

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**

**1. lékařská fakulta**

**Diagnostické a prognostické markery v éře cílené léčby CRC**

**MUDr. Veronika Veškrňová**

Praha, 9.11.2020

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Libor Vítek, Ph.D.

Školící pracoviště: Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice, Vídeňská 800, Praha 4 – Krč, 14059, tel.: 261 082 531

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Konzultant (byl-li): -

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
2. Hypotézy a cíle práce.....	7
3. Vlastní výsledky – soubor publikovaných prací.....	7
Původní klinické práce zaměřené na cílenou léčbu kolorektálního karcinomu.....	8
Původní práce zaměřené na roli miRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a zejména jako prognostického a prediktivního markeru.....	10
Původní práce zaměřená na funkční polymorfismy genů opravujících chyby DNA ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu.....	12
Přehledový článek shrnující biochemické faktory ovlivňující efekt cytostatik ze skupiny fluoropyrimidinů v léčbě kolorektálního karcinomu.....	13
4. Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce.....	14
5. Použitá literatura.....	16
Seznam publikací doktoranda.....	18

## 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 vážících 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 opravující 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 (e.g. stage at the time of diagnosis, histological type of tumor), genetic (e.g. RAS, BRAF status), immunological (Immunoscore), and biochemical (e.g. CEA, CA 19-9, miRNA levels). 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 parameters, 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

## 1. Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) patří mezi hlavní příčiny úmrtí souvisejících s nádorovými onemocněními na celém světě (1). 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 (2).

Regulace zprostředkovaná miRNA má zásadní vliv na buněčnou integritu. Řídí základní biologické procesy, jako je apoptóza, buněčné proliferace, diferenciace, angiogeneze a invaze (3,4). V této souvislosti jsou miRNA rozsáhle studovány ve vztahu k nádorům a jejich specifické profily exprese byly spojené s různými typy malignit, včetně CRC (5–8).

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.

## 2. Hypotézy a 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 onemocněním.**

**3. Vyhodnotit význam polymorfismů v genech opravujících chyby DNA pro vznik a průběh CRC.**

## 3. 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

Původní klinické práce zaměřené na cílenou léčbu kolorektálního karcinomu

**1) 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 přidánými 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.

***2) 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 prvními liniemi EGFRi a druhé linie bevacizumabu a 309 pacientů léčených prvními liniemi 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

**1)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.

**2) 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, s227091, 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 vázajících 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.

**3) 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 významných 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. Zaměříme se také na různá proléčiva 5-FU vyvinutá za účelem zvýšení množství cirkulujících 5-FU a omezení toxicity. Nakonec navrhneme budoucí směry personalizované terapie CRC podle nejnovějších publikovaných důkazů.

#### 4. 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 (9).

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 (10).

## **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 (3).

V translační studii jsme publikovali první důkaz, že variace v potenciálních cílových místech vázajících 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 karcinomem kolon heterozygotní genotyp GT byla spojena s delším celkovým přežitím (11).

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 karcinomem rekta nesoucí genotyp CC rs4729655 v MUC17 vykazovali delší přežití než jedinci s běžným genotypem (12).

### **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 (13).

### **5. Použitá literatura**

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1).
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394–424.
3. Kral J, Korenkova V, Novosadova V, Langerova L, Schneiderova M, Liska V, et al. Expression profile of miR-17/92 cluster is predictive of treatment response in rectal cancer. *Carcinogenesis.* 2018 Dec;39(11):1359–67.
4. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012 Mar;148(6):1172–87.
5. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jun;15(6):321–33.



6. Davis-Dusenbery BN, Hata A. MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes Cancer*. 2010 Nov;1(11):1100–14.
7. Bonfrate L, Altomare DF, Di Lena M, Travaglio E, Rotelli MT, De Luca A, et al. MicroRNA in Colorectal Cancer: New Perspectives for Diagnosis, Prognosis and Treatment. *J Gastrointest Liver Dis*. 2013;22(3):311–20.
8. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009 Nov;8:102.
9. Buchler T, Chloupkova R, Poprach A, Fiala O, Kiss I, Kopeckova K, et al. Sequential therapy with bevacizumab and EGFR inhibitors for metastatic colorectal carcinoma: a national registry-based analysis. *Cancer Manag Res*. 2019;11:359–68.
10. Fiala O, Veskrnova V, Chloupkova R, Poprach A, Kiss I, Kopeckova K, et al. 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 Oct;
11. Schneiderova M, Naccarati A, Pardini B, Rosa F, Gaetano CD, Jiraskova K, et al. MicroRNA-binding site polymorphisms in genes involved in colorectal cancer etiopathogenesis and their impact on disease prognosis. *Mutagenesis*. 2017;32(5).
12. Vymetalkova V, Pardini B, Rosa F, Jiraskova K, Di Gaetano C, Bendova P, et al. Polymorphisms in microRNA binding sites of mucin genes as predictors of clinical outcome in colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*. 2017;38(1).
13. Jiraskova K, Hughes DJ, Brezina S, Gumpenberger T, Veskrnova V, Buchler T, et al. Functional Polymorphisms in DNA Repair Genes Are Associated with Sporadic Colorectal Cancer Susceptibility and Clinical Outcome. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec;20(1).

## Seznam publikací doktoranda

### 1. publikace, které jsou podkladem disertace, *publikace in extenso v příloze autoreferátu*

#### a) s impact factorem

##### A. Původní klinické práce zaměřené na cílenou léčbu kolorektálního karcinomu

1) 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

2) 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

##### B. Původní práce zaměřené na roli miRNA v patogenezi kolorektálního karcinomu a zejména jako prognostického a prediktivního markeru

1) 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

2) 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

**3)** 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

### **C. 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

### **D. 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

### **2. publikace bez vztahu k tématu disertace, publikace in extenso v příloze autoreferátu**

a) s impact factorem

Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, Pavlik T, Veskrnova V, Honzirkova M, Zemanova M, Fiala O, Kubackova K, Slaby O, Svoboda M, Vyzula R, Dusek L, Melichar B; Czech Renal Cancer Cooperative Group. Outcomes for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Achieving a Complete Response on Targeted Therapy: A Registry-based Analysis. *Eur Urol*. 2016 Sep;70(3):469-

75. doi: 10.1016/j.eururo.2015.12.031. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26746623.  
**IF 18.728**

b) bez impact factoru

*Dvořák J, Žitňanská L, Donátová Z, Richter I, Veškrňová V, Böhler T, Abrahámová J. Trifluridin/tipiracil v léčbě pacientů s refrakterním metastatickým kolorektálním karcinomem – první klinické zkušenosti. Onkologie. 2017, 11(2), 88-91. ISSN 18024475. doi:10.36290/xon.2017.018*