1 (*VSNL1*); B: Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (*SLC26A2*); C: Visinin-like 1 (*VSNL1*); D: Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (*SLC26A2*); E: Claudin 23 (*CLDN23*); F: Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (*SLC26A2*); G: Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (*ACSL5*); H: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (*LGR5*).

In our set of patients, *CLDN23* was down-regulated in tumour tissue and we found that the level of down-regulation correlates with the OS: a smaller difference of *CLDN23* expression between tumour and normal tissue was associated with a better prognosis. This effect can be explained by the fact that for the migration of tumour cells, it is necessary to break the bonds between adjacent cells and strong down-regulation of tight junction proteins, including *CLDN23*, is one such crucial step in this process. Therefore, patients with very low *CLDN23* expression would be more prone to progression of CRC.

*ACSL5*. This gene encodes an enzyme implicated in lipid biosynthesis and fatty acid degradation. *ACSL5* down-regulation was associated with small intestine carcinoma (50), but *ACSL5* was found to be up-regulated in CRC by microarray analysis (51). In gliomas, it can be considered as a cancer survival factor (52). The function of *ACSL5* is probably dependent on the particular splice variant, since the full-length *ACSL5* is pro-apoptotic (53). Our analysis found *ACSL5* to be down-regulated in tumour tissue, and we also identified that the greater the decrease, the shorter the DFI observed in the adjuvantly-treated group of patients, assuming a protective function for *ACSL5*.

*DSTN*, *MIER3* and *MAPK1*. These three genes were found to be down-regulated in tumour tissues, but in our set of samples, we did not identify any correlation with clinical characteristics.

The product of the *DSTN* gene is the actin-binding protein destrin, also known as actin-depolymerizing factor, which has an important function in regulation of actin dynamics (54). Regarding the role of *DSTN* in cancer development and progression, there are several pieces of information about its role in membrane androgen receptor-induced apoptosis of prostate cancer cells (55), and its positive regulation of the migration of neuroblastoma cells (56); the down-regulation of *DSTN* also blocks migration and invasive capacity of gastric cancer (57). We found a slight down-regulation in tumour tissue, but this change did not correlate with any clinical parameter.

*MIER3* is a practically unresearched gene, but in 2012, it was shown that it probably plays a role in tumorigenesis because it was described as a candidate breast cancer susceptibility gene (58) and also a highly mutated gene in hypermutated colorectal tumours (59). Our data suggest down-regulation in CRC, but without strong correlations to clinical data.

Mitogen-activated protein kinase 1 is the final kinase in the MAPK pathway, which has a pleiotropic role like regulation of proliferation, differentiation and gene transcription (60). In CRC, down-regulation of *MAPK1* was shown in a previous study (61), as well as in our set of samples.

*CAPN10* and *SAMD3*. The function of sterile alpha motif domain-containing 3 is unknown; this gene was selected because of its possible up-regulation during CRC development (13). This gene is interesting regarding its observed interaction with Fanconi anemia, complementation group G (FANCG) (62), which plays a role in the maintenance of genomic integrity (63), but we did not observe any change of its expression. This was also the case with *CAPN10*, a member of the calcium activated cysteine proteases (64). Particular single nucleotide polymorphisms in the *CAPN10* gene were shown to be associated with type 2 diabetes mellitus (65), and another was also associated with CRC susceptibility (66).

## Conclusion

We have described significant expression changes of 10 studied genes in the CRC tissue compared to healthy mucosa. We also identified associations between different gene expressions and overall and disease-free survival, which could provide with useful information for disease prognosis and patient follow-up. We identified several putative positive prognostic factors, such as *ACSL5* and *CLDN23*, in tumour tissues. Our results will serve for the development of a disease risk scoring system based on the expression of these selected genes. This system will be validated and evaluated on a new group of patients with CRC. The most promising genes (mainly up-regulation of *SLC26A2* and down-regulation of *CLDN23* and *ACSL5*) will be further studied individually on a larger set of patients.

## Acknowledgements

The publication of this article was supported by grants IGA MZ CR 12025 and 14329, grant GAUK 12536, project CZ.1.05/2.1.00/03.0076 from the European Regional Development Fund and the Charles University Research Fund (project number P36). Study was approved by Institutional Review Board and Ethical Committee of Teaching Hospital and Medical Faculty in Pilsen number 421/2012.

## References

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917, 2010.
- 2 Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B and Starling N: Colorectal cancer. *Lancet* 375(9719): 1030-1047, 2010.
- 3 Armaghany T, Wilson JD, Chu Q and Mills G: Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 5: 19-27, 2012.
- 4 Aparo S and Goel S: Evolvement of the treatment paradigm for metastatic colon cancer. From chemotherapy to targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 83(1): 47-58, 2012.

- 5 Ng K and Zhu AX: Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 65: 8-20, 2008.
- 6 Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F and Laurent-Puig P: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66: 3992-3995, 2006.
- 7 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I and Van Cutsem E: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-345, 2004.
- 8 Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, Ciardiello F and Tejpar S: EGFR-targeted therapy. *Exp Cell Res* 317: 2765-2771, 2011.
- 9 De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M and Tejpar S: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11: 753-762, 2010.
- 10 Grossmann AH and Samowitz WS: Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med* 135: 1278-1282, 2011.
- 11 Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I and Kerr D: Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 489-499, 2009.
- 12 Braun MS, Richman SD, Quirke P, Daly C, Adlard JW, Elliott F, Barrett JH, Selby P, Meade AM, Stephens RJ, Parmar MK and Seymour MT: Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: Results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 26(16): 2690-2698, 2008.
- 13 Kleivi K, Lind GE, Diep CB, Meling GI, Brandal LT, Nesland JM, Myklebost O, Rognum TO, Giercksky KE, Skotheim RI and Lothe RA: Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatous. *Mol Cancer* 6: 2, 2007.
- 14 Kwong KY, Bloom GC, Yang I, Boulware D, Coppola D, Haseman J, Chen E, McGrath A, Makusky AJ, Taylor J, Steiner S, Zhou J, Yeatman TJ and Quackenbush J: Synchronous global assessment of gene and protein expression in colorectal cancer progression. *Genomics* 2: 142-158, 2005.
- 15 Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka P and Soucek P: The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 2: 187-96, 2012.
- 16 Rozen S and Skaletsky HJ: Primer3. 1998. Code available at [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
- 17 Liska V, Holubec L Jr, Treska V, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Pesta M, Finek J, Rousarova M and Topolcan O: Dynamics of serum levels of tumour markers and prognosis of recurrence and survival after liver surgery for colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 27(4C): 2861-2864, 2007.
- 18 Braunevel KH, Spilker C, Behnisch T and Gundelfinger ED: The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: Amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem* 68(5): 2129-39, 1997.
- 19 Braunevel KH: The visinin-like proteins VILIP-1 and VILIP-3 in Alzheimer's disease – old wine in new bottles. *Front Mol Neurosci* 5: 20, 2012.
- 20 Tarawneh R, D'Angelo G, Macy E, Xiong C, Carter D, Cairns NJ, Fagan AM, Head D, Mintun MA, Ladenson JH, Lee JM, Morris JC and Holtzman DM: Visinin-like protein-1: diagnostic and prognostic biomarker in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 70(2): 274-285, 2011.
- 21 Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W, Miao X, Yuan Z, Wang H, Tam PK and Ren Y: Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis* 28(10): 2122-2130, 2007.
- 22 Fu J, Fong K, Bellacosa A, Ross E, Apostolou S, Bassi DE, Jin F, Zhang J, Cairns P, Ibañez de Caceres I, Braunevel KH and Klein-Szanto AJ: VILIP-1 down-regulation in non-small cell lung carcinomas: Mechanisms and prediction of survival. *PLoS One* 3(2): e1698, 2008.
- 23 Schönrrath K, Klein-Szanto AJ and Braunevel KH: The putative tumour suppressor VILIP-1 counteracts epidermal growth factor-induced epidermal-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells. *PLoS One* 7(3): e33116, 2012.
- 24 Goulet AC, Watts G, Lord JL and Nelson MA: Profiling of selenomethionine responsive genes in colon cancer by microarray analysis. *Cancer Biol Ther* 6(4): 494-503, 2007.
- 25 Findeisen P, Röckel M, Nees M, Röder C, Kienle P, Von Knebel Doeberitz M, Kalthoff H and Neumaier M: Systematic identification and validation of candidate genes for detection of circulating tumour cells in peripheral blood specimens of colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 33(5): 1001-1010, 2008.
- 26 Akagi T, Hijiya N, Inomata M, Shiraishi N, Moriyama M and Kitano S: Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 131(6): 1307-1317, 2012.
- 27 Fu J, Jin F, Zhang J, Fong K, Bassi DE, Lopez De Cicco R, Ramaraju D, Braunevel KH, Conti C, Benavides F and Klein-Szanto AJ: VILIP-1 expression *in vivo* results in decreased mouse skin keratinocyte proliferation and tumour development. *PLoS One* 5(4): e10196, 2010.
- 28 Zhang Z, Zhang J, Miao L, Liu K, Yang S, Pan C and Jiao B: Interleukin-11 promotes the progress of gastric carcinoma *via* abnormally expressed versican. *Int J Biol Sci* 8(3): 383-393, 2012.
- 29 Miquel-Serra L, Serra M, Hernández D, Domenzain C, Docampo MJ, Rabanal RM, de Torres I, Wight TN, Fabra A and Bassols A: V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumour growth and metastasis. *Lab Invest* 86(9): 889-901, 2006.
- 30 Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT and Wight TN: Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol* 31(2): 90-100, 2012.
- 31 Skandalis SS, Kletsas D, Kyriakopoulou D, Stavropoulos M and Theocharis DA: The greatly increased amounts of accumulated versican and decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* 1760(8): 1217-1225, 2006.

- 32 Tsara ME, Theocharis AD and Theocharis DA: Compositional and structural alterations of proteoglycans in human rectum carcinoma with special reference to versican and decorin. *Anticancer Res* 22(5): 2893-2898, 2002.
- 33 Theocharis AD: Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. *Biochim Biophys Acta* 1588(2): 165-172, 2002.
- 34 Becker L, Huang Q and Mashimo H: Immunostaining of LGR5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *Sci World J* 8: 1168-1176, 2008.
- 35 Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M and Clevers H: *In vitro* expansion of single Lgr5<sup>+</sup> liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494(7436): 247-250, 2013.
- 36 Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y and Sakamoto M: Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci* 101(7): 1731-1737, 2010.
- 37 Kleist B, Xu L, Li G and Kersten C: Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 4(4): 327-335, 2011.
- 38 Nakata S, Campos B, Bageritz J, Bermejo JL, Becker N, Engel F, Acker T, Momma S, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B and Goidts V: LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathol* 23(1): 60-72, 2013.
- 39 Simon E, Petke D, Böger C, Behrens HM, Warneke V, Ebert M and Röcken C: The spatial distribution of LGR5<sup>+</sup> cells correlates with gastric cancer progression. *PLoS One* 7(4): e35486, 2012.
- 40 Wu XS, Xi HQ and Chen L: LGR5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J Surg Oncol* 10: 244, 2012.
- 41 Pyagay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE and Lindner V: Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res* 96(2): 261-268, 2005.
- 42 Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G and Zhou Y: Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* 12(12): 3716-3722, 2006.
- 43 Palma M, Lopez L, García M, de Roja N, Ruiz T, García J, Rosell E, Vela C, Rueda P and Rodriguez MJ: Detection of collagen triple helix repeat containing-1 and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 in colorectal cancer. *BMC Clin Pathol* 12: 2, 2012.
- 44 Tan F, Liu F, Liu H, Hu Y, Liu D and Li G: CTHRC1 is associated with peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer: A new predictor for prognosis. *Med Oncol* 30(1): 473, 2013.
- 45 Alper SL and Sharma AK: The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol Aspects Med* 34(2-3): 494-515, 2013.
- 46 Yusa A, Miyazaki K, Kimura N, Izawa M and Kannagi R: Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene *DTDST* induces sialyl Lewis x expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res* 70(10): 4064-4073, 2010.
- 47 Galamb O, Sipos F, Solymosi N, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Tulassay Z and Molnár B: Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign, and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(10): 2835-2845, 2008.
- 48 Lal-Nag M and Morin PJ: The claudins. *Genome Biol* 10(8): 235, 2009.
- 49 Katoh M and Katoh M: *CLDN23* gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of the CLAUDIN gene family. *Int J Mol Med* 11(6): 683-689, 2003.
- 50 Gassler N, Schneider A, Kopitz J, Schnölzer M, Obermüller N, Kartenbeck J, Otto HF and Autschbach F: Impaired expression of acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumours of the small intestine. *Hum Pathol* 34(10): 1048-1052, 2003.
- 51 Yeh CS, Wang JY, Cheng TL, Juan CH, Wu CH and Lin SR: Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by microarray-bioinformatics analysis. *Cancer Lett* 233(2): 297-308, 2006.
- 52 Mashima T, Sato S, Okabe S, Miyata S, Matsuura M, Sugimoto Y, Tsuruo T and Seimiya H: Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci* 100(8): 1556-1562, 2009.
- 53 Gassler N, Roth W, Funke B, Schneider A, Herzog F, Tischendorf JJ, Grund K, Penzel R, Bravo IG, Mariadason J, Ehemann V, Sykora J, Haas TL, Walczak H, Ganten T, Zentgraf H, Erb P, Alonso A, Autschbach F, Schirmacher P, Knüchel R and Kopitz J: Regulation of enterocyte apoptosis by acyl-CoA synthetase 5 splicing. *Gastroenterology* 133(2): 587-598, 2007.
- 54 Bamberg JR and Wiggan OP: ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 12(12): 598-605, 2002.
- 55 Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A and Stournaras C: RHO/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 314(17): 3162-3174, 2008.
- 56 Lefranc F, Sauvage S, Van Goietsenoven G, Mégalizzi V, Lamoral-Theys D, Debeir O, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Mathieu V, Decaestecker C and Kiss R: Narciclasine, a plant growth modulator, activates RHO and stress fibers in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 8(7): 1739-1750, 2009.
- 57 Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TC, Go MY, Tao Q, Chang Z and Sung JJ: Zinc-finger protein 331, a novel putative tumour suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene* 32(3): 307-317, 2013.
- 58 denDekker AD, Xu X, Vaughn MD, Puckett AH, Gardner LL, Lambring CJ, Deschenes L and Samuelson DJ: Rat *Mcs1b* is concordant to the genome-wide association-identified breast cancer risk locus at human 5q11.2 and *MIER3* is a candidate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 72(22): 6002-6012, 2012.
- 59 Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407): 330-337, 2012.
- 60 Zassadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C and Cassinat B: Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell Signal* 24(12): 2369-2377, 2012.
- 61 Wang Q, Ding Q, Dong Z, Ehlers RA and Evers BM: Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer Res* 20(1A): 75-83, 2000.



- 62 Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP and Vidal M: Towards a proteome-scale map of the human protein - protein interaction network. *Nature* 437(7062): 1173-1178, 2005.
- 63 Fei P, Yin J and Wang W: New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle* 4(1): 80-86, 2005.
- 64 Ono Y and Sorimachi H: Calpains: An elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta* 1824(1): 224-236, 2012.
- 65 Harris F, Biswas S, Singh J, Dennison S and Phoenix DA: Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 1084: 452-480, 2006.
- 66 Frances CP, Conde MC, Saez ME, Diez SF, Rey CM, Ramirez-Armengol JA, Pascual MH, Gonzalez-Perez A, Torres PP, Real LM, Serrano-Rios M, López JL, Ruiz A and Royo JL: Identification of a protective haplogenotype within CAPN10 gene influencing colorectal cancer susceptibility. *J Gastroenterol Hepatol* 22(12): 2298-2302, 2007.

*Received August 25, 2013*

*Revised September 25, 2013*

*Accepted September 27, 2013*

HLAVATÁ, I., B. MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, R. VÁCLAVÍKOVÁ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, L. HOLUBEC, V. TŘEŠKA, P. VODIČKA a P. SOUČEK. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187-196 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1093/mutage/ger075. ISSN 0267-8357. IF 3,983.

# The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer

I. Hlavata<sup>1,2</sup>, B. Mohelnikova-Duchonova<sup>1</sup>,  
R. Vaclavikova<sup>1</sup>, V. Liska<sup>3</sup>, P. Pitule<sup>3</sup>, P. Novak<sup>3</sup>, J. Bruha<sup>3</sup>,  
O. Vycital<sup>3</sup>, L. Holubec<sup>4</sup>, V. Treska<sup>3</sup>, P. Vodicka<sup>5</sup> and  
P. Soucek<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic, <sup>2</sup>Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, Prague 10, 100 00 Czech Republic, <sup>3</sup>Department of Surgery, <sup>4</sup>Department of Oncology, Teaching Hospital and Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Alej svobody 80, Pilsen, 304 00, Czech Republic, <sup>5</sup>Department of the Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science, Videnska 1083, Prague 4, 142 20 Czech Republic

\*To whom correspondence should be addressed. Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic. Tel: +420 267082711; Fax: +420 267311236; Email: psoucek@szu.cz

Received on August 3, 2011; revised on September 23, 2011; accepted on September 27, 2011

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with the highest mortality rates occurring in Central Europe. The use of chemotherapy to treat CRC is limited by the inter-individual variability in drug response and the development of cancer cell resistance. ATP-binding cassette (ABC) transporters play a crucial role in the development of resistance by the efflux of anticancer agents outside of cancer cells. The aim of this study was to explore transcript levels of all human ABCs in tumours and non-neoplastic control tissues from CRC patients collected before the first line of treatment by 5-fluorouracil (5-FU)-containing regimen. The prognostic potential of ABCs was evaluated by the correlation of transcript levels with clinical factors. Relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy efficacy were also addressed. The transcript profile of all known human ABCs was assessed using real-time polymerase chain reaction with a relative standard curve. The majority of the studied ABCs were down-regulated or unchanged between tumours and control tissues. ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues. Transcript levels of ABCA12, ABCC7 and ABCC8 increased in direction from colon to rectum. Additionally, transcript levels of ABCB9, ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the reverse significant trend, i.e. a decrease in direction from colon to rectum. The transcript level of ABCC10 in tumours correlated with the grade ( $P = 0.01$ ). Transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 were significantly lower in non-responders to palliative chemotherapy in comparison with responders. The disease-free interval of patients treated by adjuvant chemotherapy was significantly shorter in patients with low transcript levels of ABCA7, ABCA13, ABCB4, ABCC11 and ABCD4. In conclusion, ABCC11 may be a promising candidate marker for a validation study on 5-FU therapy outcome.

## Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with an estimated 1 233 700 newly diagnosed cases and 608 700 deaths/year in 2008. For this type, Central Europe has repeatedly recorded the highest mortality rates (1).

Although inherited susceptibility underlies roughly 35% of variance in CRC risk (2), germ line mutations in genes with high penetrance account for <6% of cases (3). There is growing evidence that lifestyle and environmental factors contribute to the CRC development (4).

Systemic chemotherapy is an important component of the complex treatment of CRC, with regimens based on 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan and/or oxaliplatin used as standard. These drugs are often used in combination with biological therapy in patients with advanced disease. Generally, the use of chemotherapy to treat cancers is limited by the inter-individual variability in drug response and the development of cancer cell resistance. Xenobiotics, including anticancer drugs, are extensively metabolised in the body by Phase I (activation enzymes, e.g. cytochromes P450) and Phase II (conjugation enzymes as glutathione *S*-transferases, GSTs, or glucuronide transferases, UGTs) enzymes. Phase III of biotransformation represented by ATP-binding cassette (ABC) transporters presents another important component of xenobiotic metabolism (5). ABC transporters play a crucial role in the development of resistance by the efflux of anticancer agents outside of cancer cells (6). In fact, the expression of ABCs may significantly vary among individuals and thus affects the efficacy of drug treatment (7).

The human ABC transporters are encoded by a large transporter gene superfamily, which is composed of 49 members grouped into seven subfamilies (A–G) according to the sequence homology. ABC proteins facilitate translocation of heterogeneous substrates including metabolic products, lipids and sterols, peptides and proteins, saccharides, amino acids, inorganic and organic ions, metals and drugs across the cell membrane. To transport these substrates across extracellular and intracellular membranes against a concentration gradient, ABCs use energy acquired by the hydrolysis of ATP (8). Genetic variation in these genes causes a variety of genetic diseases and disorders (9). The structure of ABC transporters consists of two types of domains: ATP-binding domains, also known as nucleotide-binding folds (NBFs) and transmembrane domains (TMDs). The NBFs contain typical motifs: Walker A and Walker B and so-called ABC-signature sequence. The TMDs are formed by 6–11 alpha helices and provide the substrate specificity (10). Although all share a similar NBF, their domains are organised in different ways, with different numbers and localisations of TMDs (11). Some of the ABCs behave as full transporters with two TMDs, each with six transmembrane segments, and two NBFs. Others are half transporters with only one TMD and become functional after dimerisation or oligomerisation (12).



The ABCA subfamily contains 12 members acting as full transporters (13; supplementary Table IS, available at *Mutagenesis* Online). ABCA5 mRNA was detected in poorly differentiated colon adenocarcinoma cell lines G-112 but not in normal colon. In contrast, ABCA2 mRNA was detected in well-differentiated colon adenocarcinoma cell lines CX-1. Thus, induction of ABCA5 may correlate with the differentiation status of human colon tumours and contribute to the tumour development (14).

The ABCB subfamily consists of 11 members (supplementary Table IIS, available at *Mutagenesis* Online). Four of them are full transporters (ABCB1, ABCB4, ABCB5 and ABCB11) and the rest is composed of half transporters. P-glycoprotein, a product of *ABCB1* gene, is localised in epithelial cells of the small and large intestine as a part of the barrier that protects cells against xenobiotics from diet, bacterial toxins, drugs and other biologically active compounds (15). ABCB1 confers MDR phenotype to cancer cells (16). ABCB1 substrates are generally amphipathic lipid-soluble compounds including anticancer drugs as *vinca* alkaloids, anthracyclines, taxanes, epipodophyllotoxins, camptothecins or anthracenes (17). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ABCB1* have been shown to influence its phenotype (expression, protein function and drug response) in context with numerous diseases [(11,18,19); supplementary Table VS, available at *Mutagenesis* Online]. ABCB1 is highly expressed in the apical membrane of enterocytes, where it pumps xenobiotics back into the intestinal lumen. No relationship was seen between ABCB1 protein expression, genotype and long-term prognosis of patients treated by 5-FU and leucovorin (20). Hypoxia is generally associated with chemoresistance. Ding *et al.* (21) suggested that hypoxia induced the expression of hypoxia-inducible factor, alpha subunit and ABCB1 in colon carcinoma. Complementary DNA (cDNA) microarray analysis of cell sublines derived from K562 leukaemia, MCF7 breast cancer and S1-colon cancer with acquired resistance against daunorubicin, doxorubicin, vincristine, etoposide and mitoxantrone has shown that ABCB1, ABCB4 and ABCG2 were up-regulated in several resistant sublines (22). ABCB2 and ABCB3 expressions were significantly associated with major histocompatibility complex class I antigen (MHC1) expression in 336 sporadic CRC tumours examined by immunohistochemistry. Thus, the expression of key components of the antigen-processing machinery represented by ABCB2 and ABCB3 is linked with the density of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), which are positive prognostic factors in CRC *in vivo* (23).

The ABCC family contains 13 members; nine of them are the multidrug resistance-associated proteins (MRPs; ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11 and ABCC12, supplementary Table IIIS, available at *Mutagenesis* Online). *In vitro* ABCC transporters can collectively confer resistance to anticancer drugs and their conjugated metabolites, platinum compounds, folate antimetabolites, nucleoside and nucleotide analogues (24). ABCC1 and ABCC2 have been shown to act synergistically with several Phase II enzymes including GSTs and UGTs and this synergy conferred resistance to several drugs (25,26). ABCC1 exports drug conjugates with glutathione and unconjugated drugs together with free glutathione (17). By contrast, ABCC2 transports a wide range of unconjugated organic anions, including e.g. methotrexate, irinotecan or ampicillin (27). ABCC2 haplotype predicted variability in

pharmacokinetics of irinotecan in Japanese metastatic CRC patients treated by FOLFIRI (regimen containing 5-FU and irinotecan) (28). mRNA expression of ABCC2 was significantly associated with resistance to cisplatin but not 5-FU (29). 5-FU significantly suppressed ATP7B and the organic cation transporter SLC22A2 and increased ABCC2 mRNA expression (5.8-fold) in human cells from colon adenocarcinoma (LS180). Overexpression of ABCC2, ABCC3 and ABCG2 was demonstrated to be beneficial for the efficacy of oxaliplatin in Madin-Darby canine kidney II cells (MDCKII). Thus, the authors predicted that the modulation of expression of transporters of both drugs could favour the synergic action of the FOLFOX (5-FU/leucovorin/oxaliplatin) combination (30). ABCC5 protein confers resistance to 5-FU by the efflux of monophosphate metabolites. The overexpression of ABCC5 in CRC may contribute to the resistance to 5-FU (31). In cell lines, celecoxib induced ABCC4 and ABCC5 expression at both mRNA and protein levels, but no induction of ABCC1 and ABCC2 was found. This observation suggested that the low response rate observed in clinical trials using combinations of celecoxib with 5-FU or irinotecan may reflex celecoxib-mediated induction of efflux of drugs from cancer cells through the up-regulation of ABCs (32). Interestingly, patients treated with oxaliplatin- and 5-FU-based regimen for metastatic CRC ( $n = 40$ ) had a significantly shorter progression-free survival in the case where their circulating tumour cells (CTCs) expressed alcohol dehydrogenase (ALDH) 1, survivin and ABCC5. Thus, detection of survivin+/ABCC5+ CTCs from peripheral blood may help in identifying metastatic CRC patients resistant to standard oxaliplatin- and/or 5-FU-based regimen (33). ABCC11 shares the highest structural similarity with ABCC4 and ABCC5. ABCC11 was also shown to confer resistance to 5-FU and certain fluoropyrimidines (supplementary Table IIIS, available at *Mutagenesis* Online). The rs17822931 SNP in *ABCC11* affects enzyme function that determines earwax type (34).

The ABCD subfamily consists of four half transporters localised in peroxisomes, providing thus peroxisomal transport of long-chain fatty acids (supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). ABCE and ABCF subfamilies contain genes that are clearly derived from ABC transporters and have ATP-binding domains but not TMDs (35, supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). There are currently no data available on the role of ABCD and ABCF subfamilies in CRC.

The six known members of ABCG subfamily are half transporters that have a reversed structure. N-terminus contains NBF and TMD is at the C-terminus (supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). ABCG2 is a multidrug resistance enzyme that can export both unmodified drugs and drug conjugates, including mitoxantrone, bisantrene, epipodophyllotoxins (e.g. etoposide), camptothecins (topotecan and irinotecan) or flavopiridol (17). Patients harbouring the -19572 to 19569delCTCA mutation in *ABCG2* had a significantly lower relative extent of conversion of irinotecan to its SN-38 metabolite than patients carrying the ancestral genotype without this deletion ( $P = 0.019$ ; 36). Dietrich *et al.* (37) examined 29 colon adenomas from 21 patients and 8 adenomas from C57BL/6 *Apc*<sup>Min/+</sup> mice. ABCG2 protein was significantly down-regulated in both human and mice colon adenomas. ABCG2 confers resistance to a narrower range of anticancer agents than ABCB1 and ABCC1 or ABCC2, e.g. anthracyclines, mitoxantrone and irinotecan. ABCG2 transports the glucuronide conjugate of SN-38, the active metabolite of irinotecan, but with ~7-fold lower affinity than unconjugated



SN-38 (38). Dye-efflux effective side population (SP) of SW480 colon cancer cells has shown a higher resistance to 5-FU and irinotecan, higher ABCB1 and ABCG2 expressions and activation of the Wnt signalling pathway when compared to non-SP containing cells. Silencing the Wnt signalling pathway may thus present a promising strategy for targeting chemotherapy-resistant CRC cells (39). The ABCG5 and ABCG8 form heterodimers and overexpression of putative stem cell marker EpCAM with ABCG5 within the buds of colorectal tumours is frequently observed and associated with poor prognosis (40).

The current state of knowledge shows that ABCs are functionally important for anticancer drug disposition and efficacy. However, apart from functional data obtained using cell and animal models, there is a limited amount of information on the importance of ABCs for the prognosis of individual patients and the prediction of the chemotherapy outcome. Some of the published studies in patients suggested that ABCs may influence not only cancer initiation but also its progression, invasion and metastasis. The aim of our study is to: (i) explore transcript levels of ABCs in tumour and control tissues from CRC patients treated by substrates of ABCs, (ii) evaluate prognostic potential of ABCs by the correlation of transcript levels with clinical factors such as tumour size, lymphatic node involvement and grading and (iii) elucidate relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy efficacy. In our pilot study presented here, we have addressed these points in a complex way by an assessment of the transcript profile of all known human ABCs. This is because some of the drugs under study are transported by numerous and in some cases unknown transporters. The selection and validation of candidate genetic markers identified in the pilot study are the final goal of our current research.

## Materials and methods

### Materials

Phenol, chloroform, agarose and chemicals for preparation of buffers were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) for polymerase chain reaction (PCR), molecular weight standard for electrophoresis  $\Phi$ X174DNA-HaeIII digest and Lambda DNA EcoRI + HindIII Marker were products of New England Biolabs Inc (Ipswich, MA, USA) and Fermentas Inc (Vilnius, Lithuania), respectively. Taq-Purple DNA polymerase and Combi PPP Master Mix for PCR were supplied by Top-Bio s.r.o. (Prague, Czech Republic).

### Subjects

Tissue samples of primary tumour of human colorectal carcinoma and paired distant unaffected mucosa were collected from CRC patients diagnosed and treated at the Departments of Surgery and Oncology, at the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen and Charles University in Prague, both in the Czech Republic during the period 2008–10. Native tissue samples were taken during surgery, macrodissected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until total RNA isolation. The control mucosa samples were taken from the macroscopically unaffected resection margins of colon tissues. The resection margins were microscopically evaluated and only samples free of malignant cells were further analysed. Corresponding tumour tissue samples were verified by the experienced pathologist. Only histologically verified patients and their samples were included in this study. The following data on patients were retrieved from medical records: age, gender, date of diagnosis, pTNM stage according to Union for International Cancer Control (41), histological type and grade of the tumour, type of chemotherapy and treatment response.

The following eligibility criteria were applied to the recruitment of patients into the study: (i) patients who were subject to surgery for CRC, (ii) no prior chemotherapy before surgery (in order to eliminate its influence on transcript levels), (iii) patients who received only first-line chemotherapy in either palliative (Group A) or adjuvant (Group B) setting and (iv) patients who received regimens based on 5-FU, leucovorin and/or oxaliplatin, e.g. FOLFOX.

Response to the treatment was evaluated by Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) criteria (42) based on routinely used imaging techniques for assessment of tumour mass (by computer tomography, with or without positron emission tomography, magnetic resonance or ultrasonography).

Increase in tumour mass or the appearance of new lesions in patients with palliative treatment (Group A) indicated progression and thus no response to the treatment. Response to the treatment was defined as a decrease of the number or volume of metastases or stabilisation of the disease.

In patients treated by adjuvant therapy after radical surgical resection R0 (Group B), disease-free interval (DFI) served as the treatment outcome for analyses. DFI was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection and disease recurrence. CRC patients treated by 5-FU and/or oxaliplatin were monitored for adverse symptoms of treatment and toxicity was scored according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, Version 2, during the whole period of treatment. Grade 3 or 4 toxicity was followed as an important factor of toxicity of the administered regimens.

All patients were informed about the study aims, methods and potential risks and signed consensually an informed consent form in agreement with the requirements of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic.

### Isolation of total RNA and cDNA preparation

Methods were published (19,43) and are presented in the supplementary Material, available at *Mutagenesis* Online.

### Quantitative real-time PCR

The diluted amplified cDNA was used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) by the relative standard curve method performed in 7500 and ViiA7 Real-Time PCR System using TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies). The following criteria were applied to the selection of TaqMan Gene Expression Assays: (i) exon–exon boundaries span where possible, in order to minimise signals from traces of contaminating DNA, (ii) as short as possible amplicons and (iii) location near to 3'-end of the transcript to reduce possible influence of RNA quality on qRT-PCR. The list of reference genes, genes of interest and respective assays is given in supplementary Table VIS, available at *Mutagenesis* Online. Cycling parameters of qRT-PCR were initial hold at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min and initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 sec and annealing at  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 sec (except ABCC9, ABCG4 and ABCG5 where  $90^{\circ}\text{C}$  for 90 sec and ABCB1 where  $58^{\circ}\text{C}$  for 90 sec were used). Each reaction contained 2.5  $\mu\text{l}$  of 20 times diluted preamplified cDNA, 5  $\mu\text{l}$  of TaqMan Gene Expression Master Mix and 0.5  $\mu\text{l}$  of TaqMan Gene Expression Assay in a final reaction volume of 10  $\mu\text{l}$ . Fluorescence was acquired after each extension step. Each sample was assessed in duplicate and the mean value was used for further analyses. Samples with  $>15\%$  variation between duplicates were reanalysed. The non-template control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. One sample of normal colon mucosa was used as calibrator for preparation of standard curves for each gene to assess reaction efficiency. For the real-time PCR reactions, preamplified cDNA of the calibrator diluted 1:4 was used as the highest template concentration point for construction of the standard curve. The rest of the standard curve points were prepared by five subsequent serial five times dilutions. The resulting standard curve was used for calculation of PCR efficiency ( $E$ ) according to the following formula:  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$  (supplementary Table VIS, available at *Mutagenesis* Online). Reference genes were selected on the basis of our pilot study, where the TaqMan Array Plates (Life Technologies) were used to compare the stability of 24 different potential reference genes chosen from the literature in a set of 10 pairs of human CRC tumours and distant unaffected mucosa samples. Stability of reference genes was analysed by geNorm version 3.5 of March 2007 (44) and NormFinder version 19 of June 2009 (45) software programs. According to both programs, EIF2B1, MRPL19, PSMC4, POLR2A, PPIA and HPRT1 were selected as the most stable genes for normalisation of transcript levels of target genes. The qRT-PCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; 46).

### Statistical analyses

Transcript levels were analysed by 7500 and ViiA7 System Software. Acquired average  $C_T$  values were further processed by relative expression software tool (REST) 2009 Software (47; Qiagen, Hildenheim, Germany). REST is routinely used for the determination of differences between different types of sample and control groups and considers both normalisation to numerous reference genes and reaction efficiency. For statistical analyses of correlation of transcript levels of all established genes with clinical data, the non-parametric tests as Mann–Whitney, Kruskal–Wallis and Spearman rank tests were used according to the



distribution of data. The mean, median, SD, variance, minimum, maximum, quantiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in the given groups and subgroups. The relations between the parameters were computed by Spearman correlation coefficient. The DFI analyses were performed by Kaplan–Meier Survival estimates and Cox regression hazard model. In the first step, each of the investigated covariates were divided into four groups using quartiles of the investigated variable. For these groups, the Kaplan–Meier survival functions were computed. All possible cut-offs were tested and the ‘optimal cut-off’ was defined as the highest statistical significance in Kaplan–Meier (log-rank test). For these cut-offs, the hazard ratios (HRs) were then computed. In order to reduce the chance of Type I and II errors, only the cut-offs, where the DFI divided by quartiles had a similar direction to the DFI, were used. *P*-values are always departures from two-sided tests. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses of clinical data were performed using SPSS v15.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## Results

Fifty-one patients meeting the eligibility criteria were recruited into the study (26 patients in the palliative Group A and 25 patients in the adjuvant Group B). The clinical and pathological characteristics of the patients are listed in Table I. Patients in both groups did not significantly differ in terms of gender, age at diagnosis, tumour size, lymph node involvement and grading. On the other hand, patients significantly differed in metastatic spread of the disease (all patients in the palliative group were M1 versus M0 in all adjuvant patients) and subsequent treatment (the palliative group was treated predominantly by more aggressive FOLFOX regimen). Tumour localisation also significantly differed between both groups (rectum prevailed in the palliative group versus adjuvant group,

*P* = 0.008). The median of follow-up was 20 months. Neither the median overall survival nor the median DFI was reached. Therefore, the importance of transcript levels of ABCs for overall survival was not evaluated. DFI was evaluated as a measure of short-term survival; 72% of censors occurred in the course of follow-up.

### *Differences in transcript levels of ABCs between tumour and control tissues*

A large number of ABC transcripts were down-regulated in tumour versus control mucosa tissues (REST 2009 software, Table II). Among these, ABCA1, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11, ABCC3, ABCC5, ABCC6, ABCC7, ABCC8, ABCC13, ABCD2, ABCD3, ABCD4, ABCG1 and ABCG2 transcripts were down-regulated at a very high level of significance (*P* ≤ 0.001). Contrastingly, ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues to a high extent (Table II). The remaining ABCs did not show significant deregulation in compared tissues. Transcript level of ABCC12 was below the limit of detection in all samples.

### *Correlations between transcript levels of ABCs in tissues and clinical data*

Relative transcript levels of ABCs were first normalised to six reference genes. Average *C<sub>T</sub>* value of EIF2B1, MRPL19, PSMC4, POLR2A, PPIA and HPRT1 transcript levels was calculated for each sample and designated as ENDO value.

**Table I.** Clinical characteristics of studied groups

	Group A (palliative), <i>n</i> = 26	Group B (adjuvant), <i>n</i> = 25	<i>P</i> <sup>a</sup>
Gender (males/females)	19/7	16/9	0.555 (Fisher's exact test)
Age at diagnosis (years), median ± SD	64.5 ± 9.7	63.0 ± 8.5	0.676 (ANOVA)
Tumour size (T)			0.798
T2	2	2	
T3	19	20	
T4	5	4	
Lymphnodes involvement (N)			0.856
N0	7	7	
N1	11	11	
N2	8	7	
M classification			<0.001
M0	0	25	
M1	26	0	
Grade			0.361
G1	4	2	
G2	21	18	
G3	1	5	
Primary tumour localisation			0.008
Colon	8	17	
Rectosigmoideum	6	6	
Rectum	12	2	
Chemotherapy			0.006 (Fisher's exact test)
5-FU ± leucovorin <sup>b</sup>	6	12	
FOLFOX	20 <sup>c</sup>	13	
Grade 3 or 4 toxicity	1	3	
Post-operative radiotherapy	3	4	0.477
Chemotherapy outcome			NA
Responders/non-responders	13/13	NA	
Relapse/remission	NA	7/18	

#### Footnotes:

<sup>a</sup>Analysed by Pearson chi-square test. The use of Fisher's exact test or analysis of variance (ANOVA) is specified in brackets; NA—not applicable.

<sup>b</sup>Ten patients received deGrammonte regimen, six patients received Xeloda (capecitabine) and four patients received 5-FU and leucovorin (FUFA) combination.

<sup>c</sup>Twelve patients also received Avastin in combination. Significant differences between groups in bold.

**Table II.** Differences in transcript levels of ABCs between tumour and control tissues

Gene	All patients, <i>n</i> = 51 <sup>a</sup>	Tumour versus control
ABCA1	0.001	Down-regulation
ABCA2	NS	No change
ABCA3	0.017	Down-regulation
ABCA4	0.001	Down-regulation
ABCA5	<0.001	Down-regulation
ABCA6	<0.001	Down-regulation
ABCA7	NS	No change
ABCA8	<0.001	Down-regulation
ABCA9	<0.001	Down-regulation
ABCA10	<0.001	Down-regulation
ABCA12	<0.001	Up-regulation
ABCA13	0.002	Up-regulation
ABCB1	<0.001	Down-regulation
ABCB2	NS	No change
ABCB3	NS	No change
ABCB4	<0.001	Down-regulation
ABCB5	<0.001	Down-regulation
ABCB6	0.004	Up-regulation
ABCB7	NS	No change
ABCB8	NS	No change
ABCB9	NS	No change
ABCB10	0.003	Down-regulation
ABCB11	<0.001	Down-regulation
ABCC1	<0.001	Up-regulation
ABCC2	0.001	Up-regulation
ABCC3	<0.001	Down-regulation
ABCC4	0.008	Down-regulation
ABCC5	<0.001	Down-regulation
ABCC6	<0.001	Down-regulation
ABCC7	0.001	Down-regulation
ABCC8	<0.001	Down-regulation
ABCC9	NS	No change
ABCC10	NS	No change
ABCC11	NS	No change
ABCC13	<0.001	Down-regulation
ABCD1	NS	No change
ABCD2	<0.001	Down-regulation
ABCD3	<0.001	Down-regulation
ABCD4	<0.001	Down-regulation
ABCE1	<0.001	Up-regulation
ABCF1	NS	No change
ABCF2	NS	No change
ABCF3	NS	No change
ABCG1	<0.001	Down-regulation
ABCG2	<0.001	Down-regulation
ABCG4	NS	No change
ABCG5	NS	No change
ABCG8	NS	No change

<sup>a</sup>Significantly deregulated genes by REST software (*P*-value displayed); NS—non significant.

Then, the ratio of  $C_T$  values for ABC gene/ENDO was calculated and used for non-parametric tests as described in Materials and methods. Thus, the higher ABC/ENDO ratios signify lower relative ABC transcript levels. Clinical characteristics presented in Table I were correlated with transcript levels of ABC genes in tumour tissues. A significant inverse correlation between ABCC10 and tumour grade was found; the higher the grade, i.e. the more aggressive the tumour, the lower the ABCC10 transcript level (Table III). Transcript levels of ABCA12, ABCC7 and ABCC8 in tumour tissues had the following significant trend in tumour localisation: colon < rectosigmoidesum < rectum. Interestingly, all three of the above listed transcripts followed exactly the same trend in control tissues as in tumours (Table III). However, ABCB9,

ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the opposite significant trend, i.e. a decrease in transcript levels in the direction from colon to rectum (Table III).

#### Relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy outcome

In the group of patients with metastatic CRC, the response to the palliative chemotherapy significantly correlated with the transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 (Table III). In the group of patients with radically R0 removed tumours, the DFI after adjuvant chemotherapy was influenced by transcript levels of several ABCs. Patients with a low transcript level of ABCA7 (cut-off  $\geq 1.25$ ) had a significantly shorter DFI ( $P = 0.033$ , log-rank test) and a higher HR of progression than patients with a high transcript level (HR = 5.09, 95% HR confidence limits = 0.97–6.7; Figure 1A). Similarly, patients with low transcript levels of ABCA13 (cut-off  $\geq 1.58$ ), ABCB4 (cut-off  $\geq 1.48$ ), ABCC11 (cut-off  $\geq 1.68$ ) and ABCD4 (cut-off  $\geq 1.19$ ) had a shorter DFI and a higher HR of progression ( $P = 0.011$ , HR = 5.75, 95% HR confidence limits = 1.25–26.37;  $P = 0.003$ , HR = 15.83, 95% HR confidence limits = 1.72–145.92;  $P = 0.016$ , HR = 8.81, 95% HR confidence limits = 1.05–74.16;  $P = 0.023$ , HR = 5.51, 95% HR confidence limits = 1.07–28.48, respectively, Figure 1B–E) than patients with high transcript levels. ABCC11 was thus a significant predictor of chemotherapy outcome in both groups of patients.

#### Discussion

The efflux of endogenous substrates and also xenobiotics including anticancer drugs out of the cells presents the principal activity of ABCs. Thus, ABCs could be important for both CRC onset and CRC treatment outcome. A number of monogenic disorders have been associated with ABCs, e.g. mutations in *ABCC7* gene with the onset of cystic fibrosis and thus, the analysis of mutations in ABCs is routinely used for genetic testing (9). Although some of the studies observed significant associations between polymorphisms in ABCs and the cancer risk, including CRC, there has been no validated marker among all known 49 human ABCs for CRC prognosis and therapy outcome prediction until now. Based on the results of our pilot study, we propose ABC10 and ABCC11 as such markers and targets for validation studies focused on their confirmation or rejection.

Despite numerous published studies in animals and cell models showing the functional impact of ABCs on multidrug resistance, no convincing evidence of a clinical utility of ABCs as markers for the prediction of chemotherapy outcome in cancer patients has been published to date. The majority of published studies deal with associations of SNPs with therapy outcome or toxicity. However, there is limited knowledge about the association between genotype and phenotype. The reason may be the complexity of ABCs, which are promiscuous and overlap in spectra of transported substrates. The lack of information about gene and protein expressions and activity of ABCs in homogenous groups of patients treated by the same spectra of drugs further complicates the evaluation of their importance. CRC seems to be a suitable disease for the pharmacogenomic profiling of ABCs because it is routinely treated by prototypical substrate of certain ABCs, 5-FU. Therefore, we have conducted a pilot study aimed at the evaluation of transcript profiles of all human ABCs in two



Table III. Significant correlations of transcript levels of ABCs with clinical data

Grade	G1 ( <i>n</i> = 6) <sup>a</sup>	G2 ( <i>n</i> = 38) <sup>a</sup>	G3 ( <i>n</i> = 7) <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>
ABCC10	1.14 ± 0.04	1.17 ± 0.04	1.23 ± 0.05	0.010
Primary localisation—tumour tissue	Colon ( <i>n</i> = 24) <sup>a</sup>	Rectosigmoideum ( <i>n</i> = 12) <sup>a</sup>	Rectum ( <i>n</i> = 14) <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>
ABCA12	1.65 ± 0.22	1.50 ± 0.10	1.46 ± 0.17	0.020
ABCC7	1.14 ± 0.18	1.07 ± 0.10	1.02 ± 0.04	0.017
ABCC8	1.78 ± 0.15	1.77 ± 0.14	1.67 ± 0.15	0.042
Primary localisation—control tissue				
ABCA12	1.76 ± 0.14	1.64 ± 0.10	1.59 ± 0.10	0.001
ABCC7	1.04 ± 0.08	1.01 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.005
ABCC8	1.52 ± 0.08	1.50 ± 0.05	1.44 ± 0.04	0.002
ABCB9	1.25 ± 0.03	1.27 ± 0.04	1.29 ± 0.03	0.005
ABCB11	1.29 ± 0.11	1.32 ± 0.05	1.37 ± 0.05	0.004
ABCG5	1.52 ± 0.10	1.62 ± 0.07	1.65 ± 0.09	<0.001
ABCG8	1.47 ± 0.11	1.58 ± 0.07	1.60 ± 0.10	<0.001
Response in palliative group	Responders ( <i>n</i> = 13) <sup>a</sup>	Non-responders ( <i>n</i> = 13) <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>	
ABCC6	1.23 ± 0.05	1.28 ± 0.06	0.033	
ABCC11	1.57 ± 0.06	1.69 ± 0.06	<0.001	
ABCF1	1.06 ± 0.03	1.08 ± 0.03	0.044	
ABCF2	1.09 ± 0.03	1.12 ± 0.03	0.015	

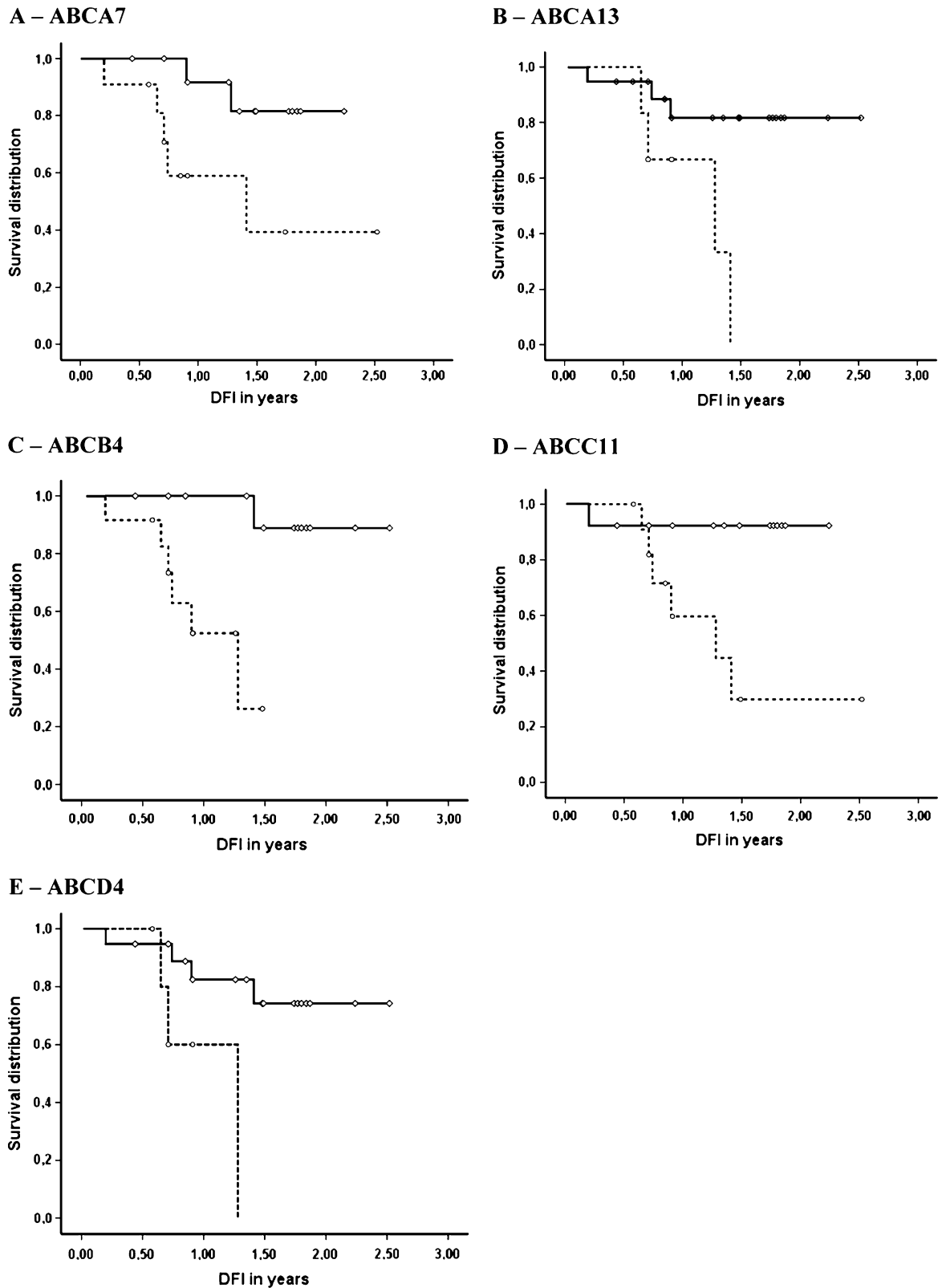
<sup>a</sup>Mean ± SD.<sup>b</sup>Significant differences analysed by independent Kruskal–Wallis test.

groups of CRC patients strongly differing in prognosis. Patients who underwent the radical surgical resection of the tumour have better prognosis than patients with the metastatic disease. Both groups were treated by chemotherapy regimens based on 5-FU and the short-term evaluation of response to this treatment was available. We hypothesised that a strong effect of potential marker(s) should be clearly visible in both groups. As far as we are aware, this is the first complex study of the role of ABC transporters in the tumour development and treatment conducted on CRC patients.

The majority of the studied ABCs were down-regulated or unchanged between tumours and non-neoplastic control tissues in this study. ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues. There are several studies on the assessment of transcript or protein levels of the selected ABCs (usually ABCB1, ABCG2 and members of ABCC subfamily) in the literature of CRC. Our data comply with the previous reports with regard to the down-regulation of ABCB1 (20) and ABCC3 as well as the up-regulation of ABCC2 in colorectal tumours (29). In addition, we found the up-regulation of ABCC1 that had not been previously detected (29). Moreover, our results confirmed the previously observed down-regulation of ABCG2. ABCG2 mRNA showed a 6-fold decrease in colorectal tumours in comparison with control tissues (48). A ubiquitous expression of ABCE1 mRNA in normal and tumour colon tissues was found. Among 21 peptides with the HLA-A2-binding motifs, two ABCE1-derived peptides were recognised by the colon cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in a dose-dependent manner. The authors suggested that ABCE1 and its peptides could be target molecules in specific immunotherapy for HLA-A2-positive CRC patients (49). Our observation of significant up-regulation of ABCE1 in tumour tissue of CRC patients, if confirmed by independent study, may be relevant for targeted therapy of CRC. There are no literature data on transcript or protein levels of other ABCs in tumour and non-neoplastic tissues from a series of CRC patients.

The analysis of the tumour localisation has identified highly interesting trends. Transcript levels of certain ABCs increased or declined in direction from colon to rectum in a significant trend. Firstly, we noticed this effect in the tumour tissues. To discern this effect from possible deregulation of mRNA expression by the tumour pathophysiology, we analysed the tissue distribution of transcripts of ABCs also in non-neoplastic control tissues. The same ABCs as in tumours, namely ABCA12, ABCC7 and ABCC8, were found differentially distributed in control tissues maintaining the same trend towards localisation (increase from colon to rectum). Additionally, ABCB9, ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the opposite significant trend, i.e. a decrease in transcript levels in direction from colon to rectum. Significant changes in gene and protein expression along the anterior–posterior intestinal axis were observed for solute carrier transporters in mice (50). Moreover, mRNA expression levels of murine Abcb2, Abcb3, Abcb9, Abcc3, Abcc6, Abcd1, Abcg5 and Abcg8 displayed significantly differential gene expression along the duodenum, jejunum, ileum and colon (51). In human samples, the expression of mRNA for ABCB1 and ABCC2 was highest in jejunum and decreased towards more distal regions, whereas ABCC1 was equally distributed in all intestinal regions (52). We did not confirm the results of Gutmann *et al.* (53) who found that mRNA expression of ABCG2 was maximal in the duodenum and decreased continuously down to the rectum, perhaps due to the fact that we had no access to samples from duodenum. Moreover, human ABCs identified by us to be differentially distributed in colorectal tissues have not been studied in this regard yet. A possible relevance of the observed gradient in expression of ABCs for efficacy of CRC chemotherapy shall be further studied.

The majority of clinically associated ABCs were either down-regulated or unchanged in tumours versus control tissues. In terms of chemotherapy outcome, the induction of mRNA levels of ABCs and subsequent enhancement of their effect cannot be ruled out. In fact, the ABCG2 mRNA content in hepatic metastases was found to be higher after an



**Fig. 1.** Kaplan–Meier survival plots presenting the relation between DFI and transcript levels of ABCs. Survival curves are shown for two groups of patients divided by cut-off (for evaluation of cut-off, see Materials and methods). Individual figures illustrate Kaplan–Meier survival plots of patients with respect to transcript levels of ABCA7 (**A**, cut-off 1.25), ABCA13 (**B**, 1.58), ABCB4 (**C**, 1.48), ABCC11 (**D**, 1.68) and ABCD4 (**E**, 1.19). Dashed lines represent the group with higher normalised values than cut-off (meaning low transcript levels of ABCs) and solid lines represent the group with lower or equal values than cut-off (high transcript levels of ABCs).

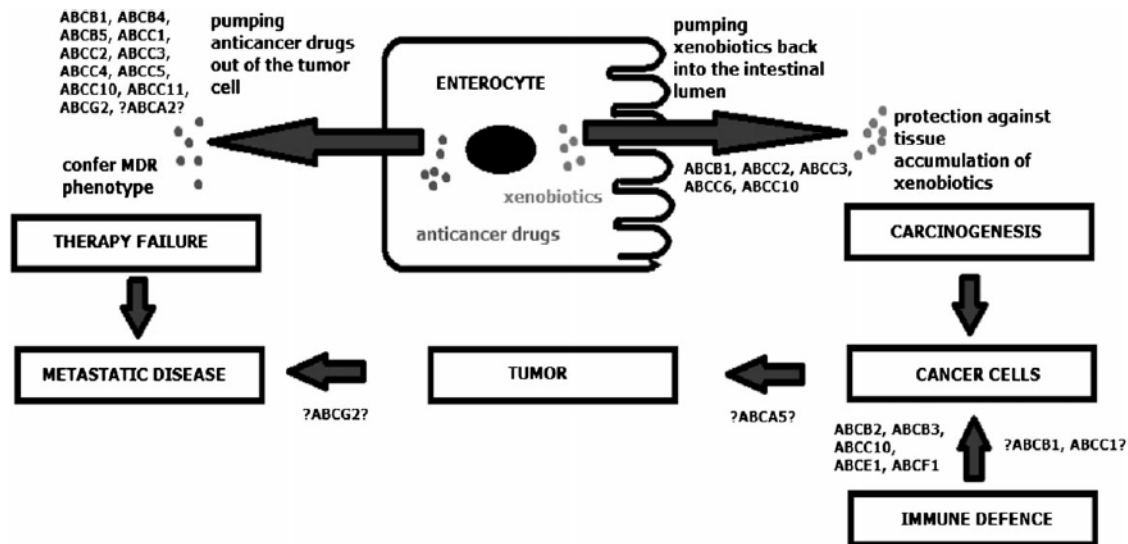


Fig. 2. Proposed involvement of ABCs in CRC development, progression and treatment outcome.

irinotecan-based chemotherapy than in irinotecan-naïve metastases (54). However, the access to post-operative liver metastases in the studied group of patients was limited and such analysis will be the subject of the validation study. In this context, it seems quite interesting that, according to recent study, synchronous or metachronous liver metastases could be treated differently on the basis of different gene expression signatures (55).

The transcript level of ABCC10 in tumours correlated with the grade in our study. There are no data on ABCC10 role in CRC in the literature. The lower ABCB1 expression was found in poorly differentiated CRC tumours ( $P < 0.05$ ; 20) in line with the study on cell lines, where ABCB1 had a higher expression in well-differentiated colon cancer cells, when compared with the poorly differentiated ones (14). An increasing expression of another member of ABCC subfamily, ABCC3 with higher grade, i.e. the opposite trend to our observation with ABCC10, was found in pancreatic tumours (56). No further data on the association of other ABCs with grading in CRC are currently available. Zhang *et al.* (57) indicated that ABCB1 expression significantly correlated with tumour localisation ( $P = 0.039$ ) and gender ( $P = 0.043$ ). The intensity of immunohistochemical ABCG2 protein staining was higher in tumours of CRC patients with lymph node positive than in negative disease (30 versus 6.7%, respectively;  $P < 0.025$ ). Thus, it seemed that ABCG2 expression may be important for progression and metastasis of CRC (58). Our pilot study, however, did not confirm any of the above published associations.

In the group of patients treated by palliative chemotherapy, the response was analysed using RECIST criteria. Patients were divided into two groups (responders versus non-responders). Transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 were significantly higher in responders in comparison with non-responders. In the group of patients treated by the adjuvant chemotherapy after the radical surgical resection of tumour, the relation between transcript levels of ABCs and DFI was evaluated. DFI was significantly shorter and HR of progression higher in patients with low transcript levels of ABCA7, ABCA13, ABCB4, ABCC11 and ABCD4, suggesting that these genes play a role in the therapy outcome

of patients treated by the adjuvant chemotherapy. Thus, ABCC11 was up-regulated in the chemotherapy-naïve tumours from patients who subsequently achieved a good response to the chemotherapy in both palliative and adjuvant groups. ABCC11 was shown to be a resistance factor for fluoropyrimidines (34). Oguri *et al.* (59) discovered that expression of the ABCC11 is induced by 5-FU and that ABCC11 is directly involved in 5-FU resistance by the efflux transport of the active metabolite FdUMP in human small-cell lung cancer cell lines. We hypothesise that the high ABCC11 expression in tumours before chemotherapy observed in both groups of CRC patients studied by us may limit further induction of ABCC11 by 5-FU treatment. However, to confirm or reject our idea, we need to analyse post-chemotherapy samples from the same patients or run a larger validation study.

It is also interesting that the most studied ABCs in the area of chemoresistance, ABCB1, ABCC1-5 and ABCG2 did not predict 5-FU therapy outcome in our CRC patients. We cannot add more evidence to the results of the recent study reporting that ABCC1 in CRC tissues could predict the reduced folate level after leucovorin administration and determine the efficacy of treatment by leucovorin (60). Schmidt *et al.* (61) observed up-regulation of ABCC6 in 5-FU-resistant colon tumour cell lines. Quite recently, ABCC3, ABCC4 and ABCC5 were found up-regulated in 5-FU-resistant pancreatic carcinoma cells (62). Nevertheless, results obtained using rather uniform cell line models cultured in the presence of a drug for a long time may not reflect the real situation in such a heterogeneous entity as colorectal tumour or a series of such tumours. As regards, observation in cancer patients, a significant down-regulation of gene expression in a number of ABCs was found in breast cancer patients ( $n = 19$ ) receiving preoperative (neoadjuvant) chemotherapy regimens including 5-FU. ABCA1, ABCA12, ABCB6, ABCC5, ABCC11 and ABCC13 were down-regulated in patients with complete pathological response, in comparison with patients with residual disease. In contrast, ABCB2, ABCC7 and ABCF2 were up-regulated in patients with complete pathological response (63). In breast cancer patients treated with endocrine therapy, ABCF2 protein immunopositive tumours had a longer disease-free survival when the tumours were oestrogen receptor negative or



progesterone receptor negative ( $P = 0.002$  and  $0.005$ , respectively; 64). Thus, the up-regulation of ABCF2 observed by us in CRC patients corresponds to available data on breast and cervical cancers. It seems obvious that ABCs have tumour-specific expression profiles (65) and thus also different roles in the mechanism of chemoresistance of the cancer cell (summarised in Figure 2). Thus, further studies are needed to evaluate the importance of the results obtained by this study.

The study of transcript levels rather than protein expression may be seen as the major limitation of our study. The power of protein analysis is obvious. However, the use of immunohistochemical analysis is semi-quantitative and reflects only protein level and not its activity. In addition, the issue of availability, specificity and selectivity of the antibodies further limits protein analysis. The correlations between transcript and protein levels of human ABCs are mostly unknown and thus, we shall consider transcript levels as independent markers. For the assessment of transcript levels, we have used highly sensitive methods based on real-time PCR, which is superior to relative or semi-quantitative approaches. The small sample size and absence of correction for multiple testing could be seen as another limitation of our pilot study. Thus, all results should be interpreted with caution and need to be confirmed by both retrospective and prospective validation studies on a larger and independent series of CRC patients.

In conclusion, our pilot study brings to light new and interesting data. Transcript levels of all known human ABC transporter genes were assessed in a series of tumour and control tissue samples from well-characterised CRC patients. Several genes were found deregulated in tumours compared with control tissues and a gradient of transcript levels along the superior-inferior axis of the large intestine was observed for the first time. The comparison of outcomes of patients treated by the 5-FU-based regimens suggested that ABCC11 may present a promising candidate marker. The validation of candidate genetic markers identified in the pilot study will be the next goal of our current research.

### Supplementary data

Supplementary Table IS-VIS and Material are available at *Mutagenesis* Online.

### Funding

Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (NR 10230-3 to V.L. and P.S.); Czech Science Foundation (310/07/1430 to P.S. and P.V.) and Grant Agency of Charles University (GAUK 15109/2009 to I.H.).

### Acknowledgements

Authors wish to thank Dr Stanislav Kormunda for survival analysis.

Conflict of interest statement: None declared.

### References

- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. D. and Parkin, D. (2010) *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr> (accessed September 8, 2010).
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 78–85.
- Aaltonen, L., Johns, L., Jarvinen, H., Mecklin, J. P. and Houlston, R. (2007) Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 356–361.
- Watson, A. J. and Collins, P. D. (2011) Colon cancer: a civilization disorder. *Dig. Dis.*, **29**, 222–228.
- Soucek, P. (2008) Xenobiotics. In Schwab, M. (ed.), *Encyclopedia of Cancer*. 2nd edn. Springer-Verlag, New York, NY.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H. *et al.* (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258**, 1650–1654.
- Mendoza, J. L., Urcelay, E., Lana, R. *et al.* (2007) MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 585–590.
- Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67–113.
- Kaminski, W. E., Piehler, A. and Wenzel, J. J. (2006) ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 510–524.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J. *et al.* (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, **346**, 362–365.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 48–58.
- Ejendal, K. F. and Hrycyna, C. A. (2002) Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **3**, 503–511.
- Broccardo, C., Luciani, M. and Chimini, G. (1999) The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 395–404.
- Ohtsuki, S., Kamoi, M., Watanabe, Y., Suzuki, H., Hori, S. and Terasaki, T. (2007) Correlation of induction of ATP binding cassette transporter A5 (ABCA5) and ABCB1 mRNAs with differentiation state of human colon tumor. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1144–1146.
- Choudhuri, S. and Klaassen, C. D. (2006) Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.*, **25**, 231–259.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O. *et al.* (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 3473–3478.
- Sharom, F. J. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, **9**, 105–127.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. and Kim, R. B. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**, 13–33.
- Vaclavikova, R., Nordgard, S. H., Alnaes, G. I. *et al.* (2008) Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics*, **18**, 263–273.
- De Iudicibus, S., De Pellegrin, A., Stocco, G., Bartoli, F., Bussani, R. and Decorti, G. (2008) ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res.*, **28**, 3921–3928.
- Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., He, J. and Liang, H. (2010) Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **136**, 1697–1707.
- Johnsson, A., Vallon-Christensson, J., Strand, C., Litman, T. and Eriksen, J. (2005) Gene expression profiling in chemoresistant variants of three cell lines of different origin. *Anticancer Res.*, **25**, 2661–2668.
- Kasajima, A., Sers, C., Sasano, H. *et al.* (2010) Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum. Pathol.*, **41**, 1758–1769.
- Zhou, S. F., Wang, L. L., Di, Y. M., Xue, C. C., Duan, W., Li, C. G. and Li, Y. (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1981–2039.
- Leslie, E. M., Haimour, A. and Waalkes, M. P. (2004) Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32700–32708.
- Smitherman, P. K., Townsend, A. J., Kute, T. E. and Morrow, C. S. (2004) Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent

- detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 260–267.
27. Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G. and Cole, S. P. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.*, **5**, 21–53.
  28. Fujita, K., Nagashima, F., Yamamoto, W. *et al.* (2008) Association of ATP-binding cassette, sub-family C, number 2 (ABCC2) genotype with pharmacokinetics of irinotecan in Japanese patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI). *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2137–2142.
  29. Hinoshita, E., Uchiyama, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M. (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2401–2407.
  30. Theile, D., Grebhardt, S., Haefeli, W. E. and Weiss, J. (2009) Involvement of drug transporters in the synergistic action of FOLFOX combination chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 1366–1373.
  31. Pratt, S., Shepard, R. L., Kandasamy, R. A., Johnston, P. A., Perry, W., III and Dantzig, A. H. (2005) The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 855–863.
  32. Gradilone, A., Pulcinelli, F. M., Lotti, L. V. *et al.* (2008) Celecoxib upregulates multidrug resistance proteins in colon cancer: lack of synergy with standard chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **8**, 414–420.
  33. Gazzaniga, P., Gradilone, A., Petracca, A., Nicolazzo, C., Raimondi, C., Iacovelli, R., Naso, G. and Cortesi, E. (2010) Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients. *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 2073–2077.
  34. Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G. and Kruh, G. D. (2003) MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29509–29514.
  35. Shani, N. and Valle, D. (1996) A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **93**, 11901–11906.
  36. Campa, D., Pardini, B., Naccarati, A. *et al.* (2008) A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BRCP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Mutat. Res.*, **645**, 56–60.
  37. Dietrich, C. G., Vehr, A. K., Martin, I. V., Gaßler, N., Rath, T., Roeb, E., Schmitt, J., Trautwein, C. and Geier, A. (2011) Downregulation of breast cancer resistance protein in colon adenomas reduces cellular xenobiotic resistance and leads to accumulation of a food-derived carcinogen. *Int. J. Cancer*, **129**, 546–552.
  38. Nakatomi, I., Yoshikawa, M., Oka, M. *et al.* (2001) Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 827–832.
  39. Chikazawa, N., Tanaka, H., Tasaka, T., Nakamura, M., Tanaka, M., Onishi, H. and Katano, M. (2010) Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Res.*, **30**, 2041–2048.
  40. Hostettler, L., Zlobec, I., Terracciano, L. and Lugli, A. (2010) ABCG5-positivity in tumor buds is an indicator of poor prognosis in node-negative colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.*, **16**, 732–739.
  41. Sobin, L. H. and Wittekind, C. (eds) (2002) *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th edn. Wiley-Liss, New York, NY.
  42. Therasse, P., Arbuck, S. G., Eisenhauer, E. A. *et al.* (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl Cancer Inst.*, **92**, 205–216.
  43. Soucek, P., Anzenbacher, P., Skoumalova, I. and Dvorak, M. (2005) Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, **23**, 1417–1422.
  44. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paep, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**, research0034.1–research0034.11.
  45. Andersen, C. L., Jensen, J. L. and Ørntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, **64**, 5245–5250.
  46. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
  47. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic. Acids Res.*, **30**, e36.
  48. Gupta, N., Martin, P. M., Miyauchi, S., Ananth, S., Herdman, A. V., Martindale, R. G., Podolsky, R. and Ganapathy, V. (2006) Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 571–577.
  49. Shichijo, S., Ishihara, Y., Azuma, K. *et al.* (2005) ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncol. Rep.*, **13**, 907–913.
  50. Anderle, P., Sengstag, T., Mutch, D. M., Rumbo, M., Praz, V., Mansourian, R., Delorenzi, M., Williamson, G. and Roberts, M. A. (2005) Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC Genomics*, **6**, 69.
  51. Mutch, D. M., Anderle, P., Fiaux, M., Mansourian, R., Vidal, K., Wahli, W., Williamson, G. and Roberts, M. A. (2004) Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract. *Physiol. Genomics*, **17**, 11–20.
  52. Berggren, S., Gall, C., Wollnitz, N., Ekelund, M., Karlbom, U., Hoogstraate, J., Schrenk, D. and Lennernäs, H. (2007) Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol. Pharm.*, **4**, 252–257.
  53. Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C. and Drewe, J. (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 695–699.
  54. Candeil, L., Gourdiere, I., Peyron, D. *et al.* (2004) ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int. J. Cancer*, **109**, 848–854.
  55. Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Nannini, M. *et al.* (2008) Gene expression profiling of liver metastases from colorectal cancer as potential basis for treatment choice. *Br. J. Cancer*, **99**, 1729–1734.
  56. König, J., Hartel, M., Nies, A. T., Martignoni, M. E., Guo, J., Büchler, M. W., Friess, H. and Keppler, D. (2005) Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, **115**, 359–367.
  57. Zhang, Z., Deng, X., Ren, X., Zhang, B., Chen, X., Yang, J., Ding, H., Sui, J. and Song, X. (2010) Expression of mutant p53 and of the multidrug resistant proteins P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi correlated in colorectal adenocarcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.*, **45**, 925–934.
  58. Liu, H. G., Pan, Y. F., You, J., Wang, O. C., Huang, K. T. and Zhang, X. H. (2010) Expression of ABCG2 and its significance in colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **11**, 845–848.
  59. Oguri, T., Bessho, Y., Achiwa, H., Ozasa, H., Maeno, K., Maeda, H., Sato, S. and Ueda, R. (2007) MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 122–127.
  60. Sadahiro, S., Suzuki, T., Maeda, Y. *et al.* (2010) Molecular determinants of folate levels after leucovorin administration in colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **65**, 735–742.
  61. Schmidt, W. M., Kalipcian, M., Dornstauder, E., Rizovski, B., Steger, G. G., Sedivy, R., Mueller, M. W. and Mader, R. M. (2004) Dissecting progressive stages of 5-fluorouracil resistance in vitro using RNA expression profiling. *Int. J. Cancer*, **112**, 200–212.
  62. Hagemann, W., Jesnowski, R., Faissner, R., Guo, C. and Löhr, J. M. (2009) ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatology*, **9**, 136–144.
  63. Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T. *et al.* (2006) Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, **99**, 9–17.
  64. Ogawa, Y., Tsuda, H., Hai, E. *et al.* (2006) Clinical role of ABCF2 expression in breast cancer. *Anticancer Res.*, **26**, 1809–1814.
  65. Zhang, W., Shannon, W. D., Duncan, J., Scheffer, G. L., Schep, R. J. and McLeod, H. L. (2006) Expression of drug pathway proteins is independent of tumour type. *J. Pathol.*, **209**, 213–219.



LIŠKA, V., P. NOVÁK, O. DAUM, V. TŘEŠKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA a P. PITULE. Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis of colorectal cancer after radical surgical treatment. In: ETTARH, R., ed. *Colorectal Cancer Biology: From Genes to Tumor*. Rijeka: Intech, 2012, 413-428. ISBN 978-953-307-707-9.

# Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Factor of Early Recurrence and Poor Prognosis of Colorectal Cancer After Radical Surgical Treatment

Vaclav Liska<sup>1</sup>, Ondrej Daum<sup>2</sup>, Petr Novak<sup>1</sup>, Vladislav Treska<sup>1</sup>,  
Ondrej Vycital<sup>1</sup>, Jan Bruha<sup>1</sup>, Pavel Pitule<sup>1</sup> and Lubos Holubec<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Surgery,*

<sup>2</sup>*Institute of Pathology,*

<sup>3</sup>*Department of Oncology, Charles University Prague,  
Medical School and Teaching Hospital Pilsen,*

*Czech Republic*

## 1. Introduction

Sixty percent of patients with colorectal cancer (CRC) are afflicted with distant metastases (liver or lung metastatic process) or a local relapse of malignancy (Bird et al., 2006). The possibilities of surgical and oncological treatment of this disease offer us a large spectrum of treatments including the combination of surgical procedures and consecutive oncological treatments. In the case of radical surgical therapy we can consider the curative access. The main medical problem of CRC is the high rate of recurrences after radically performed surgical therapy. The operability of recurrence is only about 30% in the case of local relapse and 20% in the case of distant metastases (Coleman et al., 2008; Kobayashi et al., 2007). The second dominant problem is the early recurrence of CRC after radical surgical treatment, when the patients undergo a difficult and exhausting procedure with a high risk of perioperative complications without any significant differences in overall survival against modern palliative therapy (Van den Eynde & Hendlisz, 2009).

Contemporary clinical and histopathological prognostic factors (staging, grading, etc.) used for the detection of patients with a high risk of relapse and a short overall survival rate and for the indication of adjuvant oncological treatment after radical surgery are not sufficient. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were described as a good prognostic factor for patients with a high risk of relapse. They are critical indicators of efficient antitumor immunological response. Their number, type and morphology of TIL cells determine resulting tumor prognosis (Atreya & Neurath, 2008; Galon et al., 2006). They could be connected also with the suppression of micrometastatical disease after radical surgery (Gajewski et al., 2006; Pages et al., 2005). We can recognize either the type of immune cells or distinguish their morphological aspects (infiltration of any part of tumor or surrounding of tumor or tributary lymph nodes) (Talmadge et al., 2007).

We detail only short overview of their types and function. We recommend the readers with deeper interest in these problems to find comprehensive reviews in the cited papers (Jochems et al., 2011; Ohtani 2007). From this view we find CD8+ and CD4+ T lymphocytes (Fig. 1a & Fig. 1b), natural killer cells (Fig. 1c), dendritic cells (Fig. 1d), macrophages, etc. The exact function of these cells is under current discussion. We only know that they play main role in controlling tumor development and growth. CD8+ T lymphocytes within cancer cell nests of colorectal cancer have significant impact on the survival of patients. They contain the cytolytic enzyme granzyme-B. In case of increased proliferating activity of CD8+ T lymphocytes we observe their activated and cytotoxic phenotype that is significantly associated with the absence of early metastatic events (vascular emboli, lymphatic invasion or perineural invasion of tumor cells) and with a decreased rate of cancer recurrence (Atreya & Neurath, 2008, Pages et al., 2010). A high density of memory T lymphocytes within colorectal cancer tissue was more frequently observed in patients without early detectable signs of metastatic events and was associated with both improved disease free interval (DFI) and prolonged overall survival (OS) (Galon et al., 2006; Pages et al., 2005).

Natural killer cells (NK cells) mediate an effective lysis of cancer cells but the mechanism of detection of cancer cells is different from CD8+ T lymphocytes (Cooper et al., 2009). NK cells are mainly involved in the innate immune response and do not recognize specific tumor associated antigen on the surface of cancer cells as CD8+ T lymphocytes. NK cells lyse the cancer cells that are opsonized by surface antibody. NK cells also respond to other signals as cytokines produced by antigen presenting cells, which allow them to mediate early host responses against pathogen (Moretta et al., 2006). Decreased preoperative number of NK cells was associated with increased frequency of postoperative recurrence of colorectal cancer (Atreya & Neurath, 2008; Cooper et al., 2001). Their crucial role in the elimination of haematological malignancies, primary and secondary tumors has been recognized (Lucas et al., 2007; Ljunggren & Malmberg, 2007, Stojanovic & Cerwenka, 2011). In the last year there are some signs that NK-cells have the capacity for memory-like responses, a property that was previously thought to be limited to adaptive immunity, but in this view the discussion still continues (Cooper et al., 2009).

Dendritic cells are considered to be most potent antigen presenting cells. They play key role in activation, stimulation and recruitment of T lymphocytes. They can also induce antigen-specific unresponsiveness or immune tolerance. Immature dendritic cells enter tumor tissue, uptake and process its antigens. Then after they migrate to lymph nodes, undergo maturation and interact with T-lymphocytes that are able to recognize presented antigen and so T-lymphocytes play effector role of this tumor-specific immunity (Atreya & Neurath, 2008; Pages et al., 2005; Sandel et al., 2005; Steinman et al., 2003).

Macrophages are important producers of different factors that have function during tumor progression and also during tumor progression control. Their function is not fully understand, but it was described that the number of tumor infiltrating macrophages correlates with overall survival of colorectal cancer patients (Atreya & Neurath, 2008; Pollard, 2004; Forssell et al., 2007). It seems that several types of tumor infiltrating macrophages influence the balance between pro- and anti-tumor properties of immune system (Forssell et al., 2007).

From the morphologic view we can observe TIL in the specific portions of tumor and so we detect lymphocytic infiltration intratumoral (ITL - intratumoral lymphocytes) (Fig.

2a),intrastromal (ISL - intrastromal lymphocytes) (Fig. 2b), peritumoral (PTL - peritumoral lymphocytes) (Fig. 2c) and Crohn-like reaction (Crohn-like PTL)(Fig. 2d). We can also describe reactive histological changes in tributary lymph nodes (LN reactions). It means follicular hyperplasia (LN-FH) (Fig. 3a.), sinus histiocytosis (LN-SH) (Fig. 3b.) and the presence of granulomas (LN-GR) (Fig. 3c) (Ogino et al, 2009; Pages et al., 2005).

The aim of this study was to analyze the relationship of contemporary clinical and histopathological factors and TIL to determine patients with a high risk of poor overall survival and tendency to early recurrence of malignancy with shortened disease free interval (DFI) after radical surgery for CRC.

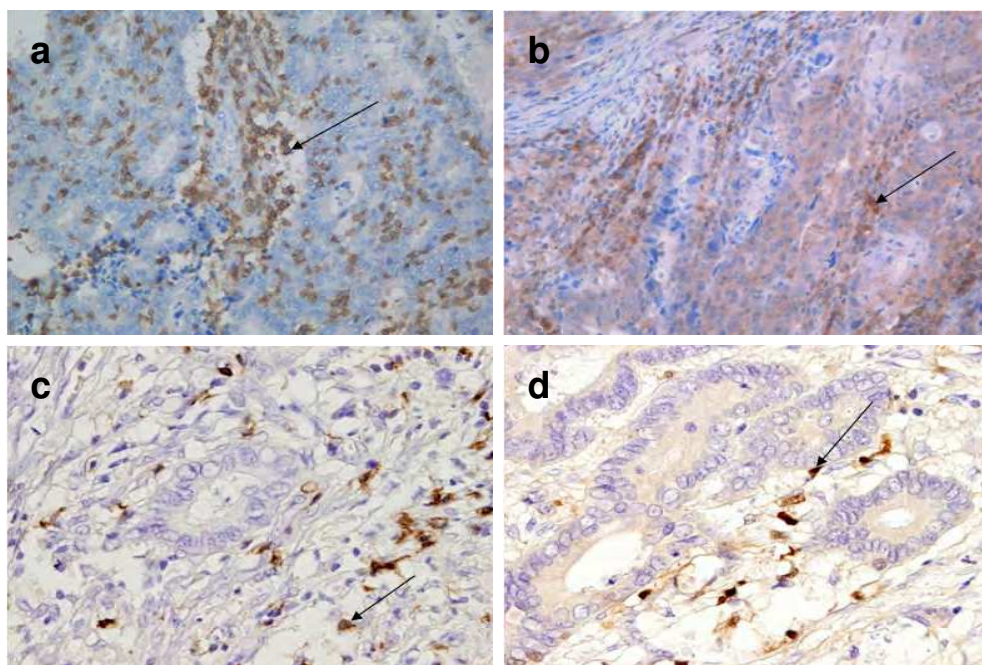


Fig. 1. Examples of tumor infiltration by immune cells: a) CD8+ T lymphocytes; b) CD4+ T lymphocytes; c) Natural killer cell (CD 57 staining) and d) Dendritic cells (S 100 staining).

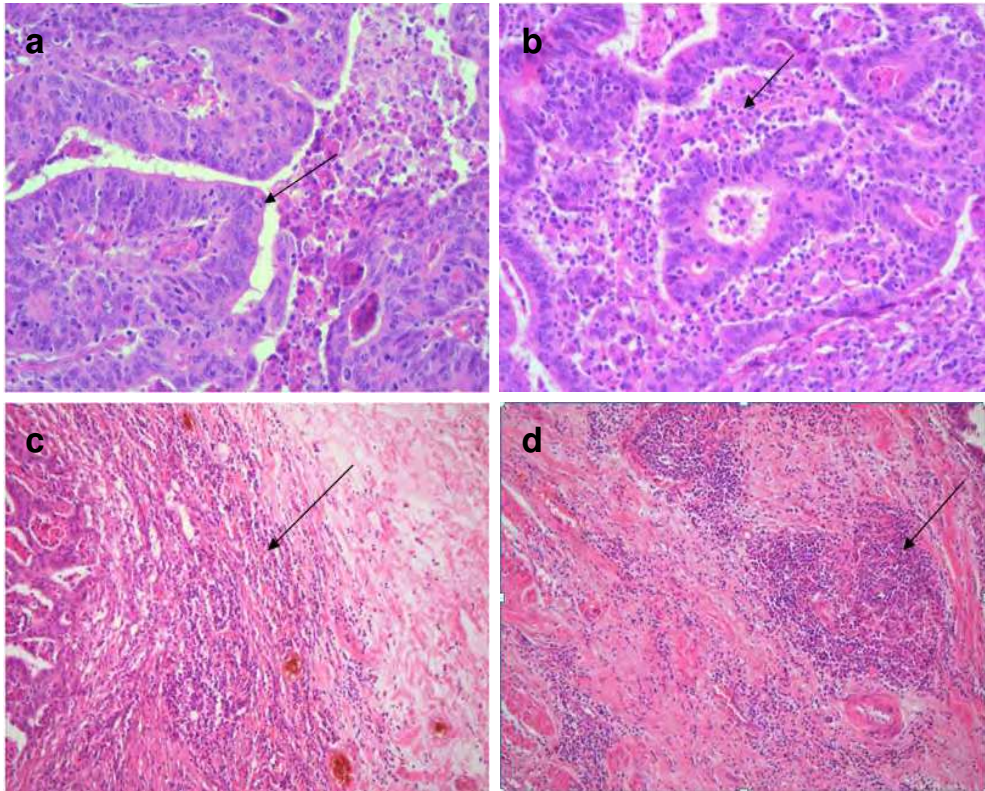


Fig. 2. Different localisation of TIL within the tumor tissue: a) intratumoral lymphocytes; b) intrastromal lymphocytes; c) peritumoral lymphocytes and d) Crohn-like peritumoral lymphocytes. All sections stained with hematoxylin-eosin.

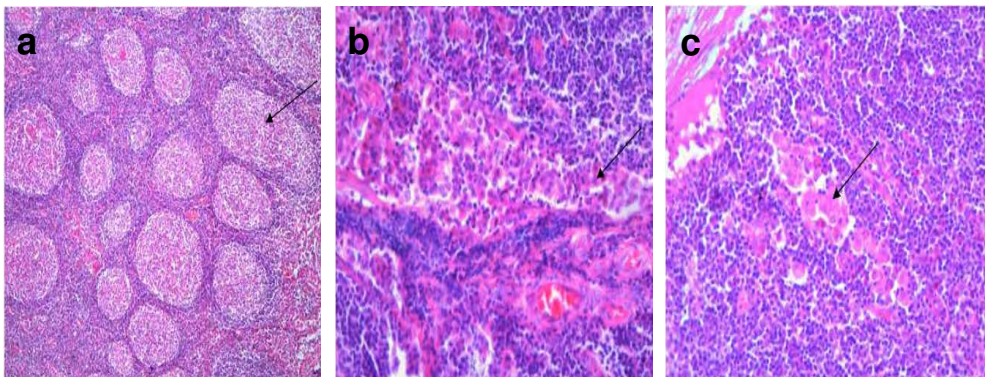


Fig. 3. Reactive histological changes in tributary lymph nodes: a) follicular hyperplasia; b) sinus histiocytosis and c) presence of granulomas. All sections stained with hematoxylin-eosin.



## 2. Methods

We analyzed 150 patients who underwent radical surgical procedure for CRC between the years 2004-2007 at the Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital in Pilsen, Charles University in Prague. We selected only patients who were operated on electively - our aim was to decrease the risk of inflammation that is often connected with the acute operation of CRC and does not depend on the immune reaction against a tumor but could be evoked by the distension of the bowel. We also excluded patients who had risk of understaging (for example low number of analysed lymph nodes) and patients with a synchronous metastatic process. The inclusion standard was also the entire follow-up of patients during the whole postoperative period to increase the number of patients with a diagnosed early recurrence of CRC.

The following clinical parameters were statistically analysed in relation to the disease free interval (DFI) and the overall survival (OS): staging, grading, preoperative leukocytosis, type of surgical procedure (radical vs. palliative), postoperative complications and postoperative oncological treatment.

### 2.1 Histology

We examined three different sections of each tumor and also sections of all found lymph nodes. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin.

The type and grade of all tumors were determined according to WHO 2000 guidelines. The stage of tumors was established according to UICC 2002 guidelines. We evaluated endovascular (VI), endolymphatic (LI) and perineural infiltration (PI) by cancer cells (0 - none, 1 - yes). Lymphocytic infiltration was detected as intratumoral (ITL - intratumoral lymphocytes), intrastromal (ISL - intrastromal lymphocytes), peritumoral (PTL - peritumoral lymphocytes) and Crohn-like reaction (Crohn-like PTL), and scaled as none (0), mild (1), moderate (2) and severe (3). Reactive histological changes in lymph nodes (LN reactions) were detected as follicular hyperplasia (LN-FH), sinus histiocytosis (LN-SH) and the presence of granulomas (LN-GR), and all these parameters were quantified in the same manner as lymphocytic infiltration.

### 2.2 Immunohistochemistry

For immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD4 (clone 4B12, 1:50, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and CD8 (clone C8/144B, 1:50, Dako, Glostrup, Denmark). Microwave pretreatment was used in both cases. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA). Appropriate positive and negative control slides were employed. The density of intratumoral infiltration by lymphocytes was evaluated in five High power microscopical fields (HPF) and expressed as the number of immunopositive cells per HPF.

### 2.3 Statistical evaluation

Statistical analysis was processed by the statistical software Statistica 9.0. The mean, median, standard deviation (SD), minimum, maximum, quartiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in given groups and subgroups of patients corresponding to studied clinical and histopathological parameters.

The relationships between the variables were described by Spearman rank correlation coefficients.

The analyses of Overall survival (OS) and Disease free interval (DFI) were performed by Kaplan-Meier's survival functions. The influence of given covariates (clinical and histopathological factors) was tested by the Log-Rank test and Wilcoxon test. The Cox regression hazard model, hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI) for HR were computed for the evaluation of given clinical and histopathological factors to OS or DFI. Multivariate analysis was performed by the use of classification and regression trees (CART). The Cox regression hazard model (stepwise regression) was applied to find the predictors in CART.

### 3. Results

The statistical analysis of the studied cohort of patients after surgical treatment for colorectal cancer demonstrated an acceptable distribution of basic statistical description parameters (gender ratio 93:57 (male vs. female)). 1, 3 and 5 years overall survival was 92.2%, 76.5% and 70.2% and 1, 3 and 5 year DFI was 85.3%, 64.3% and 49.4%.

The Spearman rank correlation coefficient did not prove any stronger correlation than a moderate correlation at endolymphatic invasion (LI) and lymph node infiltration by metastatic process (Spearman rank correlation coefficient 0.56,  $p < 0.05$ ). All the other studied factors were independent factors or factors with a low correlation.

Statistical analysis proved lymph node infiltration by metastatic process as statistically significant for the prognosis of overall survival ( $p < 0.05$ ) and N2 status of lymph nodes increased the risk of shorter overall survival 9.3x (Fig. 4).

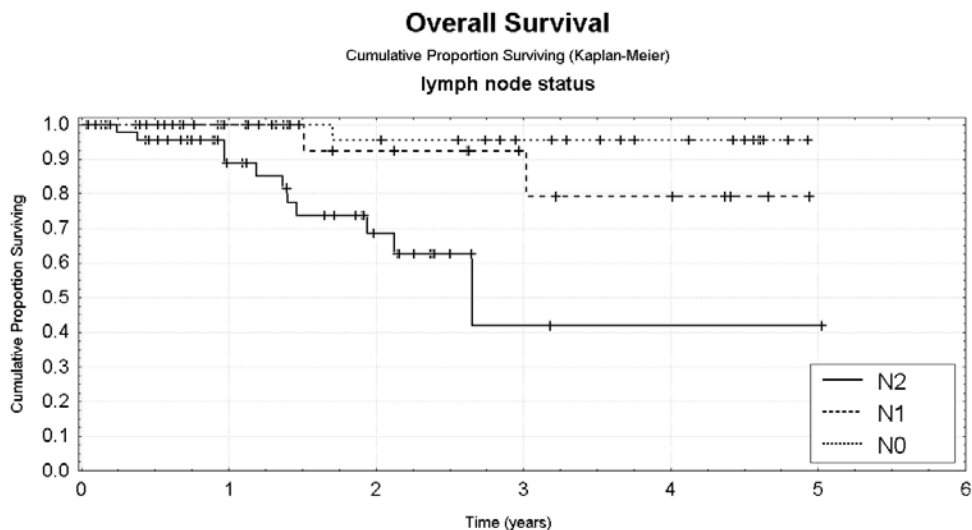


Fig. 4. Statistical analysis proved the lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of overall survival ( $p < 0.05$ ), and the N2 status of lymph nodes increased the risk of a shorter overall survival 9.3x.

Endovascular infiltration (VI) was proved as a negative prognostic factor of shorter overall survival (Fig.5.). Patients with positive histopathological findings of VI have 3.1x increased risk for shorter overall survival. The presence of peritumoral lymphocytes (PTL) (Fig.6.) and of Crohn-like PTL (Fig.7.) was proved as a positive prognostic factor of OS. Patients with a positive histopathological finding of PTL and Crohn-like PTL have a decreased risk for shorter overall survival (2.3x and 2.3x respectively). Lymph node follicular hyperplasia (LN-FH) was verified as a positive prognostic factor for longer overall survival (Fig.8.). The statistical significance of LN-FH increased also with the raised density of infiltration. LN-FH positivity decreased the risk of shorter overall survival 3.3times.

The severity of CD8+ lymphocytic infiltration was proved by the Cox regression hazard model as a positive prognostic factor enlarging overall survival (cut off 30 cells/HPF). The severity of CD4+ lymphocytic infiltration was proved as a significant factor for the prognosis of overall survival (cut off 4cells/HPF) with 2.5x increased hazard ratio in patients over the cut off (Fig.9.). Statistical analysis did not confirm the statistical significance of CD8/CD4 ratio.

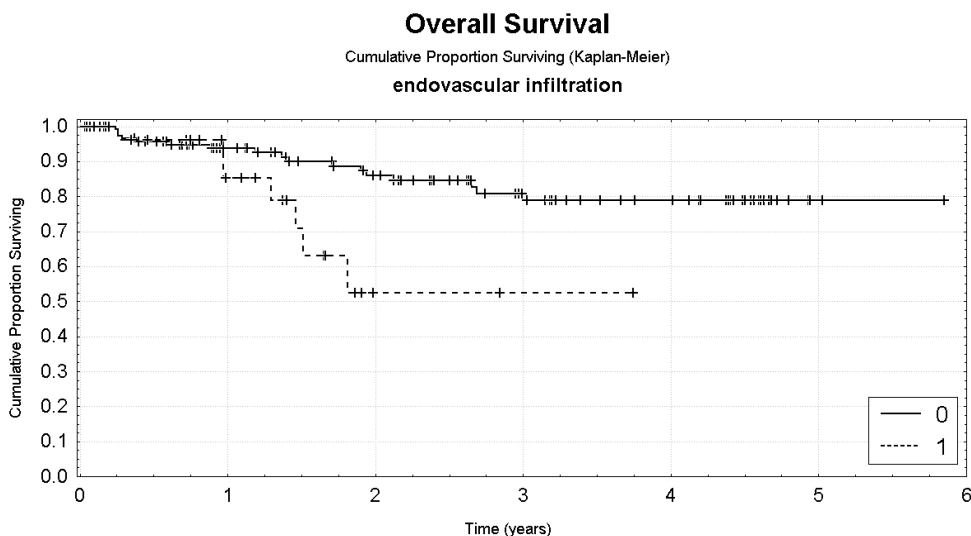


Fig. 5. Endovascular infiltration by cancer cells (VI) was proved as a statistically significant factor for the prognosis of overall survival ( $p < 0.05$ ). The patients with a positive histopathological finding of VI have 3.1x higher risk ratio for shorter overall survival.



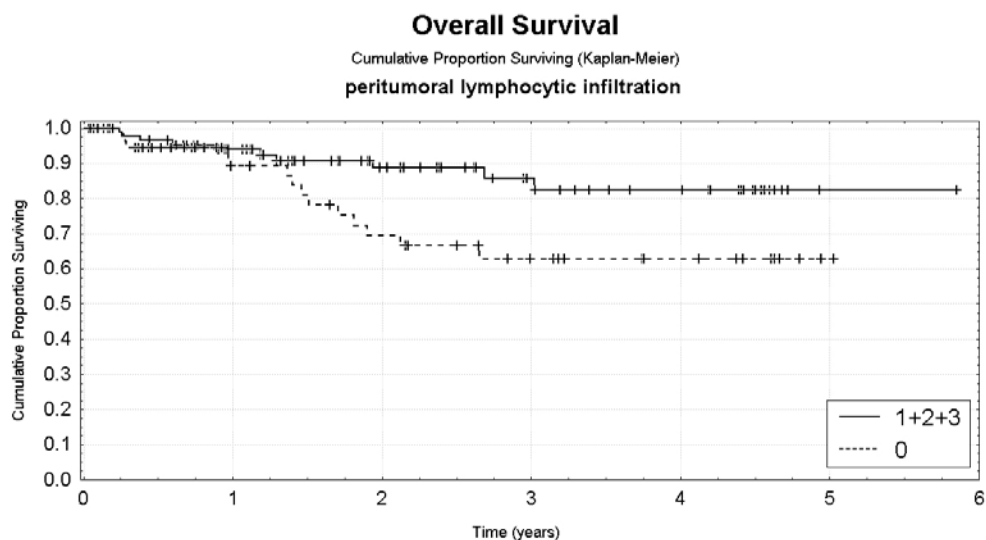


Fig. 6. Presence of peritumoral lymphocytes (PTL) was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ( $p < 0.05$ ). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

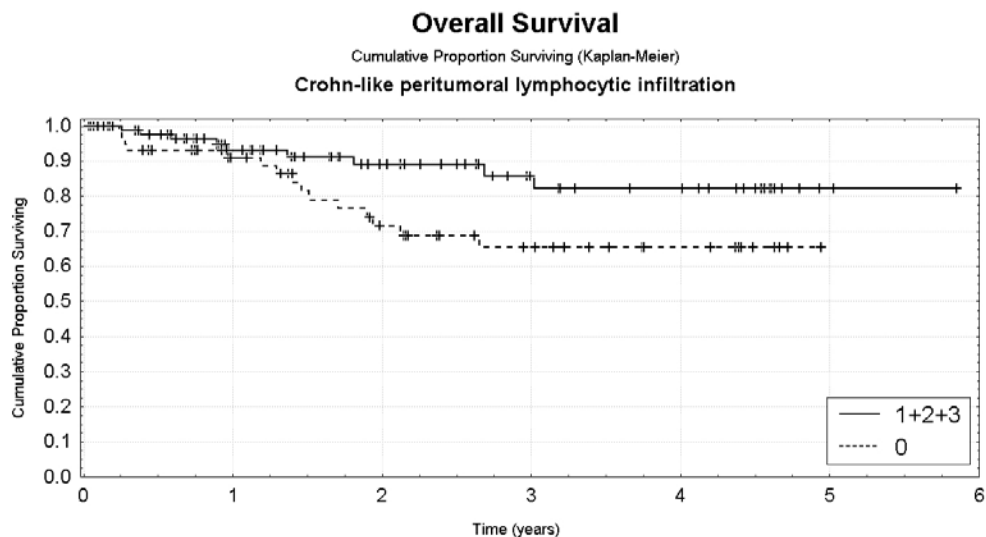


Fig. 7. Presence of Crohn-like PTL was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ( $p < 0.05$ ). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

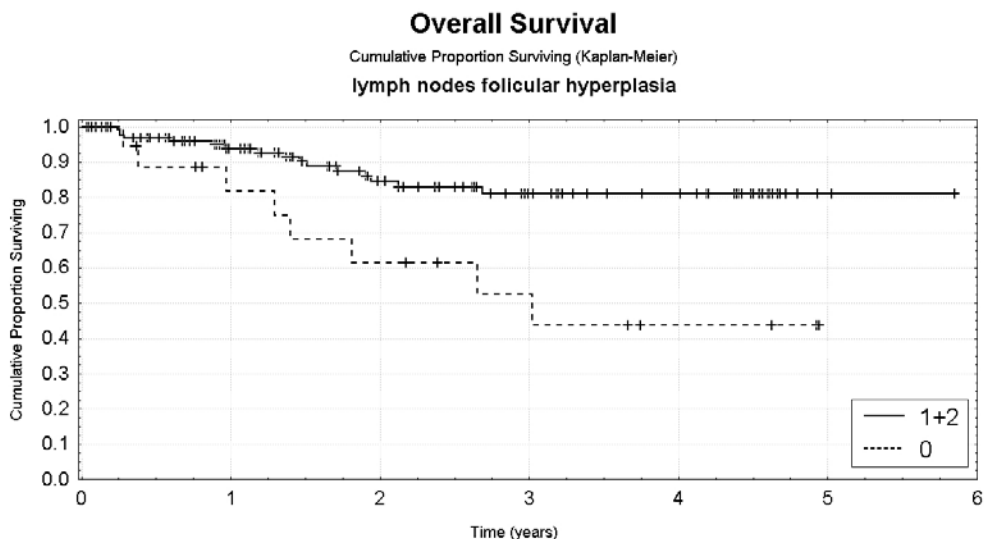


Fig. 8. Lymph node follicular hyperplasia (LN-FH) was verified as a positive prognostic factor for a longer overall survival ( $p < 0.05$ ). The statistical significance of LN-FH increased also with the raised density of infiltration. LN-FH positivity decreased the risk of a shorter overall survival 3.3x.

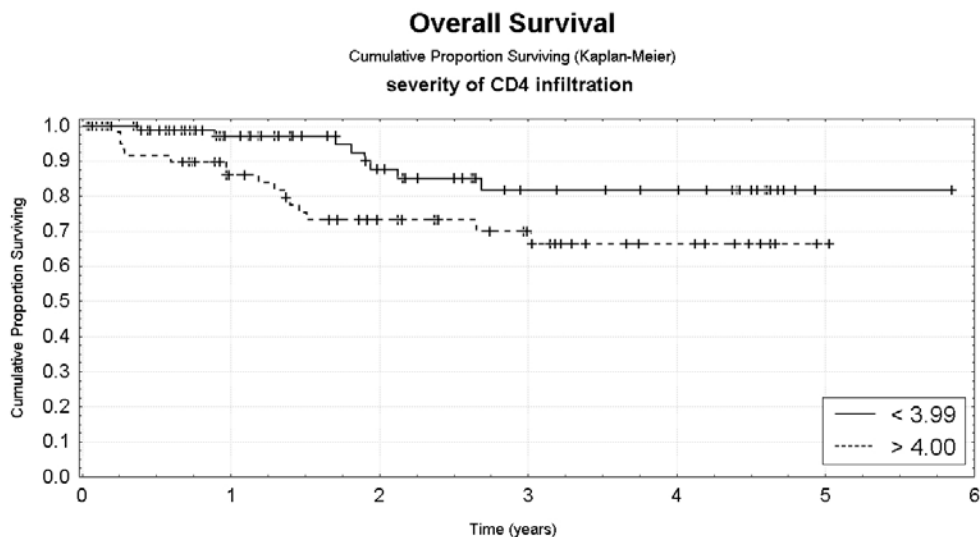


Fig. 9. Severity of CD4+ lymphocytic intratumoral infiltration was proved as a significant factor for the prognosis of overall survival (cut off 4cells/HPF) with a 2.5x increased hazard ratio in patients over the cut off ( $p < 0.05$ ).

The Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by metastatic process and LN-FH as the best prognostic factors for the prediction of the risk of shorter overall survival. This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART)( $p < 0.05$ ) (Fig.10.). All other studied parameters were not proved as statistically significant for the prognosis of overall survival.

## Classification and Regression Tree

### Overall Survival

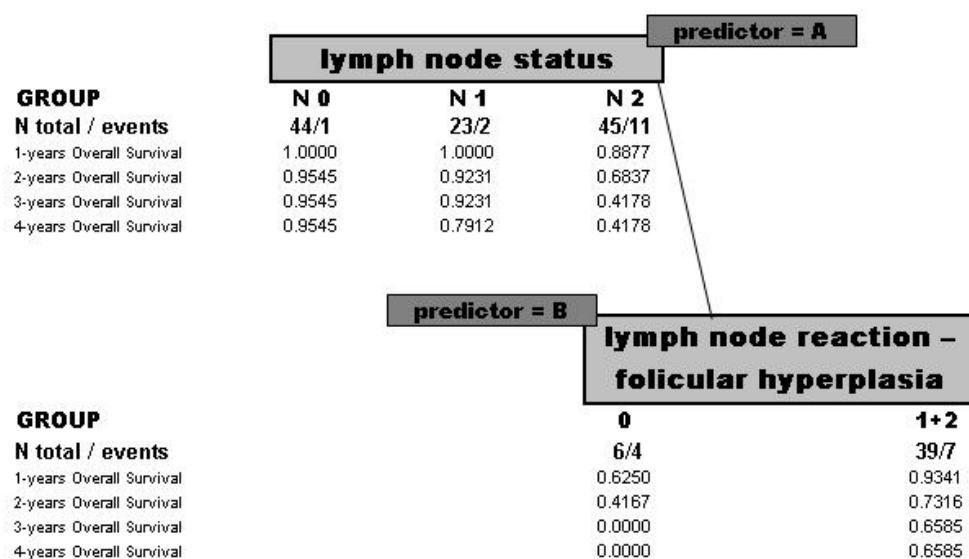


Fig. 10. Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by a metastatic process and LN-FH as the best prognostic factors for the prediction of risk of a shorter overall survival ( $p < 0.05$ ). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART).

Perineural infiltration (PI) was proved as a negative prognostic factor of an earlier recurrence (Fig.11.). Patients with a positive histopathological finding of PI have 3.8x increased risk for shorter DFI.

The severity of CD8+ lymphocytic infiltration was proved by the Cox regression hazard model as a positive prognostic factor enlarging DFI (cut off 30cells/HPF) (Fig.12.). Patients over the cut off have 2.2x increased risk of an early recurrence. The severity of CD4+ lymphocytic infiltration was not proved as a significant factor for the prognosis of DFI. Statistical analysis did not confirm the statistical significance of the CD8/CD4 ratio.

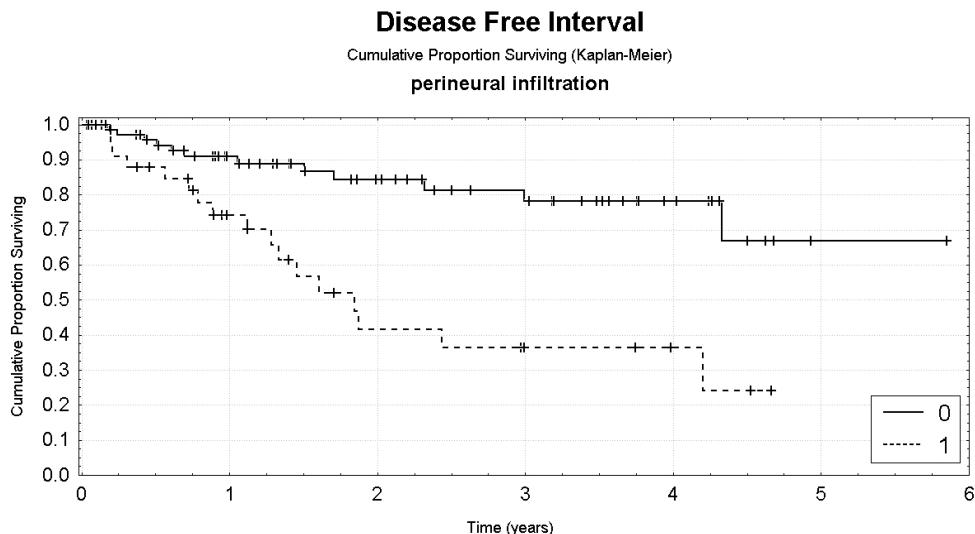


Fig. 11. Perineural infiltration (PI) was proved as a negative prognostic factor of an earlier recurrence ( $p < 0.05$ ). Patients with a positive histopathological finding of PI have a 3.8x increased risk for shorter DFI.

Statistical analysis proved lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of DFI and N2 status of lymph nodes increased the risk of shorter DFI 5x (Fig. 13.).

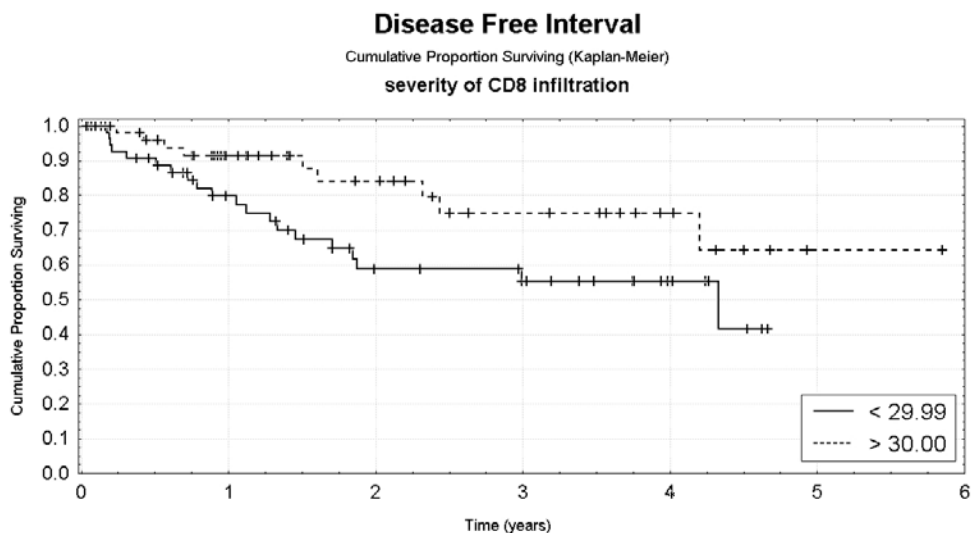


Fig. 12. Severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration was proved as a positive prognostic factor enlarging DFI (cut off 30 cells/HPF) by the Cox regression hazard model ( $p < 0.05$ ). Patients over the cut off have a 2.2x increased risk of an early recurrence.

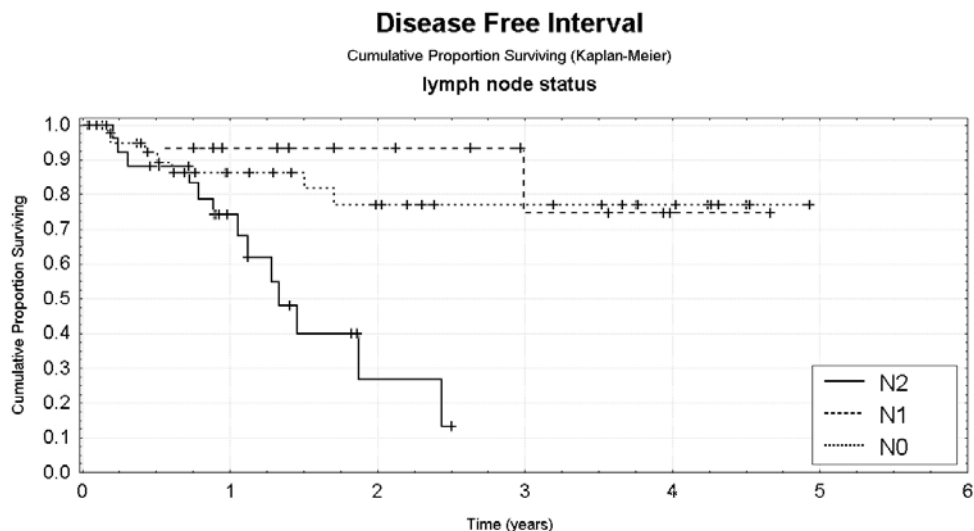


Fig. 13. Statistical analysis proved lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of DFI, and a N2 status of lymph nodes 5x increased the risk of a shorter DFI ( $p < 0.05$ ).

The Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8 positivity of infiltrating lymphocytes as the best prognostic factors for the prediction of risk of early recurrence ( $p < 0.05$ ). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART) (Fig. 14). All other studied parameters were not proved as statistically significant for the prognosis of DFI.

#### 4. Discussion

The role of the adaptive immunological response in controlling the growth and relapse of CRC remains controversial and contemporary studies have not answered all the questions about the prognosis of patients after radical surgical treatment of CRC (Galon et al., 2006; Ohtani, 2007; Van den Eynde & Hendlisz, 2009). We analysed our large cohort of patients of CRC with consideration to detect the negative and also positive prognostic factors of early recurrence of the disease and the poor overall survival after radical surgery. It was stimulated by the unsatisfactory situation and some dilemmas in the indication of surgical and oncological treatment, when early recurrence depreciates our effort to radical surgery with a high risk of complications and the long time of the decreased quality of life of our patients.

In the presented clinico-pathological study we demonstrated that lymph node infiltration by a metastatic process, N2 status of lymph nodes, VI, and extent of CD4+ lymphocytic intratumoral infiltration as negative prognostic factors of OS. In contrary PTL, Crohn-like PTL, LN-FH, and severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration were proved as positive prognostic factors of the overall survival.

# Classification and Regression Tree

## Disease Free Interval

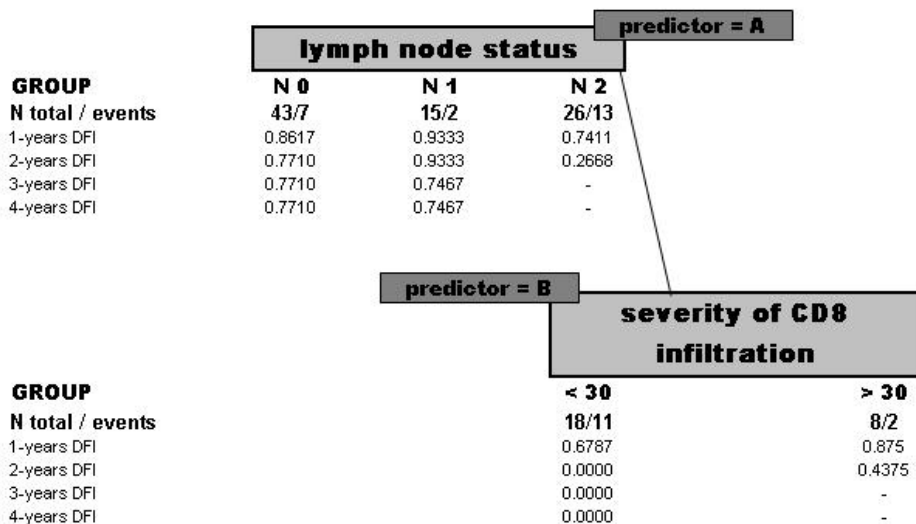


Fig. 14. Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8 positivity as the best prognostic factors for the prediction of risk of an early recurrence ( $p < 0.05$ ). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART).

The combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and LN-FH were proved as the best prognostic factors for the prediction of risk of a shorter overall survival by the Multivariate Cox Regression Hazard Model.

We also demonstrated PI, lymph node metastatic infiltration and the N2 status of lymph nodes as negative prognostic factors of an earlier recurrence, and the severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration as a positive prognostic factor enlarging DFI. The combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration were proved as the best prognostic factors for the prediction of the risk of an early recurrence by the Multivariate Cox Regression Hazard Model.

Our results support the hypothesis that the adaptive immunological response in tumor tissue and its reaction in regional lymph nodes can influence the behavior of CRC and so affect the prognosis of patients (Atreya & Neurath, 2008; Galon et al., 2006). CD4 and CD8 positivity of ITL was demonstrated as a key histopathological sign of tumor-specific immune response that could reflect the contemporary clinical situation and a tendency to relapse (CD4+) or the larger overall survival (CD8+) (Chiba et al. 2004; Koch et al., 2006, Pages et al., 2010).

We assessed several types of tumor infiltrating lymphocytes and clearly identified their relationships to relapse and the overall survival as positive or negative prognostic factors in contrary to previous publications that evaluated only the infiltration of the tumor but not the quality and type of infiltration (Ogino et al., 2009).

Tumor infiltration by lymphocytes seems to be a promising prognostic factor reflecting the risk of patients to early recurrence or poor overall survival. Future work has to be focused on the molecular-biological background of tumor infiltration by lymphocytes to understand their pathophysiological functions (Pages et al., 2005, Zbar, 2004).

## 5. Conclusion

Tumor infiltrating lymphocytes seem to be promising prognostic factors that could find their use in colorectal surgery and consecutive oncological treatment as an indicator of the type or combinations of therapies reflecting the risk of patients to early recurrence or poor overall survival. The TIL status corresponds to immune control of cancer progression.

## 6. Acknowledgment

This article was supported by research project MSM 0021620819 (Replacement of and support to some vital organs) and grant IGA MZ CR 10230 and IGA MZ CR 12025 and specific students research grant of Charles University SVV-2011- 262 806.

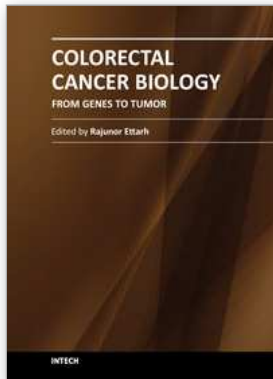
## 7. References

- Atreya, I., & Neurath, M. F. (2008). Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol.8, No.4, (April 2008), pp. 561-572, ISSN 1473-7140
- Bird, N. C., Mangnall, D., & Majeed, A. W. (2006). Biology of colorectal liver metastases: a review. *Journal of Surgical Oncology*, Vol.94, No.1, (July 2006), pp. 68-80, ISSN 0022-4790
- Chiba, T., Ohtani, H., Mizoi, T., Naito, Y., Sato, E., Nagura, H., Ohuchi, A., Ohuchi, K., Shiiba, K., Kurokawa, Y. & Satomi, S. (2004). Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *British Journal of Cancer*, Vol.91, No.9, (November 2004), pp. 1711-1717, ISSN 0007-0920
- Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J. M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T., Micheli, A., Sant, M., Weir, H. K., Elwood, J. M., Tsukuma, H., Koifman, S., Silva, E., Francisci, S., Santaquilani, M., Verdecchia, A., Storm, H. H., Young, J. L. & CONCORD Working Group. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*, Vol.9, No.8, (August 2008), pp. 730-756, ISSN 1470-2045
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer - cell subsets. *Trends in Immunology*, Vol.22, No.11, (November 2001), pp. 633-640, ISSN 1471-4906
- Cooper, M. A., Colonna, M., & Yokoyama, W. M. (2009). Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo reports*, Vol.10, No.10, (October 2009), pp. 1103-1110, ISSN 1469-221X

- Forsell, J., Oberg, A., Henriksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., & Palmquist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical Cancer research*, Vol.1, No.13, (March 2007), pp. 1472-1479, ISSN 1078-0432.
- Gajewski, T. F., Meng, Y., Harlin, H. (2006). Immune suppression in the tumor microenvironment. *Journal of Immunotherapy*, Vol.29, No.3, (May-June 2006), pp. 233-240, ISSN 1524-9557
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H. & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, Vol.313, No.5795, (September 2006), pp. 1960-1964, ISSN 0036-8075
- Jochems C, Schlom J. (2011). Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood)*. Vol. 236, No.5 (May 2011), pp. 567-79, ISSN 1535-3702
- Kobayashi, H., Mochizuki, H., Sugihara, K., Sugihara, K., Morita, T., Kotake, K., Teramoto, T., Kameoka, S., Saito, Y., Takahashi, K., Hase, K., Oya, M., Maeda, K., Hirai, T., Kameyama, M., Shirouzu, K. & Muto T. (2007). Characteristics of recurrence and surveillance tools after curative resection for colorectal cancer: a multicenter study. *Surgery*, Vol.141, No.1, (January 2007), pp. 67-75, ISSN 0039-6060
- Koch, M., & Beckhove, P. (2006). Op den Winkel J et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Annals of Surgery*, Vol.244, No.6, (December 2006), pp. 986-992, ISSN 0003-4932
- Ljunggren, H.G., & Malmberg, K.J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews. Immunology*, Vol.7, No.5, (May 2007), pp. 329-339, ISSN 1474-1733
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., & Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, Vol.26, No.4, (April 2007), pp. 503-517, ISSN 1074-7613
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari M. C., & Moretta, A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction. *Immunological Reviews*, Vol.214, No.1, (December 2006), pp. 219-228, ISSN 0105-2896
- Ogino, S., Nosho, K., Iraha, N., Meyerhardt, J. A., & Baba, Y. (2009). Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylation phenotype. *Clinical Cancer Research*, Vol. 15, No. 20, (October 2009), pp. 6412-6420, ISSN 1078-0432
- Ohtani, H. (2007). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer, *Cancer immunity*, Vol. 7, (February 2007), pp. 4, ISSN 1424-9634
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Galon, J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, Vol.353, No.25, (December 2005), pp. 2654-2666, ISSN 0028-4793



- Pagès, F., Galon, J., Die-Nosjeanu, M. C., Tartour, E., & Sautes-Fridman, C. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, Vol.29, No.8, (February 2010), pp. 1093-1102, ISSN 0950-9232
- Pollard, J. W. (2004). Tumor-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, Vol.4, No.1, (January 2004), pp. 71-78, ISSN 1474-175X
- Sandel, M. H., Dadabayev, A. R., Menon, A. G., Morreau, H., Melief, C. J., Offringa, R., van der Burg, S. H., Janssen-van Rhijn, C. M., Ensink, N. G., Tollenaar, R. A., van de Velde, C. J., & Kuppen, P. J. (2005). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clinical Cancer Research*, Vol.11, No.7, (April 2005), pp. 2576-2582, ISSN 1078-0432
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*, Vol.21, pp. 685-711, ISSN 0732-0582
- Stojanovic, A., & Cerwenka, A. (2011). Natural Killer cells and solid tumors. In: *Journal of Innate Immunity*, 10.6.2011, Available from: <<http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?doi=325465>>.
- Talmadge, J. E., Donkor, M., & Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer and Metastasis Reviews*. Vol.26, No.3-4, (December 2007), pp. 373-400, ISSN 0167-7659
- Van den Eynde, M., & Hendlish, A. (2009) Treatment of colorectal liver metastases: a review. *Reviews on Recent Clinical Trials*, Vol.4, No.1, (January 2009), pp. 56-62, ISSN 1574-8871
- Zbar, A. P. (2004) The immunology of colorectal cancer. *Surgical Oncology*, Vol.13, No.2-3, (August-November 2004), pp. 45-53, ISSN 0960-7404



## **Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor**

Edited by Dr. Rajunor Ettarh

ISBN 978-953-51-0062-1

Hard cover, 446 pages

**Publisher** InTech

**Published online** 10, February, 2012

**Published in print edition** February, 2012

Colorectal cancer is a common disease, affecting millions worldwide and represents a global health problem. Effective therapeutic solutions and control measures for the disease will come from the collective research efforts of clinicians and scientists worldwide. This book presents the current status of the strides being made to understand the fundamental scientific basis of colorectal cancer. It provides contributions from scientists, clinicians and investigators from 20 different countries. The four sections of this volume examine the evidence and data in relation to genes and various polymorphisms, tumor microenvironment and infections associated with colorectal cancer. An increasingly better appreciation of the complex inter-connected basic biology of colorectal cancer will translate into effective measures for management and treatment of the disease. Research scientists and investigators as well as clinicians searching for a good understanding of the disease will find this book useful.

### **How to reference**

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Vaclav Liska, Ondrej Daum, Petr Novak, Vladislav Treska, Ondrej Vycital, Jan Bruha, Pavel Pitule and Lubos Holubec (2012). Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Factor of Early Recurrence and Poor Prognosis of Colorectal Cancer After Radical Surgical Treatment, *Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor*, Dr. Rajunor Ettarh (Ed.), ISBN: 978-953-51-0062-1, InTech, Available from:  
<http://www.intechopen.com/books/colorectal-cancer-biology-from-genes-to-tumor/tumor-infiltrating-lymphocytes-as-prognostic-factor-of-early-recurrence-and-poor-prognosis-of-colore>

**INTECH**  
open science | open minds

### **InTech Europe**

University Campus STeP Ri  
Slavka Krautzeka 83/A  
51000 Rijeka, Croatia  
Phone: +385 (51) 770 447  
Fax: +385 (51) 686 166  
[www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)

### **InTech China**

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai  
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China  
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元  
Phone: +86-21-62489820  
Fax: +86-21-62489821

LIŠKA ,V., O. VYČÍTAL, O. DAUM, P. NOVÁK, V. TŘEŠKA, J. BRŮHA, P. PITULE a L. HOLUBE. Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and D57+ lymphocytes as independent prognostic factor after radical surgical treatment. *Anticancer Research*, 2012, **32**(5), 2129-2132. ISSN 0250-7005. IF 1,414.

# Infiltration of Colorectal Carcinoma by S100+ Dendritic Cells and CD57+ Lymphocytes as Independent Prognostic Factors after Radical Surgical Treatment

VACLAV LISKA<sup>1</sup>, ONDREJ VYCITAL<sup>1</sup>, ONDREJ DAUM<sup>2</sup>, PETR NOVAK<sup>1</sup>,  
VLADISLAV TRESKA<sup>1</sup>, JAN BRUHA<sup>1</sup>, PAVEL PITULE<sup>1</sup> and LUBOS HOLUBEC<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, <sup>2</sup>Sikl Department of Pathology and <sup>3</sup>Department of Oncology,  
Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Czech Republic

**Abstract.** *Background:* S100<sup>+</sup> dendritic cells and CD57<sup>+</sup> lymphocytes are factors reflecting the immune system's ability to suppress the progress of tumor growth. CD57<sup>+</sup> cells include natural killer cells and late stages of T-effector lymphocytes. We evaluated the relationship between the known clinical and histological factors and tumor markers as well as the presence of S100<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> cells in the tissue of colorectal carcinoma with the aim of detecting patients at high risk of short overall survival (OS) or short disease-free interval (DFI) after radical surgical treatment and we further analyzed whether S100<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> positivity could bring on new information regarding the treatment regimen. *Materials and Methods:* Data of 150 patients (97 males and 53 females) that underwent an elective radical surgical procedure for colorectal cancer were studied. The influence on DFI and on OS of the following parameters was evaluated: grading, staging and positivity for S100 and CD57 by immunohistochemical staining. We also analyzed the relation of preoperative serum levels of the tumor markers Carcinoembryonic Antigen (CEA), Cancer Antigen 19-9 (CA19-9), Cancer Antigen 72-4 (CA72-4), Thymidine kinase (TK), Tissue-Specific Polypeptide Antigen (TPS) and Tissue Polypeptide Antigen (TPA) in relation to S100 and CD57 positivity/negativity for the same patients. *Results:* OS at 1, 3 and 5 years was 92.2%, 76.5% and 70.2%; the DFI at 1, 3 and 5 years was 85.3%, 64.3% and 49.4%. CD57 positivity in the tumor mass was proven as a positive prognostic factor for OS. Risk of short OS was 2.5-fold higher in patients with low tumor infiltration by CD57<sup>+</sup> lymphocytes. The combination of N2 stage for lymph nodes and the absence of CD57<sup>+</sup> cells was

proven to be the strongest negative prognostic factor for OS. No significant influence of CD57 positivity on DFI appeared. There was no significant influence of S100 positivity on OS or DFI; nor was there any statistical dependence of CD57 and S100 positivity or negativity on preoperative serum levels of CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS or TPA. Both studied factors were shown to be statistically independent factors. *Conclusion:* The present study showed infiltration of colorectal cancer tissue by CD57<sup>+</sup> cells as being an important independent positive prognostic factor for OS.

S100<sup>+</sup> dendritic cells (DC) and CD57<sup>+</sup> lymphocytes are factors reflecting the immune system's ability to suppress the progress of tumor growth. Atreya and Neurath demonstrated their role in suppression of the progress of colorectal carcinoma (1). CD57 is a glycoprotein with cell adhesion function also called human natural killer-1 or LEU7 (2). CD57<sup>+</sup> cells include natural killer (NK) and late stages of T-effector lymphocytes. NK cells as a part of the cellular innate immunity are able to destroy malignant cells (2). NK cells mediate lysis of malignant cells but the mechanism of detection of cancer cells is different from that of the CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes (3); NK cells do not recognize specific tumor-associated antigens of cancer cells as CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes do. NK cells lyse cancer cells that are opsonized by surface antibodies or after stimulation by other signals such as cytokines, produced by antigen-presenting cells (4). A lower preoperative number of NK cells was associated with increased postoperative recurrence of colorectal cancer (5). The S100 antigen protein is present in many types of cells: cells of neural crest, chondrocytes, adipocytes, myoepithelial cells, macrophages, Langerhans cells and dendritic cells. In particular dendritic cells (DC) (antigen-presenting cells) play a key role in activating naive T-lymphocytes and NK cells. DC gather antigens in their surrounding tissues, process them and migrate to the secondary lymphoid organs to present antigens on major histocompatibility complexes class I or class II to CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes or CD4<sup>+</sup> helper T-lymphocytes (2, 6). In the majority of the available studies, increased

*Correspondence to:* Vaclav Liska, MD, Ph.D., Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Alej Svobody 80, 304 00 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 377104271, e-mail: Vena.Liska@seznam.cz, LiskaV@fnplzen.cz

*Key Words:* S100<sup>+</sup> dendritic cells, CD57<sup>+</sup> lymphocytes, colorectal cancer, prognosis.

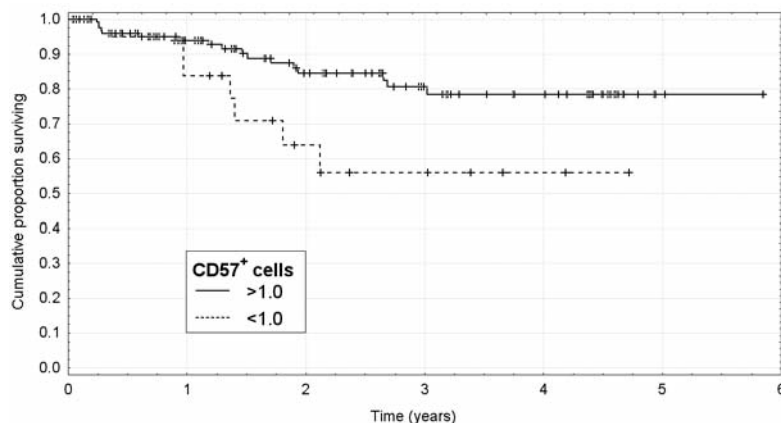


Figure 1. CD57 positivity as a statistically significant prognostic factor for OS (cut-off 1 cell, p-value=0.0350).

numbers of immune cells infiltrating the tumors correlate with an improved prognosis for cancer patients (7), but the role of certain lymphocytes remains unclear (8). Here we evaluated the relationship between the known clinical, histological factors and tumor markers that are used in standard clinical follow-up of patients and the presence of S100<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> cells in the tissue of colorectal carcinoma (CRC) with the aim of detecting patients with a high risk of short overall survival (OS) or short disease-free interval (DFI), after radical surgical treatment and to analyze whether S100<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> positivity could bring new information on the treatment regimen, independently of standard clinical examinations.

**Materials and Methods**

Data from 150 patients (97 males and 53 females) in a patient cohort that underwent an elective radical surgical procedure at the Department of Surgery of the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen between 2004-2007. The influence on DFI and on OS of following parameters was evaluated: grading, staging and positivity of S100 and CD57 by immunohistochemical staining.

*Histological and immunohistochemical analysis.* Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and was embedded in paraffin. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin. Three different sections of each tumor were examined.

For the immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD57 (clone NK1, ready-to-use; Ventana, Rocklin, CA, USA), and S100 (polyclonal, 1:1000; Dako, Glostrup, Denmark). Microwave pretreatment was used in both cases. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA, USA). The appropriate positive and negative control slides were employed. The number of DCs and NK cells was evaluated in five high power microscopical fields and was expressed as the number of immunopositive cells per high power microscopical field.

*Oncomarkers.* All the blood samples for assessment of tumor markers were obtained under standard conditions from the cubital vein during

**Classification and regression tree**

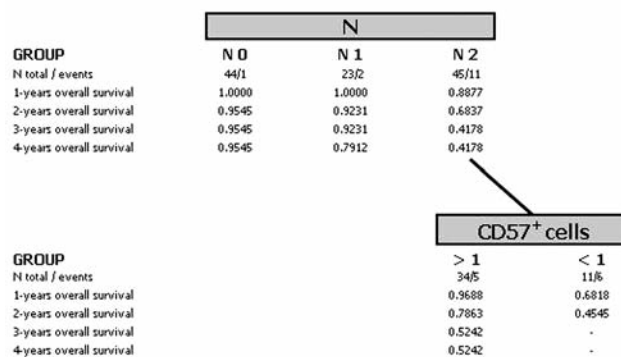


Figure 2. Classification and regression tree diagram presenting the strongest negative prognostic factor combination for OS.

the morning hours. The serum for the assessment of routine tumor markers was acquired through centrifugation and was stored at -20°C until laboratory analysis. Tumor markers were assessed at the Department of Nuclear Medicine, Faculty Hospital Pilsen with commercial laboratory kits, in accordance with the manufacturers' recommendations. The following tumor markers were assessed: CEA (ng/ml, Immunotech, Czech Republic), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9, IU/l, Shering-CIS BioInternational, France), cytokeratins: tissue-specific polypeptide antigen (TPS, kIU/l, IDL, Sweden), tissue polypeptide antigen (TPA, kIU/l, DiaSorin, Italy). Thymidine kinase (TK, IU/L) was measured by radioenzyme analysis (REA) using the Immunotech (Prague, Czech Republic) assay kits.

*Statistical analysis.* Statistical analysis was processed by the statistical software Statistica 9.0 (StatSoft, CA, USA). The relationships between the variables were described by the Spearman rank correlation coefficients. The analyses of OS and DFI were performed by Kaplan-Meier survival functions. The influence of given covariates (clinical and histopathological factors or tumor markers) was tested by the log-rank test and the Wilcoxon test. The Cox regression the hazard model, hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (CI) for HR were computed for the evaluation of given clinical and histopathological factors and tumor markers to OS or DFI. Multivariate analysis was

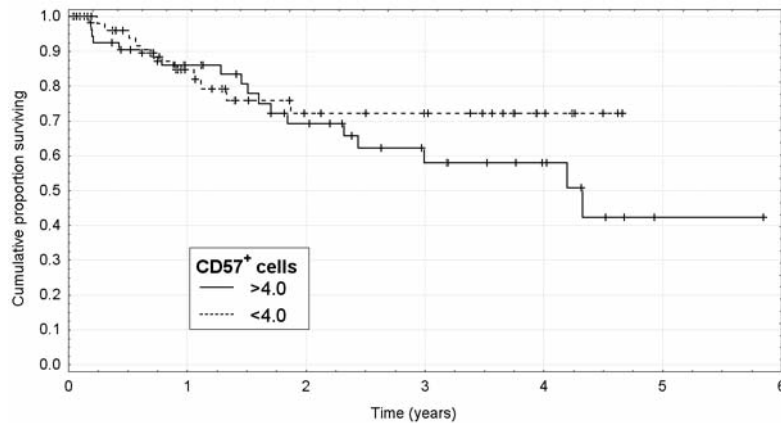


Figure 3. CD57 positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for DFI (cut-off 4 cells,  $p$ -value=0.3415).

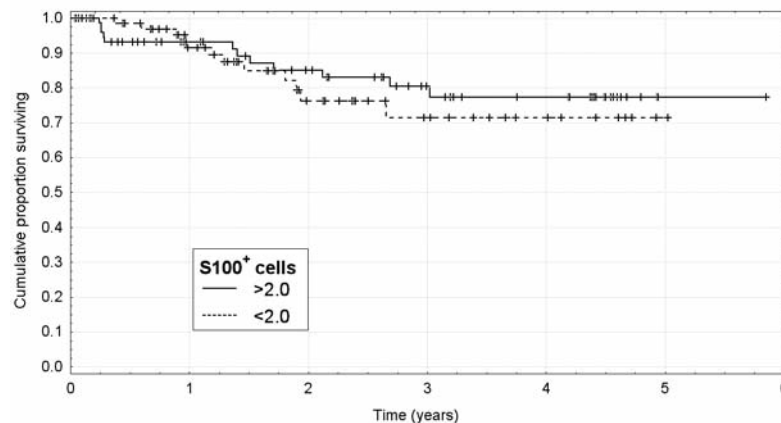


Figure 4. S100 positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for OS (cut-off 2 cells,  $p$ -value=0.5877).

performed by the use of classification and regression trees (CART). The Cox regression hazard model (stepwise regression) was applied in order to find the predictors in CART.

## Results

There were 93 males (mean age=65.27 years, median=65.94 years) and 57 females (mean=68.07 years median=67.72 years) in studied patients cohort. No statistically significant differences were proven regarding the age between males and females. OS at 1, 3 and 5 years was 92.2%, 76.5% and 70.2%; the resulting DFI at 1, 3 and 5 years was 85.3%, 64.3% and 49.4%. CD57 positivity of cells in the mass of tumor was a statistically significant positive prognostic factor (cut-off 1 cell,  $p$ -value=0.0350, Figure 1) of OS. Risk of short OS was 2.5-fold higher in patients with low tumor infiltration by CD57<sup>+</sup> lymphocytes. CART showed that the combination of N2 stage of lymph node disease and the absence of CD57<sup>+</sup> cells was the strongest negative prognostic factor of OS (Figure 2). No

statistically significant influence of CD57 positivity on DFI appeared (Figure 3).

There was no statistically significant influence of S100 positivity on OS nor on DFI (Figures 4 and 5). There was no statistical dependency or correlation of CD57 and S100 positivity or negativity on preoperative serum levels of CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS or TPA. Both studied factors were found to be statistically independent factors.

## Discussion

The role of the immunological response in controlling the growth and relapse of CRC remains controversial and contemporary studies have not answered all the questions about the prognosis of patients after radical surgical treatment of CRC (9, 10, 11, 14). We analyzed a large cohort of patients with CRC aiming at detecting the relation between these types of immune cells and the prognosis of patients after radical CRC surgery. This aim was stimulated by some dilemmas in the decision for

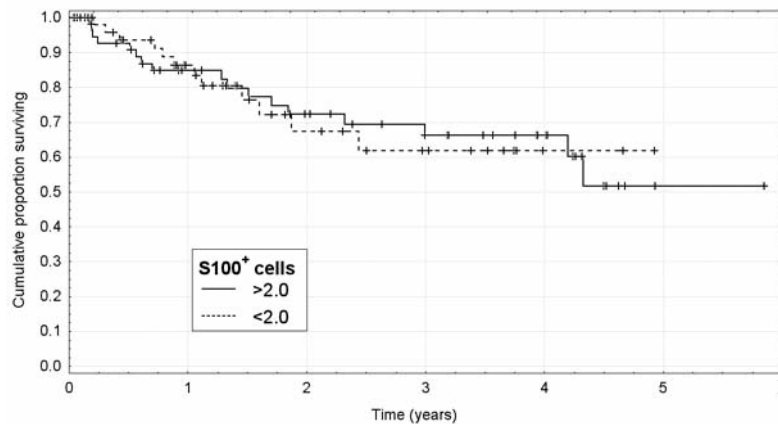


Figure 5. *S100* positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for DFI (cut-off 2 cells, *p*-value=0.9173).

surgical and oncological treatment, when early recurrence depreciates the effort of radical surgery due to a high risk of complications and the long duration of the decreased quality of life of the patients (3, 12). Our results support the hypothesis that the immunological response observed in the tumor tissue can influence the behavior of CRC and subsequently affect the prognosis of patients (9). Tumor infiltration by NK cells seems to be a promising positive prognostic factor reflecting the decreased risk of patients for poor OS. Future work should focus on the molecular-biological background of tumor infiltration by lymphocytes to provide understanding over their pathophysiological functions (1). The tumor markers inform us of the negative prognosis of patients (early recurrence (DFI) or for the poor prognosis for long OS (13). On the other hand CD57<sup>+</sup> positivity was demonstrated as being a positive prognostic factor for radically operated patients with CRC. This information is more important for clinicians than a negative factor would be, since it could modify their decision about adjuvant oncological treatment or follow-up regimen. The present study demonstrated the positive influence of tumor-infiltrating CD57<sup>+</sup> cells on the prognosis of CRC. The results could lead upon intensifying the follow-up strategy for the patients with higher risk of early CRC recurrence.

**Acknowledgements**

This study was supported by the grant IGA MZ ČR 12025 from Internal Grant Agency of Ministry of Health of Czech Republic.

**References**

1 Atreya I and Neurath MF: Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 8(4): 563-565, 2008.  
 2 Strioga M, Pasukoniene V and Characiejus D: CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T-cells and their role in health and disease. *Immunology* 134(1): 17-32, 2011.

3 Cooper MA, Colonna M and Yokoyama WM: Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo Rep* 10(10): 1103-1110, 2009.  
 4 Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC and Moretta A: Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction. *Immunol Rev* 214(1): 219-228, 2006.  
 5 Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA and Moreno M: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79(12): 2320-2328, 1997.  
 6 Larmonier J: Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1-11, 2010.  
 7 Stojanovic A and Cerwenka A: Natural killer cells and solid tumors. *J Innate Immun* 3(4): 355-364, 2011.  
 8 Zbar AP: The immunology of colorectal cancer. *Surg Oncol* 13: 45-53, 2004.  
 9 Galon J, Costes A and Sanchez-Cabo F: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-1964, 2006.  
 10 Ohtani H: Focus on TILs: prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun* 21: 4-7, 2007.  
 11 Van den Eynde M and Hendlisz A: Treatment of colorectal liver metastases: a review. *Rev Recent Clin Trials* 4: 56-62, 2009.  
 12 Chauvin C and Josien N: Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. *J Immunol* 181: 11-16, 2008.  
 13 Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C and Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 39: 718-27, 2003.  
 14 Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C and Fridman WH: Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29: 1093-1102, 2010.

Received February 13, 2012  
 Revised April 13, 2012  
 Accepted April 17, 2012

TŘEŠKA, V., J. VODIČKA, V. ŠPIDLEN, T. SKALICKÝ, J. FICHTL, V. ŠIMÁNEK, J. ŠAFRÁNEK, A. SUTNAR a J. BRŮHA. Jaterní a plicní metastázy kolorektálního karcinomu – zkušenosti chirurgické kliniky FN v Plzni. *Rozhledy v chirurgii*. 2013, **92**(9), 488-493. ISSN 0035-9351.



## Původní práce

# Jaterní a plicní metastázy kolorektálního karcinomu – zkušenosti Chirurgické kliniky FN v Plzni

V. Třeška, J. Vodička, V. Špidlen, T. Skalický, J. Fichtl, V. Šimánek, J. Šafránek, A. Sutnar, J. Brůha

Chirurgická klinika FN a LFUK v Plzni, přednosta: Prof. MUDr. V. Třeška, DrSc.

Podpořeno Výzkumným projektem P 36 Univerzity Karlovy v Praze

### Souhrn

**Úvod:** Jaterní a plicní metastázy kolorektálního karcinomu se vyvinou přibližně u 20–70 %, resp. u 10–22% nemocných s kolorektálním karcinomem. Otázka jejich optimální léčby je stále předmětem mnoha diskuzí. Cílem práce proto bylo zhodnocení výsledků chirurgické léčby v rámci multimodálního léčebného postupu.

**Materiál a metodika:** V letech 2002–4/2013 jsme řešili celkem 30 nemocných s oběma typy metastáz kolorektálního karcinomu. Průměrný věk nemocných byl  $62,8 \pm 10,7$  roku. U 19 nemocných se jednalo o metachronní a u 11 pak o synchronní metastázy. U metachronních metastáz předcházely jaterní metastázy ve 14 případech plicním a plicní metastázy pak byly diagnostikovány před jaterními u 5 nemocných. U sedmi nemocných se oba typy metastáz vyskytly současně. Jaterní resekci jsme provedli u 23, radiofrekvenční ablaci (RFA) u 7 nemocných. U 15 nemocných s plicními metastázami byla provedena laserová metastasektomie, u 14 pak plicní resekce a u jednoho nemocného RFA ložisek. U 25 nemocných jaterní výkon předcházel výkonu plicnímu. 73,3 % nemocných mělo následnou adjuvantní onkologickou léčbu.

**Výsledky:** Do 30 dní po operaci zemřel 1 nemocný (3,3 %) na aktinomykotickou sepsi komplikovanou infekcí methicillin rezistentním stafylokokem. Morbidita souboru činila 10 %. K recidivě metastáz v játrech došlo u 6 nemocných, u všech byla provedena RFA. Medián celkového a bezpříznakového přežívání nemocných po primární operaci metastáz byl 6,9, resp. 1,1 roku.

**Závěr:** Chirurgická léčba je jedinou alternativou v rámci multimodální léčby nemocných s jaterními a plicními metastázami kolorektálního původu, která nabízí nemocným dobré dlouhodobé výsledky.

**Klíčová slova:** jaterní a plicní metastázy kolorektálního karcinomu – chirurgická léčba

### Summary

**Třeška V, Vodička J, Špidlen V, Skalický T, Fichtl J, Šimánek V, Šafránek J, Sutnar A, Brůha J. Liver and pulmonary metastases of the colorectal carcinoma – the experience of the Department of Surgery, University Hospital in Pilsen**

**Introduction:** Liver and pulmonary metastases of the colorectal carcinoma develop in about 20–70%, resp. in 10–22% patients with the colorectal carcinoma. Their treatment is still a matter of discussion. The aim of our study was to evaluate the results of surgical treatment as a part of the multimodal approach.

**Material and methods:** 30 patients with liver and pulmonary colorectal metastases were operated on between 2002 and 4/2013. The average age was  $62.8 \pm 10.7$  years. 19 patients had metachronous and 11 synchronous metastases. The liver metastases preceded pulmonary in 14 cases, and vice versa in 5 patients. Both types of metastases developed in seven patients simultaneously. Liver resection was performed in 23, radiofrequency ablation (RFA) in 7 patients. Laser pulmonary metastasectomy was performed in 15, pulmonary resection in 14 and RFA in one patient. The liver procedure preceded pulmonary in 25 patients. 73.3% patients had adjuvant oncological treatment.

**Results:** 30 days mortality rate was 3.3% (N=1) for the actinomycotic sepsis complicated with MRSA infection. Morbidity rate was 10%. Recurrence of liver metastases developed in 6 patients. RFA was performed in all patients. The median of overall and disease free survival was 6.9, resp. 1.1 years.

**Conclusion:** Surgical treatment as a part of the multimodal treatment is the only radical treatment for patients with liver and pulmonary metastases. It offers good long-term results.

**Key words:** liver and pulmonary metastases of the colorectal carcinoma – surgical treatment

*Rozhl Chir 2013;92:488–493*

## ÚVOD

Synchronní a metachronní metastázy kolorektálního karcinomu jsou diagnostikovány u 60–70 % nemocných.

Nejčastější jejich lokalizací jsou právě játra (ve 20 až 70 %) a plíce (v 10–20 %) – 1, 2. Radikální chirurgická léčba jaterních i plicních metastáz kolorektálního původu je dnes nezpochybnitelnou metodou v rámci multimodální onkochirurgické léčby, nabízející nemocným

kvalitní dlouhodobé přežívání. 5leté celkové přežívání po resekci jater ve spojení s onkologickou léčbou se dnes v řadě studií pohybuje mezi 35–58 % [3,4] a u plic pak mezi 21–43 % [5,6]. Samotná onkologická léčba pak přináší minimální efekt s 5letým celkovým přežíváním jen v 0,4–4 % nemocných. Obecné pravidlo chirurgické léčby u metastazujícího kolorektálního karcinomu je radikální resekce všech chirurgicky řešitelných metastáz. To platí rovněž pro jaterní a plicní metastázy, ať již diagnostikované současně, nebo v různém časovém intervalu po sobě. Nicméně stále zůstává řada otázek v oblasti léčby nemocných s jaterními a plicními metastázami kolorektálního původu nedořešených především z hlediska optimalizace výběru nemocných k resekční léčbě. Studie navazuje na naši práci publikovanou před 3 lety [7] a snaží se o zhodnocení dlouhodobějších výsledků onkochirurgických postupů při řešení jaterních a plicních metastáz kolorektálního karcinomu.

## MATERIÁL A METODIKA

V letech 2002 až 4/2013 jsme řešili celkem 30 nemocných s jaterními (JMKRK) a plicními metastázami

(PMKRK) kolorektálního karcinomu. Jednalo se o 20 mužů a 10 žen průměrného věku  $62,8 \pm 10,7$  roku (32–75 let). Primárním nádorem byl ve 13 případech karcinom rekta, v 9 karcinom rektosigmatu a v 8 případech se jednalo o karcinom tračnicku. U 19 nemocných šlo o metachronní a u 11 pak o synchronní metastázy ve vztahu k primárnímu nádoru. U metachronních metastáz předcházely JMKRK ve 14 případech PMKRK a PMKRK pak byly diagnostikovány před JMKRK u 5 nemocných. Metachronní metastázy byly diagnostikovány v intervalu 10 měsíců – 5,6 roku po operaci primárního nádoru. U sedmi nemocných se JMKRK a PMKRK vyskytly současně. U 23 nemocných byl interval mezi výskytem obou typů metastáz 1 měsíc – 4 roky.

Léčebná strategie u každého nemocného byla zvolena multioborovým onkochirurgickým týmem. U současného výskytu obou typů metastáz jsme nejprve volili operaci JMKRK a poté v intervalu 14–60 dní operaci plic. Velkou jaterní resekci (> 3 jaterní segmenty) jsme provedli u 13 nemocných, malou resekci u 10 nemocných, RFA u 7 nemocných. U 15 nemocných s PMKRK jsme provedli laserovou metastasektomii, u 12 klínovitou resekci, nebo segmentektomii, 2krát lobektomii a 1krát RFA navigovanou výpočetní tomografií. Osm nemoc-

**Tab. 1: Soubor nemocných (2002–4/2013) s jaterními a plicními metastázami kolorektálního původu**

**Tab. 1: Group of patients (2002–4/2013) with liver and pulmonary colorectal metastases**

N = 30 (20 mužů, 10 žen)

Průměrný věk:  $62,8 \pm 10,7$  let (32–75 let)

Primární nádor: 13krát karcinom rekta, 9krát karcinom rektosigmatu, 8krát karcinom tračnicku

Metachronní metastázy: 19krát (14krát předcházely jaterní plicním metastázám), Synchronní metastázy: 11krát

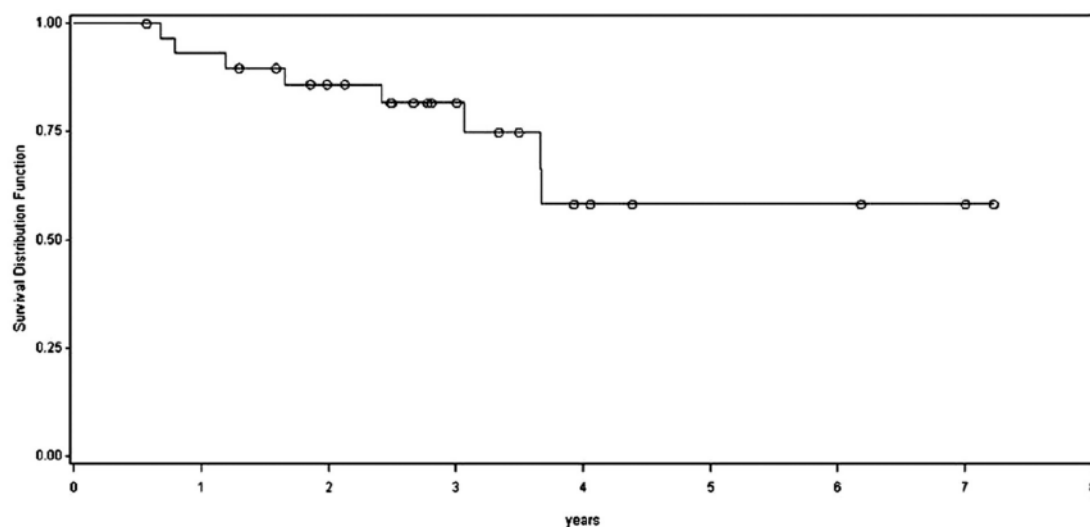
Současný výskyt obou typů metastáz: 7krát

Interval mezi výskytem metastáz (N=23): 1 měsíc – 4 roky

Jaterní výkon: 23krát resekce, 7krát radiofrekvenční ablace

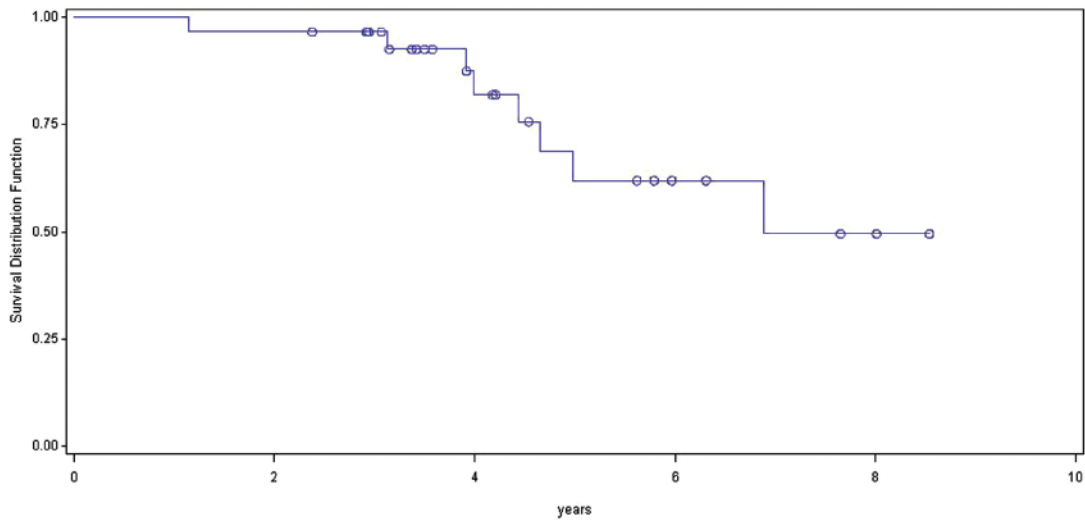
Plicní výkon: 15krát laserová metastasektomie, 14krát resekce, 1krát radiofrekvenční ablace

Adjuvantní onkologická léčba: 22krát (73,3 %)

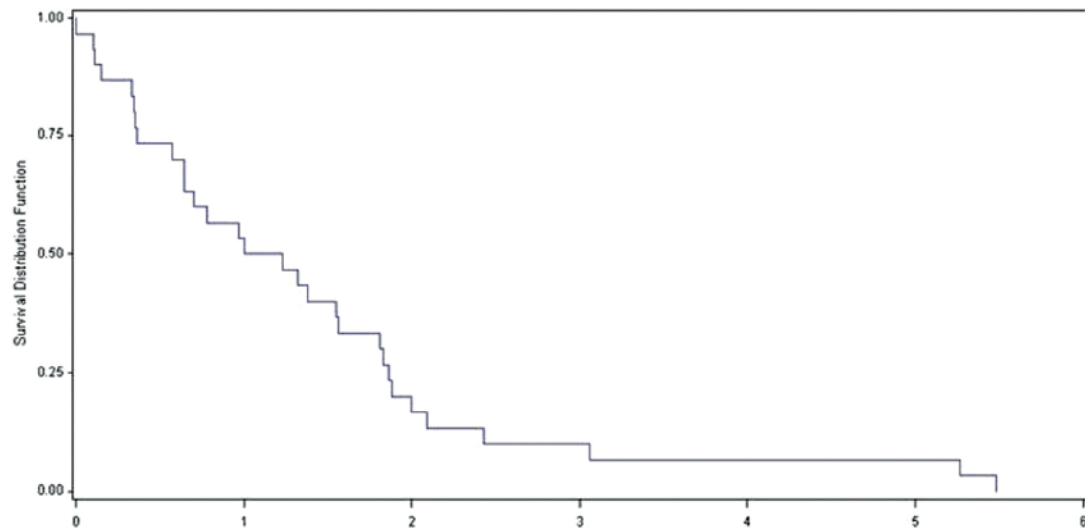


**Graf 1: Celkové přežívání nemocných od primární operace metastáz**

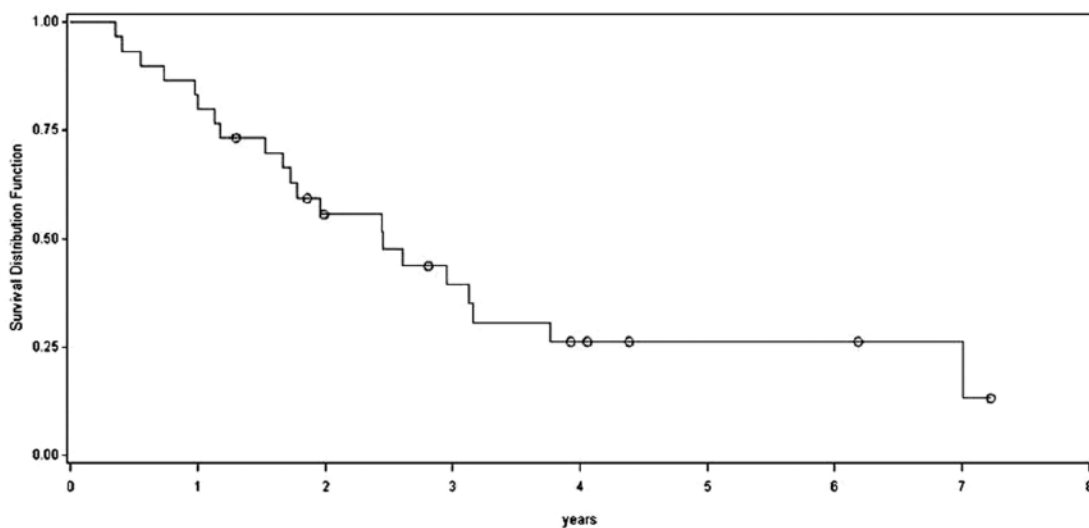
**Graph 1: Overall survival after the primary surgery of metastases**



**Graf 2: Celkové přežívání nemocných od primární operace jater**  
**Graph 2: Overall survival after the primary liver surgery**



**Graf 3: Bezpříznakové přežívání celé skupiny nemocných**  
**Graph 3: Disease free survival of the whole patient group**



**Graf 4: Bezpříznakové přežívání nemocných po jaterním výkonu**  
**Graph 4: Disease free survival after the liver surgery**



ných mělo bilobární PMKRRK, kdy jsme v jedné době nejprve provedli sanaci ložisek v jednom plicním křídle a v intervalu 14 dní – 1 měsíce pak výkon na druhém plicním křídle. 22 (73,3 %) nemocných mělo následnou adjuvantní chemoterapii po posledním primárním výkonu pro metastatický proces (nejčastěji FOLFOX, nebo kombinaci FOLFOX s cílenou biologickou léčbou), 8 nemocných nebylo dále onkologicky léčeno – Tab. 1.

Statistická analýza byla provedena s užitím SW SAS (SAS Institute Inc., USA). Pro měřené parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, minimum, maximum. Analýza celkového přežití a času do progresu byla zpracována užitím Kaplan - Meierové analýzy přežití a Coxova regresního modelu. Rozdíly v přežití mezi zkoumanými skupinami byly testovány pomocí tzv. Log-rank testu.

## VÝSLEDKY

Do 30 dní po operaci exitoval jeden nemocný (3,3 %) po torakotomii na aktinomykotickou sepsi komplikovanou infekcí methicillin rezistentním stafylokokem. U tří nemocných došlo k pooperační komplikaci (10 %). Jedenkrát se jednalo o výše popsanou sepsi, dvakrát o absces jater po RFA. K recidivě metastatického procesu v jaterním parenchymu došlo u 6 nemocných v intervalu 12–27 měsíců po operaci pro JMKRRK. U všech nemocných jsme provedli RFA jater jako sekundární výkon otevřenou nebo transkutánní cestou. U jednoho nemocného jsme pro recidivu JMKRRK využili RFA 4 krát po sobě v intervalu 30 měsíců od primární operace jater.

Celkové přežívání od primární operace metastáz bez ohledu na to, zda první byly řešeny JMKRRK, nebo PMKRRK bylo  $4,6 \pm 1,8$  roku, s mediánem přežití 6,9 let (Graf 1). Pokud byl primární operací jaterní výkon (resekce, RFA) pak 1 a 3 roky po operaci přežívalo 93,1 % a 74,8 % nemocných s průměrem přežití  $3,1 \pm 1,8$  roku (Graf 2). Vzhledem k malému počtu nemocných (N=5), u kterých byla primárním výkonem plicní operace a sekundárním jaterní, jsme celkové přežívání nehodnotili. 1 a 3leté bezpříznakové přežívání celé skupiny nemocných opět bez ohledu na to, zda primárním výkonem byla jaterní nebo plicní operace, bylo 53,3, resp. 6,7 %. (Graf 3). U nemocných, kde primárním výkonem byla jaterní operace, bylo 1 a 3leté bezpříznakové přežívání 83,3 a 39,4 % s průměrem  $3,1 \pm 1,8$  roku (Graf 4).

## DISKUZE

U 50–70 % nemocných s kolorektálním karcinomem se v různém časovém období vyvine metastatický proces. Nejčastěji dochází ke vzniku JMKRRK (ve 20–70 %) a PMKRRK (v 10–22 %) – 8,9. Dnes není pochyb o tom, že jedinou účinnou léčbou jak JMKRRK, tak PMKRRK je chirurgická operace, doplněná v řadě případů termoab-

lačními, či dalšími metodami v rámci multimodálního onkochirurgického přístupu. Pětileté přežívání nemocných s JMKRRK po radikální chirurgické léčbě se v současnosti pohybuje mezi 35–58 % a u PMKRRK pak mezi 21–43 % [10,11,12]. Nicméně jen 15–25 % nemocných s JMKRRK a 50 % nemocných s PMKRRK je primárně operovatelných.

Ještě donedávna převládal názor, že přítomnost metastáz kolorektálního karcinomu ve více systémech v organismu je znakem generalizace nádoru a nemocní byli léčeni onkologickou nebo v nejzazším případě jen symptomatickou léčbou. V současnosti platí jednoznačné pravidlo z hlediska resektability metastatického procesu. Pokud celkový stav nemocného umožňuje radikální chirurgické odstranění metastáz buď v rámci jednoho nebo víceetapových výkonů, pak největší profit pro nemocného má jaterní resekce, event. doplněná dalšími metodami (RFA, ireverzibilní elektroporace, mikrovlnná ablace). To platí i pro aktivní chirurgický postup u JMKRRK se synchronními nebo metachronními PMKRRK, či pro PMKRRK, které předcházejí vzniku JMKRRK. Pokud jde o synchronní JMKRRK a PMKRRK pak obvykle operujeme v souladu s literárními údaji [13,14] nejprve JMKRRK a v odstupu dvou a více týdnů (v závislosti na rekonvalescenci nemocného po první operaci) pak PMKRRK. Jiné skupiny [15,16] pak upřednostňují z obavy o resektabilitu procesu nejprve operovat pokročilejší proces. Otázka operací obou orgánů v jedné době není stále dořešena a existují na ni protichůdné názory. Nicméně převládají názory o postupné, etapové operaci, tak jak ji uvádíme výše. Simultánní resekce je považována za rizikovou a dokonce vedoucí k šíření nádorového procesu při nadměrné operační zátěži organismu, která je spojena se snížením jeho imunitní odpovědi [17].

Pokud jde o chirurgicky řešitelné metastázy v obou jaterních lalocích s nedostatečným zbytkovým objemem jater po jejich odstranění (FRLV – future remnant liver volume), pak je vhodné provést odstranění PMKRRK a v další etapě odstranit JMKRRK z levého laloku s následnou embolizací pravé větve portální žíly a s odstupem 4–6 týdnů po nárůstu levého laloku jater dokončit pravostrannou hepatektomii. Nicméně tzv. etapových způsobů v oblasti řešení JMKRRK je více. Jedná se o chemo-bioterapeutický downsizing s následnou resekci a/nebo RFA, mikrovlnnou ablací jaterních ložisek, či využití metody ireverzibilní elektroporace [18]. I když dlouhodobé přežívání těchto nemocných po tzv. „rescue“ terapii je nižší v porovnání s primárně resektabilními JMKRRK, pak je přesto velmi významné (36 % versus 71 % u JMKRRK a 23 % versus 72 % pro PMKRRK)

Výsledky operací pro JMKRRK a PMKRRK závisejí na řadě faktorů. Jedná se o celkový objem JMKRRK a PMKRRK a jejich počet, nutnost užití „rescue“ terapie, radikalitu resekce (R0), invazi nádoru do cévních struktur, hladiny karcinoembryonálního antigenu, které jsou zásadními faktory pro dlouhodobou prognózu



nemocných. Uvádí se rovněž, že nemocní s primárními PMKRRK a sekundárními JMRRK mají horší dlouhodobou prognózu. Možným vysvětlením je faktor jaterního filtru nádorových buněk. Pokud se jako první objeví PMKRRK, pak to obecně znamená jakési hematogenní obejití jaterního filtru s možnou generalizací do ostatních orgánů [19]. Proto metastazující karcinomy dolního rekta mohou být spojeny s horší prognózou nemocných. Nicméně výsledky radikální chirurgické léčby u nemocných s JMRRK a PMKRRK jsou obecně velmi kvalitní. Literární údaje uvádějí průměrně 5leté přežívání u 40 % nemocných [20, 21], některé pak i významně vyšší – 61 % [22], tomu odpovídají i naše výsledky.

Otázka neoadjuvantní onkologické léčby u primárně resekovatelných JMRRK a PMKRRK není zcela vyřešena [23]. Na našem pracovišti volíme včasný radikální chirurgický postup pro primární operaci metastáz a druhý výkon se snažíme provést v co nejkratším intervalu po prvním. Po zhojení nemocného je pak ve většině případů pod vedením onkologa dále podávána chemoterapie často spojená s cílenou biologickou léčbou. Otázka zařazení adjuvantní cílené biologické léčby (na základě výsledků K-ras antigenu) je stále předmětem diskuzí [24,25] a bude nepochybně nutná velká randomizovaná studie k vytvoření doporučeného postupu.

Opakované operace nebo RFA při recidivě procesu na játrech a plicích jsou jedinou možnou metodou prodlužující signifikantně přežívání nemocných a pokud je to možné, mají být provedeny. Dnes nepředstavují větší zátěž pro nemocného v porovnání s primárními operacemi pro metastatický proces a rovněž jejich dlouhodobé výsledky jsou prakticky stejné jako po primárních operacích.

## ZÁVĚR

Radikální chirurgický přístup v rámci multimodálních onkochirurgických postupů u nemocných s JMRRK a PMKRRK je jedinou možnou léčebnou alternativou, jak nemocným prodloužit kvalitní život. Naše strategie u synchronních metastáz spočívá nejprve v operaci JMRRK a poté v operaci PMKRRK. Z hlediska jaterních výkonů volíme, pokud je to možné, tkáň šetřící výkony s využitím termoablačních technik. U PMKRRK je výhodná laserová metastasektomie nebo klínovitá resekce. Nicméně v problematice řešení jaterních a plicních metastáz kolorektálního původu zůstává řada nedořešených otázek, kterými jsou především u synchronních metastáz posloupnost výkonu na jednotlivých orgánech, využití perioperační onkologické léčby zejména u nemocných s primárními PMKRRK, které mají obecně horší prognózu, a dále u nemocných s metastazujícím karcinomem rekta. V tomto smyslu budou nutné další studie, které by měly odpovědět na výše uvedené otázky.

## LITERATURA

1. Marín C, Robles R, Conesa AL, Torres J, Flores DP, et al. Outcome patient selection for surgical treatment of hepatic and pulmonary metastases from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2013;56:43–50.
2. Carpizo DR, Are Ch, Jarnagin W, DeMatteo R, Fong Y, et al. Liver resection for metastatic colorectal cancer in patients with concurrent extrahepatic disease: results in 127 patients treated at a single center. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2138–2146.
3. Grundmann RT. Current state of surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. *World J Gastrointest Surg* 2011;3:183–189.
4. Cai GX, Cai SJ. Multi-modality treatment of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2012; 18:16–24.
5. Yedibela S, Klein P, Feuchter K. Surgical management of pulmonary metastases from colorectal cancer in 153 patients. *Ann Surg Oncol* 2006;13: 1538–1544.
6. Shah SA, Haddad R, Al-Sukhni W. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *J Am Coll Surg* 2006;202: 468–475.
7. Skalický T, Třeška V, Špidlen V, Vodička V, Sutnar A, et al. Chirurgická léčba jaterních a plicních metastáz kolorektálního karcinomu. *Rozhl Chir* 2010;89:253–255.
8. Takahashi S, Nagai K, Saito N. Multiple resections for hepatic and pulmonary metastases of colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2007;37:186–192.
9. Barlow AD, Nakas A, Pattenden C. Surgical treatment of combined hepatic and pulmonary colorectal cancer metastases. *Eur J Surg Oncol* 2009;35: 307–312.
10. Schule S, Dittmar Y, Knosel T. Long-term results and prognostic factors after resection of hepatic and pulmonary metastases of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2012;80:231–243.
11. Třeška V, Skalický T, Sutnar A, Liška V. Chirurgická léčba jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. *Rozhl Chir* 2009; 88:69–75.
12. Vodička J, Špidlen V, Šimánek V, Šafránek J, Skalický T, et al. Surgical therapy of pulmonary metastases – 10-year results. *Bratisl Lek Listy* 2013;114:218–24.
13. Meimarakis G, Angele M, Conrad C, Schauer R, Weidenhagen R, et al. Combined resection of colorectal hepatic-pulmonary metastases shows improved outcome over chemotherapy alone. *Langenbecks Arch Surg* 2013;398:265–276.
14. Mineo TC, Ambrogi V, Tonini G, Bollero P, Roselli M, et al. Longterm results after resection of simultaneous and sequential lung and liver metastases from colorectal carcinoma. *J Am Coll Surg* 2003;197:386–391.
15. Headrick JR, Miller DL, Nagorney DM. Surgical treatment of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2001;71:975–979.
16. Miller G, Biernacki P, Kemeny NE. Outcomes after resection of synchronous or metachronous hepatic and pulmonary colorectal metastases. *J Am Coll Surg* 2007;205:231–238.
17. Murata S, Moriya Y, Akasu T. Resection of both hepatic and pulmonary metastases in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;83:1086–1093.
18. Adam R, Avisar E, Ariche A. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann Surg Oncol* 2001;8:347–353.
19. Koch M, Weitz J, Kienle P. Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central, and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 2001;136:85–89.
20. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27:3677–3683.

21. Villeneuve PJ, Sundaresan RS. Surgical management of colorectal lung metastasis. *Clin Colon Rectal Surg* 2009;22:233–241.
22. Hattori N, Kanemitsu Y, Komori K, Shimizu Y, Sano T, et al. Outcomes after hepatic and pulmonary metastasectomies compared with pulmonary metastasectomy alone in patients with colorectal cancer metastasis to liver and lungs. *World J Surg.* 2013; 37:1315–1321.
23. Meimarakis G, Angele M, Conrad C, Schauer R, Weidenhagen R, et al. Combined resection of colorectal hepatic-pulmonary metastases shows improved outcome over chemotherapy alone. *Langenbecks Arch Surg* 2013;398:265–276.
24. Shimada H, Tanaka K, Endou I. Treatment for colorectal liver metastases: a review. *Langenbecks Arch Surg* 2009;394:973–983.
25. Fakhri M. Anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: time for an individualized approach? *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1471–1480.

*Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.  
U Českého dvora 11  
326 00 Plzeň  
e-mail: treska@fnplzen.cz*