

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium v oblasti biomedicíny

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Veronika Veškrňová

Diagnostické a prognostické markery v éře cílené léčby CRC

Diagnostic and prognostic markers in the era of targeted treatment of CRC

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Praha, 9.11.2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 9.11.2020

VERONIKA VEŠKRŇOVÁ

Podpis:

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu jsem se řídila normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

VEŠKRŇOVÁ, Veronika. Diagnostické a prognostické markery v éře cílené léčby CRC. [*Diagnostic and prognostic markers in the era of targeted treatment of CRC*]. Praha, 2020. Počet stran 41, počet příloh 1. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav Biochemie a patobiochemie. Vedoucí závěrečné práce Doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Abstrakt

Východiska: Kolorektální karcinom (CRC) je nejčastějším zhoubným nádorem v součtu u obou pohlaví v ČR. Prognostické faktory můžeme rozdělit na klinické (stadium v době diagnózy, histologický typ nádoru), genetické (RAS, BRAF), imunologické (Immunoscore) a biochemické (CEA, CA 19-9, mikroRNA). MikroRNA (miRNA) regulují expresi onkogenů a nádorových supresorů. Regulační funkce miRNA je významně ovlivňována polymorfismy (single nucleotide polymorphisms, SNP) cílových míst vázících miRNA (miRSNP).

Cíle: Vyhodnotit v současnosti používané prognostické faktory pro CRC v kontextu cílené léčby a posoudit roli nových faktorů, včetně miRNA.

Metody: Vlastní výsledky a soubor publikovaných prací je rozdělen do 4 okruhů: klinické práce zaměřené na cílenou léčbu kolorektálního karcinomu, původní práce zaměřené na roli miRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a zejména jako prognostického a prediktivního markeru, práce zaměřené na funkční polymorfismy genů opravujících chyby DNA ve vztahu ke CRC a přehledový článek shrnující biochemické faktory ovlivňující efekt cytostatik ze skupiny fluoropyrimidinů v léčbě CRC.

Výsledky: V pracích a publikacích jsme identifikovali miRNA z klastru miR-17/92, které představují neinvazivní biomarker pro predikci prognózy po léčbě u pacientů s nádory rekta s vyšším rizikem relapsu. U polymorfismu ve vazebném místě miRSNPs rs8679 byla nalezena asociace s rizikem CRC a přežíváním pacientů. Vybrané polymorfismy v genech opravujících DNA (REV3L, POLQ a NEIL3) byly identifikovány jako prediktivní faktory pro přežití pacientů.

Závěr: Výzkum miRNA jako biomarkeru pro vznik a průběh CRC je slibnou cestou k rozšíření a zpřesnění určování prognózy pacientů s CRC a k výběru optimální léčebné strategie.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, mikroRNA, markery přežití.

Abstract

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the most common malignant tumor in both sexes in the Czech Republic. Prognostic factors in CRC can be classified as clinical (stage at the time of diagnosis, histological type of tumor), genetic (RAS, BRAF), immunological (Immunoscore) and biochemical (CEA, CA 19-9, miRNA). MicroRNAs (miRNAs) regulate the expression of oncogenes and tumor suppressors. The regulatory function of miRNAs is influenced by single nucleotide polymorphisms (SNPs) of target miRNA binding sites (miRSNPs).

Aims: To evaluate the currently available prognostic factors for CRC patients treated using targeted therapies and assess the role of novel ones, including miRNA.

Methods: The thesis includes clinical works focused on targeted treatment of colorectal cancer, original work focused on the role of miRNA in colorectal cancer pathogenesis and especially as a prognostic and predictive marker, work focused on functional polymorphisms of DNA repair genes and a review article summarizing biochemical factors influencing the effect of fluoropyrimidine cytostatics in the treatment of colorectal cancer.

Results: We have identified miR-17/92 as a non-invasive biomarker for predicting post-treatment prognosis in patients with a higher risk of relapse, as well as miRSNPs rs8679 polymorphisms as a predictor of CRC risk and patient survival. Polymorphisms in DNA repair genes (REV3L, POLQ and NEIL3) were identified as predictive factors for patient survival.

Conclusion: MiRNAs are promising prognostic biomarkers for CRC and have the potential to be used for the planning of optimal treatment strategies.

Key words: colorectal carcinoma, microRNA, survival markers

Poděkování

Ráda bych poděkovala svým mentorům a spolupracovníkům, bez jejichž pomoci a podpory by můj výzkum nebyl možný, zejména docentovi MUDr. Tomáši Büchlerovi, Ph.D. a pracovníkům Akademie věd Oddělení molekulární biologie nádorů MUDr. Pavlovi Vodičkovi, CSc., MUDr. Ludmile Vodičkové, CSc. a Ing. Veronice Vyměťákové, Ph.D.

Veronika Veškrňová
V Praze, 9.11.2020

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Úvod..... | 8 |
| Přehled epidemiologie, diagnostiky a léčby kolorektálního karcinomu..... | 9 |
| Epidemiologie kolorektálního karcinomu..... | 9 |
| Patologie kolorektálního karcinomu..... | 10 |
| Symptomatologie kolorektálního karcinomu..... | 11 |
| Léčba kolorektálního karcinomu..... | 13 |
| Prognostické a prediktivní faktory kolorektálního karcinomu..... | 17 |
| Klinické prognostické faktory..... | 17 |
| Proteiny a peptidy..... | 18 |
| Genetické prognostické biomarkery..... | 18 |
| Imunologické prognostické markery..... | 19 |
| Nekódující RNA..... | 19 |
| Cíle práce..... | 26 |
| Vlastní výsledky – soubor publikovaných prací..... | 26 |
| Klinické práce zaměřené na cílenou léčbu kolorektálního karcinomu..... | 27 |
| Původní práce zaměřené na roli miRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a zejména jako prognostického a prediktivního markeru..... | 28 |
| Práce zaměřená na funkční polymorfismy genů opravujících chyby DNA ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu..... | 31 |
| Přehledový článek shrnující biochemické faktory ovlivňující efekt cytostatik ze skupiny fluoropyrimidinů v léčbě kolorektálních karcinomu..... | 32 |
| Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce..... | 33 |
| Literatura..... | 35 |

Příloha 1 – Soubor publikovaných prací in extenso

Úvod

Cílem práce je prezentovat přehled problematiky a vlastní výsledky v oblasti výzkumu mikroRNA (miRNA) genů v patogenezi kolorektálního karcinomu.

V úvodu se věnuji epidemiologii, prognóze a léčbě kolorektálního karcinomu, prognostickým faktorům (klinickým, genetickým a biochemickým). Pak jsem se zaměřila na shrnutí poznatků o nekódujících RNA a miRNA u kolorektálního karcinomu.

Prezentované vlastní výsledky shrnuji jako komentovaný soubor sedmi článků týkajících se prognostických a prediktivních faktorů u nemocných s kolorektálním karcinomem a zejména využití miRNA ve vztahu k odhadu prognózy pacientů. Jedná se o multidisciplinární problematiku, kde je nutná kombinace konvenčních klinických prognostických parametrů s novými potenciálními markery, mezi ně patří také miRNA.

Problematika miRNA je nutně interdisciplinární a integruje poznatky z biochemie, molekulární biologie a genetiky a nově také farmakologie. K miRNA lze přistupovat jako k solubilnímu markeru nádorů v periferní krvi, který predikuje prognózu nádorového onemocnění a odpověď na systémovou léčbu, a také jako k regulátoru klíčových dějů karcinogeneze. V této práci jsme zkoumali všechny uvedené aspekty u kolorektálního karcinomu.

Přehled epidemiologie, diagnostiky a léčby kolorektálního karcinomu

Epidemiologie kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom je zhoubný nádor vycházející z buněk sliznice tračnicku a konečníku.

Histologicky se v 98 % případech jedná o adenokarcinom.

Kolorektální karcinom (CRC) patří mezi hlavní příčiny úmrtí souvisejících s nádorovými onemocněními na celém světě (Siegel et al., 2019). CRC je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality s přibližně 1,8 milionu nových případů na celém světě v roce 2018. CRC je nejčastější druhou příčinou úmrtnosti na nádorová onemocnění, která v roce 2018 odpovídá za 880 000 úmrtí. Mortalita v posledních několika letech v rozvinutých zemích mírně klesá (Bray et al., 2018).

Česká republika se ve výskytu tohoto typu onkologického onemocnění řadí na 7. místo na světě (Bray et al., 2018; Dušek et al., 2005). CRC je nejčastějším zhoubným nádorem v součtu u obou pohlaví v ČR. U mužů je v incidenci na druhém místě po karcinomu prostaty a u žen je na druhém místě po karcinomu prsu.

Podle nejnovějších dostupných údajů z Národního onkologického registru v roce 2016 byl počet nově hlášených novotvarů CRC (C 18 – ZN tlustého střeva) v absolutních číslech u obou pohlaví 4681 a mortalita 2179 pacientů. V roce 2017 byla incidence 4464 případů a mortalita 2129 osob (www.svod.cz).

Od roku 2014, kdy dosáhla incidence vrcholu (5042 případů) má nyní tendenci k mírnému poklesu, současně klesá mírně i mortalita (Dušek et al., 2005).

U zhoubných novotvarů rektosigmoideálního spojení (C19) je vývoj mortality a incidence obdobný, v posledních letech počty hlášených nových případů i úmrtí mírně klesají. V roce 2016 byl počet hlášených případů v absolutním počtu 846 případů a mortalita 399 osob.

U karcinomu rekta (C20) bylo v roce 2016 hlášeno 2138 nových případů a mortalita dosáhla 1109 případů. Incidence klesá od roku 2011 (2311 případů) a mortalita klesá od roku 2004 (1315 úmrtí). Bohužel se příliš nemění zastoupení klinických stádií při diagnóze u karcinomu tlustého střeva (C18), v roce 2016 bylo nejvíce onemocnění hlášeno ve stadiu II (25,9 %), poté stadium I (23,4 %), stadium

III (21,6 %), stadium IV (20%). Pořád je přes 40 % pacientů diagnostikováno ve stadiu III nebo IV, kde 5-leté přežití rychle klesá. U karcinomu rekta (C20) je dokonce nejvíce pacientů 31,2% diagnostikováno ve stadiu III, tedy s postižením lymfatických uzlin (Dušek et al., 2005).

Přežití pacientů s CRC do značné míry závisí na stádiu onemocnění při diagnóze: 5leté přežití ve stadiu I je 93,6%, zatímco u pacientů ve stadiu IV dramaticky klesá na 8,1% (Siegel et al., 2017).

Se zvýšeným rizikem CRC je spojeno několik environmentálních a dědičných faktorů. Mezi hlavní rizikové faktory patří věk, kouření, obezita, vysoká spotřeba zpracovaného masa a nedostatek fyzické aktivity (Lauby-Secretan et al., 2018; Morris et al., 2018). Familiární genetické syndromy jsou zodpovědné až za 10% případů kolorektálního karcinomu. Toto procento se zvyšuje v důsledku lepšího se přístupu ke genetickému testování (Yurgelun et al., 2017). Mezi nejčastější genetické syndromy spojené s CRC patří adenomatózní polypóza coli a nedostatek opravných enzymů pro opravu chyb párování (mismatch) DNA (Lynchův syndrom). Pro včasnou detekci CRC se doporučuje skrínig celé populace pomocí testů na okultní krvácení do stolice a kolonoskopie. Bylo prokázáno, že tento skrínig snižuje specifickou úmrtnost na kolorektální karcinom (Lauby-Secretan et al., 2018).

Patologie kolorektálního karcinomu

U mnoha pacientů vzniká adenokarcinom z polypů tlustého střeva, model kolorektálního karcinomu, rostoucí na základě sekvenčně se vyskytujících mutací, byl poprvé navržen Vogelsteinem a spolupracovníky před více než 30 lety (Vogelstein et al., 1988). Pokusy strukturovat data expresní analýzy vedly k několika molekulárním klasifikacím kolorektálního adenokarcinomu ("Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer,"; Jass, 2007). Poslední, a zdá se obecně přijímaná, klasifikace molekulárních subtypů (Consensual Molecular Subtypes, CMS) rozlišuje čtyři odlišné podtypy kolorektálních nádorů na základě jejich molekulárních vlastností: CMS1 (zahrnující přibližně 14% případů) charakterizovaný nestabilitou mikrosatelitů, mutací BRAF a významnou infiltrací imunitními buňkami, CMS2 (37%) s aktivovanými dráhami WNT a MYC, CMS3 (13%) s variabilním stavem nestability mikrosatelitu, nízkou metylací ostrůvků CpG a mutacemi KRAS a CMS4 (23%) s vysokými změnami počtu somatických kopií, aktivací transformace růstového faktoru β a vysoce aktivní angiogenezí. Přibližně 13% nádorů zůstává nezařaditelných (Guinney et al., 2015).

Symptomatologie kolorektálního karcinomu

V počátečních stádiích bývá CRC zpravidla asymptomatický. Symptomatologie záleží na lokalizaci nádoru. Nádory proximálně od ileální flexury způsobují sideropenickou anémii z chronických krevních ztrát, která se může projevit celkovou slabostí a zvýšenou únavností, dále se můžeme setkat s abdominálním dyskomfortem a obtížně lokalizovatelnými bolestmi břicha. Nádory kolon descendens a sigmoidea se projevují střídáním obstipace a průjmů, stolicí s příměsí krve a často také kolikovitými bolestmi břicha. Při výraznějším zúžení lumen střeva může dojít k rozvoji střevní obstrukce. Nádory rekta způsobují tenezmy, nucení na stolicí a hematochezii (Fiala & Buchler, 2017).

Pro snížení mortality na KRC je důležitá především včasná diagnóza. V diagnostice KRC se uplatňuje v současné době především kolonoskopické vyšetření, které je však invazivní a finančně i časově náročné. Test stolice na okultní krvácení, nejrozšířenější neinvazivní skrínigové vyšetření, je omezen nízkou citlivostí. U DNA testů stolice brání většímu rozšíření technická náročnost a vysoké náklady.

V ČR je zaveden program skrínigu kolorektálního karcinomu za účelem včasné diagnostiky (záchytu časných stadií), který je prováděn u asymptomatických pacientů následujícím způsobem:

Od 50 do 54 let test na okultní krvácení 1× ročně (při pozitivitě následuje kolonoskopie).

Od 55 let test na okultní krvácení 1× za 2 roky (při pozitivitě následuje kolonoskopie) nebo skrínigová kolonoskopie 1× za 10 let (Lajbl Večeřová, 2019).

Tabulka 1. Stádia kolorektálního karcinomu podle klasifikace TNM, 8. vydání (Brierley et al., 2018).

| |
|---|
| Tis karcinom in situ: invaze do lamina propria mucosae |
| T1 submukóza |
| T2 tunica muscularis propria |
| T3 subseróza nebo šíření do neperitonealizované perikolické/perirektální tkáň |
| T4 prorůstání na viscerální peritoneum nebo postižení okolních struktur <ul style="list-style-type: none">• T4a prorůstání na viscerální peritoneum• T4b postižení okolních struktur |
| N1 1-3 uzliny |

- N1a 1 uzlina
- N1b 2-3 uzliny
- N1c satelitní ložisko v subseróze nebo neperitonealizované perikolické/perirektální tkáni

N2 4 a více uzlin

- N2a 4-6 uzlin
- N2b 7 a více uzlin

M1 vzdálené metastázy

- M1a metastázy omezené na 1 orgán (játra, plíce, vaječník, neregionální uzlina(y), bez peritoneálních metastáz)
- M1b metastázy ve více než 1 orgánu nebo na peritoneu
- M1c metastázy na peritoneu s nebo bez postižení dalších orgánů

| | |
|--------------|---|
| 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 | T1, T2 N2b M0 T2, T3 N2a M0 T3, T4a N1 M0 |
| Stadium IIIC | T3, T4a N2b M0 T4a N2a M0 T4b N1, N2 M0 |
| Stadium IVA | jakékoliv T jakékoliv N M1a |
| Stadium IVB | jakékoliv T jakékoliv N M1b |
| Stadium IVC | jakékoliv T jakékoliv N M1c |

Léčba kolorektálního karcinomu

Ve stadiu 0 a I je léčba pouze chirurgická a adjuvantní terapie není indikována.

Ve stadiu II je na prvním místě chirurgické odstranění nádoru. U pT3, N0, M0 bez rizikových faktorů adjuvantní chemoterapie není indikována a pacienti jsou pouze dispenzarizováni.

Při infiltraci jiných orgánů nebo perforaci viscerálního peritonea (pT4, N0, M0) je indikována adjuvantní chemoterapie, stejně jako u pacientů ve stádiu pT3, N0, M0 s rizikovými faktory, mezi něž patří neznámé resekční okraje, obstrukce, perforace střeva nádorem, špatná diferenciace nádoru, mucinózní složka, nedostatečný počet vyšetřených lymfatických uzlin (podmínkou pro přesný patologický staging je vyšetření nejméně 12 lymfatických uzlin) lymfatická, vaskulární a/nebo perineurální invaze.

Pokud je indikována adjuvantní chemoterapie na bázi fluoropyrimidinů v klinickém stadiu II, je nutné molekulární vyšetření mikrosatelitové instability (MSI), resp. MMR (mismatch repair) v nádorové tkáni. Pacienti stadia II s defektem MMR (dMMR, tedy MSI-high) nemají prospěch z adjuvantní chemoterapie na bázi 5-fluorouracilu. Tato léčba naopak u těchto pacientů zvyšuje celkovou mortalitu.

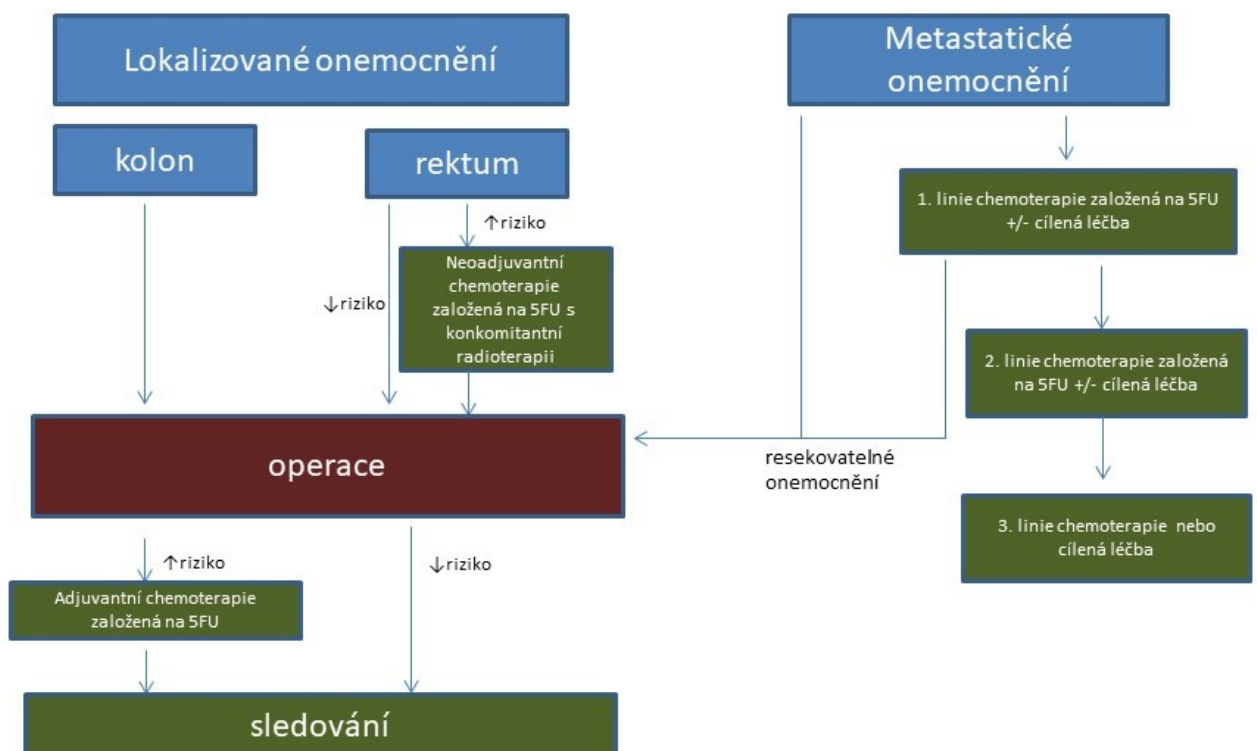
Ve III. stadiu by měla být chirurgická léčba následována adjuvantní chemoterapií kontinuálně podávaným 5-fluorouracilem (v kombinaci s leukovorinem), kapecitabinem nebo režimy FOLFOX či CAPOX.

U karcinomu rekta (C20) je léčba odlišná. Při stagingu je nutné provedení rektoskopie, endosonografie rekta a ideálně i MRI pánve. U časných karcinomů (cT1-2, příznivé cT3 N0) je možná samostatná chirurgická léčba. U středně pokročilých karcinomů (cT3 s vyšším rizikem, cT4a, N+) je standardním postupem neoadjuvantní radioterapie s konkomitantní chemoterapií (kontinuální 5-fluorouracil nebo kapecitabin), a poté s odstupem 5-7 týdnů chirurgická léčba.

Léčba CRC bez ohledu na lokalizaci primárního nádoru v kolon nebo rektu je ve stadiu IV obdobná. U vzdálených metastáz je indikována primární systémová onkologická léčba, u oligometastatického onemocnění a resekabilních metastáz je indikována systémová léčba a včasný restaging ke zvážení resekce primárního tumoru i metastáz. Postup by měl vždy stanovovat multidisciplinární tým

(chirurg, onkolog, radiodiagnostik, gastroenterolog, patolog) (Glynn-Jones et al., 2017; Labianca et al., 2013; E Van Cutsem et al., 2016).

Obrázek 1. Schéma léčby kolorektálního karcinomu (Vodicka et al., 2019)



Základním nositelem protinádorového účinku v časných liniích léčby je chemoterapie, cílená léčba tento účinek zvyšuje. Je možné použít režimy s cílenými léky bevacizumab (Avastin), cetuximab (Erbix), panitumumab (Vectibix), aflibercept (Zaltrap) nebo ramucirumab (Cyramza) (Fiala & Buchler, 2017; E Van Cutsem et al., 2016).

Bevacizumab je antiangiogenním lékem, monoklonální protilátkou proti vaskulárnímu endotelovému růstovému faktoru (VEGF). Brání vazbě VEGF na receptory na endotelích, což vede k regresi nádorové cévní sítě, normalizuje přetrvávající cévní síť a brání vzniku nových nádorových cév, a tím inhibuje růst nádoru.

Cetuximab je chimerická monoklonální IgG1 protilátka cílená na extracelulární část receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). U nádorových buněk kolorektálního karcinomu inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu nádorových buněk, inhibuje angiogenezi a snižuje nádorovou neovaskularizaci a metastatický potenciál.

Panitumumab se váže na ligand-vázající extracelulární doménu EGFR a inhibuje autofosforylaci receptoru indukovanou všemi známými ligandy EGFR. Vazba panitumumabu na EGFR vede k internalizaci receptoru, inhibici buněčného růstu, indukci apoptózy a snížené produkci interleukinu 8 a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Chu, 2012). Vazbou panitumumabu na nádorovou buňku se rovněž aktivuje imunitní reakce (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita ADCC) která vede k usmrcení nádorové buňky (Fiala & Buchler, 2017; E Van Cutsem et al., 2016).

Aflibercept je uměle vytvořený protein. Jeho základem je lidská protilátka, na kterou jsou přidány vazebné části receptorů VEGFR (receptorů z povrchu cévních endotelových buněk). Aflibercept "vychytává" VEGF (růstový faktor cévního endotelu) a PlGF (placentární růstový faktor), váže je na sebe a brání tak jejich účinkům na endotelové cévní buňky (bývá označován jako VEGF trap [= past]), což vede k regresi nádorové cévní sítě, normalizuje přetrvávající cévní síť a brání vzniku nových nádorových cév, a tím inhibuje růst nádoru (Fiala & Buchler, 2017; E Van Cutsem et al., 2016; Eric Van Cutsem et al., 2012).

Ramucirumab se váže na VEGFR-2 na endotelových buňkách, brání vazbě VEGF na VEGFR-2, což vede k regresi nádorové cévní sítě, normalizuje přetrvávající cévní síť a brání vzniku nových nádorových cév, a tím inhibuje růst nádoru (Fiala & Buchler, 2017; E Van Cutsem et al., 2016).

U pacientů, kteří byli dříve léčeni standardními režimy chemoterapie, anti-VEGF a anti-EGFR léčbou, případně u pacientů, kteří nejsou pro tuto terapii vhodnými kandidáty, lze použít regorafenib (Stivarga) nebo trifluridin/tipiracil (Lonsurf). Regorafenib a trifluridin/tipiracil mohou být použity sekvenčně, přičemž jejich optimální pořadí není určeno (Fiala & Buchler, 2017; E Van Cutsem et al., 2016).

Regorafenib inhibuje signální proteiny zahrnuté do onkogeneze, jako je BRAF a RAF1, dále tyrosinkinázy zahrnuté do angiogeneze, kam náleží receptor VEGF (VEGFR) 1, 2 a 3 a klíčový regulátor angiogeneze – tyrosinkináza s homologní doménou 2 pro imunoglobulinový a epidermální růstový faktor (TIE-2). V neposlední řadě regorafenib inhibuje stromální kinázy ovlivňující nádorové mikroprostředí, kam řadíme receptor pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor

receptor, PDGFR- β) a receptor pro fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor receptor, FGFR) (Wilhelm et al., 2011).

Pro kvalifikované rozhodnutí o typu cílené léčby pokročilého metastatického kolorektálního karcinomu je nutné znát mutační stav onkogenů rodiny RAS (KRAS, NRAS) a BRAF. Onkogeny RAS představují negativní prediktivní marker pro použití cílené anti-EGFR léčby, kterou lze podat pouze v případě nemutovaného stavu onkogenů RAS (wild type). Účinnost inhibitorů EGFR cetuximabu a panitumumabu v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu je obdobná. V případě progresu na jednom inhibitoru EGFR není indikováno podání druhého. Pro léčbu bevacizumabem, afliberceptem, ramucirumabem, regorafenibem a lékem trifluridin/tipiracil prediktivní parametr v praxi zaveden není.

Prognosticky mimořádně nepříznivou podskupinou jsou nádory s prokázanou BRAF mutací, kde je účinnost léčby inhibitory EGFR nízká a u pacientů (PS 0) je upřednostňována jako úvodní léčba triplet FOLFOXIRI plus antiVEGF terapie (Loupakis et al., 2014). Úplnou novinkou je použití kombinace specificky zaměřených cílených léků encorafenib, binimetinib a cetuximab u pacientů s mutací BRAF (Kopetz et al., 2019).

Vhodné (v současné době nepovinné) je vyšetřovat u pacientů ve IV. klinickém stadiu také mikrosatelitovou instabilitu (MSI), resp. MMR (mismatch repair) v nádorové tkáni. Nádory dMMR (MSI-high) mohou dobře odpovídat na léčbu inhibitory PD-1/PD-L1 osy (Le et al., 2015, 2017).

Prognostické a prediktivní faktory kolorektálního karcinomu

Tabulka 2. Typy nádorových biomarkerů a jejich příklady u kolorektálního karcinomu podle Tanaky a spolupracovníků (Tanaka et al., 2010)

| Typ markeru | Podtyp | Příklad |
|--------------------|--|---|
| Genetické | mutace genu | mutace genů KRAS, NRAS |
| | amplifikace genu | amplifikace HER2 |
| | mikrosatelitová instabilita | mikrosatelitová instabilita |
| Epigenetické | metylace dna | metylace promotoru MTHFR |
| Nekódující RNA | miRNA | miR-192, miR-215 |
| Proteiny a peptidy | solubilní | CEA, CA19-9 |
| | imunohistochemické | intracelulární hlenotvorba cytokeratiny 7 a 20 |
| Imunologické | hodnocení charakteru infiltrace lymfocyty | Immunoscore |

Klinické prognostické faktory

Přežití pacientů s CRC do značné míry závisí na stadiu onemocnění při diagnóze: 5leté přežití ve stadiu I je 93,6%, zatímco u pacientů ve stadiu IV dramaticky klesá na 8,1% (Siegel et al., 2017).

Zdá se, že primární umístění nádoru působí jako velmi důležitý prognostický faktor. Pacienti s pravostranným CRC jsou častěji ženy a starší pacienti s mikrosatelitovou nestabilitou, mutovaným BRAF, fenotypem CPG ostrovního methylátoru (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP), špatně diferencovanými tumory ve srovnání s levostrannými CRC (Gallois et al., 2018).

Prognóza pacientů s CRC závisí na stadiu v době diagnózy, poté na lokalizaci nádoru a jeho histologii.

Dále přežití samozřejmě závisí na celkovém stavu pacienta a přidružených onemocněních.

Proteiny a peptidy

U přibližně 20% chirurgicky léčených pacientů s CRC dojde k recidivě onemocnění během pěti let po operaci. Pro včasné zjištění recidivy musí být upřednostňované vyšetření minimálně invazivní a opakovatelné v čase. Nejvhodnějším biologickým materiálem je proto periferní žilní krev.

Karcinoembryonální antigen (CEA) je pro tento účel dobře zavedený marker, doporučený jak Americkou společností klinické onkologie (ASCO), tak Evropskou skupinou pro markery nádorů (EGTM). Existují dobré důkazy o tom, že rutinní monitorování CEA během následného sledování detekuje metastatické onemocnění. Senzitivita tohoto markeru se však nepovažuje za dostatečnou. Existují pacienti s CRC se špatně diferencovanými tumory s CEA přítomnými pouze v nízkých dokonce nedetekovatelných koncentracích (Das et al., 2017).

Existuje snaha zlepšit citlivost a specifitu použitím dalších nádorových markerů, jako je nádorový antigen 19-9 (CA19-9), ale také s použitím biomarkerů odrážejících další charakteristiky nádorových buněk. Právě taková skupina molekul s novými a slibnými vlastnostmi jsou miRNA (Kulda et al., 2010; Pesta et al., 2019).

Imunohistochemie má klíčový význam při diagnostice nádoru, zejména určení jeho typu a orgánového původu. Její prognostický význam zatím není v praxi tak významný. Možný prognostický význam u CRC mají cytokeratiny CK7, CK20 a survivin, které lze stanovit jak v nádoru, tak na cirkulujících nádorových buňkách (Ning et al., 2015). Tato metoda zatím nebyla validována pro klinické využití.

Genetické prognostické biomarkery

Desetiletí studií ukázaly, že některé geny a cesty, jako jsou KRAS, BRAF, PIK3CA, SMAD7, PARP1, TP53 a geny oprav chybného párování, jsou důležité v procesech iniciací a progresu CRC (Normanno et al., 2015; Vodenkova et al., 2019; Vodicka et al., 2019). Mutační status KRAS je prediktivním markerem odpovědi na zavedené inhibitory receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) používané pro léčbu pokročilého CRC. Ve skutečnosti jsou mutace v KRAS spojeny s rezistencí na léčbu anti-EGFR monoklonální protilátky (mAb) cetuximabem nebo panitumumabem. Nepříznivý prognostický dopad mutací BRAF byl také dokumentován (Farina-Sarasqueta et al., 2010; Rowland et al., 2015; Yokota et al., 2011), zatímco mutace PIK3CA na přežití byla omezena na pacienty s nemutovaným genem BRAF (Rosty et al., 2013).

Genetická variabilita je důležitým faktorem pro vznik onemocnění a také reakce na léčbu a toxicitu léčby. Například zděděné změny v genech pro opravu DNA byly indikovány jako užitečné nástroje pro identifikaci pacientů s rizikem aberantních farmakokinetických nebo farmakodynamických účinků (Bhushan et al., 2009). Studie asociované v celém genomu identifikovaly rostoucí počet polymorfizmů s jedním nukleotidem (SNP), které vykazují pevné asociace s rizikem CRC, které byly také replikovány v nezávislých kohortách (Fernandez-Rozadilla et al., 2013; Smith et al., 2015). Metaanalýzy však naznačují, že tyto SNP dosud představují pouze malou část rizika CRC (Whiffin et al., 2014).

Imunologické prognostické markery

Imunitní odpověď hostitele proti nádoru je předmětem rozsáhlého výzkumu. Byl prokázán prognostický význam infiltrátu imunitních buněk v nádoru. Pro kvantifikaci imunitního infiltrátu in situ byla definována metodika nazvaná Immunoscore. Parafinové řezy nádoru tlustého střeva a invazivní okraj se zpracuje imunohistochemicky a pomocí digitální patologie se kvantifikuje hustota CD3+ a cytotoxických CD8+ T lymfocytů v nádoru a jeho invazivním okraji. Immunoscore poskytuje odhad rizika recidivy u pacientů s CRC nezávisle na stádiu TNM (Galon et al., 2014; Pages et al., 2018).

Nekódující RNA

Syntéza a role nekódující RNA

Nekódující ribonukleová kyselina (noncoding RNA, ncRNA) jsou molekuly RNA, které nenesou informace pro syntézu proteinů. Podílí se významným způsobem na udržování integrity genomu a regulačních pochodech v buňce. NcRNA jiné než ribosomální RNA a transferová RNA, jsou obvykle kategorizovány na základě jejich délky a dále členěny podle funkce a/nebo role (tabulka 3).

Zájem o mechanismy posttranskripční regulace genové exprese zprostředkované miRNA v posledních letech vzrostl, kromě jiného také díky relativně jednoduché detekci a kvantifikaci těchto molekul.

Tabulka 3. Hlavní třídy nekódující RNA (ncRNA) řazené podle délky dané počtem nukleotidů (nt)

(Gulia et al., 2017).

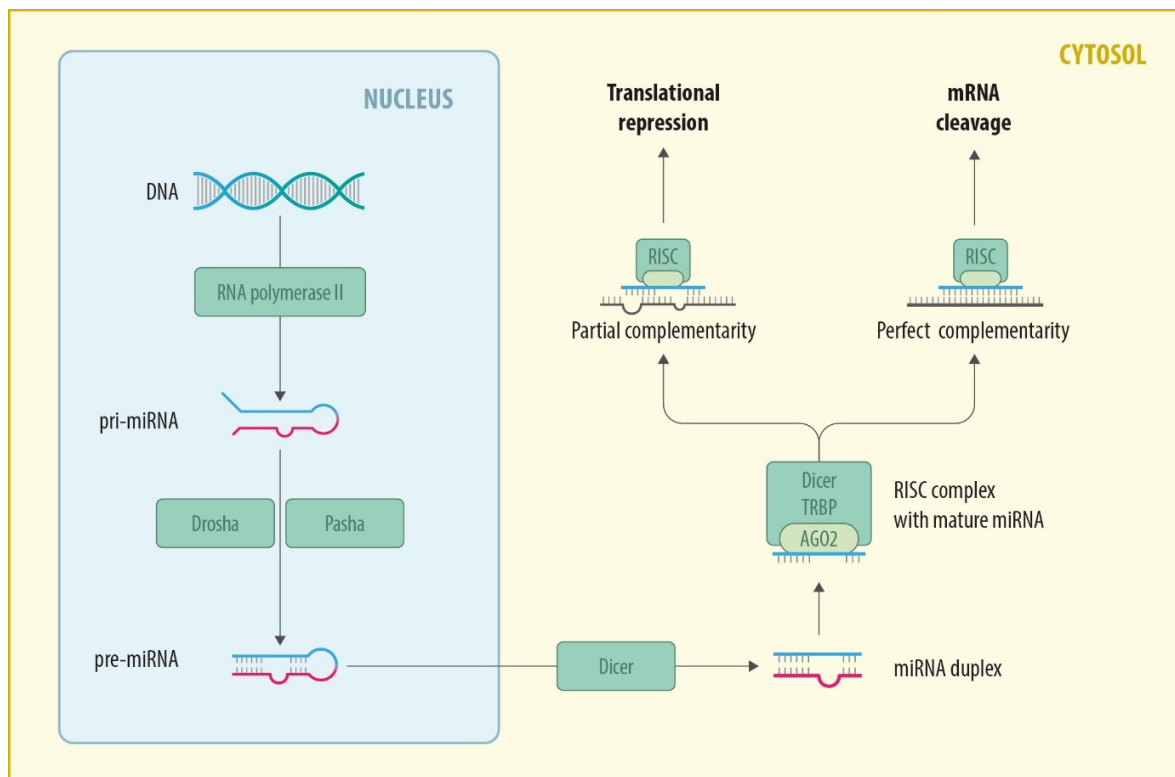
| Jméno | Zkratka | Délka (nt) | Poznámky |
|--------------------------------------|---------------|------------|---|
| Dlouhé nekódující RNA | lncRNA | >200 | Transkripty nekódující proteiny; heterogenní třída RNA. Podíl na epigenetické, transkripční a post-transkripční regulaci genové exprese |
| Přepisovaná ultrakonzervovaná oblast | T-UCR | ≈50–570 | Často se nachází na fragilních místech a genomických oblastech souvisejících s nádory; možná regulované miR |
| Cirkulární RNA | circRNA | ≈100-1600 | Kovalentně uzavřené RNA kruhy; některé mají kódovací funkce; potenciální regulátory genů a miR pasti |
| Malé interferující RNA | siRNA | 20–25 | Dvouvláknové RNA podobné miR, fungující cestou RNA interference (RNAi); podporují degradaci mRNA |
| Y RNA | Y RNA | 21–24 | Replikace DNA prostřednictvím interakcí s chromatinem a iniciačními proteiny; cíl autoimunitních protilátek |
| Mikro-RNA | miRNA; miR | 21–24 | Funkce při umlčování RNA a posttranskripční regulaci genové exprese; může mít extracelulární lokalizaci |
| Piwi-interagující RNA | piRNA | 26–31 | Epigenetická a posttranskripční inhibice (silencing) retrotranspozonů a dalších genetických prvků v buňkách |
| Malé nukleolární RNA | snoRNAs | 60–300 | Průvodce chemickými modifikacemi jiných RNA (rRNA, tRNA, snRNA) |
| Malé nukleové RNA | snRNA; U-RNA | ≈150 | Funkce při zpracování pre-messenger RNA (hnRNA) v jádru; pomoc při regulaci transkripčních faktorů; údržba telomér |

MiRNA jako regulační molekuly v procesu karcinogeneze

Regulace zprostředkovaná miRNA má zásadní vliv na buněčnou integritu. Řídí základní biologické procesy, jako je apoptóza, buněčné proliferace, diferenciace, angiogeneze a invaze (Kral et al., 2018; Mendell & Olson, 2012). V této souvislosti jsou miRNA rozsáhle studovány ve vztahu k nádorům a jejich specifické profily exprese byly spojené s různými typy malignit, včetně CRC (Bonfrate et al., 2013; Davis-Dusenbery & Hata, 2010; Lin & Gregory, 2015; Slaby et al., 2009).

Syntéza a funkce miRNA jsou schématicky znázorněné na obrázku 2.

Obrázek 2. Syntéza miRNA (autor obrázku: P. Škrobánek, Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice). Transkripce primární pri-miRNA z genu miRNA provádí RNA polymeráza II (Pol II). Pri-miRNA je poté v jádru buňky zpracována enzymem Drosha (RNáza III) a jeho kofaktorem Pasha na řetězce pre-miRNA s 60 až 110 nukleotidy. Pri-miRNA je pak exportována do cytoplazmy pomocí exportinu-5 přes jaderné póry. V cytoplazmě je pri-miRNA štěpena RNázovou aktivitou enzymu Dicer na přechodný 22-nukleotidový duplexní meziprodukt. Tento duplex se naváže na AGO2, endonukleolytickou složku miRISC (RNA-induced silencing complex, inhibiční komplex indukovaný RNA). MiRISC dopraví antisense vlákno miRNA k cílové messengerové RNA (mRNA). Pokud dojde k dokonalé komplementaritě s mRNA, dochází k endonukleolytickému štěpení. Pokud dojde ke komplementaritě částečné, výsledkem je potlačení translace příslušné miRNA (Magri et al., 2018).



Několik nedávných studií ukázalo, že miRNA mohou hrát důležitou roli v regulaci chemorezistence v CRC kontrolou příslušných signálních drah. Patří mezi ně buněčný cyklus, proliferace, apoptóza, oprava poškození DNA, metabolismus léčiv a transportní cesty (Fanale et al., 2016; Raza et al., 2014; Vodenkova et al., 2019; Wu et al., 2018). Kromě toho existují miRNA s přímou asociací s karcinogenezí, označované jako „oncomiRs“ a „anti-oncomiRs“. OncomiR působí jako onkogeny a inhibují expresi cílových tumor-supresorových genů, zatímco anti-oncomiRs fungují jako tumor-supresory a vedou k inhibici exprese onkogenů. Inaktivace oncomiR a aktivace anti-oncomiR může představovat důležitý zásah při regulaci exprese specifických genů schopných obnovit citlivost na léky (Donzelli et al., 2014). Z tohoto důvodu by výzkum založený na miRNA mohl přispět k inovativním terapeutickým strategiím a rozvoji cílené protinádorové léčby. Dále miRNAs mohly sloužit jako prognostické a prediktivní biomarkery a poskytovat další důležité informace pro personalizovanou medicínu.

MiRNA mohou být využity jako potenciální biomarkery nádorů vzhledem k jejich jedinečným vlastnostem: regulují expresi onkogenů a nádorové supresory. Více než 50% genů miRNA se nachází v regionech pozměněných u nádorů delecí nebo amplifikací (Calin et al., 2004).

MiRNA jsou přítomny v plazmě a stolici na detekovatelných úrovních a kvůli jejich malé velikosti a struktuře kmenových smyček jsou stabilnější než mediátorová RNA (mRNA). Kvůli nedokonalé komplementaritě s cílovými sekvencemi může jediná miRNA regulovat expresi více než stovek mRNA transkriptů současně a má tedy potenciálně vyšší diagnostickou hodnotu při rozlišování různých tkání a nádorů než mRNA. Geny miRNA jsou uspořádány v polycistronické klastry, které jsou koexprimovány a u nichž se předpokládá schopnost regulovat funkčně příbuzné geny (Truscott et al., 2016). Během posledního desetiletí se objevují důkazy, že aberantní exprese miRNA hraje roli při iniciaci a progresi CRC (Schetter et al., 2012; Strubberg & Madison, 2017). Obecně je většina miRNA během karcinogeneze downregulována. Zdá se, že globální downregulace exprese miRNA je pro malignitu typická (Lu et al., 2005).

Polymorfismy ve vazebných místech pro miRNA

Regulační funkce miRNA je ovlivňována polymorfismy (single nucleotide polymorphisms, SNP) cílových míst vázících miRNA (miRSNP). Schopnost miRNA lokalizovat a vázat mRNA je pro regulaci transkriptů a exprese proteinu rozhodující (Preskill & Weidhaas, 2013). SNP ve strukturách vázoucích

miRNA mohou s vysokou penetrancí vyvolat změnu fenotypu (Ryan et al., 2010, 2015). I když je sekvence vazebných míst miRNA pro většina genů kódujících proteiny vysoce konzervovaná (Ryan et al., 2010), v posledních letech řada studií ukázala na důležitost zděděných polymorfismů v cílových místech miRNA pro susceptibilitu k lidským nemocem a jejich průběhu (Maxwell et al., 2015; Ryan et al., 2010; Sethupathy & Collins, 2008).

V souvislosti s těmito poznatky se zkoumá také úloha SNP lokalizovaných v miRNA-vazebných cílových místech (miRSNP) na karcinogenezi. SNP mohou do jisté míry vysvětlit různou individuální susceptibilitu k nádorům. Tudiž malé rozdíly v podobě SNP v relevantních genech pro CRC mohou přispívat k etiopatogenezi tohoto nádoru a také modulovat přežití a odpověď na terapii u pacientů s CRC (Cipollini et al., 2014; Schneiderova et al., 2017).

Naše výzkumná skupina popsala asociace mezi miRSNPs v genech čtyř relevantních drah DNA opravy (oprava nukleotidů, oprava excize bází [BER], oprava dvouřetězcových zlomů a oprava chyb v párování [mismatch repair]) a rizikem CRC a klinických výsledků (Naccarati et al., 2016; Pardini et al., 2013; Vymetalkova et al., 2014). SNP v cílových oblastech miRNA důležitých genů pro etiologii CRC (APC, ATM, BRAF, KRAS, PARP1, PIK3CA, SMAD7 a TP53) mohou také ovlivnit účinnost translace odpovídajících proteinů. V této studii jsme tedy předpokládali, že variace výše uvedených genů mohou modifikovat CRC susceptibilitu, přežití a účinnost chemoterapie prostřednictvím modulace signální odpovědi a udržení stability genomu.

MiRNA jako prediktory účinku léčby

Několik studií prokázalo, že miR-192 a miR-215 mohou přímo přispívat k mechanismu chemorezistence vůči fluoropyrimidinům a antifolátům v CRC (Song et al., 2008; Vychytilova-Faltejskova et al., 2017; Xi et al., 2006), protože mezi jejich cílové struktury patří jak mRNA thymidilátsyntáza, tak dihydrofolát reduktáza. Snížení hladin thymidilátsyntázy a dihydrofolát reduktázy zprostředkované miR-215 vede k zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodu G2/M a ke snížení buněčné proliferace (Song et al., 2010). Někteří autoři předpokládají, že inhibice miR-21 by mohla představovat účinnou terapeutickou strategii pro CRC rezistentní na chemoterapii (Yu et al., 2013). Rovněž bylo pozorováno, že nadměrná exprese miR-143 v buněčné linii HCT116 lidského CRC vedla k inhibici exprese onkogenů ERK5, NF-KB a Bcl-2. Tím významně zvýšila míru apoptózy během léčby 5-FU (Borralho et al., 2009).

Ras proteiny jsou malé GTPázy reagující na signalizaci proti směru toku, které následně působí jako spouštěč kaskády kináz Raf/MEK/MAPK. Tato dráha představuje základní cestu potřebnou pro růst a proliferaci buněk. Mutace v genech Ras/MAPK kaskády a její aktivace se podílí na vzniku CRC a také hraje roli v rezistenci na léčbu (Zhao et al., 2017). MiRNA rodina Let-7, cíl dráhy Ras, dosud obsahuje devět členů: let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i a miR-98. Bylo pozorováno, že různé miRNA z rodiny let-7 jsou deregulované ve vztahu k rezistenci vůči různým protinádorovým lékům používaných u CRC. Weidhaas a kol. předpokládají roli let-7 při zlepšování radiosenzitivity nádorových buněk ovlivněním proteinu Ras (Weidhaas et al., 2007). Zvýšená exprese let-7g byla významně spojena s chemorezistencí vůči terapii lékem S-1 u pacientů s CRC (Nakajima et al., 2006). Mizuno a kol. rovněž uvádí, že miRNA z rodiny let-7 přispívají k chemorezistenci vůči S-1 u pacientů s CRC (Mizuno et al., 2018). V souvislosti s těmito výsledky autoři předpokládají, že snížení hladin členů rodiny let-7 indukuje expresi proteinu ERCC1 zapojeného do cesty NER, což přispívá k rezistenci vůči cisplatině nebo 5-FU (Mizuno et al., 2018).

Tie et al. pozorovali, že exprese let-7f-5p byla zvýšena v CRC tkáních rezistentních na chemoterapii ve srovnání s vzorky nádorů citlivých (Tie et al., 2018). Autoři prokázali, že chemoterapeutická rezistence podporovaná let-7f-5p potlačuje expresi několika proapoptotických proteinů, včetně tumor-supresorového proteinu p53, p53-indukovaného jaderného proteinu 1, p53-indukovaného jaderného proteinu 2 a kaspázy - 3.

MiR-20b je další nekódující RNA s rolí v rezistenci CRC na léčbu. Fu a kol. ukázali, že miR-20b snižuje rezistenci buněk linie HCT116-R na 5-FU (Fu et al., 2017). Podle této práce miR-20b snižuje rezistenci 5-FU k indukci apoptózy in vitro potlačením exprese receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v buňkách CRC.

V poslední době se předpokládá, že miRNA mohou ovlivňovat chemorezistenci nádorových kmenových buněk (cancer stem cells, CSC) (Fesler et al., 2017). Protože miRNA může cílit na mnoho genů najednou, je její využití potenciálně výhodné pro ovlivnění chemorezistence CSC, kde se uplatňuje několik různých mechanismů. Některé miRNA již prokázaly svůj potenciál regulovat CSC karcinomu tlustého střeva. Například miR-145 a miR-450b cílí na SOX2 a bylo zjištěno, že zvyšují citlivost na 5-FU a snižují vlastnosti charakteristické pro kmenové buňky (stemness) u CRC (Iliou et al., 2014; Jin et al., 2016; Yu et al., 2015). Kromě toho intervence cílená na miR-21 vede ke snížení počtu CSC tlustého střeva během léčby 5-FU (Yu et al., 2015). Všechny tyto miRNA regulují důležité geny související s CSC a mohou být užitečné při zvyšování chemosenzitivity narušením jejich mechanismů rezistence.

Dlouhé nekódující RNA

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) představují další třídu ncRNA. Jsou charakterizované délkou větší než 200 nukleotidů a omezenou nebo žádnou kapacitou kódovat protein. Některé lncRNA byly funkčně charakterizovány v tkáních a séru pacientů a mohou mít pronádorový nebo protinádorový efekt (Di Gesualdo et al., 2014). Několik studií ukázalo, že lncRNA také hrají důležitou roli v epigenetické, transkripční a post-transkripční regulaci genové exprese a podílí se na rezistenci vůči chemoterapii (Deng et al., 2017; Yang et al., 2013). Xiong a kol. pozorovali, že úroveň exprese mnoha lncRNA se mění po expozici buněk CRC cytostatiku 5-FU (Xiong et al., 2015). Většina aberantně exprimovaných lncRNA je zapojena do signálních drah PI3K/AKT a NF- κ B. Lee a kol. ukázali, že exprese lncRNA nazvané snaR se v buňkách rezistentních na 5-FU snižuje, což vede k zvýšené citlivosti na chemoterapii 5-FU (Lee et al., 2014). Tyto výsledky naznačují, že snaR může být negativním regulátorem růstu buněk CRC po expozici 5-FU.

Xiao et al. identifikovali lncRNA XIST jako významný diagnostický a prognostický biomarker. Zvýšená hladina XIST v séru korelovala se špatnou terapeutickou odpovědí a nižší mírou přežití u pacientů s CRC, kteří dostávali léčbu na bázi 5-FU (Xiao et al., 2017).

Cíle práce

1. Vyhodnotit význam prognostických a prediktivních faktorů u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených cílenou léčbou.
2. Vyhodnotit prognostický význam miRNA a jejich vazebných míst u pacientů s CRC, včetně možného využití neinvazivních molekulárních markerů pro časnou detekci CRC a včasné odhalení recidivy CRC a odhad prognózy nemocných s metastatickým nemocněním.
3. Vyhodnotit význam polymorfismů v genech opravujících chyby DNA pro vznik a průběh CRC.

Vlastní výsledky – soubor publikovaných prací

Vlastní výsledky výzkumu a příslušná diskuse jsou shrnuty v příložených publikacích. Popis použitých experimentálních metod, včetně statistických je uveden v jednotlivých publikovaných pracích.

Uvedený impact factor (IF) článků je podle Web of Science, přístup 19.1.2020, poslední uvedená hodnota pro příslušný časopis (tj. za rok 2018).

Předkládané publikace jsou rozdělené do čtyř okruhů:

- A. Původní klinické práce zaměřené na cílenou léčbu kolorektálního karcinomu
- B. Původní práce zaměřené na roli miRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a zejména jako prognostického a prediktivního markeru
- C. Původní práce zaměřená na funkční polymorfismy genů opravujících chyby DNA ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu
- D. Přehledový článek shrnující biochemické faktory ovlivňující efekt cytostatik ze skupiny fluoropyrimidinů v léčbě kolorektálního karcinomu

Fiala O*, Veskrnova V*, Chloupkova R, Poprach A, Kiss I, Kopeckova K, Dusek L, Slavicek L, Kohoutek M, Finek J, Svoboda M, Petruzelka L, Boubliková L, Dvorak J, Melichar B, Buchler T.
Impact of Delayed Addition of Anti-EGFR Monoclonal Antibodies on the Outcome of First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: a Retrospective Registry-Based Analysis. Target Oncol. 2018 Dec;13(6):735-743. IF 3.683

***dva první autoři – v publikaci je deklarovaný stejný přínos**

Přidání monoklonálních protilátek proti receptoru epidermálního růstového faktoru (anti-EGFR Abs) k chemoterapii metastatického kolorektálního karcinomu (mCRC) je běžně opožděno v reálné klinické praxi, obvykle z důvodu pozdních výsledků RAS mutace.

Cílem bylo stanovit, zda opožděné přidání anti-EGFR monoklonálních protilátek až do čtvrtého cyklu chemoterapie negativně ovlivnilo výsledky pacientů s metastatickým CRC léčených režimy první linie.

Klinické údaje u pacientů s histologicky ověřeným mCRC RAS-divokého typu léčených režimy první linie systémové terapie obsahující anti-EGFR monoklonální protilátky byly retrospektivně analyzovány z národní databáze. Pacienti byli rozděleni do tří skupin podle načasování přidání anti-EGFR mAbs k základní chemoterapii. Kohorta A (n = 401) zahrnovala pacienty, u kterých byly anti-EGFR mAb přidány k chemoterapii v prvním cyklu, pacienti skupiny B (n = 71) s anti-EGFR mAbs přidány k chemoterapii při druhém cyklu a kohorta C (n = 101) pacienti, kteří měli anti-EGFR mAbs přidány k chemoterapii ve třetím nebo čtvrtém cyklu.

336 (58,6%) pacientů dostalo panitumumab a 237 (41,4%) pacientů dostalo cetuximab. Střední přežití bez progresu (PFS) celé kohorty bylo 12,2 měsíce (95% confidence interval [CI] 10,9–13,5) a medián celkového přežití (OS) byl 33,5 měsíce (95% CI 27,6–39,4). Medián PFS a OS u pacientů léčených anti-EGFR mAbs přidány k chemoterapii byl 12,9 (95% CI 11,5–14,3) a 30,6 měsíce (95% CI 25,2–36,1) pro skupinu A, 9,7 (95% CI 9,1–10,3) a nedosáhla se pro skupinu B ve srovnání s 11,5 (95% CI 9,8–13,2) a 37,9 měsíců (95% CI 28,6–47,3) pro skupinu C.

Závěrem práce je, že opožděné přidání anti-EGFR mAb k chemoterapii první linie nebylo spojeno s horším přežitím nebo odpovědí na terapii.

Buchler T, Chloupkova R, Poprach A, Fiala O, Kiss I, Kopeckova K, Dusek L, Veskrnova V, Slavicek L, Kohoutek M, Finek J, Svoboda M, Petruzelka L, Melichar B. Sequential therapy with bevacizumab and EGFR inhibitors for metastatic colorectal carcinoma: a national registry-based analysis. *Cancer Manag Res.* 2018 Dec 28;11:359-368. doi: 10.2147/CMAR.S183093. IF 2.243

Ačkoli se inhibitory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a inhibitory receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFRi) běžně používají k léčbě metastazujícího kolorektálního karcinomu (mCRC), v současné době není optimální sekvenování těchto látek jasné.

Národní registr cílených terapií byl použit k analýze výchozích charakteristik a výsledků pacientů se stavem mCRC a divokého typu KRAS exon 2, kteří dostávali bevacizumab a EGFRi (cetuximab nebo panitumumab) jako součást léčby první a druhé linie v obou sekvencích.

Do kohorty bylo zařazeno 490 pacientů (181 pacientů léčených první linií EGFRi a druhé linie bevacizumabu a 309 pacientů léčených první linií bevacizumabu a druhé linie EGFRi). Medián celkového přežití (OS) od zahájení léčby první linie byl podobný u pacientů léčených jakoukoli sekvencí a dosáhl 31,8 (95% CI 27,5–36,1) vs 31,4 měsíců (95% CI 27,8–35,0) pro EGFRi → bevacizumab vs. bevacizumab → kohorta EGFRi. Doba od zahájení první linie do progresu v druhé linii terapie [přežití bez progresu (PFS)] byla 21,1 (95% CI 19,3-23,0) vs 19,3 měsíců (95% CI 17,3-21,3) pro bevacizumab → EGFRi vs. EGFRi → kohorta bevacizumabu (P = 0,016).

Tato retrospektivní analýza údajů z reálného světa u pacientů s mCRC divokého typu KRAS exon 2 mCRC neprokázala žádné rozdíly v OS mezi kohortami léčenými bevacizumabem → EGFRi vs. reverzní sekvencí, zatímco kombinovaný PFS upřednostňoval sekvenci bevacizumab → EGFRi.

[Původní práce zaměřené na roli miRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a zejména jako prognostického a prediktivního markeru](#)

Kral J, Korenkova V, Novosadova V, Langerova L, Schneiderova M, Liska V, Levy M, Veskrnova V, Spicak J, Opattova A, Jiraskova K, Vymetalkova V, Vodicka P, Slyskova J. Expression profile of miR-17/92 cluster is predictive of treatment response in rectal cancer. *Carcinogenesis.* 2018 Dec 13;39(11):1359-1367. doi: 10.1093/carcin/bgy100. IF 4.004

MicroRNA profily představují slibné zdroje nádorových biomarkerů. MiRNA jsou specifické pro určitý typ nádoru a pro podskupiny pacientů s odlišnou odpovědí na léčbu. Tento potenciál miRNA nebyl zatím nebyl uspokojivě prozkoumán u nádorů rekta. Cílem studie bylo najít specifické miRNA s klinicko-terapeutickým významem pro nádory rekta. Expres 2555 miRNA byla zkoumána ve 20 párech vzorků tkáně nádorů rekta a nemaligní tkáně 3D-Gene Toray microarray. Kandidátní miRNA byly ověřovány na nezávislé kohortě 100 párů nádorové rektální tkáně a v plasmě a exosomy u 100 pacientů s nádorem rekta. Pro studium asociace profilu miRNA s léčebnými výsledky byly vzorky plazmy odebírány opakovaně po dobu 1 roku, aby se ukázala i reakce pacientů na léčbu. Nakonec byly nejvýznamnější miRNA zkoumány in vitro, jak ovlivňují buněčný růst. Identifikovali jsme specifický miRNA podpis pro karcinom rekta, který odlišuje respondenty od pacientů nereagujících na adjuvantní chemoterapii. Převažující část identifikovaných miRNA byla reprezentována členy klastru miR-17/92. Upregulace miRNA-17, -18a, -18b, -19a, -19b, -20a, -20b a -106a v nádoru byla spojena s vyšším rizikem relapsu tumoru a jejich nadměrná exprese v buněčných liniích karcinomu rekta stimulovala buněčnou proliferaci. Vyšetření těchto miRNA v plazmatických exozomech ukázalo, že se jejich hladiny lišily mezi pacienty s rektálním karcinomem a zdravými kontrolami a korelovaly s léčebnou odpovědí pacienta. MiRNA z klastru miR-17/92 představují neinvazivní biomarker pro predikci prognózy po léčbě u pacientů s nádory rekta.

Schneiderova M, Naccarati A, Pardini B, Rosa F, Gaetano CD, Jiraskova K, Opattova A, Levy M, Veskrna K, Veskrnova V, Buchler T, Landi S, Vodicka P, Vymetalkova V. MicroRNA-binding site polymorphisms in genes involved in colorectal cancer etiopathogenesis and their impact on disease prognosis. Mutagenesis. 2017 Oct 17;32(5):533-542. doi: 10.1093/mutage/gex026. IF 2.898

Podle Vogelsteinova modelu kolorektální karcinogeneze mohou být genetické variace ve vysoce penetrantních genech zapojeny do patogeneze kolorektálního karcinomu (CRC). Podobně často se vyskytují aberantní funkce a / nebo změněná exprese miRNA u CRC. V tomto kontextu mohou polymorfismy v miRNA-vazebných místech (miRSNP) ovlivňovat interakci miRNA v cílových genech, což vede k diferenciální expresi mRNA / proteinu a zvýšené náchylnosti k běžným onemocněním. Pro zkoumání tohoto fenoménu jsme vytěžili 3' netranslatované oblasti (3'UTR) genů, o nichž je známo, že jsou často mutovány v CRC, a hledali jsme miRSNP a testovali jsme jejich souvislost s rizikem vzniku CRC a klinickými výsledky. Osm miRSNPs (rs1804191, rs397768, rs41116 v APC; rs1137918, rs227091, rs4585 v ATM; rs712, rs1137282, rs4585 v ATM; rs712, rs1137282, rs61764370 v KRAS;

rs8674 v PARP1 a rs16950113 v SMAD7) byly testovány v souvislosti s rizikem CRC v case-control studii (1111 případů a 1469 zdravých kontrol) od září 2003 do května 2012. Úloha těchto miRSNP byla také zkoumána ve vztahu ke klinickým výsledkům na podskupině pacientů (n=866).

rs8679 v rámci PARP1 byl asociován s rizikem CRC a odlišným přežíváním pacientů. V dominantním modelu měli nosiči alespoň jedné alely C snížené riziko vzniku maligního nádoru (P = 0,05). Genotyp CC v rs8679 byl spojen se zvýšeným rizikem recidivy / progresu u pacientů, kteří dostávali chemoterapii na bázi 5-FU (log-rank test P = 0,03). Nosičství homozygotní varianty genotypu TT pro rs712 v genu KRAS bylo spojeno se sníženým rizikem karcinomu rekta (poměr šancí (OR) = 0,65, 95% intervaly spolehlivosti (CI) 0,43–1,00, P = 0,05), zatímco jedinci s karcinomem tlustého střeva s heterozygotním genotypem GT vykazovali delší celkové přežití (OS) (P = 0,04). Poskytujeme první důkaz, že variace v potenciálních cílových místech vazajících miRNA ve 3' UTR genu PARP1 mohou ovlivňovat riziko vzniku CRC a prognózu po terapii. Další studie jsou nezbytné pro replikaci našeho nálezu a posouzení miRSNP jako prediktivních biomarkerů v nezávislých populacích.

Vymetalkova V, Pardini B, Rosa F, Jiraskova K, Di Gaetano C, Bendova P, Levy M, Veskrnova V, Buchler T, Vodickova L, Naccarati A, Vodicka P. Polymorphisms in microRNA binding sites of mucin genes as predictors of clinical outcome in colorectal cancer patients. Carcinogenesis. 2017 Jan;38(1):28-39. doi: 10.1093/carcin/bgw114. IF 4.004

Polymorfismy v miRNA vazebných místech mohou ovlivnit interakci miRNA a cílového genu, což vede k diferenciální expresi mRNA / proteinu a citlivosti na běžné choroby. Muciny byly identifikovány jako markery nepříznivé prognózy. Předpokládali jsme, že genetické variace na vazebných místech miRNA lokalizovaných v mucinových genech mohou modulovat signální odpověď a udržovat stabilitu genomu, což nakonec ovlivňuje vnímavost k nádorovému bujení, účinnost chemoterapie a přežití pacientů. V této studii jsme analyzovali asociaci jednonukleotidových polymorfismů v předpokládaných cílových místech miRNA (miRSNP) mucinových genů s rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (CRC) a posuzovali jsme i klinické výsledky u pacientů. Třináct miRSNP v 9 genech bylo hodnoceno v 1111 případech a 1469 kontrol. Pacienti nesoucí CC genotyp rs886403 v MUC21 vykazovali kratší přežití a vyšší riziko recidivy ve srovnání s TT nosiči [celkové přežití (OS): poměr rizika (HR) 1,69; 95% intervaly spolehlivosti (CI) 1,13–2,46; P = 0,01 a přežití bez událostí (EFS): HR 1,99; 95% CI 1,38–2,84; P = 0,0002, v tomto pořadí]. Pozorované asociace byly výraznější po stratifikaci

místa nádoru (u pacientů s karcinomem tlustého střeva, OS: HR 2,63; 95% CI 1,69–4,10; P <0,0001 a EFS: HR 2,65; 95% CI 1,72–4,07; P <0,0001). Naproti tomu případy karcinomu rekta nesoucí genotyp CC rs4729655 v MUC17 vykazovaly delší přežití (OS: 0,27; 95% CI 0,14–0,54; P = 0,0002) než ty s nejběžnějším genotypem. Pokud je nám známo, je to první studie zkoumající miRSNP potenciálně ovlivňující vazbu miRNA na mucinové geny a odhalující jejich vliv na citlivost na CRC nebo na přežití pacienta.

Původní práce zaměřená na funkční polymorfismy genů opravujících chyby DNA ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu

Jiraskova K, Hughes DJ, Brezina S, Gumpenberger T, Veskrnova V, Buchler T, Schneiderova M, Levy M, Liska V, Vodenkova S, Di Gaetano C, Naccarati A, Pardini B, Vymetalkova V, Gsur A, Vodicka P. Functional Polymorphisms in DNA Repair Genes Are Associated with Sporadic Colorectal Cancer Susceptibility and Clinical Outcome. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 27;20(1). pii: E97. doi: 10.3390/ijms20010097. IF 4.183

Procesy opravy DNA probíhají při samotném vzniku CRC, tak i při odpovědi CRC na léčbu. Změna v jediném nukleotidu zapříčiní záměnu aminokyseliny v proteinu a může změnit účinnost oprav DNA u vzniku CRC a u odpovědi na klinickou terapii. Provedli jsme výběr kandidátních genů, abychom u nich analyzovali spojení nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů (nsSNPs) v genech, které se účastní hlavních drah při opravách DNA u při vzniku CRC a u rozdílů ve výsledcích léčby. Naše kandidátní polymorfismy byly vybrány podle předních genomických a funkčních predikčních databází. Šestnáct nsSNP ve 12 genech opravujících DNA bylo vyhodnoceno ve zkoumané kohortě pacientů z České republiky (1832 případů a 1172 kontrol) a v rakouské replikační kohortě (950 případů a 820 kontrol). Pozorovali jsme několik signifikantních asociací v různých nsSNP ve spojení s přežitím a klinickými výsledky v Cox regresní analýze v obou kohortách. Nicméně jen některé geny (REV3L, POLQ a NEIL3) byly určeny jako predikční faktory v klasifikační a regresní tree analýze a ukázaly se jako velmi významné v přežití pacientů. Závěrem jsme získali důkazy, že dokonce i velmi malé alterace v určitých proteinech, které se účastní drah v opravě DNA se mohou podílet na vnímavosti ke vzniku CRC a ovlivňovat výsledky klinické léčby.

Přehledový článek shrnující biochemické faktory ovlivňující efekt cytostatik ze skupiny fluoropyrimidinů v léčbě kolorektálního karcinomu

Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther.* 2019 Nov 19:107447. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447. IF 9.396

5-fluorouracil (5-FU) je základní složkou systémové chemoterapie pro kolorektální karcinom (CRC) v paliativní i adjuvantní terapii. V posledních čtyřech desetiletích bylo vyvinuto a testováno několik modulačních strategií, včetně implementace kombinačních režimů na bázi 5-FU a proléčiv 5-FU, aby se zvýšila protinádorová aktivita 5-FU a překonala klinická rezistence. Navzdory povzbudivému pokroku v terapii CRC k dnešnímu dni zůstává míra odezvy pacientů na terapii stále nízká a prospěch pacientů z terapie založené na 5-FU je často ohrožen rozvojem chemorezistence. Interindividuální rozdíly v léčebné odpovědi u pacientů s CRC mohou vznikat v jedinečném genetickém a epigenetickém složení každého jednotlivce. Kritickým prvkem současného trendu personalizované medicíny je správné pochopení příčin a mechanismů přispívajících k nízké nebo nedostatečné citlivosti nádorové tkáně k terapii založené na 5-FU. Identifikace a validace prediktivních biomarkerů pro stávající a nové cílené terapie založené na 5-FU pro léčbu CRC pravděpodobně v budoucnosti zlepší výsledky pacientů. Zde uvádíme komplexní přehled shrnující možnosti léčby CRC a mechanismy působení 5-FU na molekulární úrovni, včetně anabolických i katabolických způsobů. Hlavní část tohoto přehledu zahrnuje v současnosti známé molekulární mechanismy, které jsou základem chemorezistence u pacientů s CRC. Zaměřujeme se také na různá proléčiva 5-FU vyvinutá za účelem zvýšení množství cirkulujících 5-FU a omezení toxicity. Nakonec navrhujeme budoucí směry personalizované terapie CRC podle nejnovějších publikovaných důkazů.

Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

1. Význam prognostických a prediktivních faktorů u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených cílenou léčbou

Význam odhadu prognózy je v následné individualizaci onkologické terapie a dispenzárních kontrol. Dosud nemáme spolehlivý prognostický parametr pro odhad přežití pacientů s mCRC, který by vyplýval z primárních vlastností nemoci. V klinické praxi běžně používané parametry jako stádium podle TNM nebo rozsah metastatického postižení lze považovat za sekundární, protože jsou podmíněny molekulárními vlastnostmi nádoru a faktory spojenými s hostitelem.

V práci zkoumající sekvenci cílených léků u pacientů s mCRC Coxova analýza proporcionálního rizika ukázala, že sekvence bevacizumabu → EGFRi by mohla být lepší, než sekvence opačná (trend hraničící se statistickou významností). Multivariační Coxova analýza dále ukázala, že mužské pohlaví, primární nádor v levé části tlustého střeva, stádium M0 v době první diagnózy nádoru a použití chemoterapie FOLFOX v první linii byly nezávislými příznivými prognostickými faktory pro celkové přežití (Buchler et al., 2019).

V práci hodnotící načasování zahájení cílené léčby u nemocných s mCRC multivariační Coxův proporcionální rizikový model odhalil hraničně signifikantní výhodu pozdějšího zahájení cílené léčby anti-EGFR. Dalšími nezávislými prognostickými faktory byly výkonnostní stav hodnocený podle škály Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) a režim chemoterapie pro přežití bez progresu, zatímco lokalizace primární nádoru (v pravém versus levém tlustém střevě) a režim chemoterapie byly významně spojeny s celkovým přežitím (Fiala et al., 2018).

2. Prognostický význam miRNA a jejich vazebných míst u pacientů s CRC

Podařilo se nám identifikovat specifický miRNA podpis pro karcinom rekta, který odlišuje respondenty od pacientů nereagujících na adjuvantní chemoterapii. Převažující část identifikovaných miRNA byla reprezentována členy klastru miR-17/92. Upregulace miRNA-17, -18a, -18b, -19a, -19b, -20a, -20b a -106a v nádoru byla spojena s vyšším rizikem relapsu tumoru a jejich nadměrná exprese v buněčných liniích karcinomu rekta stimulovala buněčnou proliferaci. Vyšetření těchto miRNA v plazmatických exozomech ukázalo, že se jejich hladiny lišily mezi pacienty s karcinomem rekta a zdravými kontrolami a korelovaly s léčebnou odpovědí pacienta. MiRNA z klastru miR-17/92 představují neinvazivní biomarker pro predikci prognózy po léčbě u pacientů s nádory rekta (Kral et al., 2018).

V translační studii jsme publikovali první důkaz, že variace v potenciálních cílových místech vzájemných miRNA ve 3' UTR genu PARP1 mohou ovlivňovat riziko vzniku CRC a prognózu po terapii. Genotyp CC v rs8679 byl spojen se zvýšeným rizikem recidivy nebo progresu u pacientů, kteří dostávali chemoterapii na bázi 5-FU. Nosiče homozygotní varianty genotypu TT pro rs712 v genu KRAS byly spojeny se sníženým rizikem karcinomu, zatímco u jedinců s karcinodem kolon heterozygotní genotyp GT byla spojena s delším celkovým přežitím (Schneiderova et al., 2017).

Provedli jsme jednu z prvních studií zabývajících se polymorfismy ve vazebných místech pro miRNA v genech kódujících mucin. Pacienti s CRC nesoucí CC genotyp rs886403 v MUC21 vykazovali kratší přežití a vyšší riziko recidivy ve srovnání s TT nosiči. Pacienti s karcinodem rekta nesoucí genotyp CC rs4729655 v MUC17 vykazovali delší přežití než jedinci s běžným genotypem (Vymetalkova et al., 2017).

3. Prognostický význam polymorfismů v genech opravujících chyby DNA

Pozorovali jsme několik signifikantních asociací v různých nsSNP ve spojení s přežitím a klinickými výsledky. Polymorfismy v některých genech (REV3L, POLQ a NEIL3) byly identifikovány jako prognostické faktory v klasifikační a regresní tree analýze a ukázaly se jako velmi významné pro přežití pacientů (Jiraskova et al., 2018).

Literatura

- Bhushan, S., McLeod, H., & Walko, C. M. (2009). Role of pharmacogenetics as predictive biomarkers of response and/or toxicity in the treatment of colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 8(1), 15–21. <https://doi.org/10.3816/CCC.2009.n.003>
- Bonfrate, L., Altomare, D. F., Di Lena, M., Travaglio, E., Rotelli, M. T., De Luca, A., & Portincasa, P. (2013). MicroRNA in Colorectal Cancer: New Perspectives for Diagnosis, Prognosis and Treatment. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22(3), 311–320.
- Borrhalho, P. M., Kren, B. T., Castro, R. E., Moreira da Silva, I. B., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2009). MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *The FEBS Journal*, 276(22), 6689–6700.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2018). *TNM klasifikace zhoubných nádorů* (8. vydání). Union for International Cancer Control.
- Buchler, T., Chloupkova, R., Poprach, A., Fiala, O., Kiss, I., Kopeckova, K., Dusek, L., Veskrnova, V., Slavicek, L., Kohoutek, M., Finek, J., Svoboda, M., Petruzalka, L., & Melichar, B. (2019). Sequential therapy with bevacizumab and EGFR inhibitors for metastatic colorectal carcinoma: a national registry-based analysis. *Cancer Management and Research*, 11, 359–368. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S183093>
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dan Dumitru, C., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>
- Chu, E. (2012). An update on the current and emerging targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2011.05.005>
- Cipollini, M., Landi, S., & Gemignani, F. (2014). MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 7, 173–191. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S61693>
- Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. (2012). *Nature*, 487(7407), 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Das, V., Kalita, J., & Pal, M. (2017). Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 87, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064>
- Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes & Cancer*, 1(11), 1100–1114. <https://doi.org/10.1177/1947601910396213>
- Deng, J., Wang, Y., Lei, J., Lei, W., & Xiong, J. P. (2017). Insights into the involvement of noncoding RNAs in 5-fluorouracil drug resistance. *Tumor Biology*, 39(4), 1010428317697553.
- Di Gesualdo, F., Capaccioli, S., & Lulli, M. (2014). A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget*, 5(22), 10976.
- Donzelli, S., Mori, F., Biagioni, F., Bellissimo, T., Pulito, C., Muti, P., Strano, S., & Blandino, G. (2014). MicroRNAs: short non-coding players in cancer chemoresistance. *Molecular and Cellular Therapies*, 2(1), 16.
- Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, J., Žaloudík, J., & Vyzula, R. (2005). Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. *Masarykova Univerzita, (Cit. 2019-03-03). Dostupný z WWW: Http://www.Svod.Cz.*
- Fanale, D., Castiglia, M., Bazan, V., & Russo, A. (2016). Involvement of non-coding RNAs in chemo-and

- radioresistance of colorectal cancer. In *Non-coding RNAs in Colorectal Cancer* (pp. 207–228). Springer.
- Farina-Sarasqueta, A., van Lijnschoten, G., Moerland, E., Creemers, G.-J., Lemmens, V. E. P. P., Rutten, H. J. T., & van den Brule, A. J. C. (2010). The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *21*(12), 2396–2402. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq258>
- Fernandez-Rozadilla, C., Palles, C., Carvajal-Carmona, L., Peterlongo, P., Nici, C., Veneroni, S., Pinheiro, M., Teixeira, M. R., Moreno, V., Lamas, M.-J., Baiget, M., Lopez-Fernandez, L. A., Gonzalez, D., Brea-Fernandez, A., Clofent, J., Bujanda, L., Bessa, X., Andreu, M., Xicola, R., ... Ruiz-Ponte, C. (2013). BMP2/BMP4 colorectal cancer susceptibility loci in northern and southern European populations. *Carcinogenesis*, *34*(2), 314–318. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs357>
- Fesler, A., Guo, S., Liu, H., Wu, N., & Ju, J. (2017). *Overcoming chemoresistance in cancer stem cells with the help of microRNAs in colorectal cancer*. Future Medicine.
- Fiala, O., & Buchler, T. (2017). Kolorektální karcinom. In T. Buchler (Ed.), *Speciální onkologie* (1. vydání, pp. 47–52). Maxdorf.
- Fiala, O., Veskrnova, V., Chloupkova, R., Poprach, A., Kiss, I., Kopeckova, K., Dusek, L., Slavicek, L., Kohoutek, M., Finek, J., Svoboda, M., Petruzalka, L., Boublikova, L., Dvorak, J., Melichar, B., & Buchler, T. (2018). Impact of Delayed Addition of Anti-EGFR Monoclonal Antibodies on the Outcome of First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: a Retrospective Registry-Based Analysis. *Targeted Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11523-018-0597-7>
- Fu, Q., Cheng, J., Zhang, J., Zhang, Y., Chen, X., Luo, S., & Xie, J. (2017). miR-20b reduces 5-FU resistance by suppressing the ADAM9/EGFR signaling pathway in colon cancer. *Oncology Reports*, *37*(1), 123–130.
- Gallois, C., Pernet, S., Zaanani, A., & Taieb, J. (2018). Colorectal Cancer: Why Does Side Matter? *Drugs*, *78*(8), 789–798. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0921-7>
- Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., Nagtegaal, I. D., Palmqvist, R., Masucci, G. V., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., ... Pages, F. (2014). Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *The Journal of Pathology*, *232*(2), 199–209. <https://doi.org/10.1002/path.4287>
- Glynne-Jones, R., Wyrwicz, L., Tiret, E., Brown, G., Rodel, C., Cervantes, A., & Arnold, D. (2017). Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(suppl_4), iv22–iv40. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx224>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, *21*(11). <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Gulia, C., Baldassarra, S., Signore, F., Rigon, G., Pizzuti, V., Gaffi, M., Briganti, V., Porrello, A., & Piergentili, R. (2017). Role of Non-Coding RNAs in the Etiology of Bladder Cancer. *Genes*, *8*(11). <https://doi.org/10.3390/genes8110339>
- Iliou, M. S., da Silva-Diz, V., Carmona, F. J., Ramalho-Carvalho, J., Heyn, H., Villanueva, A., Munoz, P., & Esteller, M. (2014). Impaired DICER1 function promotes stemness and metastasis in colon cancer. *Oncogene*, *33*(30), 4003.
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, *50*(1), 113–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>
- Jin, Y., Jiang, Z., Guan, X., Chen, Y., Tang, Q., Wang, G., & Wang, X. (2016). miR-450b-5p suppresses stemness and the development of chemoresistance by targeting SOX2 in colorectal cancer. *DNA*

- and *Cell Biology*, 35(5), 249–256.
- Jiraskova, K., Hughes, D. J., Brezina, S., Gumpfenberger, T., Veskrnova, V., Buchler, T., Schneiderova, M., Levy, M., Liska, V., Vodenkova, S., Di Gaetano, C., Naccarati, A., Pardini, B., Vymetalkova, V., Gsur, A., & Vodicka, P. (2018). Functional Polymorphisms in DNA Repair Genes Are Associated with Sporadic Colorectal Cancer Susceptibility and Clinical Outcome. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010097>
- Kopetz, S., Grothey, A., Yaeger, R., Van Cutsem, E., Desai, J., Yoshino, T., Wasan, H., Ciardiello, F., Loupakis, F., Hong, Y. S., Steeghs, N., Guren, T. K., Arkenau, H.-T., Garcia-Alfonso, P., Pfeiffer, P., Orlov, S., Lonardi, S., Elez, E., Kim, T.-W., ... Tabernero, J. (2019). Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 381(17), 1632–1643. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075>
- Kral, J., Korenkova, V., Novosadova, V., Langerova, L., Schneiderova, M., Liska, V., Levy, M., Veskrnova, V., Spicak, J., Opattova, A., Jiraskova, K., Vymetalkova, V., Vodicka, P., & Slyskova, J. (2018). Expression profile of miR-17/92 cluster is predictive of treatment response in rectal cancer. *Carcinogenesis*, 39(11), 1359–1367. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy100>
- Kulda, V., Pesta, M., Topolcan, O., Liska, V., Treska, V., Sutnar, A., Rupert, K., Ludvikova, M., Babuska, V., Holubec Jr., L., & Cerny, R. (2010). Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 200(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.04.015>
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Mandala, M., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24 Suppl 6, vi64–72. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt354>
- Lajbl Večřová, K. (2019). Screening zhoubných nádorů. In T. Buchler (Ed.), *Obecná onkologie* (1. vydání, pp. 97–99). Maxdorf.
- Lauby-Secretan, B., Vilahur, N., Bianchini, F., Guha, N., & Straif, K. (2018). The IARC Perspective on Colorectal Cancer Screening. *The New England Journal of Medicine*, 378(18), 1734–1740. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1714643>
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Luber, B. S., Wong, F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., ... Diaz, L. A. J. (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6349), 409–413. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., ... Diaz, L. A. J. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 372(26), 2509–2520. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>
- Lee, H., Kim, C., Ku, J.-L., Kim, W., Yoon, S. K., Kuh, H.-J., Lee, J.-H., Nam, S. W., & Lee, E. K. (2014). A long non-coding RNA snaR contributes to 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Molecules and Cells*, 37(7), 540.
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 15(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Loupakis, F., Cremolini, C., Masi, G., Lonardi, S., Zagonel, V., Salvatore, L., Cortesi, E., Tomasello, G., Ronzoni, M., Spadi, R., Zaniboni, A., Tonini, G., Buonadonna, A., Amoroso, D., Chiara, S., Carlomagno, C., Boni, C., Allegrini, G., Boni, L., & Falcone, A. (2014). Initial Therapy with FOLFOXIRI and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 371(17). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403108>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>

- Magri, F., Vanoli, F., & Corti, S. (2018). miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(2), 755–767. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13450>
- Maxwell, E. K., Campbell, J. D., Spira, A., & Baxeavanis, A. D. (2015). SubmiRine: assessing variants in microRNA targets using clinical genomic data sets. *Nucleic Acids Research*, *43*(8), 3886–3898. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv256>
- Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, *148*(6), 1172–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.005>
- Mizuno, R., Kawada, K., & Sakai, Y. (2018). The molecular basis and therapeutic potential of Let-7 MicroRNAs against colorectal cancer. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *2018*.
- Morris, J. S., Bradbury, K. E., Cross, A. J., Gunter, M. J., & Murphy, N. (2018). Physical activity, sedentary behaviour and colorectal cancer risk in the UK Biobank. *British Journal of Cancer*, *118*(6), 920–929. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.496>
- Naccarati, A., Rosa, F., Vymetalkova, V., Barone, E., Jiraskova, K., Di Gaetano, C., Novotny, J., Levy, M., Vodickova, L., Gemignani, F., Buchler, T., Landi, S., Vodicka, P., & Pardini, B. (2016). Double-strand break repair and colorectal cancer: Gene variants within 3' UTRs and microRNAs binding as modulators of cancer risk and clinical outcome. *Oncotarget*, *7*(17). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6804>
- Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., & Ju, J. (2006). Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics-Proteomics*, *3*(5), 317–324.
- Ning, Y., Hanna, D. L., Zhang, W., Mendez, A., Yang, D., El-Khoueiry, R., Matsusaka, S., Sunakawa, Y., Stremitzer, S., Parekh, A., Okazaki, S., Berger, M. D., Barzi, A., & Lenz, H.-J. (2015). Cytokeratin-20 and Survivin-Expressing Circulating Tumor Cells Predict Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients by a Combined Immunomagnetic qRT-PCR Approach. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(10), 2401–2408. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0359>
- Normanno, N., Rachiglio, A. M., Lambiase, M., Martinelli, E., Fenizia, F., Esposito, C., Roma, C., Troiani, T., Rizzi, D., Tatangelo, F., Botti, G., Maiello, E., Colucci, G., Ciardiello, F., Giuliani, F., Simone, G., Febbraro, A., Tommaselli, E., Cinieri, S., ... Sebastio, A. (2015). Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Annals of Oncology*, *26*(8). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv176>
- Pages, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T. T., Berger, M. D., Nagtegaal, I. D., Vink-Borger, E., Hartmann, A., Geppert, C., Kolwelter, J., Merkel, S., Grutzmann, R., Van den Eynde, M., Jouret-Mourin, A., ... Galon, J. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet (London, England)*, *391*(10135), 2128–2139. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30789-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30789-X)
- Pardini, B., Rosa, F., Barone, E., Di Gaetano, C., Slyskova, J., Novotny, J., Levy, M., Garritano, S., Vodickova, L., Buchler, T., Gemignani, F., Landi, S., Vodicka, P., & Naccarati, A. (2013). Variation within 3'-UTRs of base excision repair genes and response to therapy in colorectal cancer patients: A potential modulation of microRNAs binding. *Clinical Cancer Research*, *19*(21). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0314>
- Pesta, M., Kucera, R., Topolcan, O., Karlikova, M., Houfkova, K., Polivka, J., Macanova, T., Machova, I., Slouka, D., & Kulda, V. (2019). Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients. *Cancers*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060864>
- Preskill, C., & Weidhaas, J. B. (2013). SNPs in microRNA binding sites as prognostic and predictive cancer biomarkers. *Critical Reviews in Oncogenesis*, *18*(4), 327–340. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2013007254>
- Raza, U., Zhang, J. D., & Şahin, Ö. (2014). MicroRNAs: master regulators of drug resistance, stemness,

- and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*, 92(4), 321–336.
- Rosty, C., Young, J. P., Walsh, M. D., Clendenning, M., Sanderson, K., Walters, R. J., Parry, S., Jenkins, M. A., Win, A. K., Southey, M. C., Hopper, J. L., Giles, G. G., Williamson, E. J., English, D. R., & Buchanan, D. D. (2013). PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One*, 8(6), e65479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065479>
- Rowland, a, Dias, M. M., Wiese, M. D., Kichenadasse, G., McKinnon, R. a, Karapetis, C. S., & Sorich, M. J. (2015). Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 112(12). <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.173>
- Ryan, B. M., Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews. Cancer*, 10(6), 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrc2867>
- Ryan, B. M., Robles, A. I., McClary, A. C., Haznadar, M., Bowman, E. D., Pine, S. R., Brown, D., Khan, M., Shiraiishi, K., Kohno, T., Okayama, H., Modali, R., Yokota, J., & Harris, C. C. (2015). Identification of a functional SNP in the 3'UTR of CXCR2 that is associated with reduced risk of lung cancer. *Cancer Research*, 75(3), 566–575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2101>
- Schetter, A. J., Okayama, H., & Harris, C. C. (2012). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(3), 244–252. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318258b78f>
- Schneiderova, M., Naccarati, A., Pardini, B., Rosa, F., Gaetano, C. D., Jiraskova, K., Opatova, A., Levy, M., Veskrna, K., Veskrnova, V., Buchler, T., Landi, S., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2017). MicroRNA-binding site polymorphisms in genes involved in colorectal cancer etiopathogenesis and their impact on disease prognosis. *Mutagenesis*, 32(5). <https://doi.org/10.1093/mutage/gex026>
- Sethupathy, P., & Collins, F. S. (2008). MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends in Genetics : TIG*, 24(10), 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.07.004>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., & Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(3), 177–193. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1). <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Slaby, O., Svoboda, M., Michalek, J., & Vyzula, R. (2009). MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular Cancer*, 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-102>
- Smith, C. G., Fisher, D., Harris, R., Maughan, T. S., Phipps, A. I., Richman, S., Seymour, M., Tomlinson, I., Rosmarin, D., Kerr, D., Chan, A. T., Peters, U., Newcomb, P. A., Idziaszczyk, S., West, H., Meade, A., Kaplan, R., & Cheadle, J. P. (2015). Analyses of 7,635 Patients with Colorectal Cancer Using Independent Training and Validation Cohorts Show That rs9929218 in CDH1 Is a Prognostic Marker of Survival. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(15), 3453–3461. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3136>
- Song, B., Wang, Y., Kudo, K., Gavin, E. J., Xi, Y., & Ju, J. (2008). miR-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit. *Clinical Cancer Research*, 14(24), 8080–8086.
- Song, B., Wang, Y., Titmus, M. A., Botchkina, G., Formentini, A., Kornmann, M., & Ju, J. (2010). Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Molecular Cancer*, 9(1), 96.
- Strubberg, A. M., & Madison, B. B. (2017). MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Disease Models & Mechanisms*, 10(3), 197–214. <https://doi.org/10.1242/dmm.027441>
- Tanaka, T., Tanaka, M., Tanaka, T., & Ishigamori, R. (2010). Biomarkers for colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3209–3225.

- <https://doi.org/10.3390/ijms11093209>
- Tie, Y., Chen, C., Yang, Y., Qian, Z., Yuan, H., Wang, H., Tang, H., Peng, Y., Du, X., & Liu, B. (2018). Upregulation of let-7f-5p promotes chemotherapeutic resistance in colorectal cancer by directly repressing several pro-apoptotic proteins. *Oncology Letters*, 15(6), 8695–8702.
- Truscott, M., Islam, A. B. M. M. K., & Frolov, M. V. (2016). Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 22(1), 129–138. <https://doi.org/10.1261/rna.053264.115>
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J.-Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., ... Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(8), 1386–1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>
- Van Cutsem, Eric, Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausova, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G. A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., & Allegra, C. (2012). Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(28), 3499–3506. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.8201>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2019). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & Therapeutics*, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>
- Vodicka, P., Vodenkova, S., Buchler, T., & Vodickova, L. (2019). DNA repair capacity and response to treatment of colon cancer. *Pharmacogenomics*, 20(17), 1225–1233. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0070>
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., & Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- Vychytilova-Faltejskova, P., Merhautova, J., Machackova, T., Gutierrez-Garcia, I., Garcia-Solano, J., Radova, L., Brchneilova, D., Slaba, K., Svoboda, M., & Halamkova, J. (2017). MiR-215-5p is a tumor suppressor in colorectal cancer targeting EGFR ligand epieregulin and its transcriptional inducer HOXB9. *Oncogenesis*, 6(11), 399.
- Vymetalkova, V., Pardini, B., Rosa, F., Di Gaetano, C., Novotny, J., Levy, M., Buchler, T., Slyskova, J., Vodickova, L., Naccarati, A., & Vodicka, P. (2014). Variations in mismatch repair genes and colorectal cancer risk and clinical outcome. *Mutagenesis*, 29(4). <https://doi.org/10.1093/mutage/geu014>
- Vymetalkova, V., Pardini, B., Rosa, F., Jiraskova, K., Di Gaetano, C., Bendova, P., Levy, M., Veskrnova, V., Buchler, T., Vodickova, L., Naccarati, A., & Vodicka, P. (2017). Polymorphisms in microRNA binding sites of mucin genes as predictors of clinical outcome in colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*, 38(1). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw114>
- Weidhaas, J. B., Babar, I., Nallur, S. M., Trang, P., Roush, S., Boehm, M., Gillespie, E., & Slack, F. J. (2007). MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Research*, 67(23), 11111–11116.
- Whiffin, N., Hosking, F. J., Farrington, S. M., Palles, C., Dobbins, S. E., Zgaga, L., Lloyd, A., Kinnersley, B., Gorman, M., Tenesa, A., Broderick, P., Wang, Y., Barclay, E., Hayward, C., Martin, L., Buchanan, D. D., Win, A. K., Hopper, J., Jenkins, M., ... Dunlop, M. G. (2014). Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Human Molecular Genetics*, 23(17), 4729–4737. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu177>
- Wilhelm, S. M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C. A., Schutz, G., Thierauch, K.-H., & Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International*

- Journal of Cancer*, 129(1), 245–255. <https://doi.org/10.1002/ijc.25864>
- Wu, Q.-B., Sheng, X., Zhang, N., Yang, M.-W., & Wang, F. (2018). Role of microRNAs in the resistance of colorectal cancer to chemoradiotherapy. *Molecular and Clinical Oncology*, 8(4), 523–527.
- Xi, Y., Shalgi, R., Fodstad, O., Pilpel, Y., & Ju, J. (2006). Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(7), 2014–2024.
- Xiao, Y., Yurievich, U. A., & Yosypovych, S. V. (2017). Long noncoding RNA XIST is a prognostic factor in colorectal cancer and inhibits 5-fluorouracil-induced cell cytotoxicity through promoting thymidylate synthase expression. *Oncotarget*, 8(47), 83171.
- Xiong, W., Jiang, Y.-X., Ai, Y.-Q., Liu, S., Wu, X.-R., Cui, J.-G., Qin, J.-Y., Liu, Y., Xia, Y.-X., & Ju, Y.-H. (2015). Microarray Analysis of Long Non-coding RNA Expression Profile Associated with 5-Fluorouracil-Based Chemoradiation Resistance in Colorectal Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(8), 3395–3402.
- Yang, L., Lin, C., Jin, C., Yang, J. C., Tanasa, B., Li, W., Merkurjev, D., Ohgi, K. A., Meng, D., & Zhang, J. (2013). lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature*, 500(7464), 598.
- Yokota, T., Ura, T., Shibata, N., Takahari, D., Shitara, K., Nomura, M., Kondo, C., Mizota, A., Utsunomiya, S., Muro, K., & Yatabe, Y. (2011). BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 104(5), 856–862. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.19>
- Yu, Y., Nangia-Makker, P., Farhana, L., Rajendra, S. G., Levi, E., & Majumdar, A. P. N. (2015). miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells. *Molecular Cancer*, 14(1), 98.
- Yu, Y., Sarkar, F. H., & Majumdar, A. P. N. (2013). Down-regulation of miR-21 induces differentiation of chemoresistant colon cancer cells and enhances susceptibility to therapeutic regimens. *Translational Oncology*, 6(2), 180.
- Yurgelun, M. B., Kulke, M. H., Fuchs, C. S., Allen, B. A., Uno, H., Hornick, J. L., Ukaegbu, C. I., Brais, L. K., McNamara, P. G., Mayer, R. J., Schrag, D., Meyerhardt, J. A., Ng, K., Kidd, J., Singh, N., Hartman, A.-R., Wenstrup, R. J., & Syngal, S. (2017). Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(10), 1086–1095. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0012>
- Zhao, B., Wang, L., Qiu, H., Zhang, M., Sun, L., Peng, P., Yu, Q., & Yuan, X. (2017). Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(3), 3980.

Příloha 1 – Soubor publikovaných prací in extenso