

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Onkologická a radioterapeutická klinika LF UK a FN Plzeň

**Prognostické a prediktivní faktory u pacientů s metastatickým
kolorektálním karcinomem léčených cílenou léčbou**

Doktorská dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Fiala, Ph.D.

Plzeň, 2021

MUDr. Ondřej Šorejs

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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 Plzni, 13.04.2021

MUDr. Ondřej Šorejs

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Ondřeji Fialovi, Ph.D. za pečlivé a odborné vedení, cenné rady, pomoc a čas v průběhu celého postgraduálního studia. Velké díky patří Ing. Petru Hoškovi, Ph.D. za statistické zpracování dat a Mgr. Pavlu Pitulemu, Ph.D. za zpracování biologického materiálu a spolupráci po celou dobu řešení jednotlivých projektů. Na závěr děkuji své rodině za trpělivost a podporu.

Tato práce byla podpořena Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaným MŠMT ČR; projektem „Centrum klinické a experimentální jaterní chirurgie, UNCE/MED/006“ poskytovaným MŠMT ČR a programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39).

Abstrakt

Úvod: V posledních letech bylo dosaženo významného pokroku v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu (mCRC) díky nástupu cílené léčby. Bevacizumab je monoklonální protilátka (mAb) proti vaskulárnímu endotelovému růstovému faktoru (VEGF) a cetuximab a panitumumab jsou monoklonální protilátky proti receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). MicroRNA (miR) jsou jednovláknové řetězce nekódující RNA o délce 18-25 nukleotidů, které se podílejí na regulaci genové exprese a tím významně ovlivňují biologické chování nádorových buněk. Dysregulace na úrovni miR jsou považovány za slibné kandidáty na prognostické a prediktivní biomarkery.

Cíle: Cílem práce rozdělené na dvě části bylo zhodnocení asociace dysregulací vybraných miR v nádoru s efektem cílené léčby u pacientů s mCRC.

Metody: Do první studie bylo zařazeno 63 pacientů s mCRC léčených chemoterapií a bevacizumabem. Do druhé studie bylo zařazeno 46 pacientů s mCRC léčených kombinací chemoterapie s cetuximabem nebo panitumumabem. Hodnocení léčebného efektu zahrnovalo: přežití bez progresu (PFS), celkové přežití (OS), míru dosažení objektivní léčebné odpovědi (ORR) a míru dosažení kontroly onemocnění (DCR). K analýze byly využity vzorky zamražené nádorové a přilehlé nenádorové tkáně získané během operace primárního nádoru. Stanovení miR bylo provedeno pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).

Výsledky: V první studii jsme zaznamenali down-regulaci miR-126-3p ($p < 0,0001$), miR-126-5p ($p < 0,0001$) a miR-664-3p ($p = 0,0132$) v nádorové tkáni. PFS i OS byly signifikantně kratší u pacientů s down-regulací miR-126-3p v nádoru ($p = 0,0064$ a $p = 0,0027$) při léčbě bevacizumabem. Ve druhé studii jsme v nádorové tkáni zaznamenali down-regulaci miR125b ($p = 0,023$) a let-7c ($p = 0,004$) a up-regulaci miR17 ($p < 0,001$). Zaznamenali jsme signifikantně nižší ORR a DCR u pacientů s down-regulací miR-125b v nádoru ($p = 0,0005$ a $p = 0,0383$), po optimalizaci prahu stratifikace byla zjištěna asociace s kratším PFS a OS ($p = 0,055$ a $p = 0,006$) při léčbě anti-EGFR cílenou terapií. Dále zde byla zjištěna signifikantní asociace down-regulace let-7c s nižší DCR ($p = 0,0255$).

Závěr: Down-regulace miR-126-3p v nádorové tkáni pacientů s mCRC koreluje s nepříznivým efektem léčby kombinací chemoterapie s bevacizumabem. Down-regulace miR-125b a let-7c v nádorové tkáni u pacientů s wtRAS mCRC koreluje s nepříznivou odpovědí na kombinaci chemoterapie a anti-EGFR cílené léčby. Tyto miR představují potenciální prediktivní biomarkery pro cílenou léčbu mCRC, jejichž význam by měl být dále zkoumán.

Abstract

Introduction: In recent years, significant progress has been made in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) due to the use of targeted therapy. Bevacizumab is a monoclonal antibody (mAb) against vascular endothelial growth factor (VEGF) and cetuximab and panitumumab are monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor (EGFR). MicroRNAs (miRs) are single-stranded non-coding RNA chains of 18-25 nucleotides in length that are involved in the regulation of gene expression and thus significantly influence the biological behaviour of cancer cells. Dysregulations at the miR level are considered promising candidates for prognostic and predictive biomarkers.

Aims: The aim of this work, divided into two parts, was to evaluate the association of dysregulation of selected miRs with the effect of targeted therapy in patients with mCRC.

Methods: The first study included 63 mCRC patients treated with chemotherapy and bevacizumab. The second study included 46 mCRC patients treated with chemotherapy and cetuximab or panitumumab. Assessment of treatment effect included progression-free survival (PFS), overall survival (OS), objective response rate (ORR) and disease control rate (DCR). Samples of frozen tumor and adjacent non-tumor tissue obtained during primary tumor surgery were used for analysis. The relative expression of microRNAs was measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Results: In the first study, we observed down-regulation of miR-126-3p ($p < 0.0001$), miR-126-5p ($p < 0.0001$) and miR-664-3p ($p = 0.0132$) in tumor tissue. PFS and OS were significantly shorter in patients with down-regulation of miR-126-3p in tumor ($p = 0.0064$ and $p = 0.0027$) when treated with bevacizumab. In the second study, we observed down-regulation of miR125b ($p = 0.023$) and let-7c ($p = 0.004$) and up-regulation of miR17 ($p < 0.001$) in tumor tissue. We observed significantly lower ORR and DCR in patients with down-regulation of miR-125b in the tumor ($p = 0.0005$ and $p = 0.0383$), and after optimizing the stratification threshold, there was an association with shorter PFS and OS ($p = 0.055$ and $p = 0.006$) when treated with anti-EGFR targeted therapy. Furthermore, there was a significant association of down-regulation of let-7c with lower DCR ($p = 0.0255$).

Conclusions: Down-regulation of miR-126-3p in the tumor is associated with poor outcome of mCRC patients treated with chemotherapy and bevacizumab. Down-regulation of miR-125b and let-7c in the tumor is associated with poor outcome of wtRAS mCRC patients treated with chemotherapy and anti-EGFR targeted therapy. These miRs represent potential predictive biomarkers for targeted therapy of mCRC and their role should be further investigated.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	9
Úvod.....	14
1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu.....	15
2 Etiologie a rizikové faktory.....	17
2.1 Endogenní rizikové faktory.....	17
2.1.1 Genetické faktory.....	17
2.1.2 Věk.....	18
2.1.3 Pohlaví.....	19
2.2 Exogenní rizikové faktory.....	19
3 Patogeneze.....	21
3.1 Model vzniku z konvenčních lézí (cesta chromozomální instability, CIN).....	21
3.2 Model vzniku ze serátních lézí („ <i>serrated pathway</i> “ neboli „ <i>microsatellite instability pathway</i> “, MIN/MSI).....	22
3.3 Model vzniku ze zánětlivých lézí (dysplastické nepolypózní změny).....	24
4 Diagnostika.....	25
5 Staging.....	26
6 Screening.....	29
7 Prognostické a prediktivní faktory.....	31
7.1 Vybrané prognostické a prediktivní faktory u CRC.....	32
7.1.1 Rozsah onemocnění (staging).....	32
7.1.2 Věk a celkový stav pacienta.....	32
7.1.3 Klinická symptomatika.....	34
7.1.4 Histomorfologický obraz a grading.....	34
7.1.5 Cévní a perineurální invaze.....	34
7.1.6 Sérové onkomarkery.....	35
7.1.7 Molekulárně-genetické faktory.....	35
7.1.8 Lokalizace primárního nádoru.....	37
8 Lokální léčebné metody.....	38
8.1 Endoskopická léčba.....	38
8.2 Chirurgická léčba.....	38
8.3 Radioterapie.....	39

9	Systémová onkologická léčba rozdělená dle léčebného záměru	41
9.1	Adjuvantní systémová léčba	41
9.2	Paliativní systémová léčba	47
9.2.1	Paliativní chemoterapie	47
9.3	Cílená léčba	49
9.3.1	Cílená léčba zaměřená na blokádu angiogeneze	49
9.3.1.1	Nádorová angiogeneze	49
9.3.1.2	Signální dráha VEGF	50
9.3.1.3	Léčebné strategie blokády signální dráhy VEGF	51
9.3.1.4	Antiangiogenní léčba mCRC	52
9.3.2	Cílená léčba zaměřená na blokádu EGFR signální dráhy	57
9.3.2.1	Signální dráha EGFR	57
9.3.2.2	Léčebné strategie blokády signální dráhy EGFR	57
9.3.2.3	Anti-EGFR terapie v léčbě mCRC	58
9.3.3	Cílená léčba zaměřená na blokádu BRAF	63
9.3.3.1	BRAF signalizace a mutace BRAF u CRC	63
9.3.3.2	BRAF inhibitory v léčbě mCRC	64
9.3.4	Cílená léčba zaměřená na blokádu HER2/neu	65
9.3.4.1	HER2/neu receptor a HER2/neu overexprese/amplifikace u CRC	65
9.3.4.2	HER2/neu blokáda v léčbě mCRC	66
9.3.5	Imunoterapie	67
9.3.5.1	Protinádorová imunita a moderní imunoterapie	67
9.3.5.2	Léčba ICI u mCRC	69
10	Prediktivní faktory pro cílenou léčbu mCRC	72
10.1	Molekulárně-genetické prediktivní faktory pro anti-EGFR terapii	73
10.1.1	Mutace RAS	73
10.1.2	Mutace BRAF	75
10.1.3	Mutace PI3K	76
10.1.4	HER2/neu exprese a amplifikace	77
10.1.5	Exprese EGFR	77
10.2	Klinické prediktivní faktory	78
10.2.1	Kožní exantém jako prediktivní faktor pro anti-EGFR terapii	78

10.2.2	Lokalizace primárního nádoru jako prediktivní faktor pro cílenou léčbu	79
11	MicroRNA	82
11.1	Vznik a funkce miR v organismu	82
11.2	MiR a kancerogeneze	84
11.3	MiR jako diagnostický biomarker	85
11.4	Prognostický a prediktivní význam miR	86
12	Cíle	88
13	Význam dysregulací miR-126 a miR-664 v nádoru u pacientů s mCRC léčených bevacizumabem	89
13.1	Metodické postupy	89
13.2	Výsledky	91
13.2.1	Expresse miR v nádorové tkáni	91
13.2.2	Vztah mezi hladinami exprese miR a efektem léčby	94
14	Význam dysregulací miR-125b, let-7c, miR-99a, miR-17, miR-143 a miR-145 v nádoru u pacientů s mCRC léčených anti-EGFR protilátkami	101
14.1	Metodické postupy	101
14.2	Výsledky	104
14.2.1	Expresse miR v nádorové tkáni	104
14.2.2	Vztah mezi hladinami exprese miR a efektem léčby	105
15	Diskuze	108
16	Závěr	113
17	Souhrn výsledků	114
	SEZNAM LITERATURY	116
	SEZNAM OBRÁZKŮ	140
	SEZNAM TABULEK	143
	PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA	144

SEZNAM ZKRATEK

5-FU - 5-fluorouracil

AAPC - attenuated APC, gen pro mírnější formu adenomatózní polypózy tlustého střeva

AFP- Alfa-fetoprotein

AKT (PKB) - proteinkinasis B, proteinkináza B

APC - adenomatous polyposis coli, familiární adenomatózní polypóza

BRAF - v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, homolog virového onkogenu v-Raf

BSC - best supportive care, nejlepší podpůrná léčba

CA 19-9 - cancer antigen 19-9, nádorový antigen CA 19-9

CEA - Carcinoembryonic Antigen, karcinoembryonální antigen

CIMP - CpG island methylator phenotype, CpG island methylátorův fenotyp

CIN - chromosomal instability, chromozomální nestabilita

CLL- chronic lymphocytic leukemia, chronická lymfocytární leukémie

CMS - Consensus Molecular Subtype, molekulární sybtypy CRC

CR - complete regression, kompletní regrese

CRC - colorectal cancer, kolorektální karcinom

CRM - circumferencial resection margin, radiální resekční okraj

CT - computed tomography, počítačová tomografie

CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, antigen 4 cytotoxického T lymfocytu

ČR - Česká republika

DCR - disease control rate, kontrola onemocnění

DFS - disease-free survival, přežití bez nemoci

DGCR8 (Pasha) - DiGeorge critical region 8, DiGeorge kritická oblast 8

dMMR - defektní mismatch repair systém

DNA - Deoxyribonucleic Acid, deoxyribonukleová kyselina

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group

EGF - Epidermal Growth Factor, epidermální růstový faktor

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor, receptor pro epidermální růstový faktor

EMR - endoscopic mucosal resection, endoskopická mukozální resekce

ErbB - Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog

ErbB1 - avian erythroblastosis oncogene B1

ERK - extracellular signal-regulated kinase, kináza regulovaná extracelulárním signálem

ESMO - European Society for Medical Oncology

FAP - familial adenomatous polyposis, familiární adenomatózní polypóza

FGFR - fibroblast growth factor receptor, receptor pro růstový faktor fibroblastů

FISH - Fluorescence in situ Hybridization, fluorescenční in situ hybridizace

FOLFIRI 5 - fluorouracil + leukovorin + irinotekan

FOLFOX 5 - fluorouracil + leukovorin + oxaliplatin

G1-4 - grading, stupeň diferenciac

GIT - gastrointestinální trakt

GTP - guanosine triphosphate, guanosintrifosfát

Gy – Grey

HER1-4 - human epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor

HNPCC - hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

HRAS - Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, homolog virového onkogenu

CHT – chemoterapie

IFL - irinotekan, 5-fluorouracil, leukovorin

IgG - imunoglobulin G

IHC – imunohistochemie

IL-10 - interleukin - 10, cytokin interleukin 10

JPS - juvenile polyposis, juvenilní polypóza

KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, homolog virového onkogenu odvozeného od Kirstenova krysího sarkomu

MAP - MYH Associated Polyposis, MYH asociovaná polypóza

MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase, proteinová kináza aktivovaná mitogeny

mBRAF - mutace onkogenu BRAF

mCRC - metastatic colorectal cancer, metastatický kolorektální karcinom

MEK - mitogen activated protein kinase

MHC - major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

MIN - microsatellite instability pathway

miRNA, miR – mikroRNA

mKRAS - mutace onkogenu KRAS

MLH1 - MutL homolog 1

MMR - mismatch repair systém, systém oprav chybného párování bazí

mNRAS - mutace NRAS

mOS - median overall survival, medián celkového přežití

mPFS - median progression-free survival, medián času bez progresu onemocnění

MR - magnetická rezonance

mRAS - mutace onkogenů RAS (KRAS a NRAS)

mRNA - messenger RNA, messengerová RNA

MSH2 - MutS protein homolog 2

MSH6 - MutS protein homolog 6

MSI - microsatellite instability, mikrosatelitová instabilita

MSI-H - high microsatellite instability, vysoká míra mikrosatelitové instability

MSI-L - low microsatellite instability, nízká míra mikrosatelitové instability

MSS - microsatellite stability, mikrosatelitová stabilita

mTOR - mammalian target of rapamycin

NGS - next generation sequencing, sekvenování nové generace

NK - natural killer, buňka "přirozený zabiják"

NRAS - neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, homolog virového onkogenu v-ras

ORR - overall response rate, celková četnost léčebných odpovědí

OS - overall survival, celkové přežití

PCR - polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PD - L1, L2 - programmed death ligand 1,2, ligand proteinu programované smrti 1,2

PD - Progressive Disease, progredující onemocnění

PD-1 - programmed death 1, protein programované smrti

PET - Positron Emission Tomography, pozitronová emisní tomografie

PFS - progression-free survival, přežití bez progresu

PI3K - Phosphatidylinositol 3-kinase, fosfatidylinositol 3-kináza

PI3KCA - Phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic Subunit-alpha, alfa katalytická podjednotka fosfatidylinositol 3-kinázy

PIGF - placental growth factor, růstový faktor placenty

PIK3CA - phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PJS - Peutz-Jeghersův syndrom

PMS2 - mismatch repair endonukleáza PMS2

PR - partial regression, paciální regrese, remise

pre-miRNA - precursor microRNA, prekurzorová mikroRNA

pri-miRNA primary microRNA , primární mikroRNA

PS - performance status, stav výkonnosti

PTEN - Phosphatase and Tensin homolog, fosfatázový a tenzinový homolog

RAS - rat sarcoma viral oncogene homolog

RECIST - Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RFS - relaps-free survival, přežití bez relapsu onemocnění

RISC - RNA induced silencing complex, RNA indukovaný komplex

RTG – rentgen

SD - stable disease, stabilizace onemocnění

TGF-β - transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta

TKI - tyrosine kinase inhibitor, tyrosinkinázový inhibitor

TME - total mesorectal excision, totální mezorektální excize

TNF β - Tumor Necrosis Factor beta, tumor nekrotizující faktor beta

TNM - mezinárodní klasifikace pro staging zhoubných nádorových onemocnění

TOKS - test okultního krvácení ve stolici

TP53 - gen pro nádorový supresor p53

TRUS - transrectal ultrasonography, transrektální ultrasonografie

TTP - time to progression, čas do progresu onemocnění

USG - ultrasonography, ultrasonografie

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor, vaskulární endotelový růstový faktor

VEGFR - Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor

WHO - World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

wtBRAF - nemutovaný (wild-type) typ onkogenu BRAF

wtKRAS - nemutovaný (wild-type) typ onkogenu KRAS

wtRAS - nemutovaný (wild-type) typ onkogenů RAS (KRAS a NRAS)

Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově mezi nejčastější zhoubné nádory a Česká republika se dlouhodobě nachází mezi státy s nejvyšší incidencí tohoto onemocnění. Efektivní screening vede k vyššímu zachytu časných stadií CRC a tím ke zlepšení prognózy pacientů. Na druhou stranu, stále se setkáváme s velkým množstvím pacientů s metastatickým CRC (mCRC). Asi 20 % pacientů je iniciálně diagnostikováno ve stadiu mCRC a navíc až u 50 % nemocných s iniciálně lokalizovaným onemocněním dochází k relapsu a rozvoji metachronního metastatického rozsevu. V posledních letech bylo dosaženo významného prodloužení přežití pacientů s mCRC, které je dáno rozvojem systémové onkologické léčby, která představuje hlavní léčebnou modalitu u mCRC. Tohoto pokroku bylo umožněno díky překotnému vývoji na poli molekulární biologie, který vedl k porozumění klíčovým patofyziologickým mechanismům, které charakterizují vznik a biologické chování zhoubných nádorů. Tyto poznatky pak umožnily rozvoj zejména cílené léčby, jejíž nástup je nepochybně spojen s prodloužením přežití i zlepšením kvality života pacientů s mCRC.

Současným trendem v moderní onkologii je snaha o individualizaci léčby zejména na základě molekulárně-genetické charakterizace nádoru. Tento princip výběru léčby, založený na identifikaci prediktivních biomarkerů, je základem konceptu personalizované onkologické léčby. V současné době máme k dispozici různé molekulárně-genetické biomarkery, které se v praxi úspěšně etablovaly. Přesto se však nedaří plně identifikovat pacienty, kteří na zvolenou léčbu neodpovídají a u některých modalit cílené léčby dokonce stále nemáme žádné relevantní prediktivní biomarkery. Z tohoto důvodu představuje hledání prognostických a prediktivních biomarkerů pro systémovou léčbu mCRC významnou oblast aplikovaného výzkumu v onkologii. Jedním z přístupů molekulární charakterizace nádorů je analýza microRNA (miR). Jedná se o krátké nekódující RNA, které plní významnou funkci v regulaci biologických procesů v buňce. Dosavadní poznatky ukazují, že by miR mohly v budoucnu představovat efektivní prediktivní biomarkery, avšak úroveň poznání v této oblasti je limitovaná a intenzivní výzkum zde nadále probíhá.

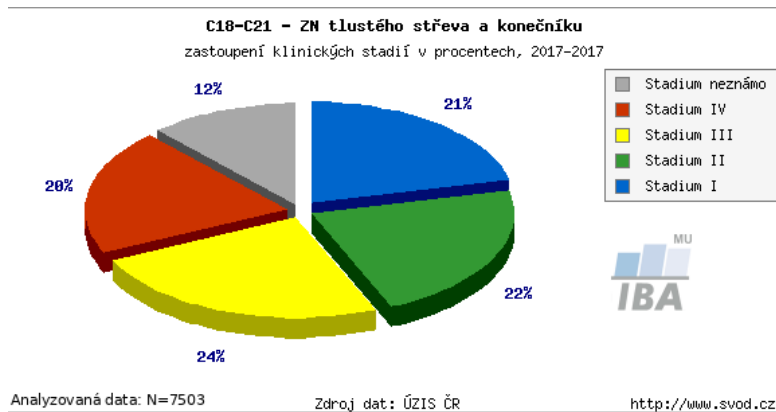
Předkládaná dizertační práce je zaměřená na hledání potenciálních prognostických a prediktivních biomarkerů v oblasti miR u pacientů s mCRC. Práce zahrnuje teoretický přehled problematiky CRC včetně epidemiologie, diagnostiky, léčby, užívaných biomarkerů, i vybraných aspektů nádorové biologie a molekulární genetiky. Výzkumná část je složena ze dvou částí, jejichž cílem bylo zhodnocení významu dysregulací vybraných miR v nádorové tkáni u pacientů s mCRC léčených různými modalitami cílené léčby.

1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu

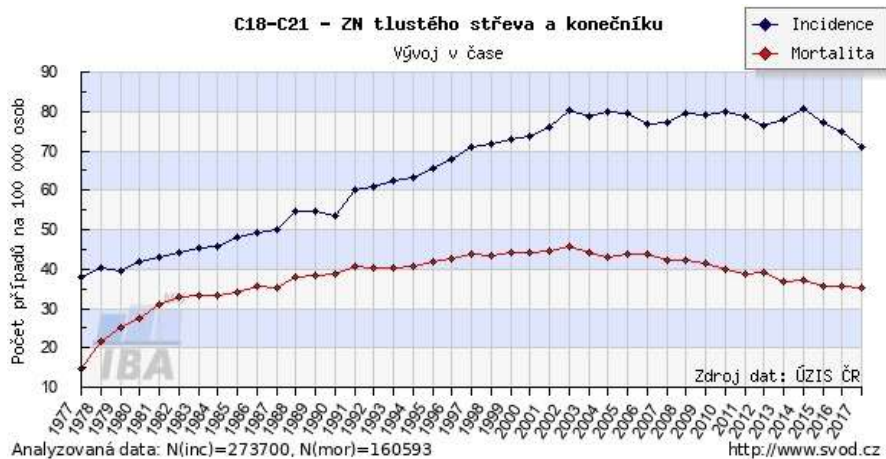
Kolorektální karcinom je jedním z nejčastějších zhoubných nádorových onemocnění. Jedná se tedy o závažný zdravotní problém s celosvětově vysokou incidencí i mortalitou [1]. Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) rozděluje CRC na základě anatomické lokalizace na karcinomy tlustého střeva (**C18**), které se dále dělí na karcinomy céka (C18.0), colon ascendens (C18.2), flexura hepatica (C18.3), colon transversum (C18.4), flexura lienalis (C18.5), colon descendens (C18.6), colon sigmoideum (C18.7) a dále na karcinomy rektosigmoideální spojení (**C19**) a karcinomy rekta (**C20**) [2]. Z histopatologického hlediska se jedná o adenokarcinomy vznikající maligní transformací žláznatých buněk střevní sliznice. Celosvětově je CRC každým rokem nově diagnostikován u více než 1 300 000 pacientů a jedná se tedy o 3. nejčastější zhoubný nádor. Celkově tvoří cca 9,7 % všech malignit vyjma nádorů kožních [1]. Vrchol incidence CRC se pohybuje kolem 75. roku věku. Celosvětově téměř 700 000 nemocných v důsledku CRC každým rokem umírá (8,5 % všech úmrtí na malignity, 4. nejčastější příčina úmrtí na malignity) [1]. V letech 2012 až 2016 bylo každý rok v České republice (ČR) průměrně diagnostikováno téměř 8000 nových případů a prevalence, tedy počet žijících osob s CRC, v roce 2016 stoupla o 38,6 % v porovnání s rokem 2006 [3]. Závažnou skutečností je dlouhodobě nepříznivý poměr pokročilých stádií onemocnění u nově diagnostikovaných pacientů. V ČR je v posledních letech u 25 % pacientů CRC diagnostikován v klinickém stadiu III a u 20 % ve stadiu IV (**obrázek 1**) [3]. V průběhu léčby či dispenzarizace se ovšem až u 50 % nemocných s iniciálně lokalizovaným onemocněním vyskytnou metachronní metastázy [3]. Vzdálené metastázy predilekčně postihují játra a zde jsou nálezy až u 90 % případů iniciálně neresekabilní [4]. Druhou nejčastější orgánovou lokalizací jsou plíce, kde se metastázy vyskytují až ve 20 % případů [3]. V dostupné literatuře se i ve zbytku světa četnost metastatického onemocnění v době stanovení diagnózy pohybuje kolem 25 % případů [1]. Tento fakt významně limituje prognózu pacientů a dosažitelné léčebné výsledky. Bohužel ani dostupná data z posledních let nenaznačují výraznou změnu tohoto nepříznivého trendu.

Mortalita na CRC v letech 2012 až 2017 v ČR činila přibližně 36,2 na 100 000 obyvatel. Tedy na toto onemocnění ročně zemřelo v průměru 3 500 pacientů. ČR se dle údajů Global Cancer Observatory pro rok 2018 nachází na dvacáté příčce v Evropě a na dvaadvacáté ve světě v úmrtnosti na CRC [5].

V posledních letech se v ČR setkáváme s relativně příznivým trendem v podobě poklesu mortality na CRC, na kterém se nepochybně podílí celoplošný screeningový program a rovněž zlepšování léčebných výsledků v oblasti chirurgické, ale i systémové onkologické léčby. Vývoj incidence a mortality u CRC ilustrují grafy na **obrázku 2**.



Obrázek 1 - Zastoupení klinických stadií kolorektálního karcinomu v ČR
Převzato a upraveno podle: DUŠEK L., et al., 2020 [3]



Obrázek 2 - Vývoj incidence a mortality kolorektálního karcinomu v ČR
Převzato a upraveno podle: DUŠEK L., et al., 2020 [3]

2 Etiologie a rizikové faktory

Identifikovat jasnou příčinu vzniku CRC u konkrétního pacienta je značně obtížné a u většiny případů nemožné, neboť se jedná o multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se může podílet celá řada faktorů. Tyto rizikové faktory je možné obecně rozdělit na endogenní a exogenní.

2.1 Endogenní rizikové faktory

Endogenní rizikové faktory nelze ovlivnit. Patří sem faktory genetické, věk, pohlaví a některá chronická predisponující onemocnění.

2.1.1 Genetické faktory

Byla identifikována řada hereditárních genetických syndromů, které jsou významně asociovány se zvýšeným rizikem vzniku CRC, v některých případech i v časném věku. Některé genetické syndromy mohou být spojeny s větším či menším rizikem rozvoje CRC.

- **Familiární adenomatózní polypóza (FAP)**

Molekulárním podkladem je zárodečná mutace v genu APC, díky čemuž dochází ke vzniku velkého množství polypů, na jejichž podkladě se může rozvinout CRC většinou již ve velmi časném věku. FAP je zodpovědná za cca 1 % všech CRC. Pokud není FAP včas diagnostikována a léčena v podobě preventivního chirurgického výkonu, vede až ve 100 % případů ke vzniku CRC do věku 40 let. Incidence se odhaduje zhruba na 1/10 000 [6, 7]. Mírnější formu představuje tzv. AAPC (attenuated APC) s mutacemi především v prvních čtyřech exonech genu APC. Množství polypů při ní není tak výrazné (méně než 100) a karcinom se zpravidla vyvíjí až po 30. roce věku.

- **Lynchův syndrom**

Hereditární nepolypózní karcinom (HNPCC), tzv. Lynchův syndrom je dědičné onemocnění při kterém dochází k časnému rozvoji CRC, endometriálního karcinomu a dalších malignit. Molekulárním podkladem jsou zárodečné mutace nejčastěji dvou hlavních tzv. mismatch repair (MMR) genů (MSH2, MLH1) kódujících DNA reparační enzymy. Na podkladě Lynchova syndromu vzniká zhruba 1–3 % CRC. Celosvětově se prevalence Lynchova syndromu v populaci udává přibližně 1/300 -1/500 [8, 9].

- **Peutz-Jeghersův syndrom**

Peutz-Jeghersův syndrom (PJS) se řadí mezi familiární gastrointestinální polypózy. Nejčastěji jej způsobuje mutace v genu pro serin/threoninovou kinázu STK11 na krátkém raménku 19. chromozomu. Je charakterizován výskytem kožních a slizničních hyperpigmentací a dále také vývojem gastrointestinálních polypů. Polypy se vyskytují v tenkém i tlustém střevě, duodenu a žaludku. Mohou mít charakter hamartomů, adenomů nebo hyperplastických polypů. Proto může být toto onemocnění zaměněno za FAP. Kumulativní riziko nádorů GIT je 66 % (tenké střevo, tlusté střevo, jícn). Incidence je 1/ 300 000 až 1/ 25 000 [10].

- **Gardnerův syndrom**

Gardnerův syndrom je familiární adenomatózní polypóza tlustého střeva s extrakolickými projevy (osteomy a fibromatóza). Onemocnění je způsobeno mutací APC genu lokalizovaného na dlouhém raménku 5. chromozomu (5q 21-22) a je charakterizováno vznikem mnoha adenomů ve sliznici tlustého střeva (bývá jich více než 100). Adenomy se objevují kolem 25. roku života a v průběhu dalších 10-15 let se téměř ve 100 % na jejich podkladě vyvíjí karcinom. Incidence je odhadována na 1/ 8 300 až 1/ 14 025 [11].

- **MYH polypóza**

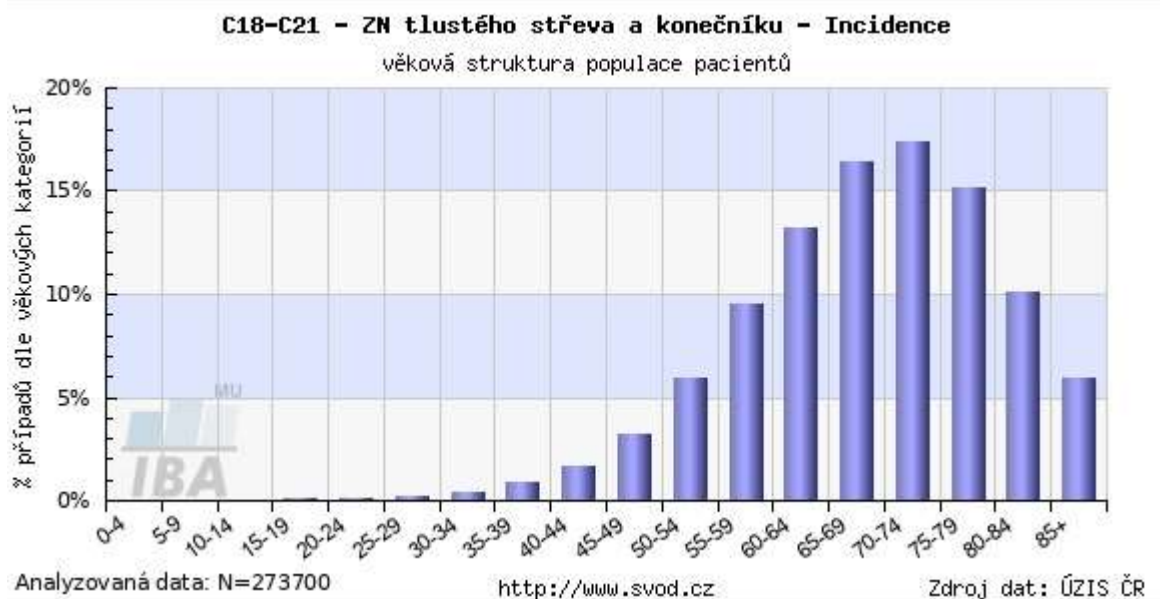
MAP (MYH Associated Polyposis) je adenomatózní polypóza tlustého střeva, která je způsobena germinálními mutacemi obou alel MYH genu. Tento gen patří mezi tzv. mutátorové geny („base-excision repair“ gen). Klinický obraz je obdobný jako u atenuované nebo méně často u klasické formy FAP [12].

- **Juvenilní polypóza (JPS)**

Jedná se o hamartomatózní syndrom, který je charakterizován stopkatými polypy s obsahem primitivní („juvenilní“) vazivové tkáně. Tyto polypy bývají solitární a jejich nejčastější lokalizací je rektosigma, vzácněji tenké střevo či žaludek [13]. Pacienti s JPS mají zvýšené riziko vzniku nádorů GIT a pankreatu, kdy kumulativní riziko vzniku nádoru se odhaduje na 68 % do 60. roku života [14]. U přibližně 60 % pacientů s JPS je příčinou vzniku zárodečná mutace v genech SMAD4 a BMPR1A. Incidence JPS se odhaduje na 1/100 000 [13].

2.1.2 Věk

Křivka incidence dokládá prudší nárůst CRC ve věkové kategorii nad padesát let, proto je věk nejvýznamnějším neovlivnitelným rizikovým faktorem. Pouhých 19 % všech nemocných je mladších 60 let (**obrázek 3**).



Obrázek 3 - Věková struktura pacientů s kolorektálním karcinomem v ČR
Převzato a upraveno podle: DUŠEK L., et al., 2020 [3]

2.1.3 Pohlaví

Není zcela jasné, do jaké míry a zda vůbec hraje roli vlastní pohlaví a jaké je jeho sdružení s dalšími rizikovými faktory jako jsou např. životní styl (kouření, obezita, konzumace alkoholu apod.) [15].

Chronická idiopatická zánětlivá onemocnění jako je ulcerózní kolitida a Crohnova choroba (viz kapitola 3.3) [16-18].

2.2 Exogenní rizikové faktory

Exogenní rizikové faktory většinou souvisí s nezdravou životosprávou a do jisté míry je možné je ovlivnit. Exogenní rizikové faktory vzniku CRC byly předmětem mnoha experimentálních i klinických studií, jejichž výsledky však nejsou zcela jednotné. Patří sem **dietetické faktory, nedostatek některých vitaminů, obezita, kouření, nízká fyzická aktivita, diabetes mellitus, respektive metabolický syndrom**. Ze stravovacích návyků sem patří vyšší podíl živočišných tuků ve stravě, nedostatek vitaminů A, C, E a selenu ve stravě, některé úpravy potravin jako je smažení, grilování, pečení či uzení, nedostatek vlákniny a vápníku v stravě, nadměrná konzumace alkoholu (zejména destiláty a pivo) a červeného masa [15, 19]. Několik studií prokázalo kauzální roli mezi konzumací alkoholu a výskytem CRC. Metaanalýza prospektivních studií prokázala mírnou korelaci mezi užíváním alkoholu (> 50 g/den) a mortalitou na CRC [20]. Tato asociace byla výraznější u asijské populace než u bělošské rasy a to pravděpodobně v důsledku genetických faktorů (rozdílnost v metabolismu

alkoholu), dietních faktorů a tělesné konstituce [21]. Prospektivní studie u pacientů s defektem v MMR genech odhalila korelaci mezi konzumací alkoholu (> 28 g/den nebo 2 nápoje denně) a vyšším rizikem vzniku CRC [22].

Podle posledních studií pacienti s metabolickým syndromem, diabetem II. typu a dyslipidemií mají větší riziko vzniku CRC [23]. Obézní nemocní mají často inzulinovou rezistenci, která stimuluje sekreci inzulinu a některých růstových faktorů a následná hyperinzulinemie spolu s prozánětlivým stavem pak obecně zvyšuje riziko vzniku zhoubných nádorů, včetně CRC [18, 24]. Epidemiologické studie naznačují protektivní význam vitamínu D pro riziko rozvoje CRC. Ukázalo se, že jak volný, tak celkový 25-hydroxyvitamin D jsou inverzně asociované s rizikem vzniku CRC [25]. Zvýšení cirkulující hladiny vitamínu D o 10 ng bylo spojeno s 26 % sníženým rizikem vzniku CRC. Jako doporučované stravovací návyky jsou tedy takové, které maximálně eliminují výše uvedené rizikové faktory.

3 Patogeneze

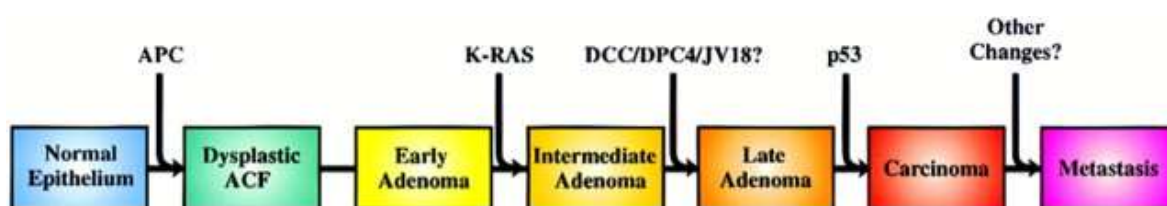
V minulosti bylo popsáno několik modelů vzniku a vývoje CRC. Detailní histologická a molekulárně-genetická charakterizace jednotlivých vývojových stadií vedla k pochopení mechanismů kancerogeneze tohoto onemocnění. Současné poznatky o molekulární biologii a genetice dokazují, že se jedná o polymorfní onemocnění [26]. Existují tři hlavní modely vzniku CRC, které dávají do souvislosti specifické genetické změny s příslušnými morfologickými změnami.

3.1 Model vzniku z konvenčních lézí (cesta chromozomální instability, CIN)

Tradiční lineární model, který byl popsán již v roce 1990 Fearonem a Vogelsteinem, je zodpovědný za 50-70 % případů onemocnění. Tento model, který je dnes označován jako „klasická cesta“ kolorektální kancerogeneze (cesta chromozomální instability nebo teorie postupné malignizace), je založený na hypotéze, že převážná část případů CRC vzniká postupnou transformací normální střevní sliznice přes časný a pokročilý adenom až na invazivní karcinom. Iniciačním krokem je mutace nádorově supresorového genu APC, který kóduje stejnojmenný protein, jenž hraje zásadní roli ve wimentin/ β -kateninové signální dráze, reguluje migraci buněk a zodpovídá za správný průběh mitózy. Mutace genu APC, která je detekovatelná u více než 80 % CRC, vede k aktivaci zmíněné signální dráhy. Důsledkem toho je nadměrná proliferace epitelu střevních krypt a vznik hyperplazie střevních klků. Díky těmto mutacím dochází k přeměně normálního střevního epitelu v časný, zpravidla tubulární, adenom. Ovšem sama APC mutace nestačí ke vzniku zhoubného nádoru. K tomu dojde až vlivem dalších aktivačních mutací protoonkogenů a tumor supresorových genů. Dalšími geny, které bývají často mutovány v časných stádiích vývoje CRC jsou například onkogeny z rodiny RAS (KRAS, NRAS).

Proteiny RAS jsou zapojeny v řadě signálních drah, podílí se na transdukcii signálu mezi receptory a signálními molekulami a regulují procesy buněčného dělení. Jedním z klíčových receptorů asociovaných s těmito proteiny je receptor pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR), který bývá u pacientů s CRC často exprimován ve zvýšené míře. Z tohoto důvodu byla vyvinuta cílená léčba využívající monoklonálních protilátek proti tomuto receptoru (viz **kapitola 9.3.2**). Dalším z genů zapojených do klasického Vogelsteinova modelu je nádorově supresorový gen TP53. Protein p53, kódovaný tímto genem, se podílí na regulaci řady významných buněčných procesů, jakými jsou zejména buněčný cyklus, apoptóza, angiogeneze či aktivace mechanismů opravy DNA. Mutace, které vedou ke snížení nebo ztrátě funkce p53 patří mezi nejčastější mutace u nádorů a bývají identifikovány u více než 50 % všech malignit, včetně

CRC, kde významně přispívají k přeměně pozdního adenomu v adenokarcinom [27]. Nádory vznikající na základě lineárního modelu se obvykle vyznačují vysokou chromozomální instabilitou (CIN – chromosomal instability, „chromosomal instability pathway“), avšak lze je považovat za mikrosatelitně stabilní. Morfologicky jsou tyto nádory popisovány jako adenokarcinomy vznikající na podkladě tubulárních či tubulovilózních adenomů. Obvyklou lokalizací jsou levostranné úseky tračnicku (distální třetina colon transversum, colon descendens, sigmoideum a rektum) [28-32].



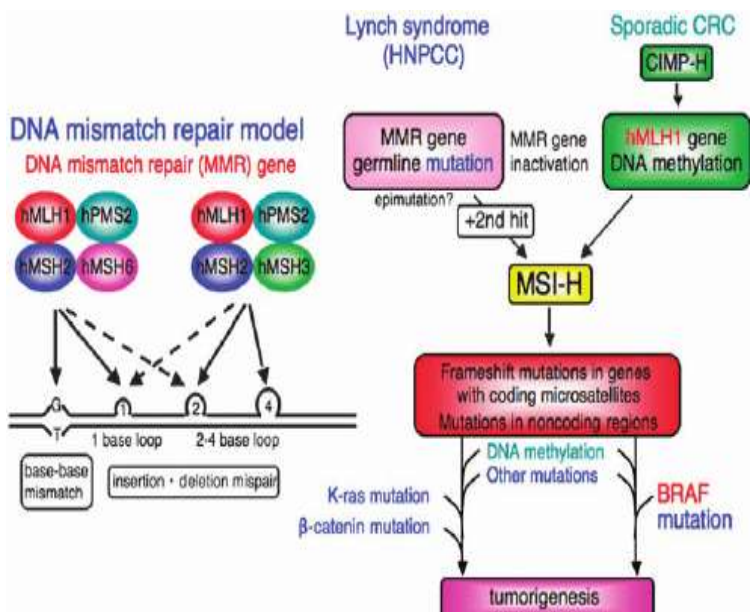
Obrázek 4 - Sled genetických změn asociovaných s kancerogenezí kolorektálního karcinomu dle Vogelsteinova modelu

Převzato a upraveno podle: KINZLER K.W., et al., 1996 [31]

3.2 Model vzniku ze serátních lézí („*serrated pathway*“ neboli „*microsatellite instability pathway*“, MIN/MSI)

Zhruba ve stejné době jako Fearon a Vogelstein popsaly Fenoglioová-Preiserová a Longacreová novou morfológickou variantu kolorektálního adenomu, kterou podle vzhledu epitelu krypt těchto polypů připomínajícího zuby pily pojmenovaly „serrated adenoma“, tj. „pilovité“ neboli „serátní“ adenomy [30]. Základním prvkem „serrated pathway“ je primární aktivace MAP-kinázové dráhy. MAP-kinázová signální dráha je jedna z nejdůležitějších signálních drah u maligních nádorů, která ovlivňuje proliferaci, diferenciaci i apoptózu nádorových buněk. Jedná se o signální dráhu spojující receptory EGFR s jádrem buňky. Mutace onkogenů BRAF nebo RAS vedou k trvalé aktivaci této klíčové signální dráhy, a tím ke stimulaci proliferace a potlačení apoptózy. U serátní cesty kancerogeneze jsou většinou primárním inzultem mutace onkogenů RAS nebo BRAF. Tyto mutace jsou pravděpodobně zároveň zodpovědné za iniciaci metylací DNA a vznik tzv. CpG-island methylátorového fenotypu (CIMP). DNA metylace představují jeden z významných epigenetických mechanismů regulace genové exprese. Tímto epigenetickým mechanismem vzniká skupina nádorových onemocnění označovaná jako CIMP, která u CRC představuje cca 27 % případů. Nejčastěji bývá metylován promotor genu MLH1, který je součástí již zmíněného MMR

systému. Jeho základní funkcí je oprava chybného párování bazí při replikaci DNA [33]. Jestliže dojde v průběhu replikace DNA k chybnému spárování bazí (např. thymin s guaninem), dojde na tomto místě k připojení heterodimeru MSH2-MSH6, který chybu identifikuje a signalizuje poškození, a následně ke vzniku heterodimeru MLH1-PMS2, který chybu opraví. Exonukleázou je vystřížen úsek s chybně spárovanou bazí a DNA-polymeráza podle komplementární matrice DNA dosyntetizuje požadované nukleotidy. Za předpokladu rozsáhlejšího poškození DNA se tento systém spolupodílí na zástavě buněčného cyklu a indukcii apoptózy. V případě chybně fungujícího MMR systému dochází k akumulaci mutací. Děje se tak v místech DNA, kde se opakují jeden či více nukleotidů. Tyto úseky DNA jsou označovány jako tzv. repetitivní sekvence neboli mikrosatelity. Funkce DNA polymerázy zde mnohdy selhává, což ve svém důsledku vede ke vzniku delších či kratších mikrosatelitů. Pokud je délka mikrosatelitů rozdílná, jedná se o patologii, která je označována jako mikrosatelitová instabilita (MSI) (**obrázek 5**). MSI slouží jako obecný znak neúčinnosti MMR systému a celkové genomické instability příslušné tkáně [33, 34]. Karcinogeneze spojená s nestabilitou mikrosatelitů může být asociována s mutacemi různých genů kódujících proteiny MMR systému, kam patří: MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, MSH3, PMS1 a Exo1. Můžeme se setkat i s hereditární formou poruchy funkce MMR systému na podkladě zárodečných mutací v podobě Lynchova syndromu (viz **kapitola 2.1.1**). U sporadických MSI-high (MSI-H) CRC se relativně často setkáváme s mutacemi BRAF [35, 36].



Obrázek 5 - Model karcinogeneze kolorektálního karcinomu s deficientní funkcí mismatch repair (MMR) systému

Převzato a upraveno podle: IMAI K., et al., 2008

3.3 Model vzniku ze zánětlivých lézí (dysplastické nepolypózní změny)

Dalším popsaným modelem u sporadické formy CRC byl model kancerogeneze, pro který je charakteristický morfologický vývoj bez polypů a adenomů. V lézích, které předcházejí vzniku kolorektálního karcinomu u osob s chronickým idiopatickým zánětlivým střevním onemocněním (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba) byl zjištěn téměř opačný sled výše popsaných genetických změn, než je tomu u klasického Vogelsteinova modelu. Na počátku transformačních změn stojí mutace TP53 a působení cytokinů. Mutace v RAS a APC genech zde byly popsány až v pozdějších fázích kancerogeneze [37].

4 Diagnostika

Při prvním kontaktu s pacientem je nezbytná důsledně odebraná **anamnéza** a **fyzikální vyšetření**. Významnou diagnostickou pomůckou je **test na okultní krvácení ve stolici (TOKS)**, který se uplatňuje i v rámci screeningu. Základním diagnostickým úkonem u CRC je **kolonoskopické vyšetření** s odběrem biopsie k histologickému vyšetření [38]. Nativní **RTG** břicha nedokáže odhalit CRC, ale lze získat informaci o případných komplikacích, jako je ileus nebo perforace. V rámci stagingu má nezastupitelné místo **výpočetní tomografie** (computed tomography - **CT**), která se uplatňuje zpravidla při hledání metastatického postižení, k diagnostice primárního tumoru ji lze provést spíše u lokálně pokročilých lézí. Je to nejčastěji využívaná vyšetřovací metoda pro hodnocení léčebné odpovědi, kde se používá hodnocení dle kritérií **RECIST** [39]. CT dnes představuje zlatý standard v rámci primární diagnostiky i pro další sledování follow-up pacientů. Může se též dobře uplatnit při diagnostice akutních stavů, které mohou být způsobeny lokálně pokročilým nádorem (ileus, perforace, absces, a jiné). Alternativně lze, v rámci stagingu, k vyloučení generalizace využít **USG** břicha a RTG hrudníku. **Magnetická rezonance (MR)** nachází hlavní uplatnění zejména v rámci stagingu karcinomu rekta. Vzhledem k vynikajícímu tkáňovému kontrastu MR umožňuje dobře rozlišit invazi nádoru do jednotlivých anatomických vrstev stěny střeva a případně i okolí. Má tedy klíčovou roli zejména pro stanovení T-stagingu karcinomů rekta. Precizní staging je zde velmi důležitý, neboť umožňuje identifikovat pacienty vhodné k léčbě neoadjuvantní radio-chemoterapií (T3b a vyšší, N1 a vyšší). Alternativu MR v rámci stagingu karcinomů rekta představuje **transrektální USG (TRUS)**. MR může rovněž odhalit případnou infiltraci análních sfinkterů, což je informace cenná zejména z hlediska operátora. Další využití MR nachází při zobrazení jaterních metastáz, zejména při nejistých nálezech na CT.

Rozvoj zobrazovacích metod v poslední době vede k širšímu využití tzv. hybridních metod, které jsou založeny na fúzi obrazů z **pozitronové emisní tomografie (PET)** a CT (**PET/CT**), případně MR (**PET/MR**). Tyto metody se mohou rovněž významným způsobem uplatnit ve stagingu CRC. Vzhledem k limitované dostupnosti, se však uplatňují spíše v případech s nejistým nálezem na CT, případně MR. Laboratorně je možné kromě standardního vyšetření krevního obrazu a základní biochemie vyšetřit sérové nádorové markery **karcinoembryonální antigen (CEA)** a **CA 19-9**, které bývají u CRC většinou signifikantně zvýšené. Při jejich interpretaci je třeba pamatovat na limity vyšetření v podobě rizika falešné negativity či pozitivity. Elevaci hladiny onkomarkerů mohou způsobovat i některá nenádorová onemocnění nebo stavy (např. zánět, kouření). Přínosné může být i sledování dynamiky hladin onkomarkerů, kdy pokles ukazuje na příznivý efekt protinádorové léčby, naopak vzestup může indikovat progresi nálezu, případně může být prvním znamením relapsu onemocnění [40, 41].

5 Staging

Konečným výstupem provedených základních diagnostických procesů je stanovení stadia onemocnění neboli tzv. **staging**. Běžně se používá klasifikace **TNM**, která byla vyvinuta za pomoci American Joint Committee on Cancer (AJCC) a Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Pro chirurgické obory je možná bližší klasifikace Duksova (**tabulka 1**). Pro stanovení stadia onemocnění je potřebné znát hloubku penetrace nádoru stěvnou, případně jeho invazi do okolních anatomických struktur nebo orgánů (**T**), stupeň postižení regionálních mízních uzlin (**N**) a přítomnost vzdálených metastáz (**M**). Na základě těchto kritérií je možné nádorové onemocnění zařadit do jednotlivých **klinických stadií (I-IV)**, která mají klíčový význam pro stanovení léčebného postupu a napomáhají k určení prognózy. Klinický staging je určován na základě výsledků klinických a zobrazovacích vyšetření, je označen písmenem "**c**" (cT, cN, cM). Patologickou klasifikaci provádí patolog na základě makroskopického i mikroskopického vyšetření nádoru, okolních tkání, lymfatických uzliny, případně metastáz odebraných při operaci a je označena písmenem "**p**" (pT, pN, pM). Přehled jednotlivých kritérií pro TNM staging CRC a výsledné rozdělení do jednotlivých klinických stadií jsou uvedeny v **tabulce 2 a 3** [2].

Tabulka 1 - Duksova klasifikace

Duksova klasifikace	
Stádium	Popis
Stádium A	Tumor ohraničen stěvnou
Stádium B	Tumor zasahuje nebo proniká serózou
Stádium C1	Tumor + pozitivní perikolické lymfatické uzliny
Stádium C2	Tumor + pozitivní perivaskulární uzliny
Stádium D	Vzdálené metastázy

Tabulka 2 - TNM staging

T – Primární nádor

TX	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
Tis	Karcinom in situ: invaze do lamina propria mucosae
T1	Nádor postihuje submukózu
T2	Nádor postihuje tunica muscularis propria
T3	Nádor postihuje subserózu nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně
T4	Nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury nebo prorůstá na viscerální peritoneum
T4a	Nádor prorůstá na viscerální peritoneum
T4b	Nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury
N – Regionální mízní uzliny	
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	Metastáza v 1-3 regionálních mízních uzlinách
N1a	Metastáza v 1 regionální mízní uzlině
N1b	Metastáza ve 2-3 regionálních mízních uzlinách
N1c	Ložisko/a nádoru v subseróze nebo neperitonealizované perikolické či perirektální měkké tukové tkáni bez metastázy v regionální mízní uzlině
N2	Metastázy ve 4 nebo více regionálních mízních uzlinách
N2a	Metastázy ve 4-6 regionálních mízních uzlinách
N2b	Metastázy v 7 a více regionálních mízních uzlinách
M – Vzdálené metastázy	
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastáza
M1a	Metastázy omezené na jeden orgán bez peritoneálních metastáz
M1b	Metastázy ve více než jednom orgánu
M1c	Metastázy na peritoneu s nebo bez postižení dalších orgánů

Tabulka 3 - Rozdělení do klinických stádií

Stádium	T	N	M
Stádium 0	Tis	N0	M0
Stádium I	T1, T2	N0	M0
Stádium IIa	T3	N0	M0
Stádium IIb	T4a	N0	M0
Stádium IIc	T4b	N0	M0
Stádium IIIa	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stádium IIIb	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stádium IIIc	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stádium IVa	jakékoli T	jakékoli N	M1a
Stádium IVb	jakékoli T	jakékoli N	M1b
Stádium IVc	jakékoli T	jakékoli N	M1c

6 Screening

Úkolem sekundární prevence je včasný záchyt onemocnění ve stadiu prekancerózy či záchyt počátečních kurabilních stadií CRC. Přestože existuje řada preventivních programů, jejichž cílem je snížení incidence, potažmo i mortality, nemá stále výskyt CRC výrazně klesající tendenci. Vyléčit se daří pouze 40-50 % pacientů, v závislosti na pokročilosti onemocnění. Cílem screeningu je pokles incidence (včasným záchytem prekancerózních lézí) a mortality. Od zahájení kolorektálního screeningového programu v roce 2000 do roku 2015 došlo k poklesu incidence o 18,4 % a k poklesu mortality o 32,4 % [42]. Základy organizovaného screeningu v ČR byly položeny právě v roce 2000. Po Německu se stala ČR druhou zemí na světě, která zahájila celoplošný screening CRC u asymptomatických jedinců. Program probíhal ve dvou etapách. První spočívala v provádění testu na okultní krvácení ve stolici (**TOKS**) guajakovým testem. Při jeho pozitivním výsledku se provedla kolonoskopie. Guajakový test poskytovali praktičtí lékaři nebo gynekologové při preventivní prohlídce. Od roku 2006 je program monitorován na národní úrovni, což znamená, že dochází ke sběru dat v rámci Registru screeningových kolonoskopií. Následně se od roku 2009 začaly provádět imunochemické testy na okultní krvácení a také se zavedla možnost jedno etapového screeningu, což znamená možnost koloskopického vyšetření bez nutnosti provedení TOKS. Od roku 2013 se upustilo od guajakového testu a v rámci testování se využívají pouze imunochemické TOKS [43].

Screeningové metody lze rozdělit na dva typy, a to na testování stolice anebo provedení endoskopického či radiologického vyšetření. Testování stolice probíhá pomocí konvenčních TOKS založených na detekci hemoglobinu ve stolici. Při guajakovém testu bylo nutné snížit či vyloučit možnost falešně pozitivních výsledků, které by byly způsobeny přítomností hemoglobinu v potravě. Nyní je využíváno imunochemických testů (Fecal Immunohistochemical Test – **FIT** nebo také **iTOKS**), kde testovací destička obsahuje částice potažené protilátkami proti hemoglobinu a slouží ke kvalitativnímu průtokovému imunostanovení okultního krvácení ve stolici. Dále je možná detekce za pomoci nových testů na přítomnost DNA mutací ve stolici (**DNA fekální testy**). K endoskopickým a radiodiagnostickým metodám patří optická kolonoskopie, flexibilní sigmoideoskopie, alternativní metody mohou představovat CT kolonografie nebo kapslová kolonoskopie. Koloskopie představuje zlatý standard screeningu, jehož výhodou není jen přímý pohled optikou kolonoskopu na střevní sliznici, ale přináší navíc možnost provedení polypektomie a zároveň i odběr biopsie z nádoru. Prospektivní studie (National Polyp Study) prokázala, že koloskopie s odstraněním adenomů sníží incidenci CRC o 76-90 % v porovnání s populací, která tento screening nepodstoupila [44].

Screeningový program CRC u populace s běžným rizikem (tj. bez zjištěné genetické predispozice, výrazné rodinné zátěže, případně jiných faktorů výrazně zvyšujících riziko CRC) je realizován následujícím způsobem. U asymptomatických jedinců ve věkovém rozpětí 50-54 let je nabízen TOKS v jednoročním intervalu. V případě, že výsledek je pozitivní, provede se TOKS-pozitivní kolonoskopie. Od padesáti pěti let věku si může jedinec vybrat, zda chce pokračovat testem na okultní krvácení do stolice ve dvouletých intervalech nebo podstoupit screeningovou kolonoskopii jednou za deset let. Po zavedení adresného zvaní v roce 2015 došlo k vzestupu účasti cílové populace na screeningovém programu na 32,2 %, což bylo o 5,7 % více než v roce 2013. V roce 2015 bylo v ČR provedeno téměř 1,5 mil TOKS a 530 000 preventivních koloskopií [42]. Podmínkou efektivního screeningu je dostatečná účast cílové populace, která se v ČR v současnosti pohybuje stále pouze kolem 30 %. K efektivnímu screeningovému programu by byla zapotřebí minimálně 45% účast. Cestou ke zlepšení by mohlo být snížení věkové hranice k provedení screeningové kolonoskopie již od padesáti let. Studie provedená prof. Brennerem ukazuje, že tato změna by mohla mít odůvodnění hlavně u mužů ve věkové kategorii 50-54 let [46]. U mužů v této věkové kategorii, kteří podstoupili screeningovou kolonoskopii, byl zjištěn dvojnásobný počet pokročilých adenomů v porovnání s ženami stejné věkové kategorie [42, 45]. Dle dat z NOR je z celkového počtu zachycených CRC zhruba kolem 5 % z celkového počtu nádorů u pacientů mladších než 50 let [47].

7 Prognostické a prediktivní faktory

Prognostické faktory jsou parametry, které poskytují indicie k odhadu prognózy daného onemocnění pro konkrétního pacienta. Zjednodušeně lze říci, že prognostické faktory ovlivňují celkový průběh onemocnění **bez ohledu na konkrétní typ léčby**.

Prognóza nádorového onemocnění u vybrané kohorty pacientů může být hodnocena pomocí různých parametrů. Nejdůležitější z nich jsou doba **celkového přežití (overall survival – OS)** a pětileté přežití neboli podíl pacientů přežívajících 5 let od diagnózy nebo sledované léčebné intervence; alternativně lze volit jiný interval (např. 3 roky, 10 let). Dalším parametrem, který lze použít ke zhodnocení prognózy po **radikální léčbě**, je **přežití bez známek relapsu** onemocnění (**relapse-free survival – RFS** nebo též **disease-free survival – DFS**), i zde lze použít pětileté přežití bez relapsu, případně jiný časový interval. Může se jednat o pacienty bez adjuvantní léčby, s adjuvantní léčbou, případně obě skupiny dohromady. Při **paliativní léčbě** je možné použít k hodnocení OS, které je možné hodnotit od stanovení diagnózy, ale většinou zde bývá počítané od zahájení sledované léčby. Dále pak **přežití bez progresse (progression-free survival – PFS)** nebo jeho varianta v podobě **času do progresse onemocnění (time to progression – TTP)**. Oba tyto parametry představují dobu, která uplynula mezi zahájením sledované léčby a progresí onemocnění. Základní rozdíl mezi nimi spočívá v metodice, kdy při výpočtu PFS jsou zahrnuti pacienti, kteří zemřeli bez ohledu na přesný důvod úmrtí, při výpočtu TTP jsou do výpočtu zahrnuti pouze pacienti, kteří zemřeli v důsledku doložené progresse nádoru. Možné je hodnotit i kvalitu života, respektive čas do zhoršení kvality života nebo nástupu symptomů.

Obecně lze říci, že prognostické faktory reflektují zejména biologickou agresivitu nádoru a míru rizika recidivy, případně progresse onemocnění. V klinické praxi mohou významným způsobem ovlivnit například rozhodnutí o podání adjuvantní onkologické léčby, případně volbu a intenzitu sledování.

Prediktivní faktory jsou ukazatele, které předurčují, na základě specifického biologického chování nádoru, **účinnost konkrétního typu léčby**. Je možné též předpovědět i riziko vzniku nežádoucích účinků při využití daného léčebného postupu. V některých případech může být jeden a tentýž parametr současně prognostickým i prediktivním faktorem a mnohdy lze těžko definovat jednoznačnou hranici mezi prognostickými a prediktivními faktory. Rolí zde sehrává i míra aktuálního poznání dané problematiky, která se může v čase vyvíjet. Jako příklad u CRC lze uvést BRAF mutace, o kterých byl zprvu znám jejich nepříznivý prognostický význam. Po nástupu takto zacílené léčby, představují též významný prediktivní biomarker, na jehož podkladě je možné volit optimální typ cílené léčby.

V poslední době je trendem hledání potenciálních prediktivních biomarkerů pro různé modalitě systémové léčby, zejména však léčbu cílenou a imunoterapii.

Podmínkou pro to, aby mohl být prediktivní biomarker užíván v rutinní klinické praxi musí být dostatečně senzitivní a specifický. Stejně tak je důležitá i cena vyšetření. Díky identifikaci prediktivních biomarkerů je možné rozvíjet koncept personalizované onkologické léčby v běžné klinické praxi. Ten je založen na výběru optimální léčby pro daného pacienta za využití dostupných prediktivních biomarkerů a blíže bude diskutován dále (viz **kapitola 10**).

7.1 Vybrané prognostické a prediktivní faktory u CRC

7.1.1 Rozsah onemocnění (staging)

Zcela zásadní vliv na prognózu pacientů se zhoubnými nádory má stanovení pokročilosti onemocnění, které je vyjádřeno TNM stagingem (viz **kapitola 5**) [2]. Obecně platí, že čím vyšší je stadium onemocnění, tím horší je prognóza. V **tabulce 4** jsou uvedeny pětiletá přežití pacientů s CRC dle klinického stadia.

Tabulka 4 - Pravděpodobnost pětiletého přežití dle klinického stadia

Stádium	Pětileté přežití
Stádium 0 a 1	80–90 %
Stádium 2	60–80 %
Stádium 3	50–60 %
Stádium 4	4–10 %

7.1.2 Věk a celkový stav pacienta

CRC je onemocněním převážně vyšších věkových kategorií. Existují práce, které hovoří o horší prognóze pacientů ve věku do 40-45 let, což je ale dáno vyšším podílem mucinózních, nízce diferencovaných a někdy i pokročilejších nádorů u pacientů této skupiny. Samotný mladší věk patrně prognózu významně neovlivňuje [48]. Hlavní význam pro horší prognózu naopak starších pacientů ve věku 75-80 let je vyšší perioperační morbidita a mortalita. Stejně tak i horší celkový stav a komorbidity velmi často neumožňují podání intenzivní systémové léčby. Jedním z ukazatelů funkčního stavu pacienta je **Eastern Performance Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS)**, což je skóre v rozmezí od 0 (plně aktivní) přes 3 (schopný pouze omezené péče o sebe) až po 5 (umírající) a byl přijat Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization - WHO) (**tabulka 5**) [49, 50]. Informace o celkovém funkčním stavu pacienta má zásadní význam pro prognózu nemocného, jelikož ovlivňuje léčebné

možnosti. Obecně platí, že čím horší je celkový stav pacienta, tím horší je i prognóza.

Tabulka 5 - ECOG performance status popisující funkční stav pacienta

0	Plně aktivní, schopen všech běžných aktivit bez omezení
	Plně aktivní, více méně ve stejné míře jako před nemocí
1	Omezení fyzicky náročných aktivit, ambulantní, schopen lehčí práce např. domácí práce, kancelářská práce
	Neschopnost těžké fyzické práce, ale možnost vykonávat cokoli jiného
2	Ambulantní, schopen péče o sebe, ale neschopen jakékoli práce, mimo lůžko více než 50 % denní doby
	Mimo lůžko více než polovinu dne, schopen péče o sebe, neschopen práce
3	Schopen omezené péče o sebe, upoután na lůžko více než 50 % denní doby
	Na lůžku nebo v křesle více než polovinu dne, při péči o sebe nutná pomoc
4	Zcela neschopný, neschopen péče o sebe, upoután na lůžko nebo do křesla
	Po celou dobu upoután na lůžko nebo křeslo, výrazná potřeba pomoci
5	Umírající/ mrtvý

7.1.3 Klinická symptomatika

Pokročilost nádorového onemocnění často úzce koreluje s tíží symptomů. Nezávisle na stagingu je však dobře dokumentována horší prognóza pacientů diagnostikovaných a léčených pod obrazem akutního stavu. Je patrné, že akutně operovaní pacienti mají výrazně vyšší perioperační a pooperační mortalitu a přibližně poloviční pravděpodobnost pětiletého přežití v porovnání s elektivně řešenými případy [51]. To odpovídá všeobecně známému a nepříznivému prognostickému vlivu nádorové obstrukce nebo perforace.

7.1.4 Histomorfologický obraz a grading

Histomorfologický obraz nádoru často reflektuje některé rysy víceméně typické pro agresivní chování a u CRC bylo prokázáno, že některé specifické histologické subtypy korelují s prognózou onemocnění. Mezi adenokarcinomy (cca 90-95 % CRC) je s nepříznivou prognózou asociován **mucinózní adenokarcinom** (hlenotvorný – více než 50 % extracelulárního hleny) [52, 53]. Ze vzácných histologických subtypů CRC je s nepříznivou prognózou spojen tzv. **karcinom z prstenčitých buněk** (*signet-ring cell carcinoma*) a **malobuněčný karcinom** [54].

Grading, který vyjadřuje stupeň diferenciací nádoru, představuje další významný histomorfologický parametr, který je významně asociován s agresivním biologickým chováním zhoubných nádorů, včetně CRC. Bylo prokázáno, že nádory s vysokým gradem (G3, G4), který ukazuje na nízký stupeň diferenciací, jsou asociovány s obecně nepříznivou prognózou pacientů s CRC [53]. Pro některé histologické subtypy CRC je poměrně charakteristický vysoký grade, např. pro mucinózní karcinomy [53].

7.1.5 Cévní a perineurální invaze

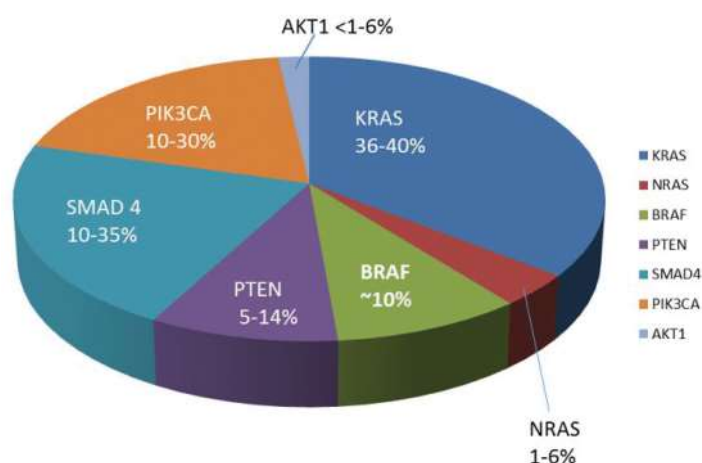
Podmínkou pro metastatické šíření nádoru je situace, kdy nádorové buňky invadují do cévních kapilár. Lymfatické kapiláry jsou přítomny již v submukóze, a tak není výjimkou postižení lymfatických uzlin i u velmi časných stadií CRC. Hematogenní metastazování do vzdálených orgánů lze chápat nikoli jen jako pokročilejší stupeň popsaného procesu, ale i jako, do jisté míry, odlišný děj. Nádorové buňky při něm invadují do krevních kapilár střešní stěny nebo i do větších cév a hematogenně jsou roznášeny po organismu. Invaze do krevních kapilár střešní stěny je nezávislým nepříznivým prognostickým faktorem spojeným zejména s vyšší frekvencí vzdálených metastáz a stejně tak **lymfangioinvaze** představuje významný nepříznivý prognostický faktor u CRC [55, 56]. Spolu s **angioinvazí** je **perineurální nádorová invaze** považována za nepříznivý prognostický faktor u pacientů s CRC [57].

7.1.6 Sérové onkomarkery

Sérové nádorové markery **CEA** a **CA 19-9** se u CRC významným způsobem uplatňují v diagnostice a sledování efektu léčby, ale kromě toho je možné je využít i k odhadu prognózy onemocnění. Bylo prokázáno, že jejich vysoké hodnoty korelují s nepříznivou prognózou [58, 59]. Určitou limitací je fakt, že vysoké hladiny onkomarkerů často úzce korelují s klinickým stádiem a rozsahem nádorového postižení, které má zásadní prognostický význam samo o sobě [58].

7.1.7 Molekulárně-genetické faktory

Detailní pochopení mechanismů kancerogeneze, ale i samotného biologického chování nádorů, vedlo k identifikaci různých prognostických a prediktivních faktorů na molekulárně-genetické úrovni, nejen u CRC. Tyto biomarkery mohou být identifikované na poli genomu, epigenomu, transkriptomu i proteomu. Probíhající výzkum v této oblasti je velmi intenzivní a stále přináší nové poznatky. Kromě celé řady molekulárně-genetických prognostických biomarkerů, bylo u CRC identifikováno množství prediktivních biomarkerů, které lze využít k volbě specificky zacílené systémové léčby. Z hlediska somatických mutací je možné CRC rozdělit na řadu podjednotek, které mají svá specifika, co se týče prognózy, ale zejména z hlediska možnosti využití cílené léčby. Mezi nejčastější tzv. „driver“ mutace u CRC patří: **KRAS**, **NRAS**, **BRAF**, **PI3K**, **PTEN** a **SMAD4** (obrázek 6) [60]. Pro predikci efektu a volbu cílené léčby se v současné době nejvýznamněji uplatňují mutace KRAS, NRAS a BRAF. Význam jednotlivých mutací, které se mohou uplatnit v podmínkách klinické praxe je podrobně diskutován v dalším textu (viz kapitola 10.1). Významným prognostickým a zároveň prediktivním faktorem, který se uplatňuje v klinické praxi je **MSI** (viz kapitola 3.2). MSI-H profil nádoru je



Obrázek 6 - Nejčastější typy somatických mutací u kolorektálního karcinomu
Převzato a upraveno podle: MUZNY D.M., et al., 2012 [60]

typický pro hereditární nepolypozní CRC (HNPCC), ale může být přítomen i u cca 15-20 % sporadických případů CRC [61]. Testování MSI se provádí standardně metodikou založenou na PCR nebo imunohistochemickým vyšetřením. Recentní práce ukazují rovněž využití tzv. sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS) [62]. Zásadní je vyšetřování MSI u pacientů s podezřením na Lynchův syndrom. Pacienti s MSI-H profilem nádoru mají obecně lepší prognózu, která je nejspíše na podkladě intenzivnější imunitní reakce vyvolané vysokou expresí neoantigenů na nádorových buňkách a tyto nádory méně často metastazují [63]. Ukazuje se, že je MSI rovněž významným prediktorem příznivého efektu imunoterapie [64].

Dalším faktorem, který je považován za prognostický, je **mutace genu TP53**, který kóduje protein p53. Jedná se o tumor supresorový gen umístěný na p raménku 17. chromozomu a patří mezi nejvíce studované geny v souvislosti s maligní transformací, stejně tak i s biologickým chováním zhoubných nádorů. Převažují názory, že mutace TP53 genu je spojena s obecně horší prognózou [65, 66].

Velká pozornost v aktuálním výzkumu je věnována prognostickému, případně prediktivnímu významu na úrovni epigenetiky. Zde je výzkum zaměřený na význam DNA metylací i na různé typy nekódujících RNA [67]. Problematika nekódujících RNA je podrobně diskutována v **kapitole 11**.

Trendem, který se v současné době uplatňuje je snaha o komplexní typizaci CRC vedoucí k rozdělení nádorů do několika subtypů, které by dobře refletovaly biologické vlastnosti nádoru, molekulárně-genetický profil i klinické rysy onemocnění. Na základě vyhodnocení dat o genové expresi a korelace s klinicko-patologickými charakteristikami byly navrženy různé klasifikační systémy. Průnikem celkem šesti navržených klasifikačních systémů byly definovány tzv. konsenzuální molekulární podtypy CRC, které byly recentně popsány autorským kolektivem Guinney et al. (**obrázek 7**) [68]. Na základě „**The consensus molecular subtypes (CMS) of colorectal cancer**“ je možné CRC dělit na čtyři základní podtypy **CMS1-4**. Podtyp **CMS1** (14 %) jsou většinou hypermutované nádory MSI-H, BRAF mutované. Podtyp **CMS2** (37 %) sdružuje zpravidla nádory levostranného tračníku s charakteristikami MSS a CIN, typicky s mutací TP53 s aktivací dráhy WNT/MYC. Podtyp **CMS3** (13 %) zahrnuje KRAS mutace a metabolickou dysregulaci. Dle studie AGITG MAX mají CMS2/3 podtypy benefit z léčby bevacizumabem [69]. Podtyp **CMS4** (23 %) tvoří nádory podobné mezenchymálním nádorům, typická je aktivace drah TGFbeta a VEGF, angiogeneze a stromální invaze.

CMS1 MSI Immune 14%	CMS2 Canonical 37%	CMS3 Metabolic 13%	CMS4 Mesenchymal 23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGFβ activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Obrázek 7 – Subtypizace kolorektálního karcinomu dle *Consensus Molecular Subtypes* (CMS)

Převzato a upraveno podle: GUINNEY J., et al., 2015 [68]

7.1.8 Lokalizace primárního nádoru

Proximální a distální části tračnicku mají odlišný embryologický původ. Pravý tračník vychází ze středního střeva (midgut) a levý ze zadního střeva (hindgut). Jako tzv. pravé střevo je nazývána část od céka přes vzestupný tračník a část transversa až k tzv. Cannon-Boehmovu bodu, který se nachází přibližně ve 2/3 příčného tračnicku, blíže k oblasti flexura lienalis. Jako levé střevo považujeme část střeva od výše zmíněného bodu dále směrem kaudálním, tedy zbylou část příčného tračnicku, sestupný tračník, sigmoideum a rektum [70]. Stále více se ukazuje, že nádory nacházející se v pravé části tlustého střeva a nádory nacházející se v levé části jsou odlišné biologické a klinické entity. Rozdíly jsou známé již delší dobu. Byly popsány různé charakteristiky nádorů, které jsou spojené s lokalizací primárního tumoru a to například rozdílná epidemiologie, patogeneze, morfologie, patofyziologie, genetické a epigenetické změny [71-73]. Nádory, které se vyskytují na pravé straně jsou často charakterizovány několika nepříznivými prognostickými faktory. Častěji jsou exofytické, nízkce diferenciované a s vyšším výskytem vzácných histologických podtypů (mucinózní či medulární) CRC. Dále jsou zde přítomné hypermutace, častěji vznikající na podkladě alternativní cesty kancerogeneze, MSI-H a často mutace BRAF a RAS [68, 74, 75]. Tyto odlišné klinické i molekulární charakteristiky se promítají do různých klinických výsledků a obecně jsou pravostranné nádory spojeny s výrazně horší prognózou [76]. Rozdílná bývá i odpověď na léčbu, jak bylo popsáno v několika studiích [74, 77]. Prediktivní potenciál pro cílenou léčbu je blíže popsán v **kapitole 10.2.2.**

8 Lokální léčebné metody

8.1 Endoskopická léčba

Endoskopie je nenahraditelná diagnostická metoda, kterou lze současně využít i ke kurativní léčbě prekanceróz (střevních polypů) či velmi časných stadií CRC (Tis nebo T1 nádory). Výkony, které je možné provádět jsou polypektomie, endoskopická mukozální resekce (**EMR**) a endoskopická submukózní disekce (**ESD**), kdy dochází k snesení polypu i s jeho submukózní spodinou. U T1 nádorů lze použít endoskopickou léčbu jen za předpokladu absence faktorů vysokého rizika rekurence (resekční okraj pod 1 mm či inkompletní odstranění nádoru, nízké diferencované karcinomy, angioinvaze). Jinak je doporučeno provedení (případně doplnění) chirurgické resekce včetně lymfadenektomie [78].

8.2 Chirurgická léčba

Jedinou léčebnou modalitou u drtivé části lokalizovaných stadií CRC je radikální resekce postiženého úseku colon nebo rekta s doporučeným alespoň 5 cm lemem zdravé tkáně a radikální lymfadenektomií spádových uzlin. Za poslední roky až desetiletí nedoznaly chirurgické postupy žádných zásadních principiálních změn. Stále se jedná o jedinou modalitu, která může dát pacientovi naději na úplné vyléčení a krom terminálních stavů nachází uplatnění ve všech stadiích onemocnění. Čím nižší je klinické stádium, tím je naděje na kurativní výkon větší. Operace má dva hlavní cíle. Tím prvním je radikální odstranění makroskopicky patrného nádoru a spádové lymfatické oblasti s možnými uzlinovými metastázami. Druhým je pak přispět ke stanovení stadia onemocnění, protože hloubku penetrace nádoru střevní stěnou a úroveň uzlinového postižení je možno přesně posoudit jen histopatologickým vyšetřením resekátu střeva a odstraněných regionálních lymfatických uzlin. Až jedna třetina pacientů s CRC je operována v akutním stavu, nejčastěji pro komplikace vznikající v příčinné souvislosti s nádorovým postižením v podobě střevní obstrukce (ileus) nebo perforace. U lokálně pokročilých nádorů infraperitoneální části rekta by samotnému chirurgickému výkonu měla předcházet neoadjuvantní konkomitantní radiochemoterapie. Pro správný chirurgický, potažmo patologický, staging je nezbytný odběr a patologické zhodnocení minimálně 12 regionálních lymfatických uzlin. Dle lokalizace primárního nádoru je u nádorů colon indikována pravostranná hemikolektomie, levostranná hemikolektomie a resekce sigmatu. U nádorů rekta je v dnešní době standardem tzv. totální mezorektální excize (TME). Výkony v této lokalizaci se rozlišují sfinkter zachovávající výkony (nízká přední resekce – LAR) a amputace rekta. K té je přistoupeno v případě nízké uložených nádorů s infiltrací svěračů nebo při nemožnosti dodržení dostatečné onkologické radikality.

Z profylaktických důvodů se ve vybraných případech provádí totální nebo subtotální kolektomie u prokázané dědičné dispozice ke vzniku CRC buď před jeho rozvojem, nebo až v době řešení vzniklého maligního nádoru. Jedná se především o diagnózy typu FAP nebo HNPCC (viz **kapitola 2.1.1**).

Krom kurativních výkonů je možné provést i výkony paliativní (paliativní resekce nádoru, střevní bypass nebo vyvedení stomie nad překážkou při ileózním stavu apod.). U resekabilního metastatického onemocnění hraje chirurgická léčba nezastupitelnou roli. V případě radikální resekce metastáz lze dosáhnout významně delšího přežití než při systémové léčbě samotné. V léčbě mCRC má zhodnocení resekability metastáz zásadní význam [79, 80].

8.3 Radioterapie

Radioterapie, jako radikální léčba, je u CRC indikována pouze u nádorů rekta. Důvodem je vyšší riziko lokální recidivy v oblasti rekta oproti zbytku tlustého střeva [81]. Onkologická terapie předřazená chirurgickému výkonu vedoucímu k místnímu odstranění zhoubného nádoru je označovaná jako **neoadjuvantní léčba**. S výhodou lze indikovat neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapii u rizikových lokálně pokročilých stádií karcinomu rekta, které prorůstají fascia recti či se k ní přibližují na méně než 1 mm, anebo ji překračují. Další indikací je metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin [82]. Hlavním důvodem, proč zařadit neoadjuvantní léčbu před chirurgický výkon je skutečnost, že díky redukci nádorového objemu dochází následně k usnadnění resekčního výkonu, včetně jeho radikality a dále dochází ke zvýšení pravděpodobnosti dosažení sfinkter šetřícího výkonu. Smyslem předoperační léčby je tedy umožnit dosáhnout negativního cirkumferenčního (laterálního) okraje (CRM) při TME. Nevýhodou může být, za jistých okolností, fakt, že předoperační radioterapie je indikována i při neznalosti přesného patologického stagingu, což může vést k nadbytečnému užití neoadjuvance u časnějších stádií [83]. Při využití precizních zobrazovacích metod jako MR, PET/MR nebo TRUS dochází k upřesnění stagingu, proto by měly být tyto metody standardem před zahájením léčby.

Historická data uvádějí pravděpodobnost vzniku lokální recidivy při samostatném operačním výkonu u stadia II 15-30 % a u stadia III 30-50 % [84, 85]. Cílem radioterapie je snížení četnosti lokálních recidiv, zlepšení přežití a neoadjuvantním podání i zlepšení lokálních podmínek pro operaci, což může vést k nižší morbiditě, umožnění provedení radikální resekce u iniciálně neresekebilních nálezů a dochází i k vyššímu podílu chirurgických výkonů zachovávajících sfinkter. Byla provedena metaanalýza 22 randomizovaných studií, které porovnávaly léčebné výsledky kombinace chirurgického výkonu s neoadjuvantní nebo adjuvantní radioterapií proti samotnému chirurgickému výkonu, která prokázala, že radioterapie signifikantně snižovala riziko vzniku

lokální recidivy v pánvi (o 46 % v případě neoadjuvantní léčby a o 37 % v případě adjuvantní léčby) [86]. Anatomickou hranicí pro indikace radioterapie zpravidla bývá vzdálenost orálního okraje nádoru 15-20 cm od anokutánní linie.

V radioterapii jsou využívána různá aplikační schémata lišící se celkovou dávkou (nejčastěji od 25 do 55 Gy) a frakcionací. Konvenční radioterapie trvá 5 týdnů, při dávce 1,8-2,0 Gy na frakci do dávky 45 Gy v první fázi s eventuálním „boostem“ na oblast tumoru a mesorekta ve druhé fázi do celkové maximální dávky 50,4-54 Gy. Optimální načasování chirurgického výkonu je 4-6 týdnů po ukončení neoadjuvantní radioterapie. Při alternativním tzv. „Švédském schématu“ akcelerované radioterapie je v jednom týdnu podáno 5 x 5 Gy, optimální termín operace je pak začátek následujícího týdne. Obě frakcionační schémata mají podle polské randomizované studie obdobné OS, DFS a nebyl ani prokázán významná rozdíl ve výskytu lokálních recidiv. Ani australská studie TROG 01.04 či švédská studie Stockholm III neprokázaly statisticky signifikantní rozdíl v OS, DFS či lokální kontrole [87-90]. Po neoadjuvantní terapii dochází přibližně v 15 % případů k histopatologicky verifikované kompletní remisi [91]. Z cytostatik se v rámci konkomitantní chemoradioterapie používá perorální analog 5-fluorouracilu (5-FU) kapecitabin. Ten patří zároveň i mezi základní cytostatika v paliativní i adjuvantní léčbě karcinomu tlustého střeva a konečníku. U lokálně pokročilých nebo recidivujících nádorů rekta se na několika světových pracovištích používá HDR-IORT (high-dose-rate intraoperační radioterapie). Paliativně je možno ozářit jak primární tumor, tak metastatická ložiska ve všech lokalizacích, kde není překážkou nepoměrná radiosenzitivita okolních zdravých tkání, a kdy celková dávka nepřesáhne maximální tolerovanou dávku pro danou oblast. Nejčastěji se paliativně ozařují lokálně značně pokročilé krvácející nádory, případně metastatická ložiska ve skeletu či mozku.

9 Systémová onkologická léčba rozdělená dle léčebného záměru

9.1 Adjuvantní systémová léčba

Cílem adjuvantní léčby je maximálně snížit riziko relapsu nádorového onemocnění. V adjuvantní systémové léčbě u CRC je využívána chemoterapie založená na kombinačních režimech, kde základem je 5-FU. Cílená léčba zde doposud nenalezla uplatnění.

U karcinomů colon je adjuvantní chemoterapie indikována obligátně ve III. klinickém stadiu (pN+) a u pacientů ve II. klinickém stadiu s vysokým rizikem recidivy. Mezi hlavní rizikové faktory patří: pT4, G3, angioinvaze, perineurální šíření, stenožující nebo perforující tumor, nedostatečné nebo pozitivní resekcí okraje, méně než 12 vyšetřených lymfatických uzlin a iniciálně vysoká elevace CEA. U pacientů stadia II bez rizikových faktorů je benefit z podání adjuvantní chemoterapie sporný (**obrázky 8 a 9**) [92]. U pacientů s nádory s MSI-H je profit z adjuvantní chemoterapie založené na 5-FU nejistý (**obrázek 10**) a ve II. klinickém stadiu není podávání adjuvantní chemoterapie doporučeno [93, 94].

Načasování zahájení adjuvantní léčby je nutné považovat za důležitý faktor, který ovlivňuje úspěch léčby. Z publikované metaanalýzy 8 studií, která zahrnovala celkem 7576 pacientů vyplývá, že pokud byla adjuvantní léčba zahájena za více než 8 týdnů od chirurgického výkonu, došlo ke zkrácení OS [95].

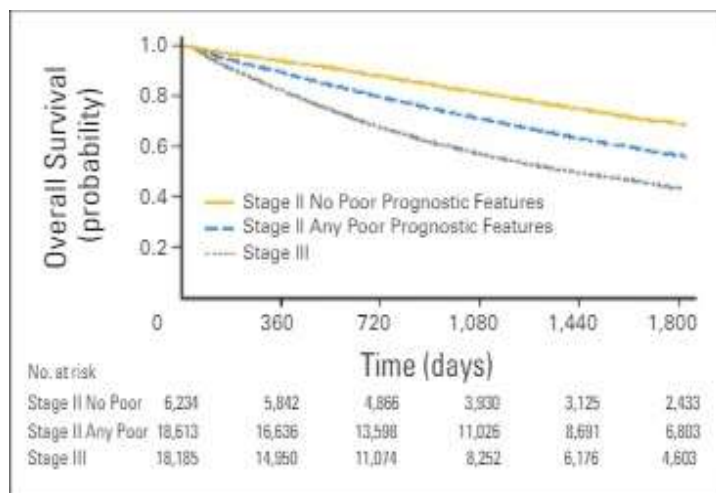
Režimy využívané k adjuvantní chemoterapii standardně zahrnují 5-FU modulovaný leukovorinem, případně kapecitabin, u pacientů stadia III (a u vysoce rizikových pacientů stadia II) v kombinaci s oxaliplatinou (režim FOLFOX, případně CAPOX). Přidání oxaliplatiny do kombinace FOLFOX ve studii MOSAIC přineslo významný pokrok v adjuvantní léčbě CRC. Díky této kombinaci došlo k 18% redukci rizika relapsu u pacientů léčených kombinací FOLFOX oproti do té doby používanému režimu FU/FA (**obrázek 11**) [96].

Mezi další hojně diskutovaná témata patří problematika optimální délky trvání adjuvantní chemoterapie. Již v 80. a 90. letech prokázala studie INT-0089, že podávání 5-FU + levamizolu po dobu 6 měsíců má stejný léčebný účinek jako podávání po dobu 12 měsíců [97]. K potvrzení těchto dat došlo následně i velkou metaanalýzou CENTRAL. Zde byla porovnávána adjuvantní chemoterapie založená na 5-FU podávaná v délce 3-6 měsíců oproti léčbě trvající 9-12 měsíců. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v délce DFS ani v OS mezi oběma skupinami [98]. Na základě těchto výsledků bylo dosaženo konsenzu, že adjuvantní léčba by neměla trvat déle než 6 měsíců. Na otázku optimální délky adjuvantní chemoterapie se později snažila odpovědět rozsáhlá studie IDEA. Cílem zde bylo

vyhodnotit non-inferioritu tříměsíčního léčebného schématu ve srovnání s šestiměsíčním. Do prospektivní studie bylo zařazeno 12 834 pacientů s CRC ve stadiu III, kteří byli následně adjuvantně léčeni oxaliplatinou a fluoropyrimidinem po dobu 3 nebo 6 měsíců (60 % FOLFOX, 40 % CAPOX). Jak se dalo očekávat, kratší trvání adjuvantní léčby bylo spojeno s významně nižším výskytem a závažností nežádoucích účinků, zejména neurotoxicity, hand-foot syndromu, mukozitidy, nevolnosti, únavy či průjmu. V celkové populaci se non-inferiorita tříměsíčního schématu nepotvrdila, nicméně rozdíl v efektivitě zde byl pouze minimální. Třileté DFS bylo dosaženo u 74,6 % pacientů s tříměsíční léčbou proti 75,5 % pacientům s šestiměsíčním schématem léčby (HR: 1,07, $p=0,11$) (**obrázek 12**). Non-inferiorita tříměsíčního schématu léčby byla prokázána u podskupiny pacientů s rozsahem onemocnění pT1-3 pN1, kteří byli léčeni režimem CAPOX [99].

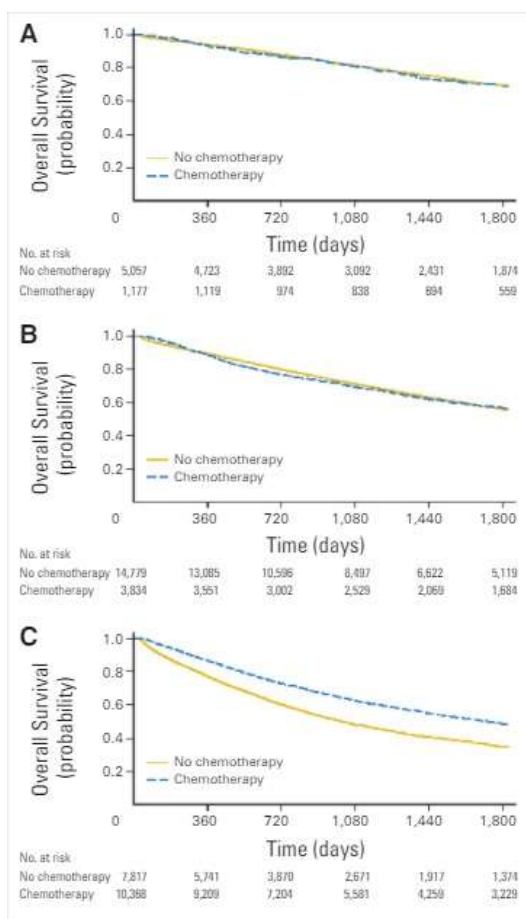
Vzhledem k účinnosti cílené léčby u nemocných s generalizovaným CRC se očekávalo, že její zařazení do adjuvantní léčby přinese zlepšení výsledků i v této indikaci. Nicméně výsledky většiny doposud provedených klinických studií tuto hypotézu nepotvrdily. Studie NSABP C-08, která porovnávala režimy FOLFOX vs. FOLFOX + bevacizumab zaznamenala trend delšího DFS v rameni s bevacizumabem, avšak rozdíl nebyl statisticky signifikantní (**obrázek 13**) (HR: 0,87; $p=0,08$) [100]. Obdobné výsledky přinesla i evropská studie AVANT [101]. Na základě těchto výsledků není bevacizumab vhodný k zařazení do adjuvantní léčby. Obdobně neúspěšné byly protilátky proti EGFR. Účinnost cetuximabu v adjuvantní léčbě CRC byla zkoumána ve studii NCCTG N0147, jejíž výsledky neprokázaly zlepšení DFS ani OS [102].

U karcinomů rekta, podobně jako u karcinomů colon, může být podána adjuvantní chemoterapie u stadia III a u rizikových nádorů stadia II, ale úroveň důkazů o účinnosti je zde výrazně menší než u nádorů colon. V případě podání adjuvantní chemoterapie je doporučena celková doba trvání neoadjuvantní chemoradioterapie a následné adjuvantní chemoterapie 6 měsíců [93]. V případech, kdy nebyla u pacientů s karcinomem rekta stadia II a III použita neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapie, je tato léčebná modalita indikována v léčbě adjuvantní (viz **kapitola 8.3**).



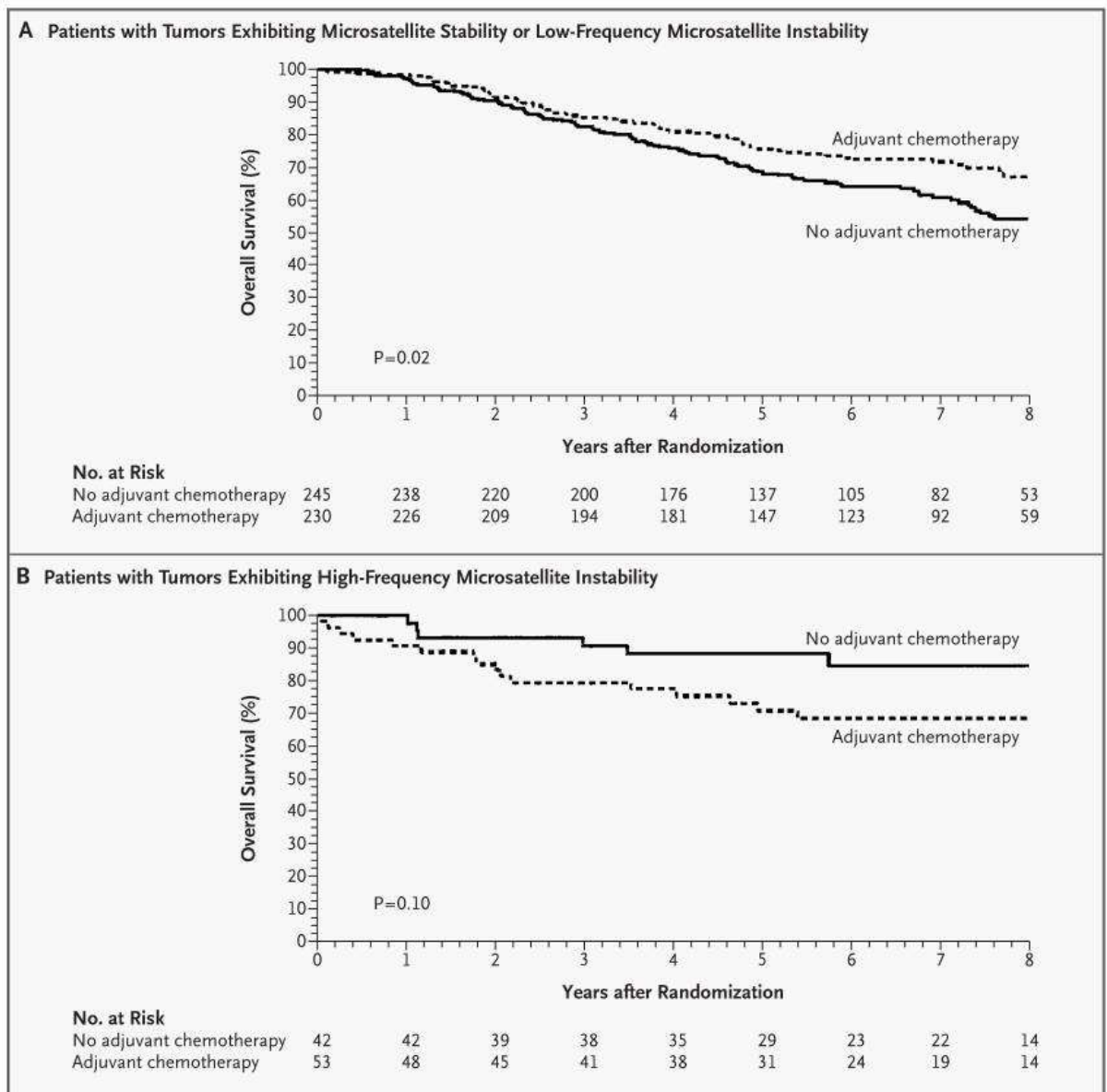
Obrázek 8 - Srovnání celkového přežití (OS) dle klinického stadia; u stádia II i dle rizikových faktorů

Převzato a upraveno podle: O'CONNOR E.S., et al., 2011 [92]

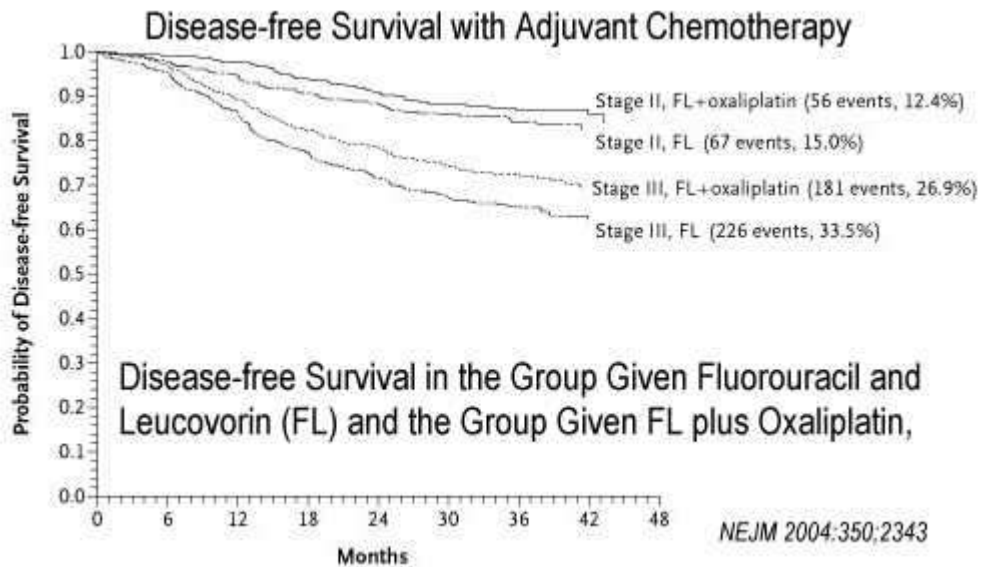


Obrázek 9 - Srovnání celkového přežití (OS) dle klinického stádia a podané adjuvantní chemoterapie (**A**: st. II bez rizikových faktorů, **B**: st. II s rizikovými faktory, **C**: st. III)

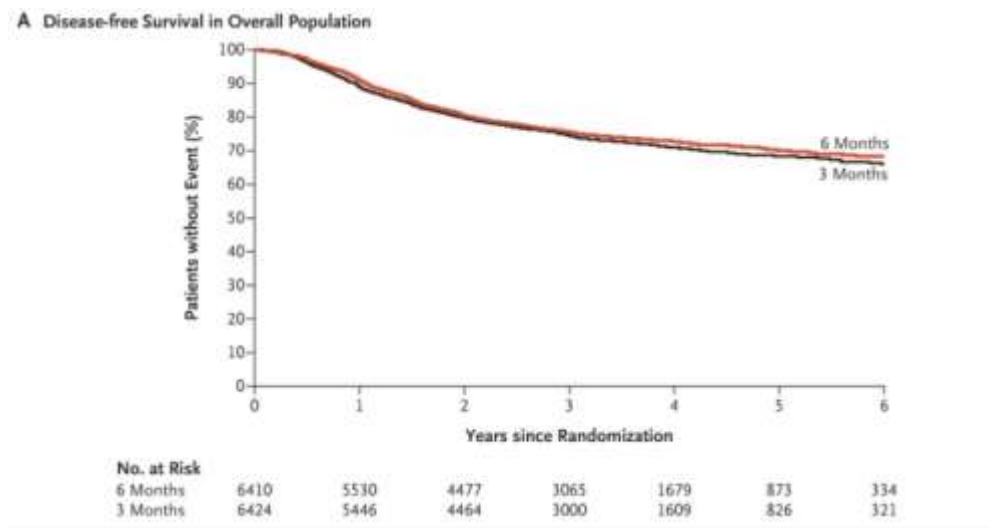
Převzato a upraveno podle: O'CONNOR E.S., et al., 2011 [92]



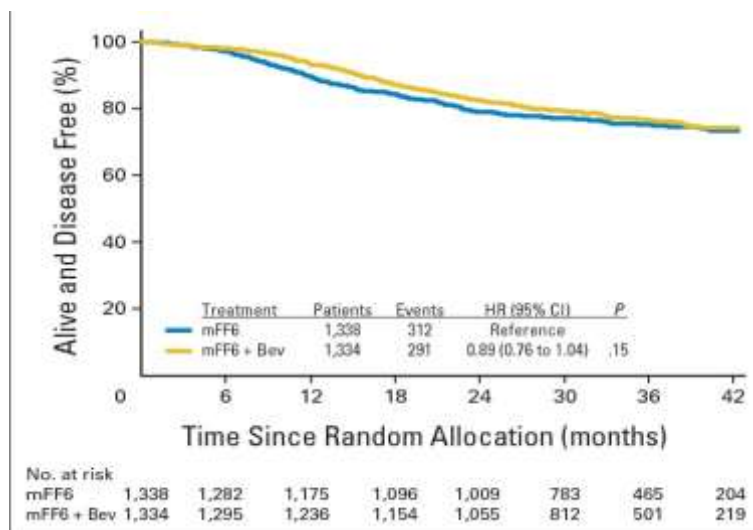
Obrázek 10 - Srovnání celkového přežití (OS) podle podání adjuvantní chemoterapie u pacientů II. a III. stadia s **MSS** karcinomy (**A**: dosaženo prodloužení OS při podání adjuvantní chemoterapie) a **MSI-H** karcinomy (**B**: nesignifikantní rozdíl, trend delšího OS u pacientů bez adjuvantní chemoterapie)
Převzato a upraveno podle: RIBIC C.M., et al., 2003 [94]



Obrázek 11 - Srovnání přežití bez nemoci (DFS) u pacientů léčených režimem FU/FA (5-fluorouracil + leukovorin - FL) a režimem FOLFOX (FL + oxaliplatin), se zohledněním klinického stadia
Převzato a upraveno podle: ANDRÉ T., et al., 2004 [96]



Obrázek 12 - Srovnání přežití bez nemoci (DFS) mezi pacienty stadia III podstupujícími adjuvantní chemoterapii FOLFOX/CAPOX ve tříměsíčním vs. šestiměsíčním režimu (celková populace) ve studii IDEA
Převzato a upraveno podle: GROTHEY A., et al., 2018 [99]



Obrázek 13 - Srovnání přežití bez nemoci (DFS) pacientů léčených adjuvantní chemoterapií FOLFOX (mFOLFOX6 = mFF6) a kombinací FOLFOX + bevacizumab (mFF6+Bev) ve studii NSABP C-08
Převzato a upraveno podle: ALLEGRA C., et al., 2011 [100]

9.2 Paliativní systémová léčba

Cílem paliativní systémové léčby je prodloužení života a zmírnění potíží, které nádorové onemocnění působí a současně snaha o udržení co nejvyšší kvality života pacienta. Tato léčba se týká zejména nemocných v metastatickém stádiu CRC (mCRC), případně pacientů s lokálně pokročilým inoperabilním onemocněním. Systémová léčba je sama o sobě velmi účinná, ale bohužel dosažení dlouhodobé remise přináší jen zřídka. Šanci na dlouhodobé přežití u pacientů s metastatickým postižením v poslední době zvyšuje rostoucí efektivita systémové léčby, většinou založené na kombinaci chemoterapie a léčby cílené a rovněž zlepšení možností léčby lokální, zahrnující resekční výkony i lokálně ablační metody. U pacientů s primárně resekabilním onemocněním je indikována radikální resekce bez předchozí systémové léčby. U potenciálně resekabilních nálezů je primárně indikována léčba systémová v podobě kombinace chemoterapie a cílené léčby s neoadjuvantním záměrem. Cílem je dosažení downstagingu a případná resekce následuje ihned, jakmile je to technicky možné, případně jsou zvažovány možnosti lokálně ablativních výkonů. U nemocných s neresekabilním metastatickým postižením v drtivé většině případů již není reálným cílem vyléčení, ale systémovou léčbou je možné dosáhnout významného prodloužení přežití a zlepšení kvality života těchto pacientů.

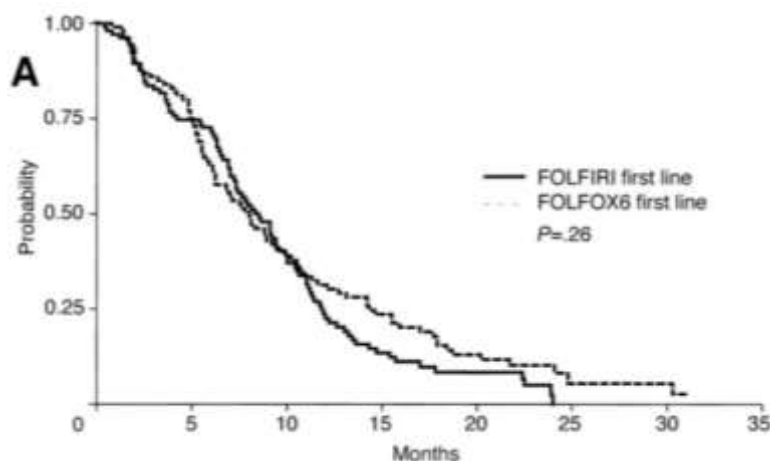
Volba optimální systémové léčby se odvíjí od řady parametrů. Je třeba zohlednit zejména cíl léčby (např. dosažení resekability nebo prodloužení délky života se snahou o zlepšení nebo zachování dobré kvality života), celkový stav pacienta, včetně věku a komorbidit a dále molekulárně-genetický profil vlastního nádorového onemocnění. Hlavním trendem v současné onkologii je personalizace léčby, která představuje snahu o maximální optimalizaci léčby daného pacienta za využití širokého spektra prognostických a zejména prediktivních faktorů. Na toto téma je zaměřena i výzkumná část předkládané dizertační práce.

9.2.1 Paliativní chemoterapie

Základním a nejdéle využívaným cytostatikem v adjuvantní i paliativní léčbě CRC je 5-fluorouracil (5-FU), který je kombinován s leukovorinem. Molekula 5-FU je považována za základní stavební kámen několika využívaných schémat. Jedná se o analog citidinu, který má v lidském těle relativně krátký biologický poločas (cca 10-25 min). Pro aplikaci jsou používány kontinuální infusní režimy, které jsou účinnější a méně toxické než režimy bolusové [103]. Účinnost 5-FU v monoterapii u mCRC dosahovala 10–15 % léčebných odpovědí s mediánem OS v délce 11–16 měsíců [104]. Nejčastějšími nežádoucími účinky léčby 5-FU jsou nevolnost, zvracení, mírná alopecie, průjmy, slizniční změny, kardio a hematologická toxicita (leukopenie, trombocytopenie). Léčebnou

alternativou infusního podání 5-FU může být tabletová forma jeho prekurzoru (prodrug) kapecitabinu, který je metabolizován třístupňovou selektivní konverzí na 5-FU. K vývoji kapecitabinu vedla snaha zvýšit účinnost a toleranci fluoropyrimidinových cytostatik. Jeho hlavní výhodou je perorální užití, které je pro pacienta pohodlnější a umožňuje léčbu u nemocných s insuficientním periferním žilním přístupem. Mezi nežádoucí účinky patří průjem, kožní změny (tzv. hand-foot syndrom), většinou mírná nauzea, případně zvracení. Tabletový kapecitabin nachází využití v adjuvantní i paliativní léčbě CRC v monoterapii nebo jako součást kombinačních režimů (CAPOX, CAPIRI) anebo v rámci konkomitantní radiochemoterapie.

Od 90. let 20. století přibýly v léčbě mCRC k samotnému 5-FU režimy založené na kombinaci s dalšími cytostatiky, které jsou označovány jako tzv. dublety. Sem patří kombinace s oxaliplatinou (**FOLFOX**, **CAPOX**), irinotekanem (**FOLFIRI**, **CAPIRI**), eventuálně tzv. triplet zahrnující kombinaci s oxaliplatinou a irinotekanem (**FOLFOXIRI**). Tímto rozšířením se zvyšuje šance na dosažení léčebné odpovědi a též je dosahováno prodloužení přežití pacientů. Bylo prokázáno, že režimy FOLFOX a FOLFIRI mají při léčbě mCRC první linie ekvivalentní efektivitu (**obrázek 14**), liší se však spektrem toxicity [105]. Pro oxaliplatinu jsou charakteristické polyneuropatie, jejichž riziko stoupá s kumulativní dávkou, pro irinotekan průjemy a alopecie. Následně byly obdobným způsobem zavedeny režimy založené na kapecitabinu (CAPOX, CAPIRI), které jsou stejně efektivní jako režimy založené na kontinuálním infusním podání 5-FU [106].



Obrázek 14 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) u pacientů s mCRC léčených v první linii paliativní léčby režimem FOLFIRI a režimem FOLFOX

Převzato a upraveno podle: TOURNIGAND C., et al., 2004 [105]

Z kombinačních schémat lze využít též režim FOLFOXIRI, což je intenzivní režim s vysokou účinností, ale zatížený relativně vysokou toxicitou [107].

Výše uvedené kombinační režimy představují v současnosti zlatý standard chemoterapie užívané k léčbě mCRC v první a druhé linii a jsou zde kombinované s cílenou léčbou.

9.3 Cílená léčba

Díky pokrokům, kterých bylo dosaženo při studiu nádorové biologie na molekulární úrovni, bylo umožněno detailně zmapovat řadu buněčných mechanismů, které jsou pro zhoubné nádory, do jisté míry, specifické, nebo na jejich úrovni dochází k významným dysregulacím. Protinádorová léčba zaměřená na takovéto specifické mechanismy je označována jako cílená léčba (*targeted therapy*). Obecným mechanismem účinku systémové chemoterapie je nejčastěji inhibice mitózy, enzymů a replikace DNA vedoucí k neselektivnímu poškození všech proliferujících buněk, tedy i buněk nenádorových. Na rozdíl od ní je cílená léčba zaměřena na více specifické molekuly či procesy, které jsou typické pro nádorové buňky. Vzniká tak nová generace léčiv, jejichž cílem je zasažení nádorové buňky na úrovni regulačních mechanismů většinou v podobě inhibice různých specifických signálních drah. Tím dochází ke zvýšení nejen efektu vlastního terapeutického zásahu, ale současně se snižuje riziko výskytu závažných nežádoucích účinků, které takovou léčbu provázejí. V následujícím textu bude představena cílená terapie, která je v současné době dostupná k léčbě mCRC a díky které došlo v posledních letech k výraznému prodloužení přežití pacientů s mCRC.

9.3.1 Cílená léčba zaměřená na blokádu angiogeneze

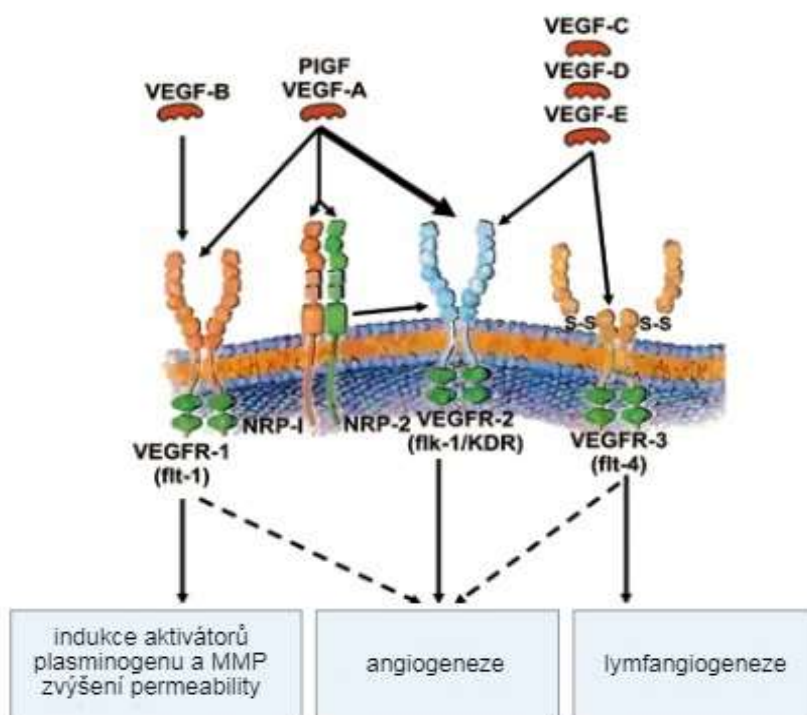
9.3.1.1 Nádorová angiogeneze

Novotvorba cév, tzv. angiogeneze, hraje velmi důležitou roli nejen při fyziologickém růstu a vývoji tkání, ale i při rozvoji nádorového onemocnění. Jedná se o proces podléhající složitým regulačním mechanismům. Za fyziologických podmínek je mezi pro- a anti-angiogenními faktory udržována rovnováha. V případě nádorové angiogeneze dochází poruše této rovnováhy, pro kterou je charakteristická nadprodukce množství pro-angiogenních faktorů, vedoucí k akcelеровané novotvorbě aberantních cév [108]. U novotvořených nádorových cév je endoteliální výstelka diskontinuální, klasická vaskulární hierarchie se ve srovnání s normálními cévami ztrácí, a to vede k extravazaci a následnému zvýšení intersticiálního tlaku v okolí. Nově vzniklé cévy tedy nejsou schopné dostatečně zásobovat nádorovou tkáň nutrienty a kyslíkem a odstraňovat vytvořené odpadní produkty. Morfologická i funkční insuficience novotvořeného

krevního řečiště, ve spojení s proliferační aktivitou a vysokým metabolickým obratem nádoru vede k lokální hypoxii, acidóze a dále tak dochází ke stimulaci produkce pro-angiogenních faktorů [109]. Tím pádem dochází zpětnovazebnou smyčkou k urychlení další neoangiogeneze a celý proces se dostává do bludného kruhu.

9.3.1.2 Signální dráha VEGF

Vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor - VEGF) a jeho buněčný receptor (vascular endothelial growth factor receptor - VEGFR) se zásadním způsobem podílejí na regulaci angiogeneze. **VEGF** má několik subtypů: -A, -B, -C, -D, dalším přirozeným ligandem **VEGFR** je placentární růstový faktor (placental growth factor - PIGF). Tyto klíčové pro-angiogenní růstové faktory se vážou na VEGFR, který má 3 izoformy, označované jako: VEGFR-1, -2 a -3. Jedná se o transmembránový buněčný receptor, který prostřednictvím své intracelulárně lokalizované tyrosinkinázové domény aktivuje specifické signální dráhy, které přímo nebo nepřímo vedou ke stimulaci angiogeneze. Interakce mezi VEGF-A a VEGFR-2 je považována za nejdůležitější proces při stimulaci nádorové angiogeneze (**obrázek 15**) [110].



Obrázek 15 - Signální dráhy vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF)

Převzato a upraveno podle: KLENER P., et al., 2010 [110]

9.3.1.3 Léčebné strategie blokády signální dráhy VEGF

Mnoho experimentálních i klinických studií prokázalo, že deregulovaná nádorová angiogeneze je významným terapeutickým cílem, kterého lze využít v léčbě širokého spektra pokročilých malignit, včetně mCRC [111]. Inhibice nádorové angiogeneze cestou blokády VEGF signalizace je možné dosáhnout na úrovni ligandu, receptoru nebo intracelulárních signálních drah (**obrázek 16**).

Blokáda na úrovni ligandu

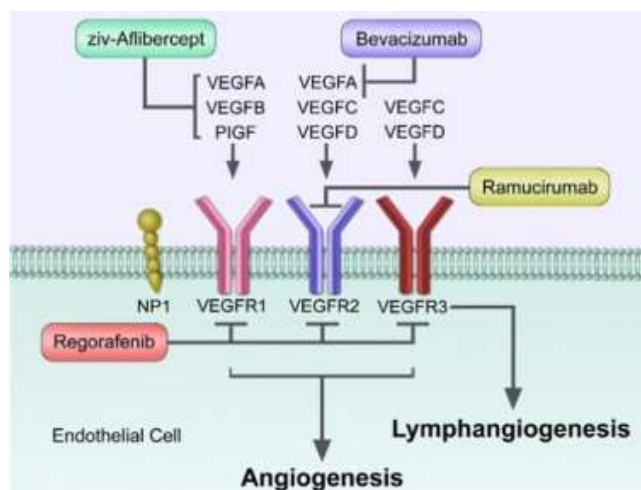
Tato strategie je založená na zablokování funkce přirozených ligandů VEGFR, respektive na inaktivaci těchto pro-angiogenních růstových faktorů. K tomu je možné použít monoklonální protilátky, které se vážou na VEGF a tím brání jeho vazbě na receptor. Mezi takové preparáty patří **bevacizumab**, který je široce používán v léčbě mCRC, ale i řady jiných malignit. Jinou strategií je využití umělého solubilního receptoru, který na sebe váže pro-angiogenní růstové faktory, čímž blokuje jejich funkční uplatnění. Do této skupiny patří **aflibercept**, což je chimérický klamný receptor na bázi VEGFR1/VEGFR2 fúzovaný s Fc fragmentem IgG1, který vychytává VEGF a PlGF. Tento mechanismus účinku je označován jako tzv. *VEGF trap* (past).

Blokáda na úrovni receptoru

Tato strategie je založená na zablokování funkce vlastního buněčného receptoru, tedy VEGFR. K tomu jsou využívány monoklonální protilátky zacílené proti VEGFR. Jejich vazbou na receptor dochází k jeho vyřazení z funkce a v konečném důsledku tak k blokádě VEGF signální dráhy. Mezi takové preparáty patří např. **ramucirumab**, což je humánní IgG1 monoklonální protilátka proti VEGFR-2.

Blokáda na úrovni intracelulárních signálních drah

Tato strategie je založená na zablokování VEGF signalizace na úrovni intracelulárních signálních drah. Toho je docíleno blokádou funkce signálních proteinů, většinou v podobě inhibice jejich kinázové aktivity. Preparátů této skupiny existuje velké množství a jsou využívány v léčbě různých malignit. V léčbě mCRC našel širší uplatnění **regorafenib**.



Obrázek 16 – Různé strategie blokády signální dráhy vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF)

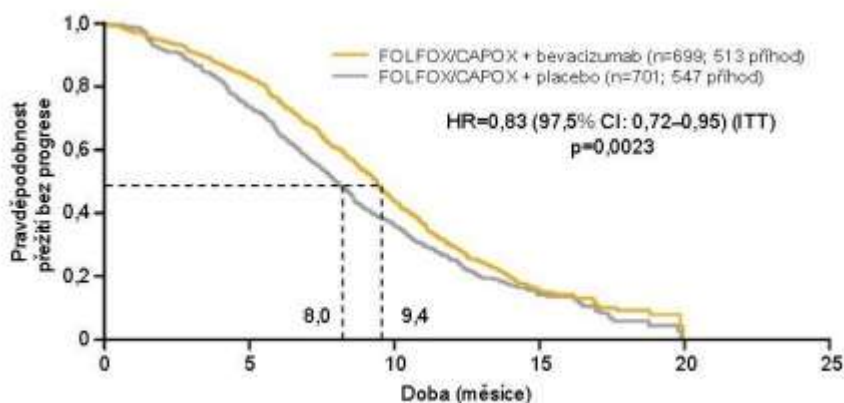
Převzato a upraveno podle: CLARKE J.M., et al., 2014

9.3.1.4 Antiangiogenní léčba mCRC

Bevacizumab

Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná IgG-1 monoklonální protilátka, která se váže na VEGF-A. Tímto mechanismem dochází k blokádě vazby jednoho z nejvýznamnějších pro-angiogenních růstových faktorů na svůj buněčný receptor, VEGFR-2, což v konečném důsledku vede k blokádě angiogeneze. Ke schválení užití bevacizumabu v 1. linii léčby mCRC vedla v roce 2004 poněkud kontroverzní randomizovaná klinická studie fáze III, která hodnotila přidání bevacizumabu k tehdy využívanému bolusovému režimu IFL (irinotekan, 5-FU, leukovorin). V této studii došlo přidáním bevacizumabu k signifikantnímu prodloužení OS z 15,6 (u chemoterapie samotné) na 20,3 měsíců (HR: 0,66, $p < 0,001$) [112]. Obdobných výsledků bylo následně dosaženo i při využití, dnes již standardně používané, chemoterapie FOLFOX [113]. Účinnost bevacizumabu potvrdila randomizovaná studie III. fáze s označením NO16966, která porovnávala 1400 pacientů s mCRC léčených režimem CAPOX/FOLFOX v kombinaci s bevacizumabem nebo placebem. U režimů s bevacizumabem došlo k signifikantnímu prodloužení PFS o 1,4 měsíce (**obrázek 17**) [114]. Výsledky metaanalýzy 29 studií (3502 pacientů) potvrzují efektivitu bevacizumabu i v kombinaci s režimem FOLFIRI (ORR 51,4 %, medián PFS: 10,8 měsíců, medián OS: 23,7 měsíců) [115]. Mezi nejčastější nežádoucí účinky bevacizumabu patří hypertenze (nově vzniklá, nebo akcelerace preexistující hypertenze), riziko krvácení a proteinurie. Samotná léčba bevacizumabem signifikantně nezvyšuje riziko vzniku tromboembolie [116]. Nicméně pokud se tato komplikace v průběhu léčby vyskytne, léčbu bevacizumabem je vhodné ukončit. Bevacizumab též

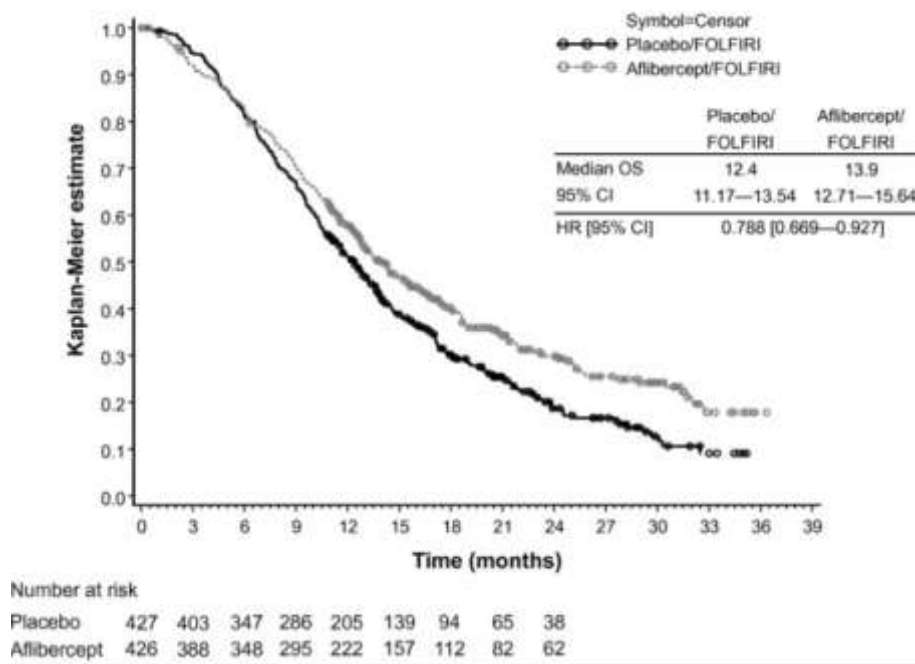
nepříznivým způsobem ovlivňuje hojení ran. Jelikož má relativně dlouhý biologický poločas (cca 20 dnů s individuální variabilitou 11 až 50 dnů), doporučuje se bevacizumab vysadit minimálně 4, lépe však 6 týdnů před plánovaným chirurgickým výkonem, a naopak zahájena by měla být nejdříve 4 týdny po výkonu.



Obrázek 17 - Srovnání přežití bez progresse (PFS) při užití režimů FOLFOX/CAPOX s bevacizumabem nebo s placebem ve studii NO16966
Převzato a upraveno podle: PETRELLI F., et al., 2015 [114]

Aflibercept

Aflibercept je rekombinantní fúzní protein, ve kterém jsou ligand-vázající domény receptorů VEGFR-1 a VEGFR-2 navázány na Fc fragment lidského IgG1. Tímto způsobem vytvořený fúzní protein funguje jako past (*trap*) vycytávající cirkulující VEGF-A, VEGF-B a PlGF. Účinnost afliberceptu byla prokázána v randomizované klinické studii III. fáze s označením VELOUR (**obrázek 18**). Zde bylo dosaženo prodloužení mediánu OS podobně jako u výše zmíněné studie NO16966 o 1,4 měsíce (13,5 vs. 12,1 měsíců, $p=0,003$) [117]. Mezi nejčastěji popisované nežádoucí účinky afliberceptu patří hypertenze, průjem, infekční komplikace, tromboembolismus a únava [118].

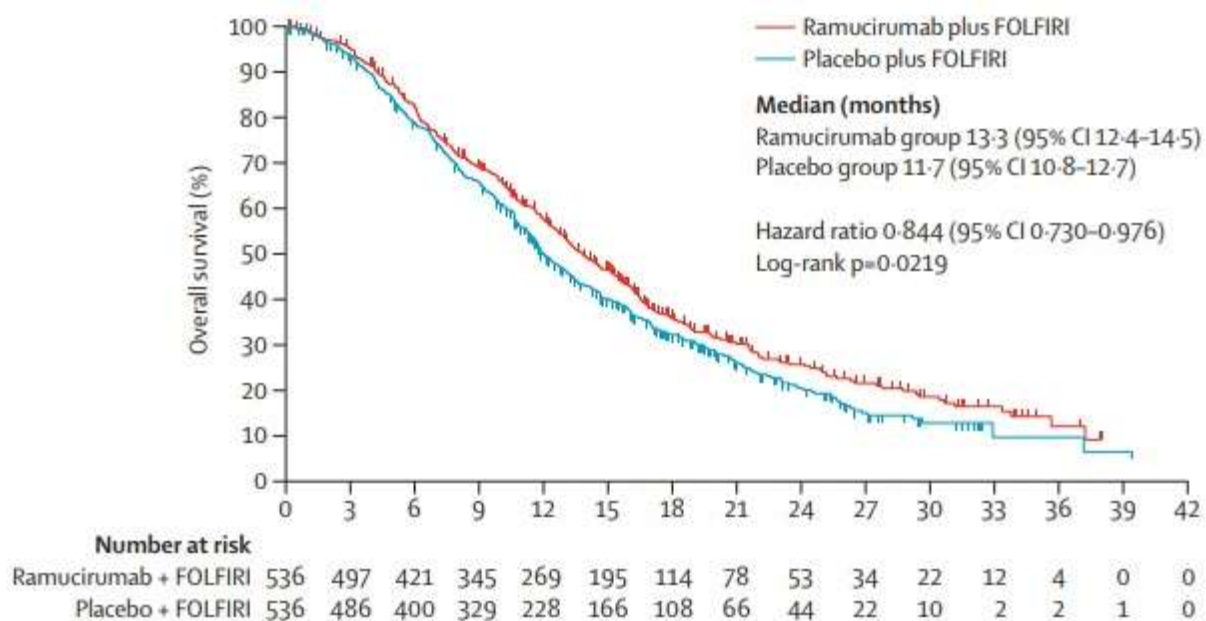


Obrázek 18 - Celkové přežití (OS) u pacientů léčených kombinací afibercept a FOLFIRI ve srovnání s FOLFIRI a placebo ve studii VELOUR

Převzato a upraveno podle: TABERNERO J., et al., 2014 [117]

Ramucirumab

Ramucirumab je plně humánní monoklonální protilátka proti extracelulární doméně receptoru VEGFR-2. Jeho účinnost byla potvrzena v klinické studii III. fáze s názvem RAISE (**obrázek 19**), kdy po přidání ramucirumabu k chemoterapii FOLFIRI, bylo pozorováno signifikantního prodloužení mediánu OS o 1,6 měsíce (13,3 vs. 11,7 měsíce, $p=0,02$) a mediánu PFS o 1,2 měsíce (5,7 vs. 4,5 měsíce, $p<0,0005$) [119]. Mezi nejčastěji popisované nežádoucí účinky patří neutropenie, hypertenze, průjem a únava.

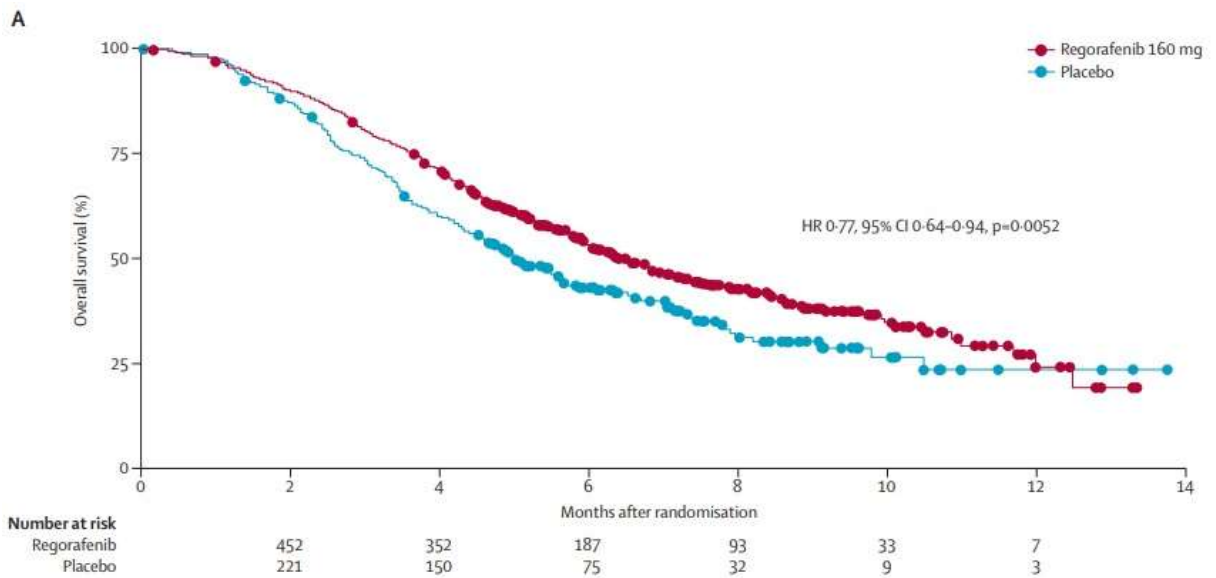


Obrázek 19 - Celkové přežití (OS) u pacientů léčených kombinací ramucirumab a FOLFIRI ve srovnání s FOLFIRI a placebo ve studii RAISE

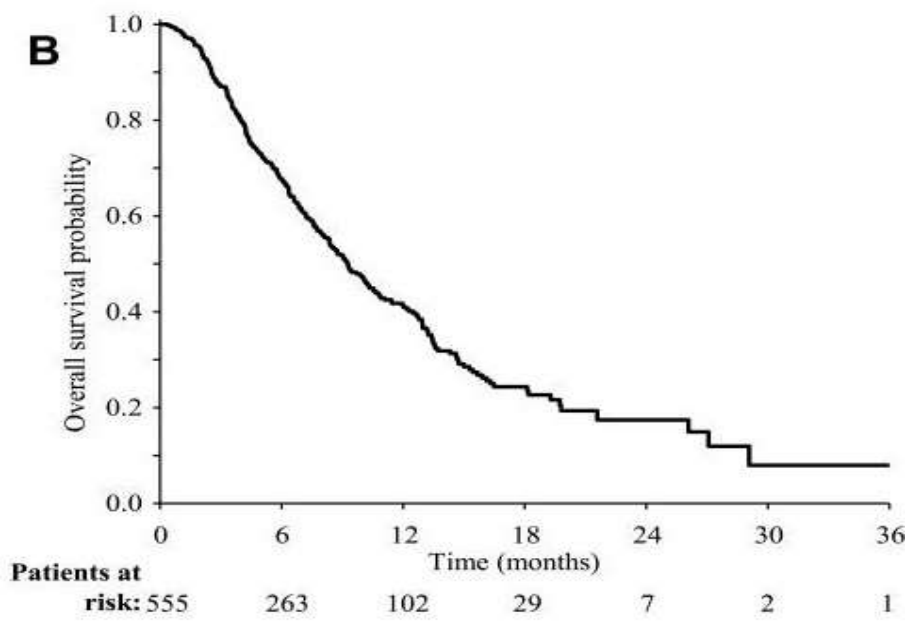
Převzato a upraveno podle: TABERNERO J., et al., 2015 [119]

Regorafenib

Regorafenib je nízkomolekulární multikinázový inhibitor, který blokuje kinázovou aktivitu VEGFR (-1, -2 i -3) a receptoru pro růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor, FGFR). Účinnost regorafenibu byla potvrzena v randomizované klinické studii fáze III CORRECT. Jednalo se o studii, ve které bylo při porovnání s placebem u pacientů po selhání léčebných režimů s oxaliplatinou, irinotekanem, ev. kombinace s cílenou léčbou, prokázáno prodloužení mediánu OS (6,4 vs. 5,0 měsíce, $p=0,005$) a mediánu PFS (1,9 vs. 1,7 měsíce, $p<0,000001$) (**obrázek 20**) [120]. Další studie, která potvrdila obdobné výsledky byla studie fáze IIIb s označením CONSIGN [121]. Výsledky rozsáhlé retrospektivní studie z ČR ukazují medián PFS 3,5 měsíce a OS 9,3 měsíce (**obrázek 21**) [122]. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří kožní reakce, průjemy, hypertenze, elevace jaterních testů a únava.



Obrázek 20 - Srovnání celkového přežití (OS) u pacientů léčených regorafenibem oproti placebu ve studii CORRECT
Převzato a upraveno podle: GROTHEY A., et al., 2013 [120]



Obrázek 21 - Celkové přežití (OS) pacientů s mCRC léčených regorafenibem v českém registru CORECT
Převzato a upraveno podle: NOVAKOVA-JIRESOVA A., et al., 2020 [122]

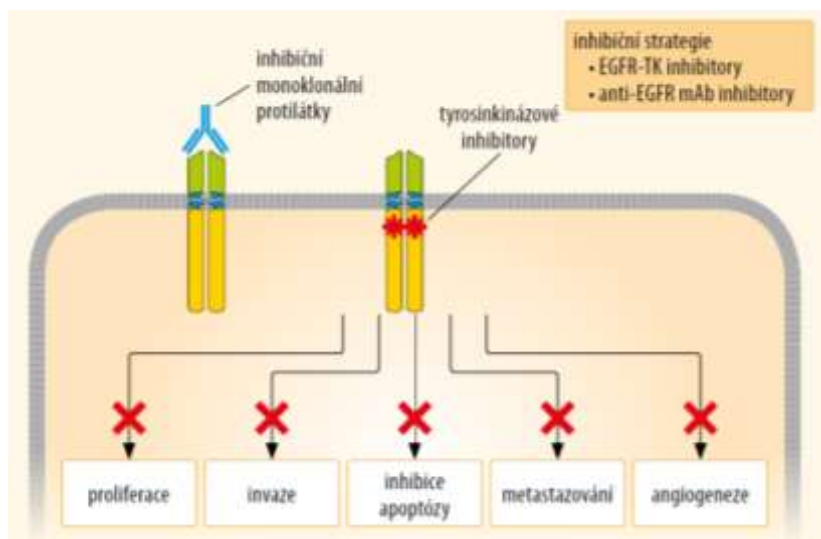
9.3.2 Cílená léčba zaměřená na blokádu EGFR signální dráhy

9.3.2.1 Signální dráha EGFR

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) patří do rodiny transmembránových tyrozinkinázových receptorů označované jako **HER** (human EGFR related) nebo také **ErbB** (Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog). V této rodině jsou celkem čtyři typy receptorů: **HER1 (EGFR, ErbB1)**, **HER2/neu (ErbB2)**, **HER3 (ErbB3)** a **HER4 (ErbB4)**. EGFR je transmembránový receptor s tyrozinkinázovou doménou lokalizovanou na intracelulární části, jehož aktivace vede ke spuštění několika intracelulárních signálních kaskád. Sem patří zvláště kaskáda **RAS/RAF/MAPK** (Mitogen-Activated Protein Kinase), která vede zejména ke stimulaci buněčné proliferace a dále pak kaskáda **PI3K-AKT**, která vede převážně k inhibici apoptózy. EGFR signalizace má klíčový význam v regulaci mnoha důležitých buněčných procesů jako je proliferace, přežívání, apoptóza a schopnost migrace jak zdravých, tak nádorových buněk sliznice kolorekta [123, 124]. S dysregulací EGFR signální dráhy na různé úrovni se můžeme setkat u různých zhoubných nádorů, včetně CRC, kde je overexprese EGFR detekovatelná u cca 50 % případů a dále se zde často setkáváme s řadou mutací genů, které kódují významné signální proteiny zapojené do této dráhy, jako jsou RAS, BRAF, PTEN, PI3K atd. Tyto dysregulace sehrávají významnou roli v kancerogenezi a často jsou spojeny s agresivním chováním nádoru, rychlou progresí onemocnění, horší prognózou a sníženou citlivostí k chemoterapii nebo některým typům cílené léčby (viz **kapitola 10.1**) [125].

9.3.2.2 Léčebné strategie blokády signální dráhy EGFR

Aktivita EGFR signální dráhy sehrává velmi důležitou roli v biologickém chování nádoru, zejména z hlediska regulace proliferace a apoptózy. S abnormálně zvýšenou aktivitou této signální dráhy se můžeme setkat u celé řady malignit, včetně CRC, jak bylo uvedeno výše. Inhibice dysregulované EGFR signalizace u solidních nádorů tak představuje významnou a efektivní možnost cílené léčby, která se v léčbě mCRC významně etablovala. Blokády EGFR signální dráhy na úrovni receptoru je možné dosáhnout dvěma odlišnými přístupy, které představují blokádu aktivity extracelulární domény receptoru vazbou monoklonální protilátky a blokádu tyrozinkinázové domény receptoru kinázovým inhibitorem (**obrázek 22**).



Obrázek 22 - Strategie blokády signalizace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR)

Převzato a upraveno podle: FIALA O., et al., 2019

Blokáda na úrovni extracelulární domény receptoru

Zablokování funkce receptoru na úrovni jeho extracelulární domény vazbou cílené monoklonální protilátky (např. cetuximab, panitumumab) vede ke znemožnění vazby přirozeného ligandu na tento receptor, a tak dochází k inhibici aktivace celé této signální dráhy. Tento přístup nachází významné uplatnění v léčbě mCRC u pacientů s nádory wtRAS (prediktivní význam RAS mutací je detailně popsán v kapitole 10.1). V této indikaci jsou široce používány anti-EGFR monoklonální protilátky, většinou v kombinaci s chemoterapií.

Blokáda na úrovni intracelulární tyrosinkinázové domény receptoru

Blokáda na úrovni intracelulární tyrosinkinázové (TK) domény receptoru pomocí nízkomolekulárních inhibitorů, tzv. EGFR TKI (např. erlotinib, gefitinib, afatinib) vede k inhibici aktivity receptoru v oblasti jeho TK domény a důsledkem je zablokování přenosu signálu od receptoru na další signální proteiny EGFR dráhy.

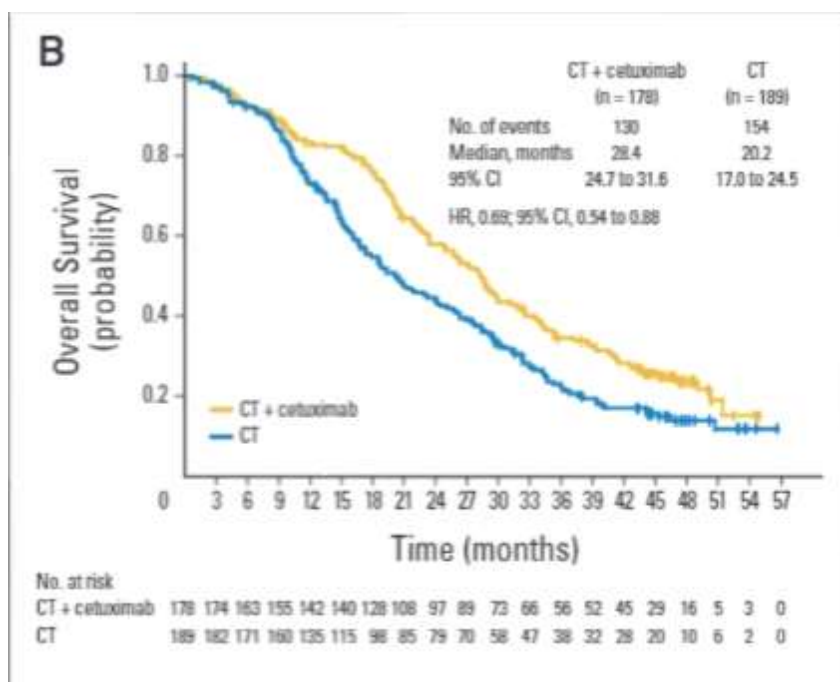
9.3.2.3 Anti-EGFR terapie v léčbě mCRC

Cetuximab

Cetuximab je chimérická monoklonální rekombinantní protilátka IgG1, která je složena z části lidské a části myší. Váže se na extracelulární doménu receptoru. Po zablokování EGFR cetuximabem dochází k inhibici aktivace signálních drah EGFR, což vede k inhibici buněčné proliferace a k indukci apoptózy [124]. Pilotní studie s cetuximabem byla publikována již v roce 2004. Zde byli zařazeni nemocní po selhání léčby irinotekanem, kteří byli randomizováni do dvou ramen. V prvním

byli pacienti léčeni kombinací cetuximab + irinotekan, což bylo i přes předešlé selhání léčby tímto přípravkem. Ve druhém rameni pak byli nemocní léčeni pouze cetuximabem v monoterapii. ORR při kombinaci irinotekan + cetuximab byla 22,9 % vs. 10,8 % u monoterapie cetuximabem ($p=0,007$). Medián PFS byl 4,1 vs. 1,5 měsíce ($p=0,01$) ve prospěch kombinace irinotekan + cetuximab. Medián OS byl 8,6 měsíce v kombinaci vs. 6,9 měsíce při monoterapii cetuximabem ($p=0,48$) [126]. Randomizovaná klinická studie fáze III CRYSTAL u pacientů s mCRC prokázala, že po přidání cetuximabu k režimu FOLFIRI v první linii dochází v porovnání se samotnou chemoterapií ke zlepšení ORR 57,3 % vs. 39,7 %, mediánu PFS (9,9 vs. 8,4 měsíce, HR: 0,70; $p=0,0012$) i OS (23,5 vs. 20 měsíců, HR: 0,80; $p=0,0093$) u neselektované populace pacientů. U pacientů s nádory wtKRAS bylo ORR 66,3 % vs. 38,6 %, medián PFS byl 11,4 vs. 8,4 měsíce (HR: 0,56; $p<0,001$) a medián OS 28,4 vs. 20,2 měsíce (HR: 0,69; $p=0,0024$) ve prospěch kombinace FOLFIRI + cetuximab (**obrázek 23**) [127]. Cetuximab má pro kombinaci s režimy na bázi oxaliplatiny oporu ve výsledcích randomizovaných studií OPUS a COIN. OPUS byla studie fáze II, kde byla ramena cetuximab + FOLFOX vs. samostatný FOLFOX. Medián PFS byl 8,3 vs. 7,2 měsíce (HR 0,567; $p=0,0064$) a medián OS 22,8 vs. 18,5 měsíce (HR: 0,855; $p=0,39$) [128]. COIN byla klinická studie fáze III, kde byla srovnávána ramena cetuximab + oxaliplatina + 5-FU/kapecitabin vs. oxaliplatina + 5-FU/kapecitabin. Medián PFS byl 8,6 vs. 8,6 měsíce (HR: 0,96; $p=0,60$) a medián OS 19,9 vs. 20,1 měsíce (HR: 1,02; $p=0,86$) [129]. Naopak studie NORDIC-VII neprokázala signifikantní zlepšení ORR, PFS ani OS při přidání cetuximabu k dnes již obsolentnímu bolusovému režimu FLOX [130]. Několik dalších studií prokázalo efektivitu cetuximabu v dalších liniích léčby mCRC (v monoterapii i v kombinaci s chemoterapií). Studie CO.17 prokázala zlepšení mediánu OS při podání cetuximabu v monoterapii oproti samotné podpůrné léčbě, další studie však prodloužení OS neprokázaly [131]. Mezi hlavní nežádoucí účinky cetuximabu patří kožní reakce, které se objevují u více než 80 % pacientů. Projevují se především jako akneiformní papulopustulózní exantém, hypertrichóza, deskvamace či pruritus. Mezi závažné komplikace léčby patří anafylaktická reakce po podání cetuximabu.

V současné době je cetuximab užíván k léčbě pacientů s mCRC s wtRAS v první i druhé linii léčby v kombinaci s chemoterapií FOLFOX nebo FOLFIRI, případně v monoterapii (po selhání léčby oxaliplatinou a irinotekanem).



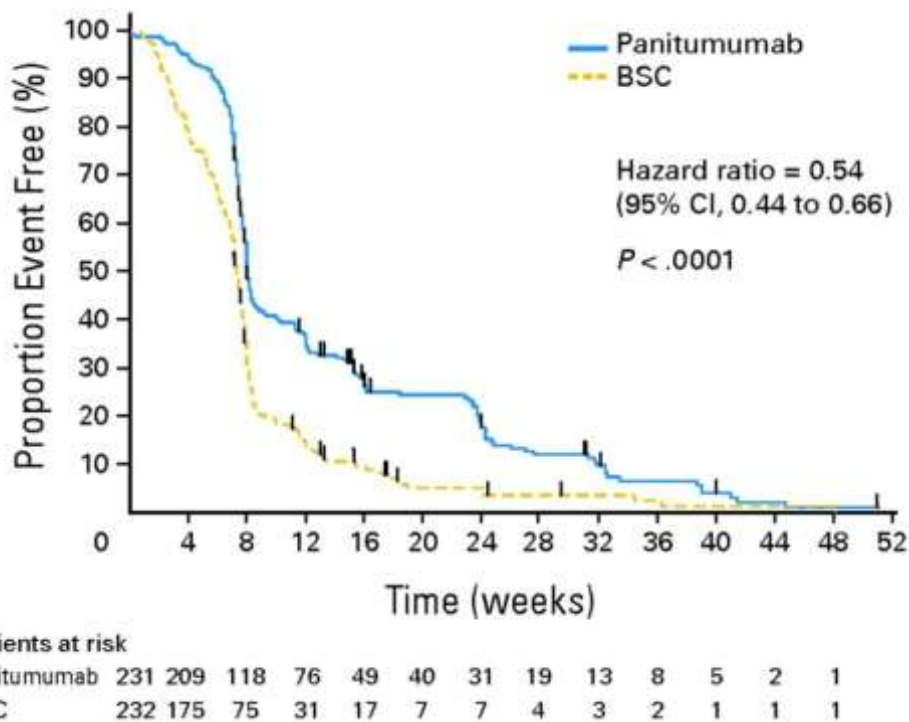
Obrázek 23 - Srovnání celkového přežití (OS) u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených kombinací cetuximabu s chemoterapií FOLFIRI ve srovnání s chemoterapií samotnou ve studii CRYSTAL

Převzato a upraveno podle: VAN CUTSEM E., et al., 2015 [127]

Panitumumab

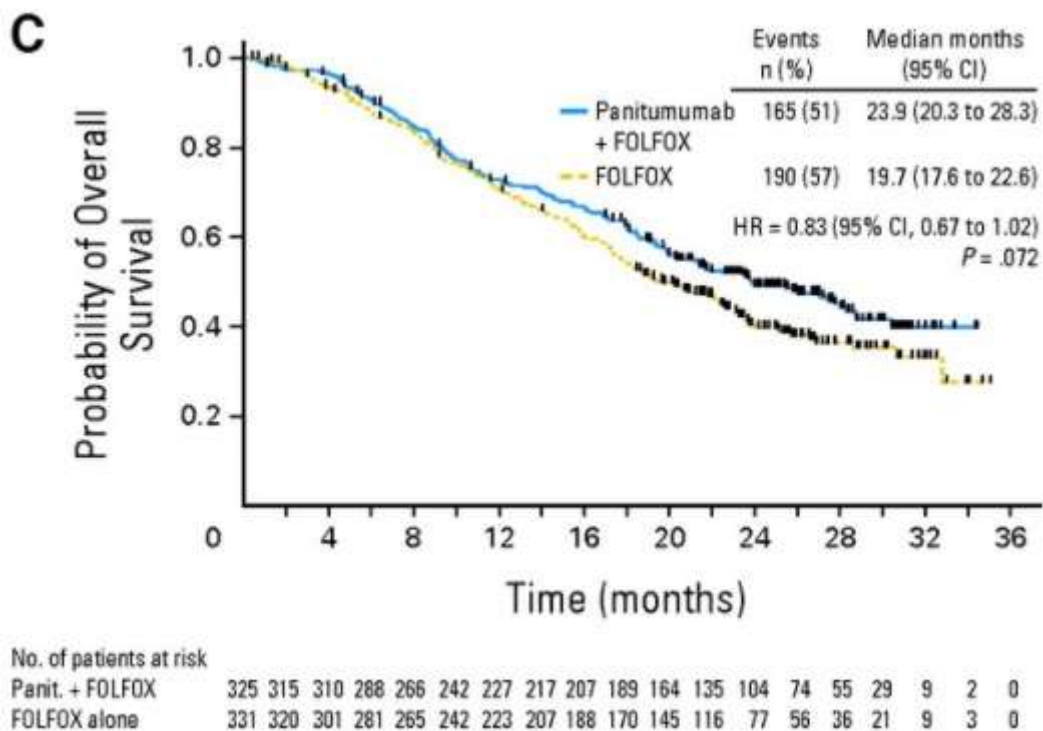
Panitumumab je plně humanizovaná monoklonální protilátka typu IgG2, která se váže na jiný epitop extracelulární domény EGFR než cetuximab a působí jako kompetitivní antagonisté ligandů EGFR. V open-label studii Van Cutsema fáze III z roku 2007 byl hodnocen panitumumab v porovnání s podpůrnou terapií u nemocných po selhání chemoterapie. Prodloužení OS bylo patrné jen u nemocných s wtKRAS nádory, medián OS v tomto případě činil 12,3 vs. 7,3 týdne (HR: 0,45; $p=0,0001$) (**obrázek 24**), u mutované formy KRAS byly výsledky v obou ramenech srovnatelné (7,4 vs. 7,3 týdne; HR: 0,99; NS) [132]. Klíčový význam pro terapeutické využití panitumumabu u mCRC měla studie fáze III, PRIME, která hodnotila panitumumab v kombinaci s chemoterapií v první linii léčby mCRC. Celkem 1183 nemocných bylo randomizováno k léčbě režimem FOLFOX vs. FOLFOX + panitumumab. U wtKRAS populace bylo zaznamenáno vyšší ORR v režimu s panitumumabem (48 % vs. 55 %) a OS bylo signifikantně delší též v rameni s panitumumabem (19,7 vs. 23,9 měsíce) (**obrázek 25**). U populace s mKRAS byly PFS i OS v rameni s panitumumabem kratší (19,2 vs. 15,5 měsíce, HR 1,17, $p=0,14$) [133]. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří kožní toxicita, která postihuje asi 90 % nemocných léčených panitumumabem. Obdobně jako u cetuximabu se jedná o výsev papulopustulozního exantému. Další udávané nežádoucí účinky jsou průjem, iontové dysbalance (hypomagnezemie,

hypokalcemie, hypokalemie), bolesti břicha, únava a dehydratace. Panitumumab je používán k léčbě mCRC u pacientů s nádory wtRAS v první nebo druhé linii v kombinaci s chemoterapií FOLFOX nebo FOLFIRI, případně v monoterapii u pacientů předléčených režimy na bázi oxaliplatinu a irinotekanu.



Obrázek 24 - Přežití bez progresu (PFS) u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených panitumumabem ve srovnání s podpůrnou léčbou (BSC)

Převzato a upraveno podle: VAN CUTSEM E., et al., 2007 [132]



Obrázek 25 - Celkové přežití (OS) u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem wtKRAS léčených kombinací panitumumabu s chemoterapií FOLFOX ve srovnání se samotnou chemoterapií ve studii PRIME

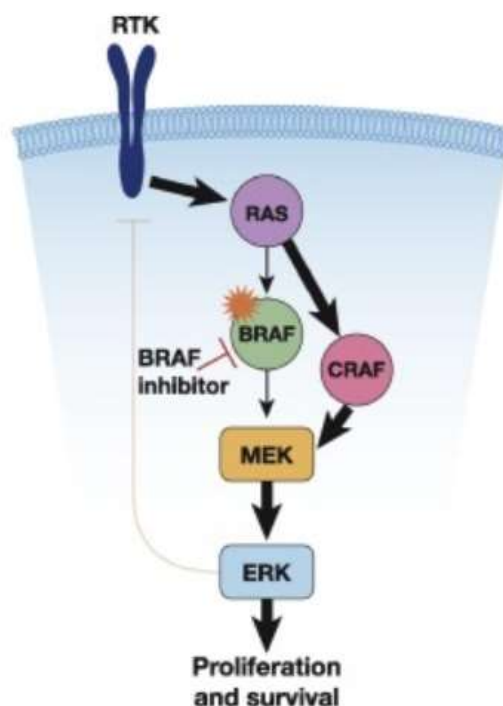
Převzato a upraveno podle: DOUILLARD J.Y., et al., 2010 [133]

9.3.3 Cílená léčba zaměřená na blokádu BRAF

9.3.3.1 BRAF signalizace a mutace BRAF u CRC

BRAF představuje významný intracelulární signální protein zapojený do signální dráhy **RAS/RAF/MEK/ERK**, kde funguje jako přenašeč signálu, díky své serin-threonin kinázové aktivitě [134]. Mutace onkogenu BRAF vede ke konstitutivní aktivaci signalizace MEK/ERK stimulující proliferaci. Výskyt mutací onkogenu BRAF je u CRC udáván kolem 5–15 % [135, 136]. Karcinomy s mutací BRAF (mBRAF) mají některé specifické charakteristiky, které jsou detailně popsány v **kapitole 10.1.2**. Mutace BRAF jsou typicky asociovány s obecně nepříznivou prognózou CRC, a to jak u lokalizovaných, tak u metastatických stádií [137, 138].

Inhibice aberantní aktivity mutovaného BRAF představuje efektivní nástroj cílené léčby u takto charakterizovaných nádorů různého typu, včetně CRC. Terapeuticky se zde využívají nízkomolekulární kinázové inhibitory (**obrázek 26**). V léčbě mCRC se tyto preparáty intenzivně testují a některé byly již zavedeny i do klinické praxe.



Obrázek 26 - Schéma znázorňující přenos signálu dráhy RAS/RAF/MEK/ERK a místo působení BRAF inhibitoru

Převzato a upraveno podle: STRICKLER J.H., et al., 2017

9.3.3.2 BRAF inhibitory v léčbě mCRC

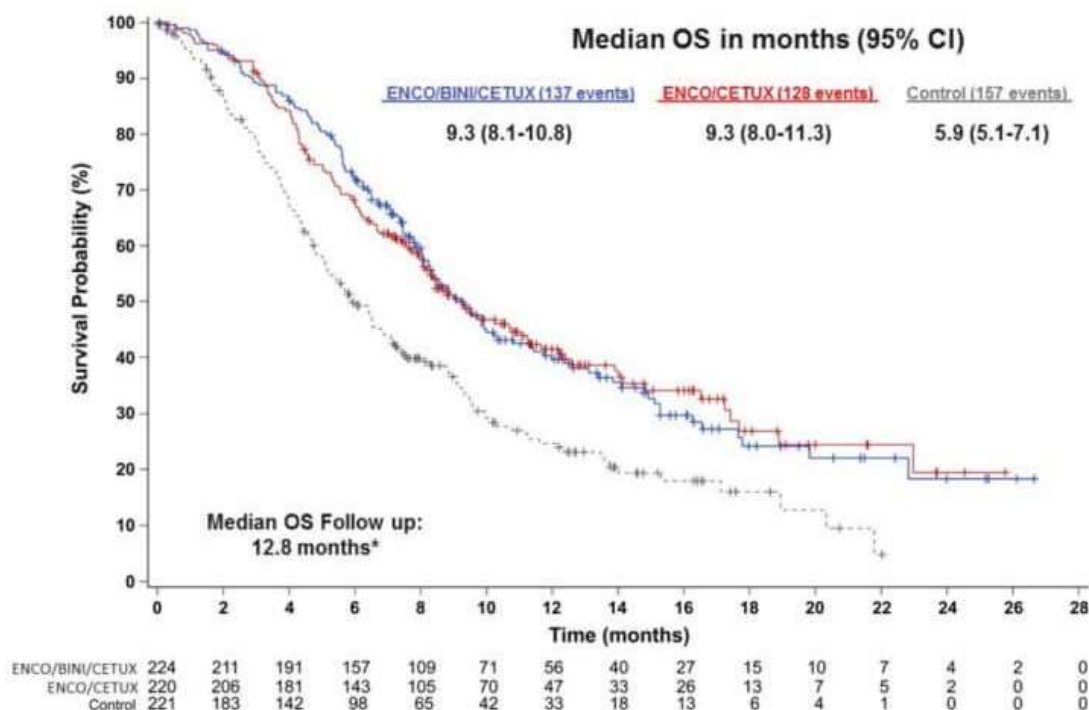
První testovanou molekulou pro léčbu mCRC byl **vemurafenib**, který se do té doby běžně používal s dobrými výsledky u metastatického melanomu s BRAF mutací. Výsledky testování tohoto preparátu v monoterapii u pacientů s mBRAF mCRC však neprokázaly očekávaný efekt. Pilotní studie fáze II, ve které byli pacienti s mBRAF mCRC po selhání předchozí léčby léčeni monoterapií vemurafenibem ukázala dosažení PR pouze u jediného z 21 léčených pacientů, u sedmi dalších došlo ke stabilizaci onemocnění [139]. Optimističtější výsledky následně přinesla randomizovaná studie fáze II s označením SWOG 1406. V této studii byli pacienti s mBRAF mCRC předlášeni jednou až dvěma liniemi systémové léčby a byli randomizováni k léčbě kombinací irinotekan + cetuximab nebo kombinaci irinotekan + cetuximab + vemurafenib. Celkem bylo zařazeno 106 pacientů. Léčba kombinací irinotekan + cetuximab + vemurafenib vedla k výraznému prodloužení PFS, kdy medián ve zkušebním rameni činil 4,4 měsíce oproti 2,0 měsícům v rameni s irinotekanem + cetuximabem (HR: 0,42; $p < 0,001$) [140].

Dalším zkoušeným preparátem je **enkorafenib**. Jeho účinek zkoumala multicentrická studie fáze III s názvem BEACON. V té bylo zařazeno 665 pacientů s mBRAF (V600E) mCRC, předlášeni jednou či více liniemi systémové léčby. Pacienti byli rozděleni do 3 ramen. V prvním rameni byli pacienti léčeni tripletem (enkorafenib + binimetinib + cetuximab), ve druhém rameni dubletem (enkorafenib + cetuximab) a v kontrolní skupině dle preferencí investigátora, který mohl zvolit cetuximab + irinotekan nebo cetuximab + FOLFIRI. Výsledky studie ukázaly výrazné prodloužení OS i PFS u obou ramen s kombinací léčbou zahrnující enkorafenib v porovnání s léčbou kombinací cetuximab + chemoterapie na bázi irinotekanu.

Poslední publikovaná data ukazují medián OS 9,3 měsíce pro dublet enkorafenib + cetuximab, stejně tak 9,3 měsíce pro triplet enkorafenib + binimetinib + cetuximab vs. 5,9 měsíce pro kontrolní rameno cetuximab + chemoterapie (HR (triplet vs. kontrolní rameno): 0,60; HR (dublet vs. kontrolní rameno): 0,61; $p < 0,001$) (**obrázek 27**). Obdobně slibné výsledky byly dosaženy i u PFS [141]. Tato data ukazují, že obě kombinace s enkorafenibem jsou výrazně účinnější než léčba cetuximabem a chemoterapií a zároveň to, že je srovnatelná efektivita dubletu enkorafenib + cetuximab a tripletu enkorafenib + cetuximab + binimetinib.

Využití BRAF inhibitorů v prvolinové léčbě mBRAF mCRC je v současné době intenzivně zkoumáno. S napětím jsou očekávány zejména výsledky probíhající klinické studie fáze III, BREAKWATER. Účelem této multicentrické, randomizované studie fáze III je vyhodnotit, zda kombinace cílené léčby enkorafenib + cetuximab nebo jejich kombinace s chemoterapií, mohou zlepšit

klinické výsledky ve srovnání se současnou standardní léčbou (chemoterapie +/- bevacizumab) u pacientů s dříve neléčeným mBRAF mCRC [142].



Obrázek 27 - Srovnání celkového přežití (OS) pacientů léčených tripletem enkorafenib + cetuximab + binimetinib oproti pacientům léčeným dubletem enkorafenib + cetuximab a oproti kontrolní skupině léčené chemoterapií

Převzato a upraveno podle: KOPETZ S., et al., 2020 [141]

9.3.4 Cílená léčba zaměřená na blokádu HER2/neu

9.3.4.1 HER2/neu receptor a HER2/neu overexprese/amplifikace u CRC

HER2/neu je transmembránový receptor z rodiny HER, do které dále patří receptory HER1 (EGFR), HER3 a HER4. Při aktivaci těchto receptorů dochází k jejich párování, vznikají tak homo- nebo heterodiméry. V této podobě dochází k aktivaci tyrozinkinázové intracelulární domény receptoru a následně k dalšímu přenosu signálu a aktivaci dalších signálních drah (viz kapitola 9.3.2). Hlavní úlohou HER2/neu je účast na tvorbě heterodimérů, kdy funguje jako vazebný partner pro další receptory rodiny HER.

Zvýšená exprese (tzv. *overexprese*) HER2/neu, jejíž genetickou podstatou je amplifikace (zmnožení kopií) daného genu, může vést k zesílení mitogenních

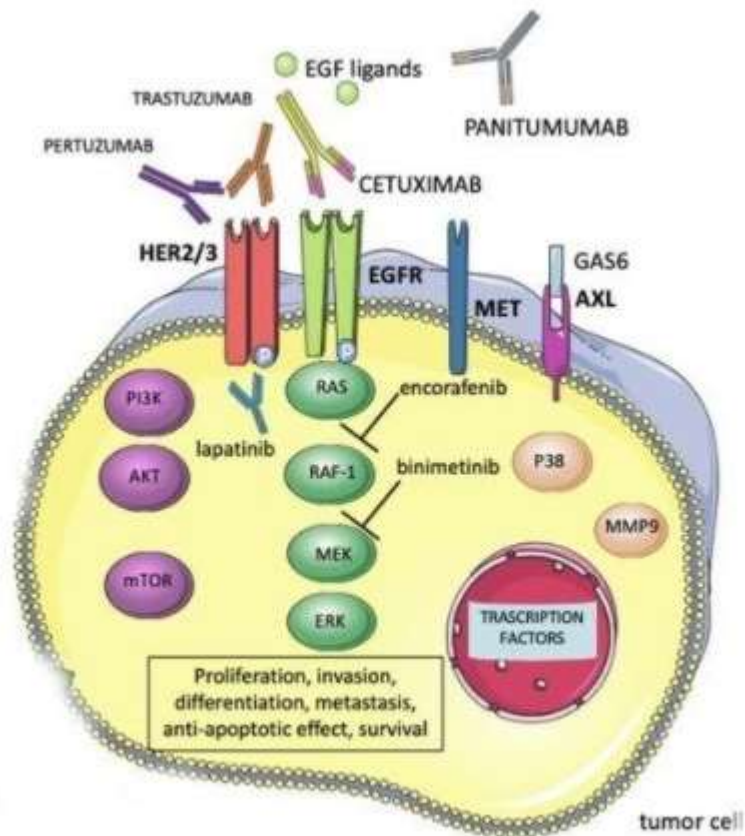
signálů v buňkách bez závislosti na přítomnosti ligandů daných receptorů [143]. Dochází tak k trvalé aktivaci signálních drah receptorů rodiny HER [144]. Z důvodů vzájemného propojení funkce mezi jednotlivými členy rodiny receptorů HER a jejich signalizace byla vyslovena hypotéza, že amplifikace/overexprese HER2/neu může být případnou příčinou rezistence k anti-EGFR terapii u mCRC.

9.3.4.2 HER2/neu blokáda v léčbě mCRC

Blokáda HER2/neu představuje efektivní nástroj cílené léčby a je již dlouho využívána v léčbě karcinomu prsu, a v některých případech metastatického karcinomu žaludku. V poslední době je hodně zkoumána a ukazuje se jako efektivní také v léčbě dalších malignit, kde se můžeme setkat s HER2/neu overexpresí, kam patří i CRC. HER2/neu overexprese/amplifikace je u CRC málo častá, je popisována u cca 2–5 % případů [145]. Retrospektivní studie ukazují, že pacienti s mCRC s prokázanou HER2/neu overexpresí/amplifikací, kteří jsou léčeni anti-EGFR léčbou mají horší léčebné výsledky než ti bez HER2/neu overexprese [146, 147]. Jako další potenciální terapeutický cíl se jeví i HER3, jehož zvýšená exprese byla u kolorektálního karcinomu též zaznamenána a jeho schopnost aktivace této dráhy je ještě větší než HER2 [148].

Mezi dostupné látky blokující HER2/neu receptor patří monoklonální protilátky (trastuzumab, pertuzumab) a tyrozinkinázový inhibitor (lapatinib) (**obrázek 28**). **Trastuzumab** je humanizovaná rekombinantní IgG1 monoklonální protilátka, která se váže na extracelulární doménu receptoru HER2. **Pertuzumab** je humanizovaná monoklonální protilátka, která se váže na extracelulární doménu dimerizační subdomény receptoru HER2, ovšem na jiné místo než na jaké se váže trastuzumab. **Lapatinib** je perorálně podávaný kompetitivní inhibitor s vysokou afinitou pro tyrozinkinázové podjednotky receptorů EGFR/HER1 a HER2.

HER2 inhibitory jsou v poslední době zkoumány v léčbě mCRC, avšak pro málo častý výskyt HER2 positivity u CRC je nábor pacientů do klinických studií obtížný. Do studie fáze II s názvem HERACLES, respektive do její podstudie HERACLES-A bylo zařazeno jen 33 pacientů s HER2-positivním mCRC. Léčení byli kombinací trastuzumabu s lapatinibem. I přes předléčenost bylo dosaženo ORR 30 %, u 2 pacientů bylo dosaženo CR. Stabilizace onemocnění byla popsána u 44 % pacientů. Do podstudie HERACLES-B bylo zařazeno 11 pacientů, kteří byli léčeni pertuzumabem a trastuzumabem. U dvou bylo dosaženo PR. Kombinační strategie anti-HER2 cílené léčby u refrakterních HER2-positivních mCRC tak ukazují velmi slibné výsledky [149].



Obrázek 28 - Schéma blokády receptorů EGFR a HER2/neu
 Převzato a upraveno podle: MARTINI G., et al., 2020

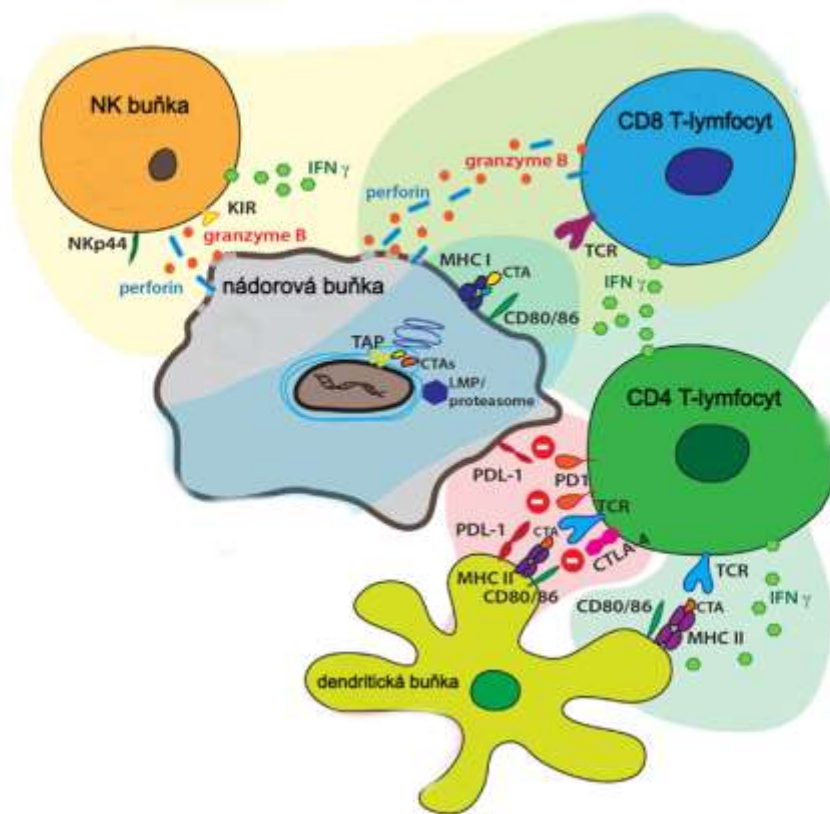
9.3.5 Imunoterapie

9.3.5.1 Protinádorová imunita a moderní imunoterapie

Imunitní systém je do určité míry schopen rozpoznávat a eliminovat nádorové buňky. K tomu využívá všechny hlavní imunitní mechanismy a to **nespecifické** (neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK buňky) i **antigeně specifické** (opsonizační protilátky, aktivující komplement, aktivující fagocytózu, zánětlivé Th1 a cytotoxické (Tc) lymfocyty (**obrázek 29**). Cytotoxické T lymfocyty představují nejdůležitější buňky protinádorové imunity. Reagují na přítomnost specifických nádorových antigenů, mezi které patří glykoproteiny nebo fragmenty produktů mutovaných genů. Jelikož jsou tyto produkovány pouze nádorovými buňkami, nazývají se nádorové specifické antigeny. Kromě těchto antigenů se k identifikaci nádorových buněk hojně využívá antigenů asociovaných s nádory, které se fyziologicky vyskytují na embryonálních buňkách, např. α -fetoprotein (AFP) nebo CEA [150]. V případě, že nádorová buňka nemá, nebo netvoří žádné specifické bílkoviny a nevyskytují se ani HLA molekuly, které umožňují funkčnost

cytotoxických T lymfocytů, nastupují tzv. NK (natural killer) buňky a cytotoxické monocyty. Po rozpoznání nádorové buňky buňkou cytotoxickou dojde k její aktivaci. Jednou z možností, jak likvidovat nádorové buňky, je poškození buněčné membrány pomocí perforinů. Další možností je vyvolat v cílové buňce apoptózu obsazením receptoru pro $TNF\beta$, nebo obsazením receptoru Fas (CD95). Obecně platí, že imunitní mechanismy jsou v obraně proti nádorům poměrně málo účinné, což je způsobeno velkou podobností nádorových buněk normálním buňkám. Proto nádorové buňky často unikají pozornosti imunitního systému. Mimo to mají nádorové buňky řadu specifických mechanismů, jak před imunitním systémem uniknout. Například vznikají mutované formy bez nádorového antigenu [151]. Některé nádorové buňky snižují expresi MHC glykoproteinů a tím znemožňují jejich rozpoznání cytotoxickými T-lymfocyty [152]. Dalším mechanismem k utlumení protinádorové imunity je produkce některých cytokinů nádorovými buňkami, jako např. TGF- β nebo IL-10 [153].

Jako neobyčejně perspektivní možnost léčby se jeví použití monoklonálních protilátek blokujících inhibiční receptory T lymfocytů, které fungují jako tzv. imunitní kontrolní body (*checkpointy*). Jsou to regulační mechanismy, které fyziologicky brání abnormální aktivaci imunitní reakce. **Receptor PD-1** (Programmed Death 1) je exprimován na aktivovaných T a B lymfocytech a je aktivován vazbou ligandů PD-L1 a PD-L2, jež mohou být produkovány T a B lymfocyty, NK buňkami, ale také nádorovými buňkami. **Receptor CTLA-4** (Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4) se nachází na povrchu T lymfocytů a jde o klíčovou inhibiční molekulu. Blokáda aktivace těchto inhibičních molekul vede k významné aktivaci protinádorové imunity, a tak představuje velmi účinnou možnost protinádorové léčby, která je označovaná jako tzv. inhibitory imunitního checkpointu (Immune Checkpoint Inhibitors – ICI). Do této skupiny protinádorových léků patří: **anti-PD-1 monoklonální protilátky (nivolumab, pembrolizumab)**, které se vážou na receptor PD-1 a blokují jeho interakci s ligandy PD-L1 a PD-L2; **anti-PD-L1 monoklonální protilátky (atezolizumab, durvalumab a avelumab)**, které blokují aktivaci PD-1 vazbou na jeho přirozený ligand; **anti-CTLA-4 monoklonální protilátky (ipilimumab)**, které blokují inhibiční signály indukované signální drahou přes CTLA-4 [154].



Obrázek 29 - Mechanismy protinádorové imunity
Převzato a upraveno podle: Héninger E., et al., 2015

9.3.5.2 Léčba ICI u mCRC

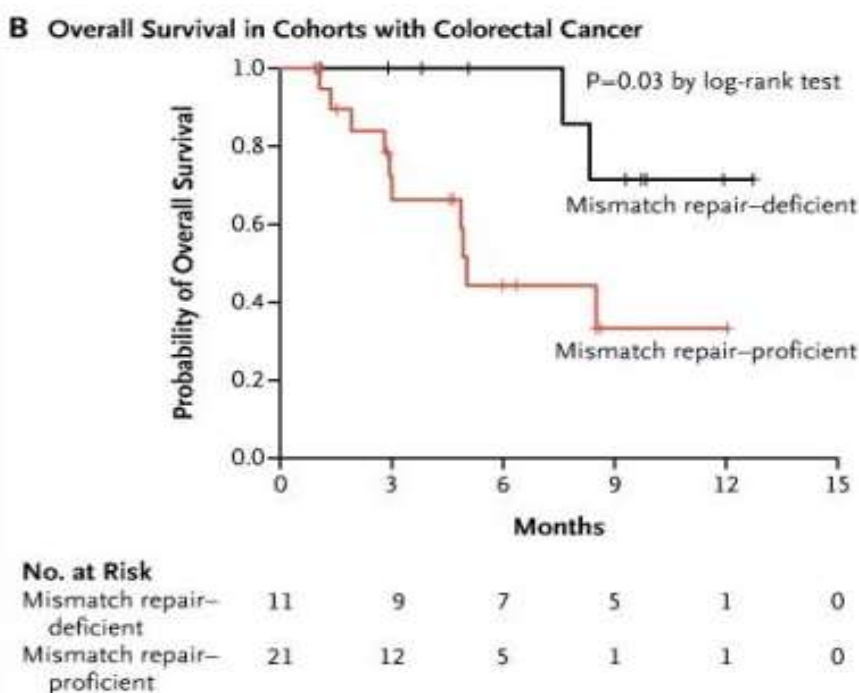
Systémová onkologická léčba založená na aktivaci imunitního systému za využití ICI vedla v posledních 10 letech k výraznému pokroku v léčbě širokého spektra malignit. Jako výhodné se jeví cílit imunoterapii na nádory s velkou mutační náloží, s níž se u CRC můžeme setkat zejména u nádorů s deficientním systémem mismatch-repair proteinů (dMMR, MSI-H), což bylo popsáno v **kapitole 7.7**.

U dMMR nádorů byla prokázána vysoká míra infiltrace nádorové tkáně tumor infiltrujícími lymfocyty (TIL) a zároveň byla v nádorové tkáni prokázána vysoká míra exprese proteinů PD-1, PD-L1 [155]. Moderní imunoterapie zaměřená na osu PD-1/PD-L1 může zásadně zlepšit prognózu takových pacientů.

Prvním preparátem, jehož účinnost byla zkoumána ve spojitosti s mCRC byl inhibitor PD-1, **pembrolizumab**. Do studie fáze II zkoumající účinnost u pacientů s mCRC byli zařazení pacienti předléčení nejméně dvěma liniemi systémové terapie. V kohortě pacientů s dMMR nádory byla ORR 57 % oproti 0 % v kohortě bez defektu MMR. V kohortě mCRC dMMR bylo dosaženo CR v 11 %, PR

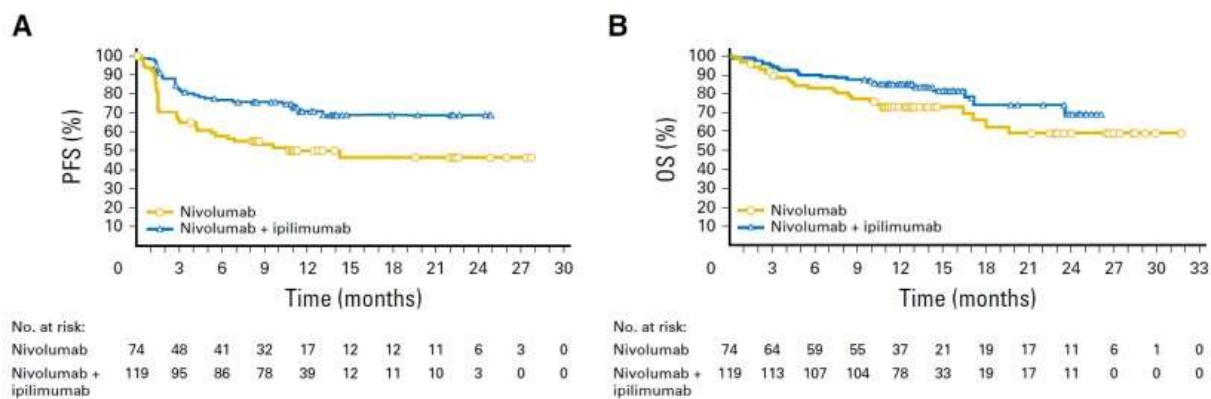
v 46 % a SD 32 %. Toto bylo jasným důkazem, že podskupina pacientů s mCRC s dMMR má prospěch z léčby inhibitory PD-1 (**obrázek 30**) [156].

Dalšími preparáty, jejichž účinnost v kombinaci byla prokázána v terapii pokročilého maligního melanomu jsou nivolumab a ipilimumab [157]. Účinnost těchto preparátů u mCRC testovala klinická studie fáze II s názvem CheckMate 142, kam bylo zařazeno celkem 74 pacientů s mCRC po selhání předchozí terapie (54 % předléčeno ≥ 3 liniemi). ORR bylo dosaženo u 31,1 % pacientů a 69 % pacientů dosáhlo kontroly onemocnění na nejméně 12 týdnů (**obrázek 31**). Výsledky byly nezávislé na stupni exprese PD-L1, mutačním stavu KRAS a BRAF. Podobně jako ve studiích s pembrolizumabem, byla imunoterapie efektivní u nádorů s dMMR, oproti tomu žádná léčebná odpověď nebyla zaznamenána u nádorů s funkčním MMR systémem [158].



Obrázek 30 - Srovnání celkového přežití (OS) pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem se zohledněním dMMR a pMMR (proficientní, bez defektu) léčených pembrolizumabem

Převzato a upraveno podle: LE D.T., et al., 2015 [156]



Obrázek 31 - Srovnání přežití bez progresce (PFS) a celkového přežití (OS) pacientů léčených kombinací nivolumab + ipilimumab vs. nivolumab samotný ve studii CheckMate 142

Převzato a upraveno podle: OVERMAN M.J., et al., 2017 [158]

10 Prediktivní faktory pro cílenou léčbu mCRC

Prediktivní faktory a personalizace léčby mCRC

Prediktivní faktory jsou ukazatele, které predikují, na základě specifického biologického chování nádoru, účinnost (případně toxicitu) konkrétního typu léčby. Spolehlivé prediktivní biomarkery mohou mít velký význam pro klinickou praxi, neboť umožňují tzv. **personalizaci léčby**. Léčebné postupy v současné onkologické praxi jsou zásadním způsobem ovlivněny konceptem personalizované onkologické léčby, který je založen na výběru optimální terapie pro konkrétního pacienta právě na základě využití definovaných prediktivních biomarkerů [159]. Snahou je zde nabídnout danému pacientovi léčbu s vysokou pravděpodobností dosažení maximální léčebné odpovědi, případně i omezit riziko závažných nežádoucích účinků dané terapie. Prediktivní faktory můžeme obecně rozdělit na molekulárně-genetické, biochemické a klinické [160].

Molekulárně-genetické prediktivní biomarkery představují různé genetické, případně epigenetické změny, většinou v podobě genových mutací, amplifikací nebo změny na úrovni exprese proteinů. Obecně vzato, u cílené léčby je většinou snazší najít prediktivní biomarkery u terapie, která je zacílená na inhibici specifických molekul, respektive některé úzce definované signální dráhy. Takto je tomu například u léčby cílené na blokádu EGFR, BRAF nebo HER2/neu. U mCRC sem patří zejména mutace genů RAS, které predikují rezistenci k anti-EGFR léčbě, dále pak mutace BRAF predikující odpověď na BRAF inhibitory a HER2/neu overexprese/amplifikace predikující odpověď na HER2/neu inhibitory [161]. Na druhou stranu, hledání efektivních prediktivních biomarkerů pro léčbu cílenou na inhibici některých komplikovaných biologických procesů s širokým spektrem regulace, je mnohdy velmi komplikované. Sem patří například antiangiogenní cílená léčba, která u mCRC, ale i u jiných nádorů, stále nemá dostupné a v praxi využitelné, molekulární prediktivní biomarkery.

Klinické prediktivní faktory efektu cílené léčby většinou zahrnují různé nežádoucí účinky, které jsou specifické pro daný typ terapie, a často je známá i jejich asociace s efektem dané léčby. Jejich praktické využití je však limitované, neboť je ze své podstaty (objeví se v průběhu léčby) nelze využít pro samotný výběr typu cílené léčby. Sem patří například kožní toxicita u EGFR inhibitorů, která je asociována s příznivým efektem této léčby [162]. U inhibitorů angiogeneze je to vznik nebo akcelerace arteriální hypertenze [163]. Jiným typem klinických prediktivních faktorů je u mCRC lokalizace primárního nádoru (viz **kapitola 10.2.2**).

10.1 Molekulárně-genetické prediktivní faktory pro anti-EGFR terapii

Udává se, že u přibližně 35–45 % pacientů s mCRC nedosáhne léčebné odpovědi v případě, že jsou léčeni kombinací chemoterapie s cílenou léčbou založenou na inhibici EGFR signalizace. Paradoxně může u některých nemocných vést přidání anti-EGFR terapie k horším léčebným výsledkům než při použití chemoterapie samotné [164, 165].

Jako průlomové se ukázalo zjištění, že mutace onkogenů **RAS (KRAS, NRAS)** působí rezistenci k anti-EGFR terapii a na základě toho jsou pacienti s mCRC selektováni pro tento typ cílené léčby. Mimo RAS mutací, je známo množství dalších biomarkerů z oblasti molekulárně-genetické i klinické, jejichž prediktivní význam je zkoumán nebo se o něm spekuluje.

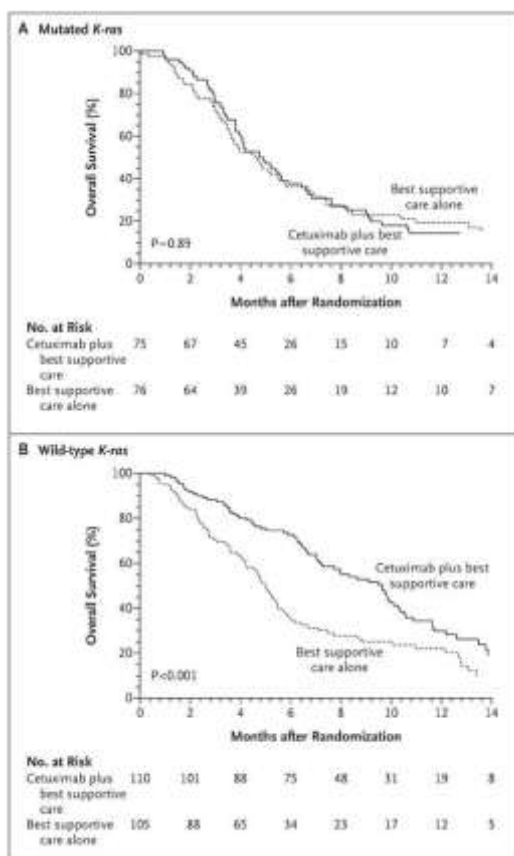
10.1.1 Mutace RAS

Rodina proteinů RAS je kódována geny KRAS, NRAS a HRAS, které patří k nejčastějším onkogenům u člověka. Tyto proteiny hrají významnou úlohu v signální transdukcii u EGFR signální dráhy a jejich mutace vedou k dysregulaci klíčových buněčných procesů, jako je proliferace, apoptóza či diferenciace. U CRC se setkáváme s mutacemi genů KRAS a NRAS. Výskyt mutací KRAS v kodonech 12 a 13 (v exonu 2) je popisován u přibližně 40 % CRC a u dalších zhruba 5 % jsou přítomné mutace KRAS v exonech 3 a 4. Výskyt mutací NRAS je popisován u cca 5 % CRC a to v exonech 2, 3 i 4 (viz **kapitola 7.7**) [60].

RAS geny kódují na membránu vázané intracelulární proteiny s GTP-ázovou aktivitou, které zprostředkovávají, mimo jiné, signální přenos mezi EGFR a dalšími proteiny proliferací kaskády RAS/RAF/MEK/ERK. V případě aktivační mutace dochází ke vzniku proteinů RAS se soustavnou GTP-ázovou aktivitou, což vede k neustálé stimulaci subsekventních signálních drah [166]. U nádorů s mutací genů RAS (**mRAS**) dochází k abnormálně zvýšené aktivaci signálních drah bez ohledu na aktivitu EGFR, respektive bez ohledu na blokádu EGFR na úrovni receptoru monoklonální protilátkou. To je pak důvodem, proč v těchto případech dochází k rezistenci na anti-EGFR cílenou terapii. Na základě toho je vyloučení mutací RAS nezbytnou podmínkou k zahájení anti-EGFR terapie [129, 167, 168].

Zpočátku byl u mCRC prokázán prediktivní význam u mutací KRAS. Randomizované klinické studie CRYSTAL a OPUS prokázaly, že přidání cetuximabu k první linii chemoterapie u pacientů s mCRC významně zlepšilo výsledek léčby ve srovnání se samotnou chemoterapií [128, 169]. Ve studii NCIC CO.17 u pacientů s nádory wtKRAS léčba cetuximabem ve srovnání se samotnou podpůrnou péčí významně zlepšila OS (medián 9,5 vs. 4,8 měsíce, HR: 0,55; $p < 0,001$) a PFS, kde byl medián 3,7 vs. 1,9 měsíce (HR: 0,40; $p < 0,001$) (**obrázek 32**) [131]. Později bylo dosaženo dalšího zlepšení prediktivní diagnostiky

u mCRC odhalením významu mutací NRAS. Výsledky *post hoc* analýzy studie PRIME ukázaly, že podání panitumumabu pacientům s nádory mKRAS či mNRAS má negativní efekt ve smyslu zhoršení PFS a OS oproti léčbě chemoterapií samotnou (OS 15,6 vs. 19,2 měsíce, HR: 1,21; $p=0,04$). Tato studie prokázala, že kromě, do té doby standardně vyšetřovaných, mutací KRAS v exonu 2 (v kodonech 12 a 13) jsou za rezistenci k panitumumabu zodpovědné i mutace KRAS v exonu 3 (v kodonech 59 a 61) a 4 (v kodonech 117 a 146) a dále také mutace onkogenu NRAS ve stejných exonech (2, 3 a 4) [170,171]. Publikovaná metaanalýza hodnotící data z 9 studií následně prokázala, že anti-EGFR terapie nepřináší pacientům s mRAS nádory žádný terapeutický benefit [172]. Analýzou mutací onkogenů RAS v exonech 2, 3 a 4 je v současné době možné vyselektovat cca 45 % pacientů s mCRC, kteří neodpovídají na léčbu cetuximabem či panitumumabem.



Obrázek 32 - Srovnání celkového přežití (OS) pacientů léčených cetuximabem oproti základní podpůrné léčbě (BSC) u pacientů s mKRAS nádory (Graf **A**) a u pacientů s wtKRAS nádory (Graf **B**)

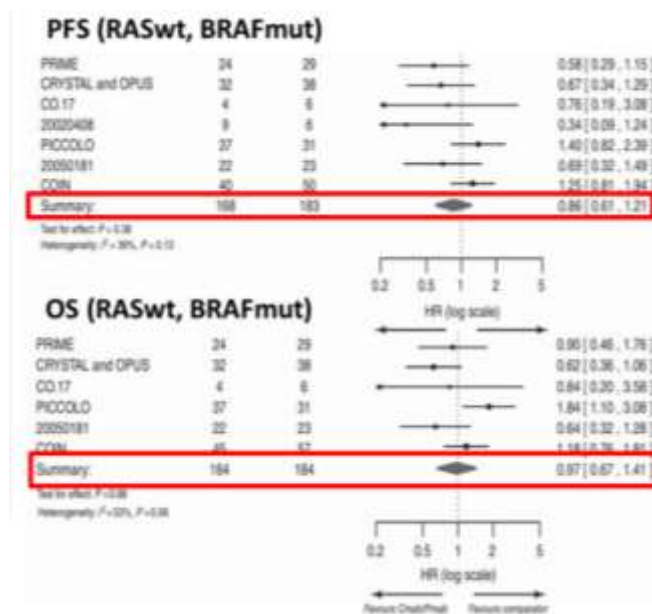
Převzato a upraveno podle: KARAPETIS C.S., et al., 2008 [131]

10.1.2 Mutace BRAF

BRAF je onkogen, který patří do rodiny RAF genů (ARAF, BRAF a CRAF). Kóduje serin/threonin proteinkinázu, která přenáší signál od proteinu RAS v signální dráze RAS-RAF-MEK-ERK a jeho mutace se vyskytuje u 5–15 % CRC, z více než 90 % se jedná o substituci valinu za glutamát v kodonu 600 (V600E) exonu 15 [135]. Tato mutace vede k aktivaci RAF kinázy, tím dochází k aberantnímu přenosu mitogenního signálu celou RAS/RAF signální dráhou bez ohledu na aktivaci EGFR, respektive jeho inhibici cílenou léčbou [173]. Zajímavé je, že tyto onkogenní mutace se prakticky nevyskytují současně s mutacemi RAS [174]. Mutace BRAF jsou častěji popisovány u pravostranných CRC, mucinózních karcinomů a MSI-H nádorů [175].

Bylo prokázáno, že BRAF mutace představují významný negativní prognostický faktor, které je nezávislý na podané léčbě (viz **kapitola 9.3.3**) [136].

Prediktivní význam BRAF mutací pro identifikaci pacientů s mCRC rezistentních k anti-EGFR cílené léčbě se jeví jako pravděpodobný, ale ne zcela jistý. Byly publikované studie, které svědčí pro tuto hypotézu, ale i takové, které jí nepotvrzují. Například prospektivní studie Saridakiho et al. v roce 2013 prokázala ve druhé a vyšší linii léčby prediktivní význam mutace BRAF u wtRAS mCRC, kdy pacienti s mBRAF nádory měli oproti pacientům s wtBRAF horší PFS i OS [176]. Oproti tomu, výsledky metaanalýzy dat z několika randomizovaných klinických studií publikované Rowlandem et al. prediktivní význam BRAF mutací pro anti-EGFR cílenou léčbu jednoznačně nepotvrdily (**obrázek 33**) [177].



Obrázek 33 - Výsledky metaanalýzy klinických studií ukazující význam mutací BRAF u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených anti-EGFR cílenou léčbou

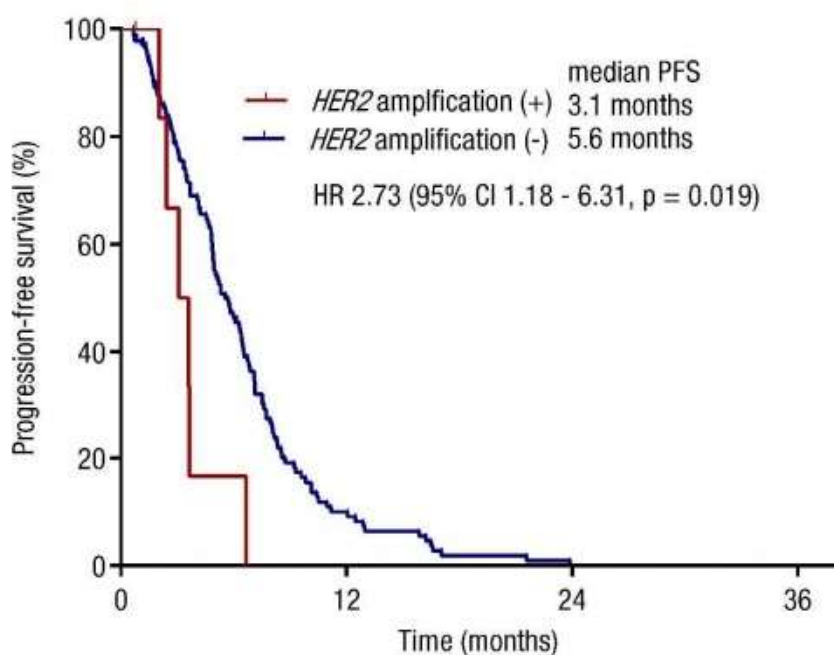
Převzato a upraveno podle: ROWLAND A., et al., 2015 [177]

10.1.3 Mutace PI3K

Molekuly zapojené do signální dráhy PI3K/AKT/mTOR patří mezi nejvíce studované v souvislosti se vznikem mnoha typů nádorových onemocnění [178, 179]. Fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) je zapojena do signální dráhy PI3K/AKT/mTOR, která ovlivňuje buněčnou proliferaci a přežití buněk [180]. Většinou se setkáváme s mutacemi katalytické podjednotky alfa PI3K (PI3K catalytic subunit alpha - PI3KCA). Jsou popisovány u cca 15–20 % CRC a mohou se vyskytovat současně s mutacemi RAS nebo BRAF [60, 181]. Důsledkem těchto mutací je aberantní aktivace signální dráhy AKT/mTOR, která je nezávislá na blokádě EGFR na úrovni receptoru. Dle retrospektivní analýzy evropských studií zahrnující přes 700 pacientů s mCRC léčených cetuximabem, se ukázalo, že pouze mutace PI3KCA v exonu 20 jsou významně asociovány s nižší ORR a kratším PFS i OS při porovnání s pacienty s nádory bez této mutace (HR: 3,29; $p=0,0057$) [182]. Mutace PI3KCA v exonu 20 proto mohou být významným faktorem v rezistenci k anti-EGFR terapii, a to zejména u pacientů s wtKRAS mCRC, a to také potvrdily dvě provedené metaanalýzy [102, 183]. U několika dalších nádorových onemocnění se nyní v klinických studiích testují také nízkomolekulární inhibitory PI3K jako nové možnosti léčby u nádorů s tímto typem onkogenní mutace.

10.1.4 HER2/neu exprese a amplifikace

Amplifikace genu HER2/neu se může též spolupodílet na primární rezistenci k anti-EGFR terapii. Podle retrospektivní studie publikované Yonesakou et al. dosahovali pacienti s mCRC s HER2/neu amplifikací nejhorších léčebných výsledků při léčbě cetuximabem [184]. Další studie potvrzující toto zjištění byla práce Jeongy et al. publikovaná v roce 2017. Zde bylo zařazeno více než 140 pacientů s mCRC léčených cetuximabem v monoterapii ve druhé linii. Medián PFS se významně lišil podle stavu HER2/neu, činil 3,1 měsíce u pacientů s nádory s amplifikací HER2/neu ve srovnání s 5,6 měsíci u pacientů s nádory bez amplifikace (HR: 2,73; $p=0,019$) (**obrázek 34**) [185]. Prediktivní potenciál HER2/neu amplifikace nebo overexpresy pro anti-EGFR terapii se tak jeví jako velmi pravděpodobný.



Obrázek 34 - Srovnání přežití bez progrese (PFS) u pacientů léčených cetuximabem podle HER2/neu amplifikace

Převzato a upraveno podle: JEONG J.H., et al., 2017 [185]

10.1.5 Expres EGFR

Jako u prsních tumorů byla hypotéza, že nemůže protilátka proti tomuto receptoru fungovat bez zvýšené exprese EGFR. Bylo ale zjištěno, že odpovědi na anti-EGFR cílenou léčbu je dosahováno i u nádorů s normální nebo dokonce i s žádnou imunohistochemicky (IHC) detekovatelnou expresí EGFR. Jako hlavní

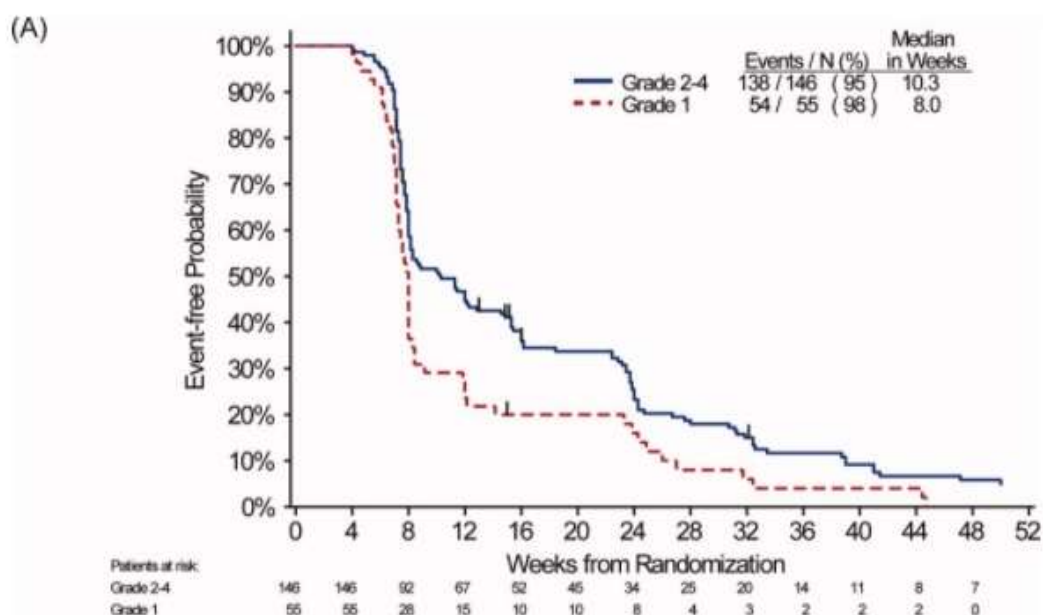
důvod nízké hodnoty predikce bývá uváděná limitovaná senzitivita IHC vyšetření [186].

10.2 Klinické prediktivní faktory

10.2.1 Kožní exantém jako prediktivní faktor pro anti-EGFR terapii

Papulopustulózní kožní exantém je typickým vedlejším účinkem anti-EGFR cílené léčby. Četnost výskytu exantému se udává až kolem 80 % a dle některých studií jeho výskyt a intenzita koreluje s vyšším efektem této cílené léčby (**obrázek 35**) [187].

Původně se předpokládalo, že výsev exantému může souviset se saturací EGFR v nádorové tkáni. Proto se začaly objevovat studie, ve kterých se navyšovaly dávky cetuximabu u pacientů, kteří byli bez exantému, s cílem zlepšit efektivitu léčby. Výsledkem bylo zvýšení ORR u pacientů s wtKRAS (30 % vs. 16 %), avšak nikoliv zlepšení OS [188]. Exantém však zřejmě ukazuje pouze lokální saturaci EGFR v kůži, kde je taktéž EGFR vysoce exprimován. Faktem je, že saturace EGFR v nádoru může být zcela rozdílná [189]. Argumenty proti využívání exantému jako prediktivního faktoru jsou zejména, že se exantém může objevovat i u pacientů, kteří nedosáhli odpovědi na anti-EGFR léčbu, ale stejně tak se nemusí objevit u všech pacientů s dosaženou léčebnou odpovědí [190].



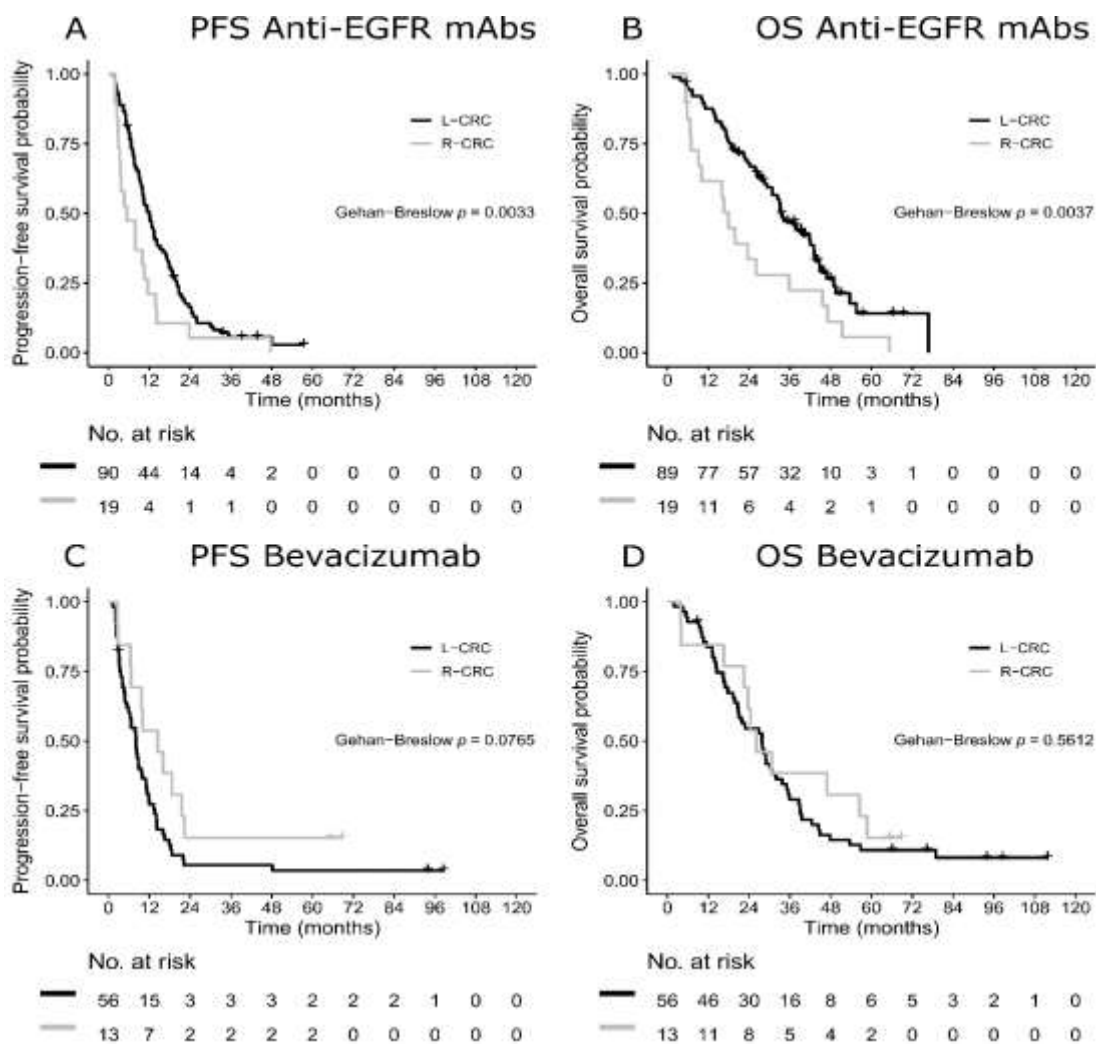
Obrázek 35 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) u pacientů léčených panitumabem dle stupně kožní toxicity

Převzato a upraveno podle: PEETERS M., et al., 2009 [187]

10.2.2 Lokalizace primárního nádoru jako prediktivní faktor pro cílenou léčbu

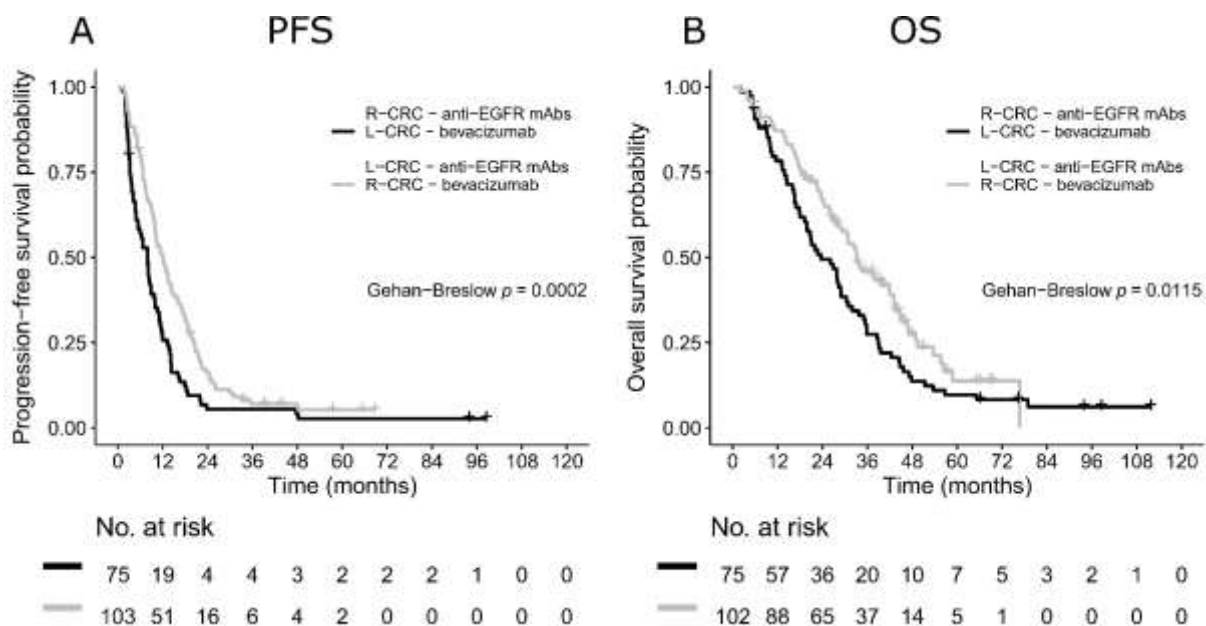
Pravostranné tumory jsou obecně charakterizovány výrazně horší prognózou, což bývá způsobeno kumulací více nepříznivých prognostických faktorů (viz **kapitola 7.8**). V poslední době se ale ukazuje, že lokalizace primárního nádoru může být i významným prediktivním markerem pro cílenou léčbu. Dle retrospektivně analyzovaných dat z klinických studií CRYSTAL, PRIME, NCIC CO.17 a studie 20050181 bylo zjištěno, že v případech wtRAS byla účinnost anti-EGFR protilátek vyšší u levostranných nádorů ve srovnání s pravostrannými [191-194]. Data z randomizovaných klinických studií AGITG MAX, NO16966, AVF2107g hodnotící prediktivní roli lokalizace primárního nádoru ve spojitosti s anti-VEGF léčbou naznačují, že primární lokalizace nádoru nemá vliv na účinnost bevacizumabu [195-197]. Dle doporučení ESMO je při výběru typu cílené léčby vhodné zohlednit kromě molekulárně-genetických prediktorů (mutace RAS a BRAF) i primární lokalizaci nádoru [198].

V retrospektivní studii, která proběhla na našem pracovišti, bylo cílem posoudit, zdali má lokalizace primárního tumoru prediktivní roli pro cílenou léčbu u pacientů mCRC s wtRAS. Zařazeno bylo celkem 178 pacientů léčených v první linii chemoterapií spolu s cetuximabem, panitumumabem nebo bevacizumabem. Byl zaznamenán delší PFS a OS u pacientů s levostrannými tumory, kteří byli léčeni anti-EGFR protilátkami oproti pacientům s pravostrannými nádory, zatímco nebyl zjištěn žádný rozdíl podle stranové lokalizace u pacientů léčených bevacizumabem (**obrázek 36**). Z hlediska PFS i OS se jako optimální léčebný přístup v první linii jeví podání anti-EGFR protilátek pacientům s levostranným tumorem a bevacizumabu pacientům s pravostranným tumorem (**obrázek 37**) [199].



Obrázek 36 - Srovnání přežití bez progrese (PFS) a celkového přežití (OS) u pacientů léčených anti-EGFR protilátkami a bevacizumabem podle lokalizace primárního nádoru

Převzato a upraveno podle: FIALA O., et al., 2019 [199]



Obrázek 37 - Srovnání přežití bez progresse (PFS) a celkového přežití (OS) mezi léčebnými přístupy: anti-EGFR protilátky pro levostranné wtRAS mCRC a bevacizumab pro pravostranné wtRAS mCRC vs. anti-EGFR protilátky pro pravostranné wtRAS mCRC a bevacizumab pro levostranné wtRAS mCRC

Převzato a upraveno podle: FIALA O., et al., 2019 [199]

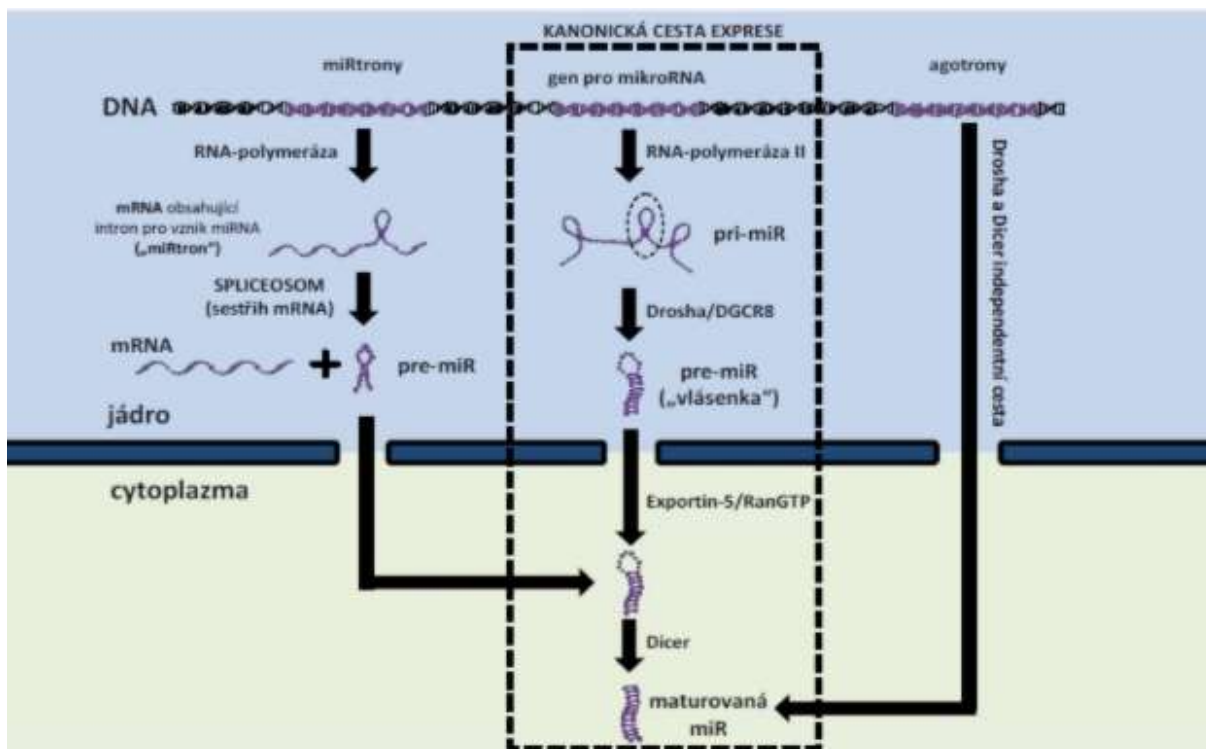
11 MicroRNA

MicroRNA (miR) jsou krátké nekódující RNA o délce 18-25 nukleotidů, které regulují expresi genů na post-transkripční úrovni a jejich deregulace může vést ke vzniku různých onemocnění, včetně těch nádorových. V posledních letech jsou častým předmětem onkologického výzkumu, neboť bylo opakovaně prokázáno jejich významné zapojení do procesů kancerogeneze [200-202]. Odhaduje se, že tyto malé molekuly tvoří přibližně 5 % lidského genomu a mohou regulovat expresi až 60 % všech genů kódujících proteiny [203]. Je známá schopnost těchto molekul ovlivňovat genovou expresi mnoha nádorových supresorů či onkogenů a tím pádem se velkou měrou podílet na procesech vedoucích k maligní transformaci buněk. Uplatňují se v regulaci klíčových buněčných procesů jako je diferenciace, proliferace nebo apoptóza. Důležitou roli sehraávají i v regulaci buněčného cyklu, angiogeneze či hematopoiezy [204].

Historie miR se datuje do roku 1993, kdy byla identifikována první miR, která byla označena jako *lin-4* [205]. Nyní je známo již více než 1900 miR v lidském genomu a údaje o jejich struktuře či funkci jsou shromažďovány v online databázích [206]. Důvodem, proč se jeví miR jako slibné biomarkery je jejich vysoká stabilita, přítomnost v tkáních i tělních tekutinách a relativně snadná detekce. I přes to, že byly miR objeveny relativně nedávno, byla již jejich role v nádorové biologii poměrně dobře zmapovaná. V posledních letech se objevují práce, které dokazují, že by tyto molekuly mohly sloužit jako nové diagnostické biomarkery, ale i jako nové prediktivní a prognostické biomarkery využitelné k předpovědi prognózy a/nebo léčebné odpovědi u onkologických pacientů [207, 208].

11.1 Vznik a funkce miR v organismu

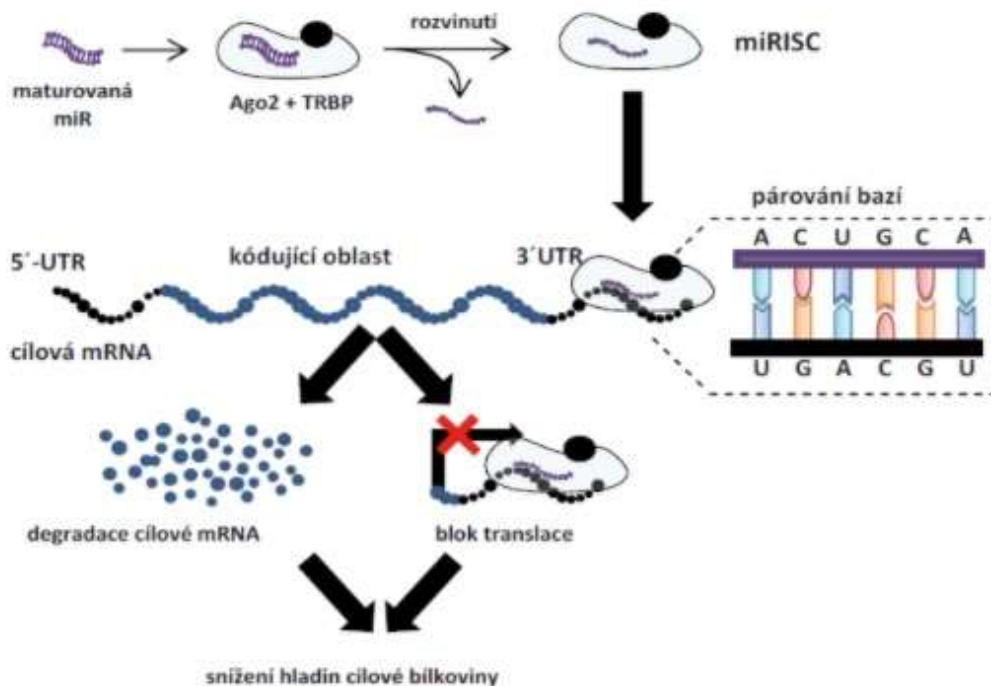
Geny pro miR se nachází na všech chromozomech, vyjma chromozomu Y. Mohou se vyskytovat samostatně nebo v tzv. klastrech a nejčastěji se nachází v intronech kódujících genů nebo v genech pro nekódující RNA [209]. Syntéza miR probíhá v jádře buňky, a to prostřednictvím **RNA polymerázy II**. Nejdříve tak dochází k syntéze prekurzoru označovaného jako **pri-miRNA**. Ten je následně upraven proteinovým komplexem zvaným **Mikroprocessor complex**, který je složený ze dvou základních proteinů **Drosha** (ribonukleáza III) a **Pasha** (protein DGCR8, váže se na dvouvláknovou RNA) [210]. Po sestřihu Mikroprocesorem se mění pri-miRNA na **pre-miRNA**. Následně probíhá transport komplexem **Exportin 5** z jádra buňky do cytoplazmy, kde je pre-miRNA štěpena enzymem **Dicer** (ribonukleáza III) na fragmenty o délce zhruba 22 nukleotidů [211]. Proces biogeneze miR je znázorněn na **obrázku 38**.



Obrázek 38 - Biogeneze miR v buňce
 Převzato a upraveno podle: NOVÁK J., et al., 2016

Zralé miR jsou začleněny do komplexu **RISC** (RNA induced silencing complex), který se pak váže na komplementární sekvence na 3' konci cílové mRNA, kterou tím degraduje a ve výsledku tak vede k zablokování translace cílového genu [205, 212]. Tento proces, při kterém miR interferují s cílovými úseky mRNA se nazývá **RNA interference (obrázek 39)** [213]. Párování sekvencí miR a cílové mRNA je v některých případech částečně nespecifické a některé miR tak mohou interagovat s větším množstvím cílových mRNA, mohou tedy ovlivňovat expresi několika genů a v konečném důsledku tak ovlivňovat různé buněčné procesy.

Nejnovější studie naznačují, že genová exprese může být pomocí miR nejen tlumena, ale též zvýšená, a to především v případě, kdy je organismus vystaven hladovění či jiným stresovým podmínkám [214]. Také se ukazuje, že regulace genové exprese cestou miR je mnohem komplexnější, než se původně předpokládalo, a zřejmě bude trvat ještě několik let či desetiletí, než bude zcela objasněna detailní funkce těchto malých molekul v živých organizmech.



Obrázek 39 - Schéma působení miR procesem RNA interference
Převzato a upraveno podle: NOVÁK J., et al., 2016

11.2 MiR a kancerogeneze

Jak již bylo zmíněno, kancerogeneze je mnohastupňový proces, který je, mimo jiné, charakteristický neomezeným replikačním potenciálem buněk, poruchami v apoptotické buněčné smrti, schopností neoangiogeneze, schopností buněk uniknout imunitnímu systému, a metastazováním.

Změny exprese různých miR jsou pro zhoubné nádory typické. Cestou dysregulace na úrovni miR dochází k ovlivnění exprese řady onkogenů nebo naopak tumor supresorových genů [215]. Přeneseně tak lze, na základě jejich funkce, označit některé miR za onkogenní a jiné za tumor supresorové. Za předpokladu, že miR plní funkci nádorového supresoru, je její hladina v nádorové tkáni snížena oproti zdravé tkáni (**down-regulace**). Naopak, miR, které plní funkci onkogenu jsou v nádorové tkáni přítomny ve zvýšené míře (**up-regulace**) [216]. Dysregulace na úrovni miR mohou indukovat nebo významně přispět k maligní transformaci buňky, ale mohou též významně ovlivnit biologické chování nádoru. Vznikají různým mechanismem. Často se jedná o poruchy procesů jako je biogeneze nebo maturace miR, dále jsou to změny na úrovni genomu v podobě mutací nebo se jedná o změny epigenetické [217].

Prvním lidským nádorovým onemocněním, o kterém bylo zjištěno, že je spojeno s dysregulací miR, je chronická lymfocytární leukémie (CLL). V roce 2002 byla Calinem et al. publikovaná první práce, která popisovala vztah mezi expresí

některých miR a vznikem CLL [218]. O rok později byla Michaelem et al. poprvé popsána dysregulace některých miR u CRC. V této studii autoři popsali down-regulaci miR-143 a miR-145 v nádorové tkáni CRC [219]. Následně byla popsána celá řada dalších miR, u nichž dochází k významným dysregulacím u CRC při srovnání s normální tkání střevního epitelu. Dosud bylo identifikováno celkem asi 160 různých miR, které jsou deregulovány u CRC. Zde je možné uvést např. up-regulace (zvýšení exprese) miR-135b, miR-31, miR-183, miR-92, miR-93, miR-17 a miR-96, naopak down-regulace (snížení exprese) miR-133b, miR-143, miR-145, miR-192, miR-215, miR-16, let-7a a miR-145 [220].

11.3 MiR jako diagnostický biomarker

Hlavním předpokladem pro úspěšnou léčbu nádorového onemocnění je včasná a rychlá diagnostika. V této oblasti se mohou uplatnit především cirkulující miR. Nedávné studie potvrdily, že nadějnými kandidáty pro časnou neinvazivní diagnostiku nádorových onemocnění by mohly být právě cirkulující miR, neboť je možné je detekovat v tělních tekutinách, jakými jsou sérum, plazma, sliny, moč nebo sputum [221]. Důvod výskytu miR v cirkulaci vysvětlují některé hypotézy. Jednou z nich je pasivní uvolňování z poškozených buněk, druhou pak aktivní sekrece pomocí mikrovezikulů [222]. Faktem je to, že doposud není zcela jasná funkce, jakou mají tyto molekuly v cirkulaci.

Byla publikována řada zajímavých studií, které se zabývaly možností využití cirkulujících miR jako diagnostických biomarkerů u pacientů s CRC [223, 224]. Mezi nejčastěji analyzované miR v krevním séru či plazmě u CRC patří miR-92a a miR-29a, díky jejichž hladině exprese je možné odlišit zdravé lidi od pacientů s CRC [223, 225]. Dle práce Kanaana et al. z roku 2012 bylo možné dle plazmatické koncentrace miR-21 odlišit pacienty s CRC od kontrolní skupiny zdravých lidí až s 90 % specificitou a senzitivitou [226]. Giráldez et al. popsali panel šesti miR (miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-15b, miR-29a, miR-335), jejichž exprese byla významně up-regulovaná u pacientů s CRC oproti zdravým kontrolám [227]. Další významná studie autorů Kanaan et al. popsala panel osmi miR (miR-331, miR-195, miR-532-3p, miR-17, miR-142-3p, miR-15b, miR-532-5p, miR-652), na základě jejichž exprese bylo možné odlišit zdravé jedince od pacientů s benigními polypy či adenomy s vysokou přesností [228]. Na základě těchto výsledků se zdá, že by cirkulující miR mohly představovat biomarkery využitelné pro neinvazivní diagnostiku CRC, ale také k záchytu dokonce i prekancerózních lézí.

Určitou limitaci diagnostického potenciálu cirkulujících miR představuje jejich specificita. Bylo zjištěno, že mnohé cirkulující miR nejsou dostatečně specifické pro CRC, neboť jejich deregulovaná exprese v séru či plazmě byla popsána i u jiných typů malignit, ale i u některých nenádorových onemocnění [229]. Každopádně, bude trvat ještě delší dobu, než se některé z těchto kandidátních

molekul potvrdí svůj význam a stanou se novými biomarkery využívanými pro diagnostiku CRC v reálné klinické praxi.

11.4 Prognostický a prediktivní význam miR

V poslední době se ukazuje, že mimo oblast diagnostiky, mohou mít miR význam i jako prognostické a prediktivní biomarkery u nádorových onemocnění. Jedna z prvních studií, která popisovala prognostický potenciál miR, byla publikována v roce 2006 autory Xi et al. Tato práce ukázala, že up-regulace miR-200c v nádoru koreluje s kratším OS pacientů s CRC [230]. Od té doby několik dalších studií potvrdilo, že up-regulace této miR jsou spojeny s horší prognózou nemocných. Studie Toiyamy et al. ukázala zvýšené sérové hladiny miR-200c u pacientů s mCRC oproti pacientům v I-III. stadiu [231]. Hur et al. popsali up-regulaci miR-200c ve tkáni jaterních metastáz ve srovnání s primárním nádorem [232]. Další miR, která má významný prognostický potenciál je miR-21. Bylo popsáno, že miR-21 je up-regulována u různých nádorových onemocnění, včetně CRC [233]. Ve studii Slabého et al. korelovala up-regulace miR-21 v nádorové tkáni s vyšším klinickým stadiem CRC a tím i horší prognózou pacientů [233]. Zvýšené sérové hladiny miR-21 byly také asociovány s velikostí nádoru, vzdálenými metastázami a krátkým přežitím, přičemž se jednalo o nezávislý prognostický biomarker [234]. Studie autorů Schetter et al. potvrdila korelaci mezi up-regulací miR-21 v nádoru a horší prognózou bez závislosti na stagingu či jiných klinických parametrech [235]. Kjaer-Frifeldt et al. provedli studii zaměřenou na použití miR-21 jako prognostického faktoru u pacientů s CRC ve stadiu II. Ukázalo se, že miR-21 může být kombinována s již zavedenými rizikovými faktory, které jsou běžně používané ke stratifikaci rizika pacientů, u nichž je zvažované podání adjuvantní chemoterapie. U pacientů s up-regulací miR-21 bylo vysoké riziko vzniku recidivy a měli by zřejmě prospěch z adjuvantní léčby [236]. K obdobným výsledkům došli autoři Oue et al. Na kohortě japonských pacientů ve II. stadiu CRC došli k závěru, že pacienti s nízkou hladinou exprese miR-21 měli lepší léčebnou odpověď na adjuvantní chemoterapii [39].

Recentně publikovaná data nasvědčují tomu, že různé dysregulace na úrovni miR mohou být spojené s odpovědí na specifický typ systémové léčby a mohou tak představovat potenciální prediktivní biomarkery. Výše zmíněná studie Schatera et al. ukázala, že up-regulace miR-21 v nádoru koreluje jak se špatnou prognózou, tak i s horší odpovědí na léčbu 5-FU [237]. Bylo zjištěno, že down-regulace několika dalších miR jsou také spojeny s chemorezistencí. Down-regulace miR-129, potažmo miR-15b byly identifikovány v nádorových buněčných liniích rezistentních na 5-FU [238, 239]. V další *in vitro* experimentální práci bylo zjištěno, že down-regulace miR-143 v nádorové tkáni významně koreluje s lepší odpovědí na léčbu 5-FU [240]. Další práce ukázala, že up-regulace miR-153 byla spojena

s rezistencí na oxaliplatinu a cisplatinu jak u pacientů s CRC, tak i v experimentu na buněčných liniích CRC [241].

Velkou výzvou je najít vztah mezi dysregulacemi miR a odpovědí na cílenou léčbu. Mosakhani et al. zjistili, že up-regulace miR-31, miR-140-5p, let-7 a down-regulace miR-592 a miR-1224-5p v nádorové tkáni pacientů s wtKRAS mCRC koreluje s horší léčebnou odpovědí na léčbu cetuximabem včetně kratšího OS [242]. Hansen et al. popsali korelaci mezi up-regulací miR-126 v krevním séru pacientů s mCRC a špatnou odpovědí na léčbu bevacizumabem [243]. Významným zjištěním Saridakiho et al. bylo, že odpověď pacientů na cílenou léčbu nemusí být ovlivněna pouze deregulovanou expresí miR, ale též i mutací cílových genů, která má pak za následek znemožnění vazby miR, které by měly regulaovat expresi daného cílového genu. Autoři zde popsali, že některé jednonukleotidové polymorfismy (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) genu KRAS vedou k poruše interakce miR let-7 s cílovou mRNA, což má za následek dobrou léčebnou odpověď na anti-EGFR protilátky [244].

Prediktivní význam miR je cílem intenzivního experimentálního i klinického výzkumu, který v současné době probíhá. Zatím je zde však stále mnoho nezodpovězených otázek, publikovaná klinická data jsou většinou retrospektivní a soubory pacientů limitované. Každopádně, výše uvedené zajímavé výsledky jsou předpokladem k tomu, že použití miR jako prediktivních biomarkerů by mohlo vést ke zlepšení personalizované péče u pacientů s CRC.

12 Cíle

Cílem předkládané dizertační práce bylo zhodnocení možné asociace mezi dysregulací několika vybraných miR v nádorové tkáni a efektem cílené léčby u pacientů s mCRC. Takto identifikované miR by bylo možné využít jako potenciální prognostické a/nebo prediktivní biomarkery. Práce je rozdělena na dvě části.

První část práce je zaměřena na hodnocení významu dysregulací miR-126 a miR-664 v nádoru u pacientů léčených chemoterapií a bevacizumabem.

Druhá část práce je zaměřena na hodnocení významu dysregulací miR-125b, let-7c, miR-99a, miR-17, miR-143 a miR-145 v nádoru u pacientů léčených chemoterapií a anti-EGFR protilátkami.

13 Význam dysregulací miR-126 a miR-664 v nádoru u pacientů s mCRC léčených bevacizumabem

13.1 Metodické postupy

Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 63 pacientů s histologicky verifikovaným mCRC, kteří byli v letech 2009 až 2015 léčeni systémovou terapií založenou na kombinaci bevacizumabu a chemoterapie na Onkologické a radioterapeutické klinice Fakultní nemocnice v Plzni. Souhrnná charakteristika souboru pacientů je uvedena v **tabulce 6**. Klinická data pacientů byla hodnocena retrospektivně.

Tabulka 6 - Základní charakteristiky souboru pacientů

Charakteristika	Kategorie	n (%)
Pohlaví	Ženy	20 (31,7)
	Muži	43 (68,3)
Věk	<70 let	48 (76,2)
	≥ 70 let	15 (23,8)
Lokalizace primárního tumoru	Rektum	26 (41,3)
	Kolon	36 (57,1)
	Sigma	1 (1,6)
Linie léčby	1.	48 (76,2)
	2.	9 (14,3)
	3.	1 (1,6)
	4.	2 (3,2)
	Chybějící data	3 (4,8)
Resekabilita	Neresekabilní	32 (50,8)
	Potenciálně resekabilní	11 (17,5)
	Chybějící data	20 (31,7)
Stav mutace KRAS	Nemutovaný (wtKRAS)	17 (27,0)
	Mutovaný (mKRAS)	21 (33,3)
	Nestanoveno	25 (39,7)

Léčba a sledování follow-up

Bevacizumab (Avastin) byl podáván v kombinaci s chemoterapií, následně bylo pokračováno v režimu udržovací léčby ve standardní schválené dávce (5,0 mg/kg každých 14 dní nebo 7,5 mg/kg každých 21 dní). Chemoterapie byla složená z následujících schémat: 5-FU a leukovorin v kombinaci s oxaliplatinou (FOLFOX) nebo irinotekanem (FOLFIRI) nebo samostatně (FU/FA). Žádný z pacientů nebyl v minulosti léčen antiangiogenní terapií. Klinické vyšetření a rutinní laboratorní testy byly prováděny každé dva týdny. V rámci monitorování efektu terapie byly využívány standardní radiodiagnostické zobrazovací metody jako je CT nebo PET/CT, které byly v průběhu léčby prováděny každé tři měsíce, případně mimořádně při klinickém podezření na progresi nálezů. Objektivní léčebná odpověď byla hodnocena nezávislým radiologem za použití RECIST kritérií [39]. Léčebná odpověď byla hodnocena jako kompletní remise (**CR**), částečná remise (**PR**), stabilní onemocnění (**SD**) anebo progredující onemocnění (**PD**). Míra dosažení celkové objektivní odpovědi (**ORR**) zahrnovala pacienty dosahující CR a PR.

PFS bylo stanoveno od data zahájení léčby bevacizumabem do data první zdokumentované progresse onemocnění nebo smrti. **OS** bylo stanoveno od data zahájení léčby bevacizumabem do data úmrtí, bez ohledu na jeho příčinu. Medián sledování v době analýzy činil 47,6 měsíce.

Stanovení exprese miR

Celková RNA byla izolována ze vzorků nádorové a makroskopicky zdravé sliznice z resekované části tlustého střeva (vzorky nenádorové tkáně byly odebrány co nejdále od místa nádoru). Izolace RNA byla provedena pomocí TRI Reagent® RT (MRC, Cincinnati, OH, USA) dle protokolu výrobce. Celková koncentrace RNA byla měřena soupravou Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a pro reverzní transkripci byly vzorky zředěny na 2 ng/μl. Pro hodnocení exprese miR byly použity genově specifické testy TaqMan (Thermo Fisher Scientific). Cíli pro analýzu byly hsa-miR-126-3p (ID testu 002228), hsa-miR-126-5p (000451), hsa-miR-664-3p (002897), hsa-miR-16 (000391) a hsa-miR-345 (002186), přičemž dvě poslední miRNA byly použity jako referenční geny na základě již dříve publikovaných údajů a vlastní analýzy expresní stability kombinací čtyř algoritmů (BestKeeper, NormFinder, Genorm a Srovnávací metody Delta Ct). Reverzní transkripce byla provedena samostatně pro každou miR pomocí specifických primerů z jednotlivých TaqMan testů v kombinaci s TaqMan® MicroRNA sadou pro reverzní transkripci (Thermo Fisher Scientific). Relativní exprese miR byla měřena v triplicátech v 10 μl reakcích na přístroji CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) s TaqMan® Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific). Všechny reakce byly testovány na nespecifické signály.

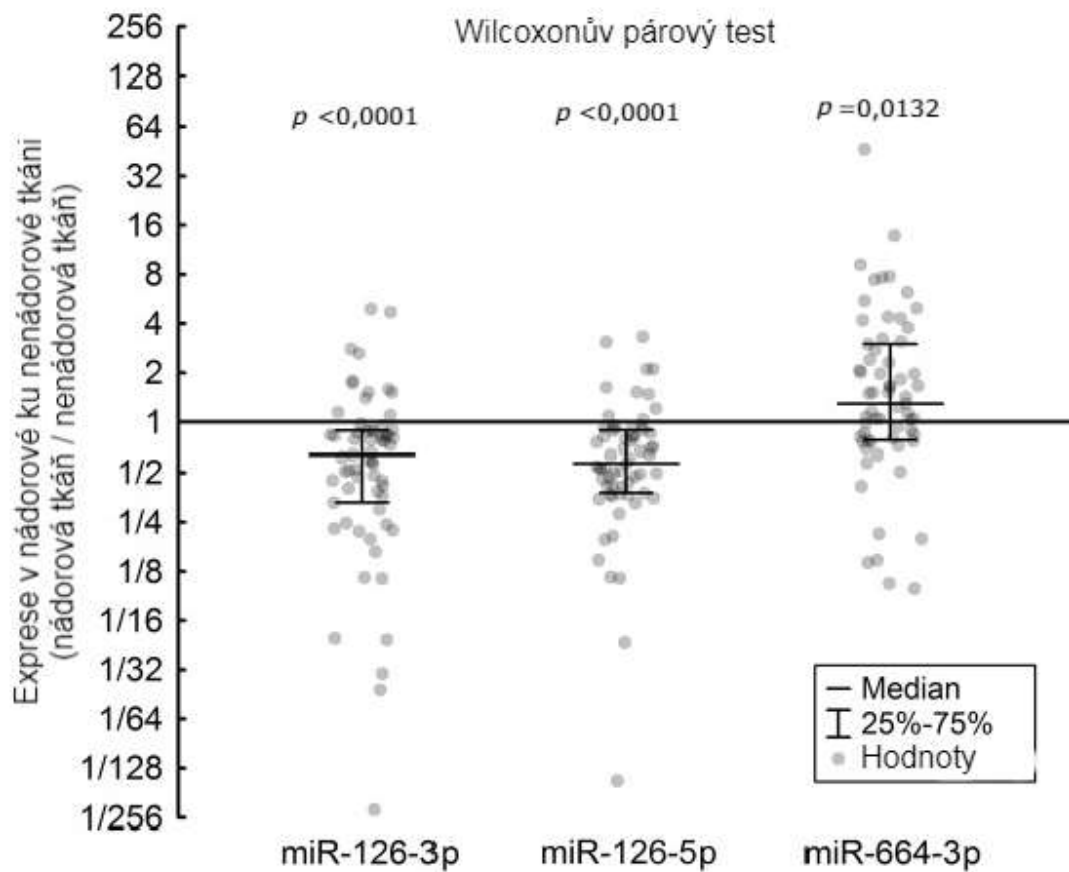
Statistická analýza

K charakterizaci skupiny pacientů byly použity standardní frekvenční tabulky a popisná statistika. Změny exprese miR-126-3p, miR-126-5p a miR-664-3p v nádorové tkáni (ve vztahu k nenádorové tkáni) byly testovány na statistickou významnost pomocí jednovýběrového Wilcoxonova testu. Korelace mezi relativními expresemi miR byly hodnoceny pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Pacienti, u kterých nedošlo k progresi či k úmrtí, byli cenzorováni k datu poslední zaznamenané kontroly s ohledem na jejich PFS nebo OS. Sledované události mající vliv na dobu přežití byly hodnoceny využitím Kaplan-Meierova odhadu distribuce přežívání, a to funkcí využívající lineární interpolaci mezi úplným pozorováním po požadovaný čas. Odhady mediánu sledování byly vypočítány pomocí inverzní Kaplan-Meierovy metody. Statistická významnost rozdílů v analýze Kaplan–Meiera u hladin exprese miR-126-3p, miR-126-5p a miR-664-3p byla hodnocena pomocí log-rank testu. Pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik byl hodnocen vztah exprese zkoumaných miR a jiných potenciálních prognostických faktorů pro PFS a OS. K testování signifikance up- nebo down-regulace byl použit jednovýběrový t-test. Rozdíly v úrovni změny exprese miR a jejich korelace s odpovědí na léčbu z hlediska ORR byly testovány pomocí dvouvýběrového t-testu. Všechny uvedené p hodnoty jsou oboustranné a hladina statistické významnosti byla nastavena na $\alpha = 0,05$. Statistické zpracování a testování bylo provedeno pomocí softwaru STATISTICA pro analýzu dat (verze 12; StatSoft, Inc, 2013; www.statsoft.com).

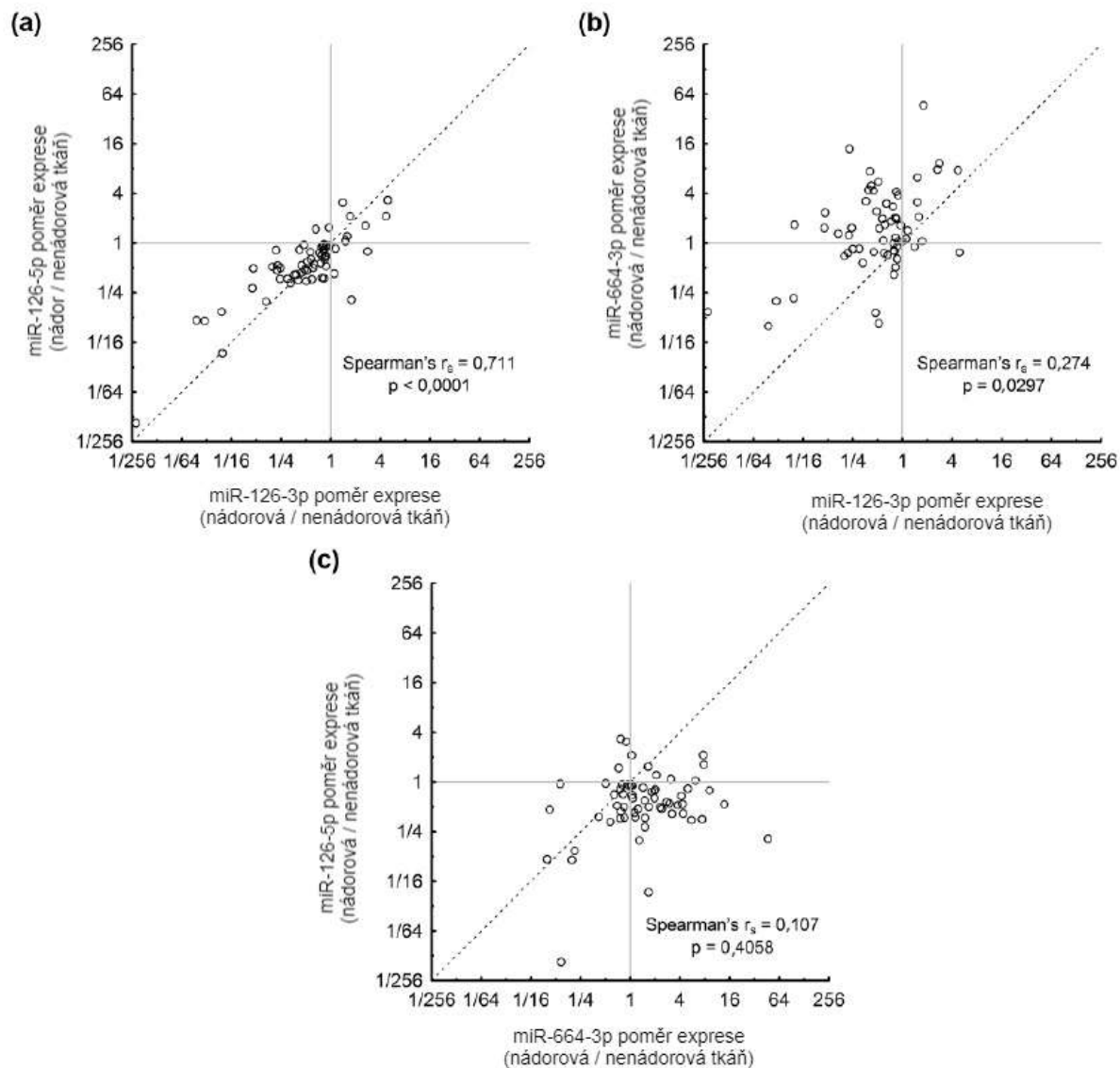
13.2 Výsledky

13.2.1 Exprese miR v nádorové tkáni

Snížené hladiny nádorové exprese miR-126-3p a miR-126-5p ve srovnání s přílehlou nenádorovou tkání byly zjištěny u 51 (80,9%) pacientů a 53 (84,1%) pacientů ($p < 0,0001$ a $p < 0,0001$). Nízké hladiny nádorové exprese miR-664-3p ve srovnání s nenádorovou tkání byly zjištěny u 23 (36,5%) pacientů ($p = 0,0132$). Hladiny exprese vybraných miR jsou znázorněny na **obrázku 40**. Relativní nádorové exprese miR-126-3p a miR-126-5p spolu signifikantně korelovaly (Spearmanovo $r_s = 0,711$, $p < 0,0001$), zatímco pouze slabá korelace byla pozorována mezi miR-664-3p a miR-126-3p ($r_s = 0,274$, $p = 0,0297$). Naopak žádná signifikantní korelace nebyla zaznamenána mezi miR-664-3p a miR-126-5p ($r_s = 0,107$, $p = 0,4058$). Výsledky korelační analýzy jsou zobrazeny na **obrázku 41**.



Obrázek 40 – Změny exprese miR-126-3p, miR-126-5p a miR-664-3p v nádoru oproti přilehlé nenádorové tkáni

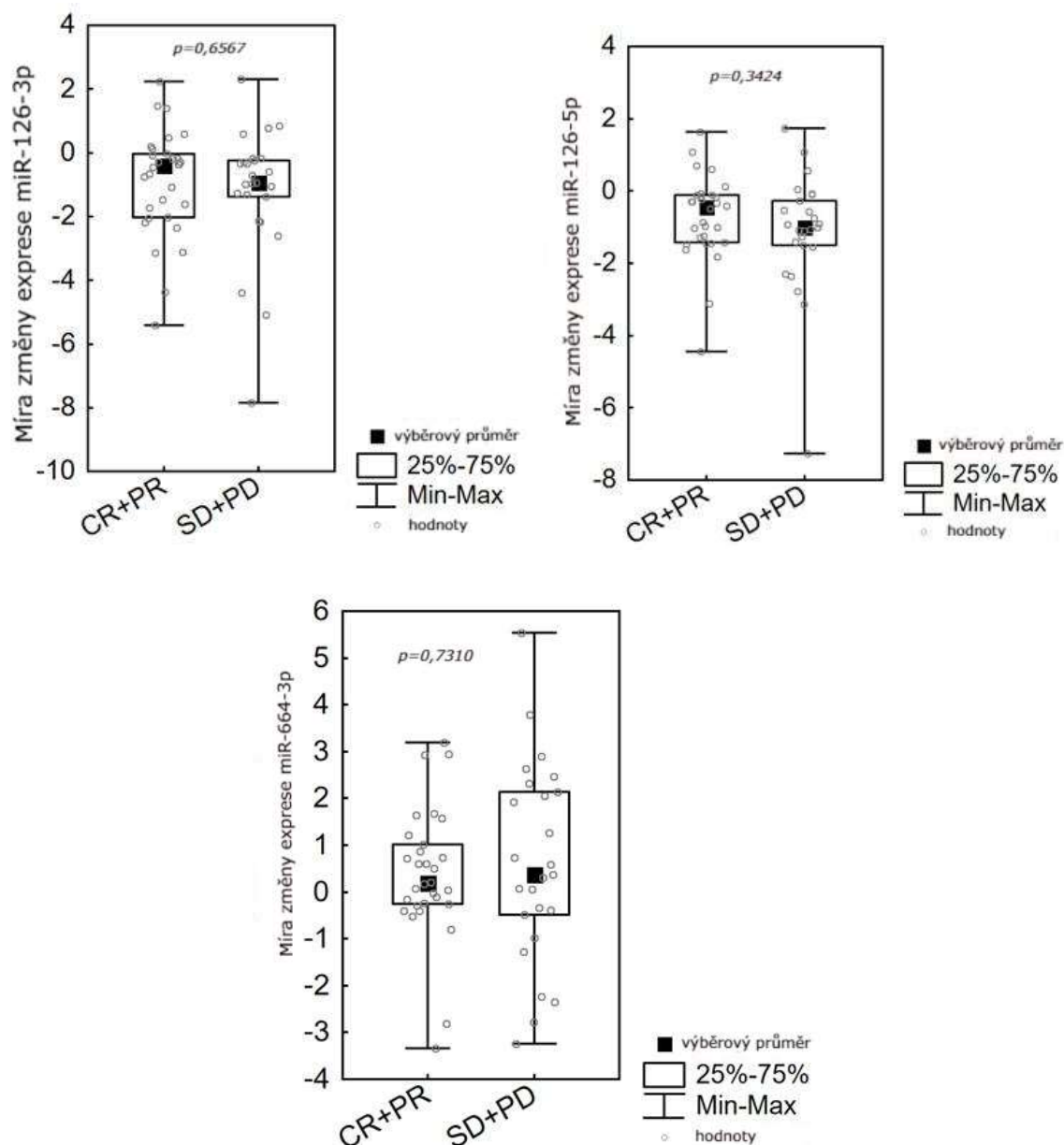


Obrázek 41 - Korelační analýza exprese miR-126-3p a miR-126-5p (a), miR-126-3p a miR-664-3p (b) a miR-664-3p a miR-126-5p (c).

Šedé linie odpovídají poměru exprese 1, tj. beze změny exprese mezi nádorovou a nenádorovou tkání. Přerušovaná linie představuje rovnost expresních poměrů na obou osách ($y=x$).

13.2.2 Vztah mezi hladinami exprese miR a efektem léčby

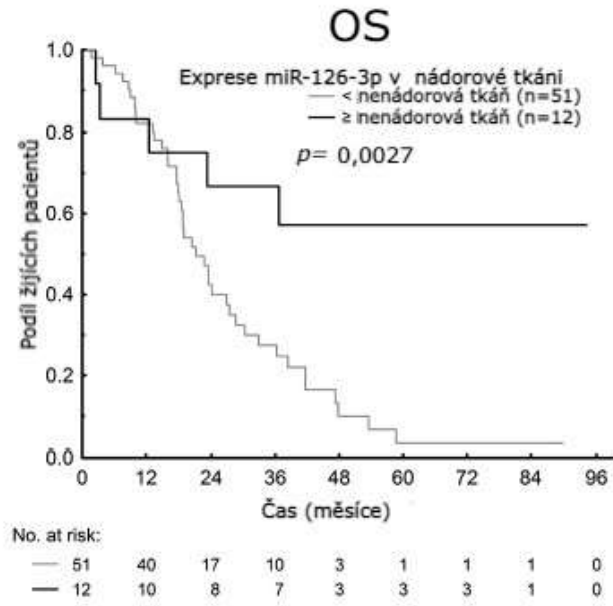
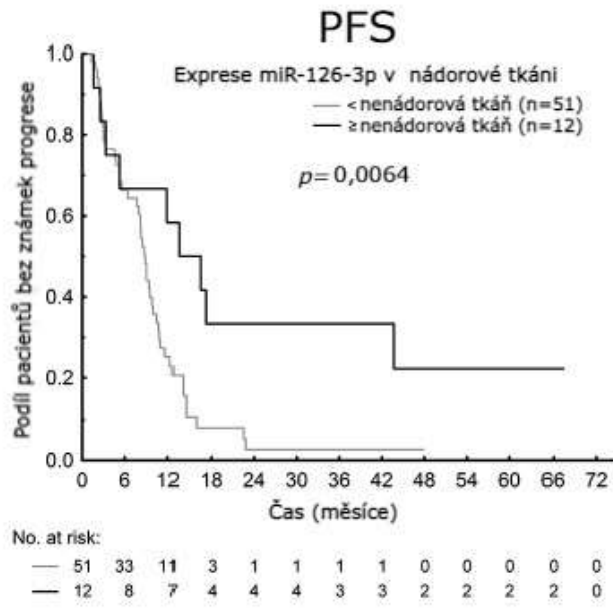
Nebyla prokázána signifikantní korelace ORR (CR+PR) s nádorovou expresí miR-126-3p ($p=0,6567$), miR 126-5p ($p=0,3424$) ani miR664 ($p=0,7310$) (obrázek 42).



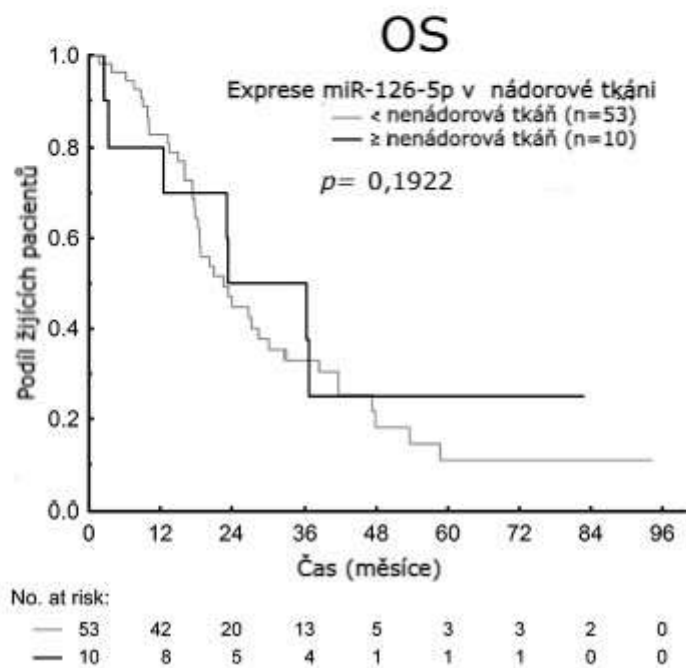
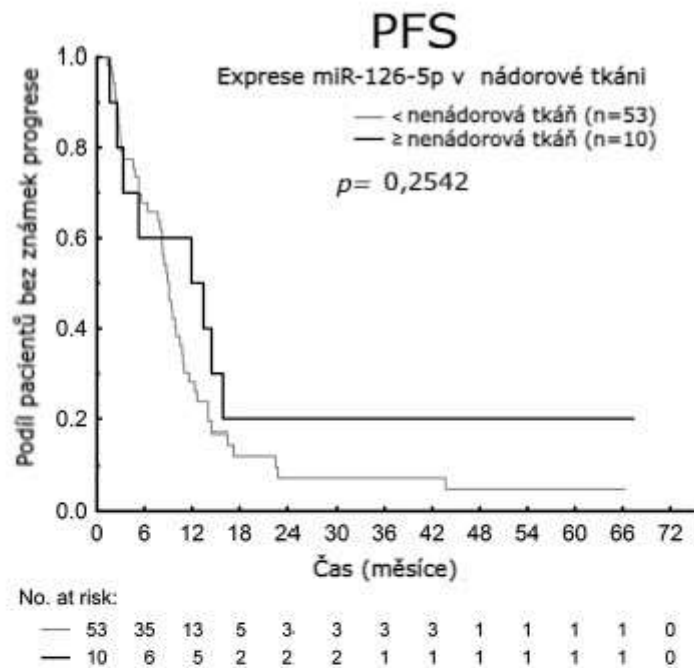
Obrázek 42 – Asociace mezi změnou exprese miR-126-3b, miR-126-5b a miR-664-3p a dosažením objektivní léčebné odpovědi (ORR)

CR=kompletní regrese, *PR*=parciální regrese, *SD*=stabilizace onemocnění, *PD*=progredující onemocnění

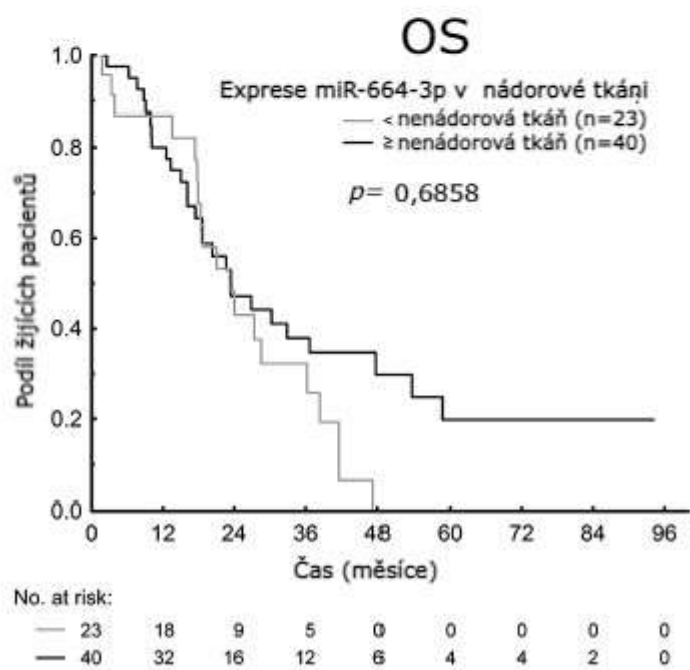
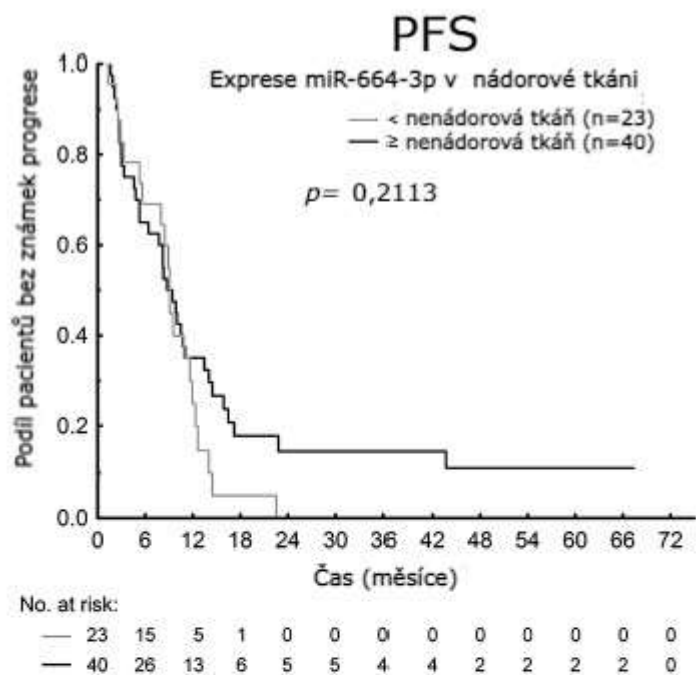
Medián PFS u pacientů se sníženou nádorovou expresí miR-126-3p činil 8,8 měsíce (95% CI: 7,1–10,0) ve srovnání s 13,5 měsíci (95% CI: 3,4–38,2) u pacientů se zvýšenou expresí ($p=0,0064$; **obrázek 43**). Medián OS u pacientů se sníženou nádorovou expresí miR-126-3p činil 20,9 měsíce (95% CI: 17,8–27,2), mediánu OS u pacientů se zvýšenou expresí nebylo dosaženo ($p=0,0027$; **obrázek 43**). Mediány PFS a OS u pacientů se sníženou nádorovou expresí miR-126-5p činily 9,0 (95% CI: 7,9–10,4) a 22,2 (95% CI: 18,1–29,7) měsíce ve srovnání s 12,0 (95% CI: 2,9–15,4) měsíců a 23,4 (95% CI: 6,9–36,8) měsíců u pacientů se zvýšenou expresí ($p=0,2113$ a $p=0,6858$, **obrázek 44**). Mediány PFS a OS činily u pacientů s down-regulací miR-664-3p v nádoru 9,1 (95% CI: 5,7–11,6) měsíce a 22,5 (95% CI: 17,8–31,6) měsíce ve srovnání s 8,8 (95% CI: 5,4–11,0) měsíce a 23,4 (95% CI: 17,2–38,1) měsíce u pacientů bez změny nebo se se zvýšenou expresí ($p=0,2542$ a $p=0,1922$; **obrázek 45**). Hodnoty PFS a OS jsou shrnuty v **tabulkách 7-9**. Základní klinické parametry byly hodnoceny společně s expresemi miR-126-3p, miR-126-5p a miR-664-3p v Coxově vícerozměrném modelu, kde bylo potvrzeno, že down-regulace miR-126-3p představuje významný nezávislý faktor pro PFS (HR: 0,28; $p=0,0053$) i OS (HR: 0,18; $p=0,0046$; **tabulka 10**). Medián PFS celé kohorty pacientů činil 9,1 měsíce (95% CI: 7,9–10,8) a medián OS 23,4 měsíce (95% CI: 18,6–31,0).



Obrázek 43 - Přežití bez progresie (PFS) a celkové přežití (OS) dle změny exprese miR-126-3p v nádoru



Obrázek 44 - Přežití bez progresie (PFS) a celkové přežití (OS) dle změny exprese miR-126-5p v nádoru



Obrázek 45 - Přežití bez progresie (PFS) a celkové přežití (OS) dle změny exprese miR-664-3p v nádoru

Tabulka 7 - Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) dle změny exprese miR-126-3p v nádoru

	Exprese miR-126-3p v nádorové tkáni		p (log-rank test)
	< Nenádorová tkáň (n=51)	≥ Nenádorová tkáň (n=12)	
Medián PFS (95% CI)	8,8 měsíce (7,1–10,0)	13,5 měsíce (3,4–38,2)	0,0064
3 měsíční PFS (95% CI)	79,8 % (68,8–90,8)	78,7 % (44,7–96,1)	
6 měsíční PFS (95% CI)	65,5 % (52,4–78,6)	65,8 % (39,0–92,6)	
12 měsíční PFS (95% CI)	24,0 % (12,0–36,1)	58,1 % (30,2–86,0)	
Medián OS (95% CI)	20,9 měsíce (17,8–27,2)	Nedosaženo	0,0027
12 měsíční OS (95% CI)	81,0 % (70,2–91,8)	75,5 % (51,2–99,8)	
24 měsíční OS (95% CI)	40,1 % (25,8–54,5)	66,1 % (39,3–92,9)	
36 měsíční OS (95% CI)	24,9 % (11,8–38,0)	57,6 % (29,1–86,2)	

Tabulka 8 - Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) dle změny exprese miR-126-5p v nádoru

	Exprese miR-126-5p v nádorové tkáni		p (log-rank test)
	< Nenádorová tkáň (n=53)	≥ Nenádorová tkáň (n=10)	
Medián PFS (95% CI)	9,0 měsíců (7,9–10,4)	12,0 měsíců (2,9–15,4)	0,2113
3 měsíční PFS (95% CI)	80,5 % (69,9–91,2)	74,5 % (47,7–100)	
6 měsíční PFS (95% CI)	66,8 % (54,1–79,5)	58,9 % (28,5–89,4)	
12 měsíční PFS (95% CI)	27,1 % (14,8–39,3)	49,7 % (18,8–80,7)	
Medián OS (95% CI)	22,2 měsíce (18,1–29,7)	23,4 měsíce (6,9–36,8)	0,6858
12 měsíční OS (95% CI)	81,7 % (71,3–92,2)	70,6 % (42,5–98,8)	
24 měsíční OS (95% CI)	44,9 % (30,8–59,1)	49,4 % (18,4–80,5)	
36 měsíční OS (95% CI)	31,5 % (17,9–41,1)	37,7 % (6,3–69,2)	

Tabulka 9 - Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) dle změny exprese miR-664-3p v nádoru

	Exprese miR-664-3p v nádorové tkáni		p (log-rank test)
	< Nenádorová tkáň (n=23)	≥ Nenádorová tkáň (n=40)	
Medián PFS (95% CI)	9,1 měsíce (5,7–11,6)	8,8 měsíce (5,4–11,0)	0,2542
3 měsíční PFS (95% CI)	81,8 % (66,1–97,6)	79,2 % (66,7–91,8)	
6 měsíční PFS (95% CI)	68,4 % (49,2–87,6)	63,4 % (48,5–78,3)	
12 měsíční PFS (95% CI)	24,4 % (5,8–43,0)	33,9 % (19,2–48,6)	
Medián OS (95% CI)	22,5 měsíce (17,8–31,6)	23,4 měsíce (17,2–38,1)	0,1922
12 měsíční OS (95% CI)	82,9 % (67,3–98,5)	78,1 % (65,3–90,9)	
24 měsíční OS (95% CI)	43,3 % (21,8–64,7)	46,7 % (30,5–62,8)	
36 měsíční OS (95% CI)	26,0 % (6,0–46,0)	35,3 % (19,4–51,2)	

Tabulka 10 - Coxův vícerozměrný model rizik pro přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS)

Parametr	Kategorie	Přežití bez progresu (PFS)		Celkové přežití (OS)	
		HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
Pohlaví	Ženy	1	0,0316	1	0,3432
	Muži	2,03 (1,06–3,88)		1,38 (0,71–2,69)	
Věk	<70 let	1	0,1781	1	0,0991
	≥ 70 let	1,61 (0,80–3,22)		1,87 (0,89–3,94)	
Linie terapie	První linie	1	0,224	1	0,0184
	Druhá nebo vyšší	1,57 (0,76–3,29)		2,76 (1,19–6,41)	
Lokalizace primárního tumoru	Rektum nebo sigma	1	0,2036	1	0,5562
	Kolon	1,46 (0,81–2,62)		1,21 (0,64–2,28)	
Exprese miR-126-3p v nádoru	< Nenádorová tkáň	1	0,0053	1	0,0046
	≥ Nenádorová tkáň	0,28 (0,11–0,69)		0,18 (0,05–0,59)	
Exprese miR-126-5p v nádoru	< Nenádorová tkáň	1	0,6329	1	0,1606
	≥ Nenádorová tkáň	0,81 (0,34–1,94)		2,10 (0,75–5,90)	
Exprese miR-664-3p v nádoru	< Nenádorová tkáň	1	0,8633	1	0,8326
	≥ Nenádorová tkáň	0,95 (0,51–1,75)		1,08 (0,52–2,23)	

14 Význam dysregulací miR-125b, let-7c, miR-99a, miR-17, miR-143 a miR-145 v nádoru u pacientů s mCRC léčených anti-EGFR protilátkami

14.1 Metodické postupy

Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 46 pacientů s histologicky verifikovaným mCRC wtRAS (wtKRAS a wtNRAS), kteří byli léčeni anti-EGFR monoklonálními protilátkami (cetuximab nebo panitumumab) v kombinaci s chemoterapií v první nebo druhé linii léčby v letech 2010 až 2019 na Onkologické a radioterapeutické klinice ve Fakultní nemocnici v Plzni. Molekulárně-genetické vyšetření mutací genů KRAS a NRAS bylo prováděno mimo rámec této studie před zahájením anti-EGFR terapie, neboť její indikace je podmíněná nemutovaným stavem RAS genů. K vyšetření byly užívané standardní certifikované metodiky založené na přímém sekvenování nebo real-time PCR. Souhrnná charakteristika souboru pacientů je uvedena v **tabulce 11**. Klinická data pacientů byla hodnocena retrospektivně.

Tabulka 11 - Základní charakteristiky souboru pacientů

Charakteristika	Kategorie	n (%)
Pohlaví	Ženy	12 (26,1)
	Muži	34 (73,9)
Věk	Medián [rozsah]	63,6 [37,3-82,5]
Lokalizace primárního nádoru	Rektum	16 (34,8)
	Kolon	30 (65,2)
Stranová lokalizace primárního nádoru	Vlevo	37 (80,4)
	Vpravo	7 (15,2)
	Transversum	2 (4,4)
Grade	G1	5 (10,9)
	G2	35 (76,1)
	G3	5 (10,8)
	Neznámý	1 (2,2)
Linie anti-EGFR léčby	První	36 (78,3)
	Druhá	10 (21,7)
Anti-EGFR protilátka	Cetuximab	21 (45,6)
	Panitumumab	25 (54,4)
Chemoterapie	FOLFOX	27 (58,7)
	FOLFIRI	19 (41,3)

Léčba a sledování follow-up

Anti-EGFR monoklonální protilátky (cetuximab nebo panitumumab) byly podávány v rámci kombinačních režimů spolu s chemoterapií v první nebo druhé linii systémové léčby, následně bylo pokračováno anti-EGFR terapií v režimu udržovací léčby. Chemoterapie byla podávána v těchto režimech: 5-FU a leukovorin v kombinaci s oxaliplatinou (FOLFOX) nebo s irinotekanem (FOLFIRI). Panitumumab (Vectibix) byl podáván ve standardní schválené dávce (6,0 mg/kg každých 14 dní). Cetuximab (Erbix) byl podáván ve standardní schválené dávce (počáteční dávka 400 mg/m², další dávky 250 mg/m² každých 7 dní). Žádný z pacientů nebyl dříve léčen anti-EGFR terapií. Sledování follow-up zahrnující klinické vyšetření, rutinní laboratorní testy a kontrolní radiodiagnostické zobrazovací metody bylo realizováno stejným způsobem jako v první části (viz **kapitola 13.1**). Léčebná odpověď byla hodnocena jako kompletní remise (**CR**),

částečná remise (**PR**), stabilní onemocnění (**SD**) anebo progredující onemocnění (**PD**). Míra dosažení celkové objektivní odpovědi (**ORR**) zahrnovala pacienty dosahující CR a PR. Míra dosažení kontroly onemocnění (**DCR**) zahrnovala ty, kteří dosáhli CR, PR a SD. PFS bylo stanoveno od data zahájení léčby anti-EGFR monoklonální protilátkou do data první zdokumentované progrese onemocnění nebo smrti. OS bylo stanoveno od data zahájení léčby anti-EGFR monoklonální protilátkou do data úmrtí, bez ohledu na jeho příčinu. Medián doby sledování činil 61,7 měsíce.

Stanovení exprese miR

Molekulárně-genetické analýzy cílené na stanovení exprese miR-125b, let-7c, miR-99a, miR-17, miR-143 a miR-145 v nádorové i nenádorové tkáni byly realizovány za použití identických laboratorních postupů jako v první části (viz kapitola 13.1).

Statistická analýza

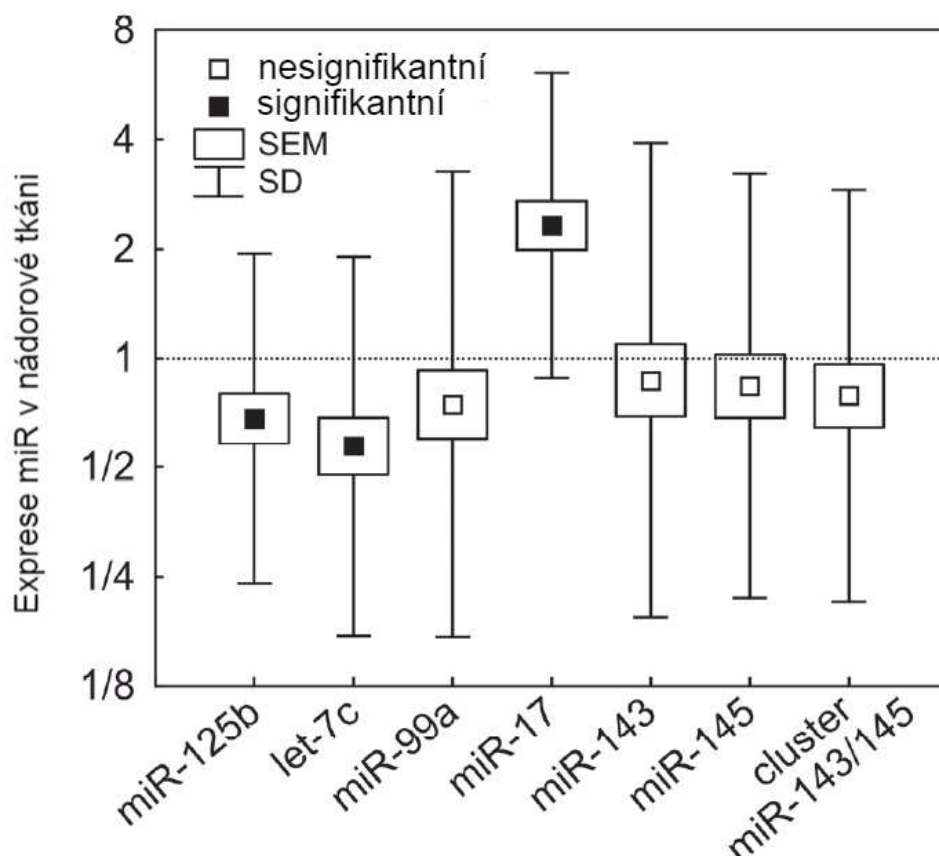
K charakterizaci souboru pacientů byly použity standardní frekvenční tabulky a popisná statistika. Úrovně změny exprese miR v nádorové tkáni (ve vztahu k přidružené nenádorové tkáni) byly vyjádřeny v $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnotách (jak je uvedeno v histogramech a pomocí Shapiro-Wilkova testu) a byly analyzovány pomocí parametrických metod. Expresce klastru miR-143/miR-145 byla stanovena jako aritmetický průměr- $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnot pro miR-143 a miR-145, a ten byl analyzován analogicky k ostatním úrovním exprese miR. K testování signifikance up- nebo down-regulace byl použit jednovýběrový *t*-test. Rozdíly v úrovni změny exprese miR mezi dvojicemi skupin odpovědí na léčbu (dosažená/nedosažená) z hlediska ORR nebo DCR byly testovány pomocí dvouvýběrového *t*-testu. Mediány přežití byly vypočítány z Kaplan-Meierových křivek přežití využívající lineární interpolaci mezi nejbližšími úplnými pozorováními. Medián doby sledování byl stanoven z údajů OS pomocí inverzní Kaplan-Meierovy metody. Vztah mezi změnou exprese miR a dobami přežití byl vypočítán pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik. Možné neproporcionální, významné nebo hraniční výsledky pak byly kontrolovány pomocí automatické stratifikace. Prahová hodnota (cut-off) miR byla stanovena automatizovaně optimalizačním procesem zjišťujícím prahovou hodnotu. Optimalizačním parametrem byla nejnižší Cox-Mantel *p*-hodnota v Kaplan-Meierově analýze, která byla následně ověřena pomocí Gehan-Wilcoxonova testu. Všechny uvedené *p* hodnoty jsou oboustranné a hladina statistické významnosti byla nastavena na $\alpha=0,05$.

14.2 Výsledky

14.2.1 Exprese miR v nádorové tkáni

Snížená hladina exprese miR-125b a let-7c v nádoru ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání byla zjištěna u 27 (64,3%) a u 30 (69,8%) pacientů ($p=0,0226$ a $p=0,0040$).

Zvýšená hladina exprese miR-17 v nádoru ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání byla zjištěna u 33 (84,6%) pacientů ($p<0,0001$). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v expresi miR-99a, miR-143, miR-145 nebo celého klastru miR-143/miR-145 mezi nádorem a přilehlou nenádorovou tkání ($p=0,1851$, $p=0,5376$, $p=0,3862$ a $p=0,2392$, v uvedeném pořadí). Zjištěné rozdíly relativní exprese hodnocených miR ilustruje **obrázek 46**.

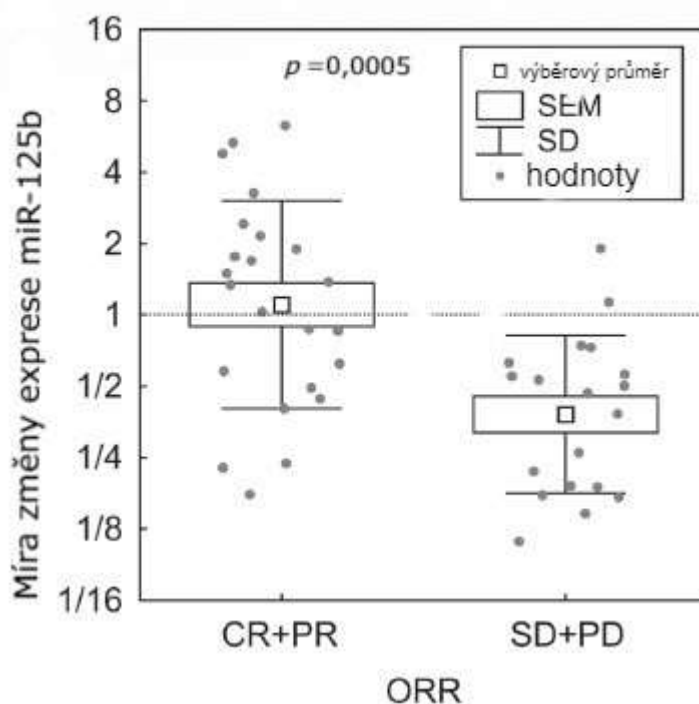


Obrázek 46 – Změny exprese miR v nádoru ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání

14.2.2 Vztah mezi hladinami exprese miR a efektem léčby

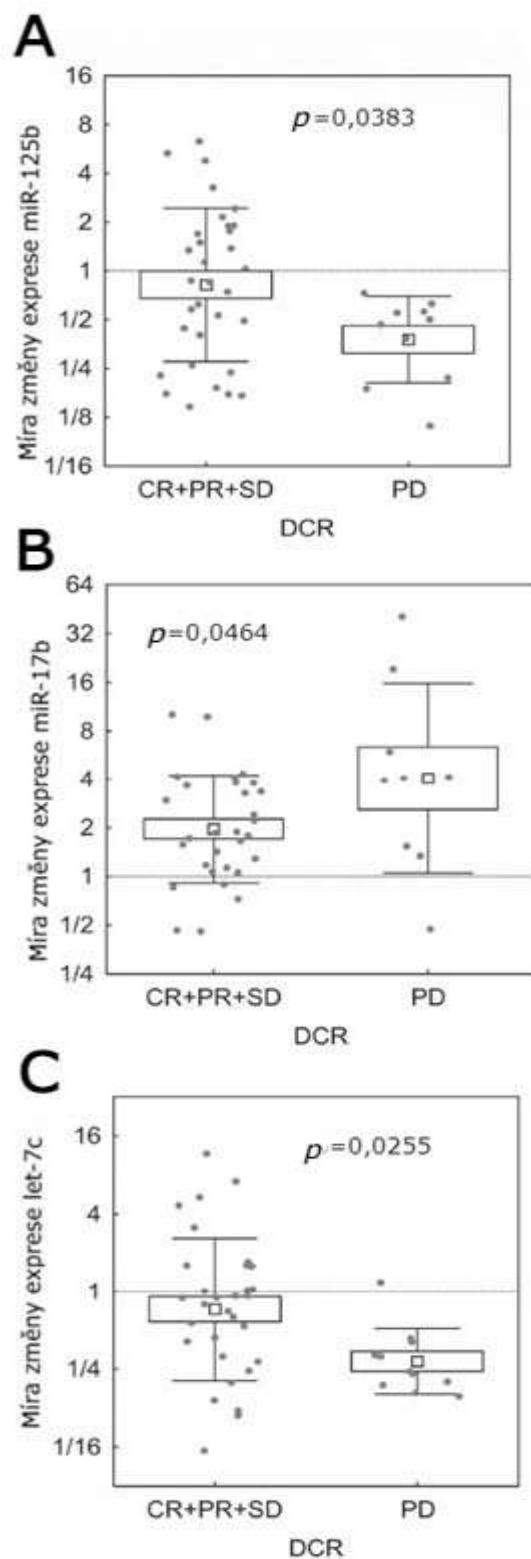
ORR (CR+PR) byla signifikantně nižší u pacientů s down-regulací miR-125b v nádorové tkáni ($p=0,0005$) (**obrázek 47**), zatímco změny hladin exprese let-7c, miR-99a, miR-17, miR-143, miR-145 a klastru miR-143/miR-145 významně nekorelovaly s ORR ($p=0,1418$, $p=0,1565$, $p=0,6419$, $p=0,9015$, $p=0,7799$, $p=0,8553$).

DCR (CR+PR+SD) byla signifikantně nižší u pacientů s down-regulací miR-125b a let-7c ($p=0,0383$, $p=0,0255$) a up-regulací miR-17 ($p=0,0464$) v nádorové tkáni (**obrázek 48A, B a C**), zatímco změny úrovně exprese miR-99a, miR-143, miR-145 a klastru miR-143/miR-145 významně nekorelovaly s DCR ($p=0,1211$, $p=0,9706$, $p=0,7399$, $p=0,8580$).



Obrázek 47 – Asociace mezi změnou exprese miR-125b a mírou dosažení objektivní léčebné odpovědi (ORR)

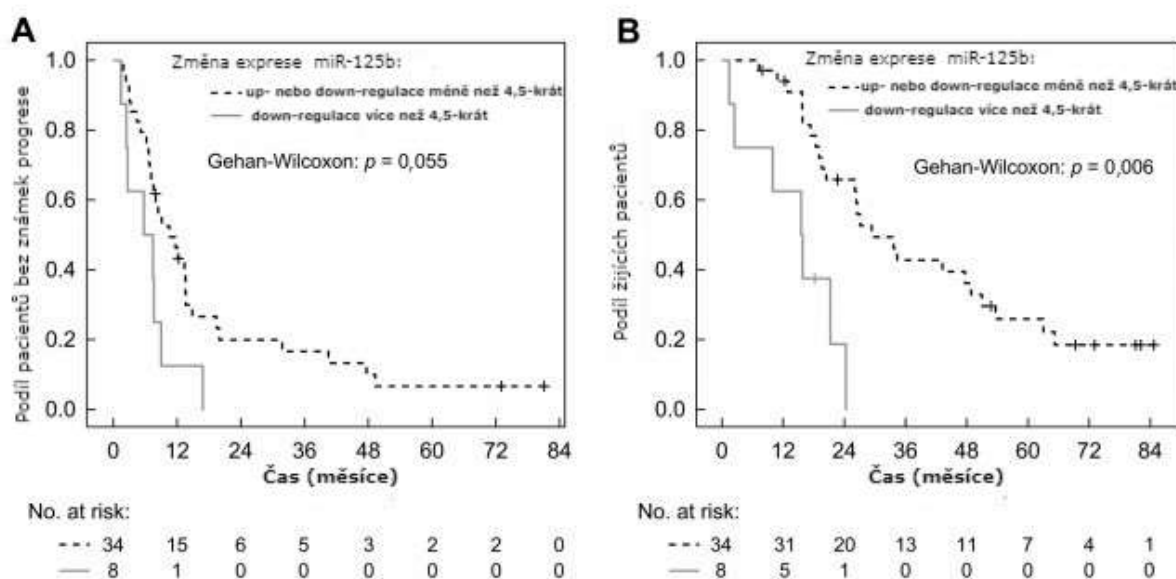
CR=kompletní regrese, PR=parciální regrese, SD=stabilizace onemocnění, PD=progredující onemocnění



Obrázek 48 - Asociace mezi změnou exprese miR-125b (**A**), miR-17 (**B**) a let-7c (**C**) a mírou dosažení kontroly onemocnění (DCR)

CR=kompletní regrese, PR=parciální regrese, SD=stabilizace onemocnění, PD=progredující onemocnění

Výsledky Coxova modelu proporcionálních rizik svědčí pro možnou asociaci mezi dysregulací miR-125b a PFS (HR: 0,849, $p=0,1389$) i OS (HR: 0,771, $p=0,0680$), avšak výsledky nedosahují statistické signifikance. Zbývající miR nevykazovaly žádnou korelaci s PFS ani OS ($p>0,2$ pro všechny). Po automatizované optimalizaci prahu stratifikace u miR-125b byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi dlouhodobě a krátkodobě přežívajícími pacienty při prahové hodnotě -2,17 (tj. 4,5 násobné snížení hladin miR-125b v nádorové tkáni) (PFS: $p=0,055$; OS: $p=0,006$) (**obrázek 49**).



Obrázek 49 - Srovnání přežití bez progresse (PFS) (**A**) a celkového přežití (OS) (**B**) dle změny exprese miR-125b s využitím automatizované optimalizace prahové hodnoty stratifikace (down-regulace miR-125b v nádorové tkáni)

15 Diskuze

Léčba mCRC se výrazně změnila v posledních letech díky zavedení preparátů cílené terapie, což vede ke prodloužení přežívání i zlepšení kvality života pacientů. Prognostické a prediktivní biomarkery hrají klíčovou roli ve výběru vhodné léčebné strategie pro každého jednotlivého pacienta v rámci konceptu personalizované onkologické léčby.

V současné době jsou k dispozici některé molekulárně-genetické prediktivní biomarkery, které jsou využívány k výběru cílené terapie v rutinní klinické praxi. Zásadní význam mají zejména mutace genů KRAS a NRAS predikující rezistenci k anti-EGFR terapii. Dále zde lze uvést mutace BRAF a overexprese/amplifikace HER2/neu, které jsou často asociovány s celkově nepříznivou prognózou, avšak jejich prediktivní význam pro rezistenci k anti-EGFR terapii, z hlediska doposud předložených důkazů, má své limity. Nepochybný je jejich prediktivní význam pro využití cílené anti-BRAF nebo anti-HER2 terapie u mCRC. Faktem zůstává, že při selekci anti-EGFR terapie na pacienty s wtRAS, případně i wtBRAF mCRC, na tuto léčbu není dosaženo odpovědi u cca 30-40 % pacientů [245]. Co se týče možnosti predikce antiangiogenní cílené terapie, zde v současné době neexistují žádné relevantní prediktivní biomarkery, které by bylo možné využít k předpovědi léčebné odpovědi. Hledání nových potenciálních prediktivních biomarkerů, potenciálně využitelných k selekci pacientů vhodných k podání dané cílené léčby představuje významnou oblast celosvětově intenzivně probíhajícího aplikovaného výzkumu u mCRC.

MiR představují důležité endogenní regulátory genové exprese a tímto ovlivňují klíčové buněčné procesy, mezi které patří, mimo jiné, diferenciaci, proliferaci nebo apoptózu. Je známo, že dysregulace na úrovni miR sehrávají zásadní roli v procesu kancerogeneze a rovněž ovlivňují biologické chování nádoru. Stále více prací dokazuje, že změny exprese některých miR jsou asociovány se vznikem a klinickým průběhem nádorových onemocnění, včetně odpovědi na některé konkrétní léčebné modalitě.

Dysregulace na úrovni miR jsou v poslední době považovány za velmi slibné kandidáty na nové prognostické a prediktivní biomarkery [246, 247].

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na zhodnocení významu dysregulací vybraných miR v nádoru u pacientů s mCRC, kteří byli léčeni odlišnými strategiemi cílené léčby, které představují kombinace chemoterapie s antiangiogenní cílenou léčbou bevacizumabem a kombinace chemoterapie s anti-EGFR cílenou terapií zahrnující cetuximab nebo panitumumab.

V první výzkumné části jsme zaměřili na hodnocení významu dysregulací miR-126 a miR-664 v nádoru u pacientů s mCRC léčených bevacizumabem.

MiR-126 je exprimována typicky v endotelových buňkách, v kapilárách i ve větších krevních cévách a sehrává významnou roli zejména v regulaci angiogeneze [248]. Byly popsány dvě formy, miR-126-3p a miR-126-5p. MiR-126-3p sehrává důležitou roli v regulaci angiogeneze a je nezbytná pro regulaci integrity krevních cév [5,6]. Hlavním cílem miR-126-3p je VEGF-A mRNA a předchozí studie ukazují její význam v regulaci signální transdukce zprostředkované VEGF-A [249-251]. Down-regulace miR-126-3p je popisována u řady maligních nádorů a tato miR je často označována za tumor supresor [252-255]. Informací o specifické funkci miR-126-5p a významu její dysregulace u nádorů je výrazně méně. Bylo popsáno, že sehrává roli, která je při progresi nádorového růstu, stimulací proliferace endotelu nebo uplatněním při regulaci adheze a transmigrace leukocytů [256, 257]. V naší studii jsme zaznamenali signifikantní down-regulaci miR-126-3p i miR-126-5p v nádorové tkáni ve srovnání s přílehlou nenádorovou tkání ($p < 0,0001$ a $p < 0,0001$), což je v souladu s výsledky, které popsali Guo et al. [251]. Zároveň jsme prokázali signifikantní asociaci down-regulace miR-126-3p a miR-126-5p ($p < 0,0001$). Naše výsledky ukazují významně kratší PFS a OS u pacientů, u kterých byla zjištěna down-regulace miR-126-3p v nádorové tkáni ($p = 0,0064$ a $p = 0,0027$). Coxův model proporcionálních rizik odhalil, že exprese miR-126-3p byla významně asociována s PFS (HR: 0,28; $p = 0,0053$) a také s OS (HR: 0,18; $p = 0,0046$) a byla tedy vyhodnocena jako nejvýznamnější a zároveň nezávislý prognostický faktor s ohledem na oba ukazatele přežití. Podobné výsledky byly publikovány Hansenem et al., kteří zaznamenali významně kratší PFS u pacientů s mCRC zařazených do klinické studie fáze III, NORDIC ACT [258]. Neprokázali jsme signifikantní dopad down-regulace miR-126-3p na ORR ($p = 0,6567$). Tento výsledek však může být ovlivněn větším zastoupením pacientů léčených ve vyšší než druhé linii, kdy byly užívány méně intenzivní chemoterapeutické režimy. Naše výsledky, které jsou ve shodě s Hansenem, nasvědčují tomu, že pacienti s down-regulací miR-126-3p špatně profitují z cílené léčby založené na blokádě angiogeneze v podobě anti-VEGF monoklonální protilátky.

Existuje jen velmi málo informací o významu dysregulace miR-126-5p, která vychází ze stejného prekurzoru jako miR-126-3p. Doposud nebyla provedena žádná relevantní studie zkoumající vliv dysregulace miR-126-5p na progresi mCRC. V naší studii nebyl pozorován signifikantní dopad down-regulace miR-126-5p na ORR ($p = 0,3424$), PFS ($p = 0,2113$) ani OS ($p = 0,6858$).

MiR-664-3p představuje další miR, která se účastní regulace angiogeneze. Jejím cílem je neuroligin 1, který, společně se svým vazebným partnerem neurexinem, je široce exprimován ve vaskulárním systému a oba se významně podílejí na regulaci angiogenezi [259, 260]. Bylo zjištěno, že dysregulace miR-664 se podílí na ovlivnění růstu, diferenciaci a regulaci apoptózy u některých malignit [260]. Dysregulace miR-664 ani jejich význam u mCRC doposud nebyly výraznější

zkoumány. V naší studii jsme zaznamenali signifikantní down-regulaci miR-664-3p v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání ($p=0,0132$). Neprokázali jsme signifikantní dopad down-regulace miR-664-3p na ORR ($p=0,7310$), PFS ($p=0,2542$) ani OS ($p=0,1922$).

Ve druhé výzkumné části jsme se zaměřili na hodnocení významu dysregulací miR-125b, let-7c, miR-99a, miR-17, miR-143 a miR-145 v nádoru u pacientů s mCRC léčených anti-EGFR protilátkami cetuximabem nebo panitumumabem. MiR-125b je členem rodiny miR-125, u které je známo, že hraje klíčovou roli v mnoha procesech souvisejících s nádorovými procesy jako je proliferace, diferenciací a apoptóza [261]. Cílení miR-125b na více genů zapojených do procesu iniciace a progresu nádorového růstu bylo již dobře popsáno a dysregulace miR-125b je běžně pozorována u mnoha druhů zhoubných nádorů. Pozoruhodné je, že miR-125b cílí zároveň na tumor supresorové geny i onkogeny, což vede k tomu, že up- i down-regulace mohou mít různé účinky, které se zdají být závislé i na konkrétním typu nádoru [261]. Down-regulace miR-125b byla popsána například u karcinomu prsu, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu jícnu, močového měchýře, štítné žlázy, ovaria a v neposlední řadě i u CRC. Naopak up-regulace miR-125b byla popsána u retinoblastomu, karcinomu nosohltanu, glioblastomu a některých leukémií [261, 262]. Mezi důležité cíle miR-125b patří tumor supresorový gen TP53, klíčový regulátor apoptózy [264]. Dále bylo prokázáno, že miR-125b se zaměřuje na několik dalších regulátorů apoptózy, jako jsou PUMA a BAK1, stejně jako regulátory buněčného cyklu, včetně cyklinu C [263]. U nádorů charakterizovaných up-regulací miR-125b působí miR-125b převážně jako onkogen, což vede k blokování apoptózy a stimulaci proliferace. Na druhou stranu miR-125b také cílí na geny kódující receptory lidského epidermálního růstového faktoru (HER) 2 a 3, které představují důležité onkogenní signální molekuly, které jsou často up-regulovány u některých tumorů, typicky u karcinomu prsu. U těchto nádorů miR-125b působí převážně jako tumor supresor a její down-regulace vede ke zvýšené signalizaci HER2/3, která může vést k iniciaci kancerogeneze nebo stimulaci nádorového růstu [264]. Role dysregulace miR-125b v CRC není dostatečně objasněna a její význam u pacientů léčených anti-EGFR cílenou terapií je nejasná.

V naší studii jsme pozorovali významnou down-regulaci miR-125b v nádorové tkáni v ($p=0,0226$). To je v souladu se studií, kterou dříve publikovali Chen a Xu, kteří zároveň uvádějí, že na down-regulaci miR-125a a miR-125b u CRC se může podílet hypermetylace DNA [265]. Naše výsledky ukazují signifikantně nižší ORR a DCR u pacientů, u kterých byla zjištěna down-regulace miR-125b v nádorové tkáni ($p=0,0005$ a $p=0,0383$) a po automatizované optimalizaci prahu stratifikace u miR-125b byla zjištěna signifikantní asociace down-regulace miR-125b s kratším

PFS a OS ($p=0,055$ a $p=0,006$). Tyto výsledky jsou v souladu se studií provedenou Capuzzem et al. [266].

MiR označovaná jako let-7c je členem rodiny let-7, která zahrnuje let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-98 a miR-202 [267]. Jejich hlavní rolí je regulace buněčné diference a proliferace, čehož dosahují ovlivněním funkce různých signálních drah [268]. Například rodina let-7 negativně reguluje expresi RAS i dalších onkogenů, jako jsou MYC, IGF1 a HMGA2, které představují kritické regulátory zejména proliferace u CRC [269-271]. Členové rodiny let-7 jsou tedy široce považováni za nádorové supresory a jejich down-regulace byla popsána u mnoha druhů rakoviny, včetně CRC [273].

V naší studii jsme zjistili významnou down-regulaci let-7c v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání ($p=0,0040$). To je ve shodě s prací Hany et al., jejichž studie též dokazuje korelaci s kratším přežitím pacientů [273]. Výsledky naší studie ukazují signifikantní asociaci down-regulace let-7c s nižší DCR ($p=0,0255$), rozdíl v ORR nebyl signifikantní ($p=0,1418$) a přežití nebylo možné hodnotit. Naše výsledky jsou tedy poněkud odlišné od studie Cappuzza et al., kde byla down-regulace let-7c spojena s významně kratším OS, ale nikoliv s kratším PFS nebo nižší DCR u pacientů s mCRC léčených anti-EGFR cílenou terapií [266].

MiR-99a se podílí na regulaci epiteliální mezenchymální tranzice (EMT), což je jeden z klíčových procesů souvisejících zejména s metastazováním [274]. V naší studii nevykazovala dysregulace miR-99a žádnou asociaci s přežitím, ORR nebo DCR.

MiR-17 je členem klastru miR-17-92, který hraje důležitou roli v karcinogenezi [275]. U CRC se podílí hlavně na regulaci EMT. V naší studii jsme prokázali významnou up-regulaci miR-17 v nádoru ($p<0,0001$), což je v souladu s předchozími studiemi, které publikovali Huang et al. a Lai et al. [276, 277]. Pozorovali jsme patrnou asociaci nižší DCR s up-regulací miR-17 ($p=0,0464$), rozdíl však byl na hraně statistické významnosti. Nezaznamenali jsme žádné významné rozdíly v PFS nebo OS, které by byly spojeny s dysregulací miR-17.

MiR-143 a miR-145 tvoří klastr, který hraje roli v regulaci více buněčných procesů, jako jsou proliferace, apoptóza, invaze, diference a angiogeneze [277]. Výsledky naší studie neprokázaly žádnou významnou souvislost mezi dysregulací miR-143, miR-145 nebo celého klastru miR-143/miR-145 a přežitím či léčebnou odpovědí.

Hlavní limitace naší práce představovaly její retrospektivní design a zejména limitovaný počet pacientů a rovněž i určitá vnitřní heterogenita souborů pacientů. Heterogenita chemoterapeutických režimů, zahrnující méně intenzivní režimy použité v pozdějších léčebných liniích v kombinaci s bevacizumabem v první části, měla zřejmě dopad na hodnocení ORR. Soubor pacientů ve druhé části byl po

stránce léčby homogenní, neboť zahrnoval pacienty léčené v první nebo druhé linii, kterým byl podáván standartní dublet FOLFOX nebo FOLFIRI v kombinaci s anti-EGFR terapií. To umožňuje dobré hodnocení léčebné odpovědi. Na druhou stranu, omezený počet pacientů i doba sledování zde částečně limitovaly vyhodnocení přežití, a proto zde byly výsledky pro PFS a OS statisticky signifikantní až po optimalizaci prahové hodnoty, jak je uvedeno výše. Naše studie nezahrnovaly kontrolní skupiny, která nebyly léčeny primárně sledovanou cílenou léčbu, tedy bevacizumabem nebo cetuximabem či panitumumabem. Proto nemůže být s jistotou určeno, zda jsou zjištěné dysregulace miR v nádorové tkáni skutečně prediktivním faktorem pro danou cílenou terapii nebo představují prognostický faktor spojený s mCRC obecně. Na druhou stranu, studií zaměřených na význam miR v souvislosti s odpovědí na specifický typ systémové léčby u mCRC stále není mnoho a většinou jsou zatíženy v principu obdobnými limitacemi jako naše práce, ačkoli mají větší kohorty pacientů. Navíc, některé z námi zkoumaných miR byly v dané souvislosti zkoumány poprvé.

16 Závěr

Naše výsledky ukazují, že down-regulace miR-126-3p v nádorové tkáni pacientů s mCRC významně koreluje s nepříznivým léčebným efektem systémové léčby založené na kombinaci chemoterapie a bevacizumabu. Další výsledky ukazují, že down-regulace miR-125b a let-7c a up-regulace miR-17 v nádorové tkáni pacientů s wtRAS mCRC signifikantně koreluje s nepříznivou odpovědí na systémovou terapii založenou na kombinaci chemoterapie a anti-EGFR cílené léčby.

Tímto jsme identifikovali miR, které představují potenciálně efektivní prognostické a prediktivní biomarkery pro různé typy cílené léčby pacientů s mCRC. Jejich význam a možnost využití v reálné klinické praxi by měly být v budoucnu dále zkoumány a ověřeny na větších souborech pacientů, optimálně v podmínkách prospektivní klinické studie.

17 Souhrn výsledků

I)

- Down-regulace miR-126-3p ($p < 0,0001$) a miR-126-5p ($p < 0,0001$) v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání. Obě down-regulace jsou vzájemně silně asociované ($p < 0,0001$).
- Down-regulace miR-664-3p ($p = 0,0132$) v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání.
- Nebyla prokázána signifikantní korelace ORR s nádorovou expresí miR-126-3p ($p = 0,6567$), miR-126-5p ($p = 0,3424$) ani miR-664 ($p = 0,7310$) u pacientů léčených chemoterapií a bevacizumabem.
- Signifikantně kratší PFS a OS pacientů s down-regulací miR-126-3p v nádoru ($p = 0,0064$ a $p = 0,0027$) při léčbě chemoterapií a bevacizumabem.
- Coxův vícerozměrný model potvrdil, že down-regulace miR-126-3p představuje významný nezávislý faktor pro PFS (HR: 0,28; $p = 0,0053$) i OS (HR: 0,18; $p = 0,0046$) při léčbě chemoterapií a bevacizumabem.
- U down-regulací miR-126-5p ani miR-664-3p nebyl pozorován signifikantní dopad na přežití ani ORR pacientů léčených chemoterapií a bevacizumabem.

II)

- Down-regulace miR-125b ($p = 0,0226$) a let-7c ($p = 0,0040$) v nádoru ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání.
- Up-regulace miR-17 v nádoru ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání ($p < 0,0001$).
- Nezjištěny významné rozdíly v expresi miR-99a, miR-143, miR-145 nebo celého klastru miR-143/miR-145 mezi nádorem a přilehlou nenádorovou tkání ($p = 0,1851$, $p = 0,5376$, $p = 0,3862$ a $p = 0,2392$).
- Down-regulace miR-125b v nádorové tkáni signifikantně asociována s nižší ORR ($p = 0,0005$) při léčbě chemoterapií a anti-EGFR cílené terapii.
- Po automatizované optimalizaci prahu stratifikace zjištěno kratší PFS a OS u pacientů s down-regulací miR-125b v nádorové tkáni při léčbě chemoterapií a anti-EGFR cílené terapii ($p = 0,055$ a $p = 0,006$).

- Down-regulace miR-125b a let-7c a up-regulace miR-17 v nádorové tkáni signifikantně asociovány s nižší DCR ($p=0,0383$, $p=0,0255$, $p=0,0464$)
- Změny úrovně exprese miR-99a, miR-143, miR-145 a klastru miR-143/miR-145 významně nekorelovaly s ORR ani DCR při léčbě chemoterapií a anti-EGFR cílené terapii.

SEZNAM LITERATURY

1. FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359-86.
2. BRIERLEY J, GOSPODAROWICZ M, WITTEKIND CH. TNM klasifikace zhoubných novotvarů: 8. vydání. 1. elektronické vydání. Praha: Grada, 2020. 1 online zdroj (266 stran). ISBN: 978-80-7472-185-X; 978-80-7472-185-4.
3. DUŠEK L, MUŽÍK J, KUBÁSEK M. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2021-1-21]. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861. Dostupné z WWW: <http://www.svod.cz>.
4. ROBINSON JR, NEWCOMB PA, HARDIKAR S, et al. Stage IV colorectal cancer primary site and patterns of distant metastasis. *Cancer Epidemiol*. 2017; 48: 92-95.
5. FERLAY J, ERVIK M, LAM F, COLOMBET M, MERY L, PIÑEROS M, ZNAOR A, SOERJOMATARAM I, BRAY F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [cit. 2021-1-22]. Dostupné z WWW: <https://gco.iarc.fr/today>
6. HALF E, BERCOVICH D, ROZEN P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* [online]. 2009, vol. 4, s. 22. [cit. 2021-1-22]. Dostupné z WWW: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-4-22>. ISSN 1750-1172.
7. KNUDSEN AL, BISGAARD ML, BÜLOW S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer*. 2003; 2(1): 43-55.
8. WIN AK, JENKINS MA, DOWTY JG, et al. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017; 26(3): 404-412.
9. CHEN S, WANG W, LEE S, et al. Colon Cancer Family Registry. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA*. 2006; 296(12): 1479-87.
10. AMOS CI, FRAZIER ML, MCGARRITY TJ ET, et al. Peutz-Jeghers Syndrome. *GeneReviews* 2007. [cit. 2021-1-21] Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=pjs>
11. FOTIADIS C, TSEKOURAS DK, ANTONAKIS P, et al. Gardner's syndrome: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(34): 5408-5411.

12. SIEBER OM, LIPTON L, CRABTREE M, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003; 348(9): 791-799.
13. CHOW E, MACRAE F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20(11): 1634-1640.
14. JASS JR. Juvenile polyposis. In: Spiegelman AD, Thomson JP (eds). *Familial adenomatous polyposis and other polyposis syndromes.* London: Edward Arnold 1994: 203–214.
15. Onkologie: Kolorektální karcinom - současný pohled na rizikové a protektivní faktory, možnosti prevence [online]. Praha: Solen, 2015, 9(4) [cit. 2020-11-5]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201504-0006_
16. CHAN AT, GIOVANNUCCI EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2029-2043.
17. SHOELSON SE, HERRERO L, NAAZ A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007; 132(6): 2169-2180.
18. ELIAKIM R, YASSIN K, NIV Y, et al. Prospective multicenter performance evaluation of the second-generation colon capsule compared with colonoscopy. *Endoscopy.* 2009; 41(12): 1026-1031.
19. SEEFF LC, NADEL MR, KLABUNDE CN, et al. Patterns and predictors of colorectal cancer test use in the adult U.S. population. *Cancer.* 2004; 100(10): 2093-2103.
20. CAI S, LI Y, DING Y, CHEN K, JIN M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* 2014; 23: 532–539.
21. THANIKACHALAM K, KHAN G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients.* 2019; 11(1): 164.
22. DASHTI SG, BUCHANAN DD, JAYASEKARA H, et al. Alcohol Consumption and the Risk of Colorectal Cancer for Mismatch Repair Gene Mutation Carriers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2017; 26: 366–375.
23. ROSATO V, TAVANI A, GRACIA-LAVEDAN E, et al. Type 2 Diabetes, Antidiabetic Medications, and Colorectal Cancer Risk: Two Case-Control Studies from Italy and Spain. *Front Oncol.* 2016; 6: 210.
24. THRIFT AP, GONG J, PETERS U, et al. Mendelian Randomization Study of Body Mass Index and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2015; 24: 1024–1031.

25. MA Y, ZHANG P, WANG F, et al. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: A systematic review of prospective studies. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 3775–3782.
26. FEARON ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 479-507.
27. LI XL, ZHOU J, CHEN ZR, CHNG WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(1): 84-93.
28. FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61(5): 759-767.
29. BIENZ M, CLEVERS H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell.* 2000 ; 103(2): 311-320.
30. MORÁN A, ORTEGA P, DE JUAN C, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(3): 151-158.
31. KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996; 87(2): 159-170.
32. YAMAGISHI H, KURODA H, IMAI Y, et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer.* 2016; 35: 4.
33. BETTINGTON M, WALKER N, CLOUSTON A, et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology.* 2013; 62(3): 367-386.
34. LONGACRE TA, FENOGLIO-PREISER CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 1990; 14(6): 524-537.
35. BOSMAN F, YAN P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol.* 2014; 65(4): 257-266.
36. JACOB S, PRAZ F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie.* 2002; 84(1): 27-47.
37. KIM ER, CHANG DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(29): 9872-9881.
38. WINAWER SJ, ZAUBER AG, HO MN, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 1993; 329(27): 1977-1981.
39. THERASSE P, ARBUCK SG, EISENHAUER EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for

Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(3): 205-216.

40. ADAM Z, VANÍČEK J, VORLÍČEK J. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0896-5.

41. ZAVORAL M, SUCHANEK S, ZAVADA F, et al. Colorectal cancer screening in Europe. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(47): 5907-5915.

42. PETRUŽELKA L. Kolorektální karcinom. Praha: Farmakon Press, spol. s r.o., [2018]. Farmakoterapie. ISBN 978-80-906589-7-4.

43. Kolorektum.cz: Program kolorektálního screeningu v České republice. Prevence a vyšetření rakoviny tlustého střeva a konečníku [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2019, 13. 7. 2011 [cit. 2020-10-15]. Dostupné z: <https://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--e-learning--prukaz-okultního-krvacení-ve-stolici-fobt-screening-krca--guajakovy-test-gfobt>

44. ZAVORAL M, VEPŘEKOVÁ G, SUCHÁNEK Š. Diagnostika kolorektálního karcinomu. *Postgrad Med* 2012; 13: 409-412

45. GREGA T, MÁJEK O, NGO O, et al. Current principles of colorectal cancer screening – from opportunistic screening to a population-based screening program. *Gastroenterologie a hepatologie* [online]. 2016, 70(5), 383-392 [cit. 2020-10-15]. ISSN 18047874. Dostupné z: <http://www.csgh.info/en/article/current-principles-of-colorectal-cancer-screening-from-opportunistic-screening-to-a-population-based-screening-program-10734>

46. BRENNER H, CHEN C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br J Cancer.* 2018; 119(7): 785-792.

47. DUŠEK L, MUŽÍK J, KUBÁSEK M. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2020-12-21]. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861. Dostupné z: <https://www.svod.cz/analyse.php?modul=vek#>

48. HEYS SD, O'HANRAHAN TJ, BRITTENDEN J, EREMIN O. Colorectal cancer in young patients: a review of the literature. *Eur J Surg Oncol.* 1994; 20(3): 225-231.

49. EXTERMANN M, OVERCASH J, LYMAN GH, et al. Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients. *J Clin Oncol.* 1998; 16(4): 1582-1587.

50. OKEN MM, CREECH RH, TORMEY DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982; 5(6): 649-655.

51. FERJANI AM, GRIFFIN D, STALLARD N, et al. A newly devised scoring system for prediction of mortality in patients with colorectal cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2007; 8(4): 317-322.
52. COMPTON CC, FIELDING LP, BURGART LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124 (7): 979-994.
53. SYMONDS DA, VICKERY AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer.* 1976; 37(4): 1891-1900.
54. HAMILTON SR, AALTONEN L A. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System: World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC, 2000.
55. KNUDSEN JB, NILSSON T, SPRECHLER M, et al. Venous and nerve invasion as prognostic factors in postoperative survival of patients with resectable cancer of the rectum. *Dis Colon Rectum.* 1983; 26(9): 613-617.
56. MINSKY BD, MIES C, RICH TA, RECHT A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989; 17(2): 311-318.
57. UENO H, HASE K, MOCHIZUKI H. Criteria for extramural perineural invasion as a prognostic factor in rectal cancer. *Br J Surg.* 2001; 88(7): 994-1000.
58. YAMASHITA K, WATANABE M. Clinical significance of tumor markers and an emerging perspective on colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2009; 100(2): 195-199.
59. DUFFY MJ, LAMERZ R, HAGLUND C, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int J Cancer.* 2014; 134(11): 2513-2522.
60. MUZNY DM, BAINBRIDGE MN, CHANG K, et al. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487(7407): 330-337.
61. HU W, YANG Y, QI L, CHEN J, et al. Subtyping of microsatellite instability-high colorectal cancer. *Cell Commun Signal.* 2019; 17(1): 79.
62. ZHENG K, WAN H, ZHANG J, SHAN G, CHAI N, LI D, FANG N, LIU L, ZHANG J, DU R, WU Q, LI X, ZHANG C. A novel NGS-based microsatellite instability (MSI) status classifier with 9 loci for colorectal cancer patients. *J Transl Med.* 2020; 18(1): 215.
63. KOOPMAN M, KORTMAN GA, MEKENKAMP L, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009; 100(2): 266-273.

64. FRANKE AJ, SKELTON WP, STARR JS, et al. Immunotherapy for Colorectal Cancer: A Review of Current and Novel Therapeutic Approaches. *J Natl Cancer Inst.* 2019; 111(11): 1131-1141.
65. MCLEOD HL, MURRAY GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1999; 79(2): 191-203.
66. LEICHMAN CG. PREDICTIVE MARKERS IN THE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER. IN BLEIBERG, H., KEMENY, N., ROUGIER, P., WILKE, W. (eds). *Colorectal Cancer - A clinical guide to therapy.* Martin Dunitz, London 2002, s. 375 - 89, ISBN 1-85317-808-X.
67. YIU AJ, YIU CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2016; 36(3): 1093-1102.
68. GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21(11): 1350-1356.
69. MOOI JK, WIRAPATI P, ASHER R, et al. The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann Oncol.* 2018; 29(11): 2240-2246.
70. IACOPETTA B. Are there two sides to colorectal cancer ?. *Int J Cancer.* 2002; 101(5): 403-408.
71. BUFILL JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med.* 1990; 113(10): 779-788.
72. BEART RW, MELTON LJ 3RD, et al. Trends in right and left-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum.* 1983; 26(6): 393-398.
73. MAUS MK, HANNA DL, STEPHENS CL, et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics J.* 2015; 15(4): 354-362.
74. MISSIAGLIA E, JACOBS B, D'ARIO G, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features [published correction appears in *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):445]. *Ann Oncol.* 2014; 25(10): 1995-2001.
75. LAPOINTE LC, DUNNE R, BROWN GS, et al. Map of differential transcript expression in the normal human large intestine. *Physiol Genomics.* 2008; 33(1): 50-64.
76. YAHAGI M, OKABAYASHI K, HASEGAWA H, et al. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg.* 2016; 20(3): 648-655.

77. CREMOLINI C, ANTONIOTTI C, LONARDI S, et al. Primary tumor sidedness and benefit from FOLFOXIRI plus bevacizumab as initial therapy for metastatic colorectal cancer. Retrospective analysis of the TRIBE trial by GONO. *Ann Oncol*. 2018; 29(7): 1528-1534.
78. TAKAHASHI Y, MIZUNO KI, TAKAHASHI K, et al. Long-term outcomes of colorectal endoscopic submucosal dissection in elderly patients. *International Journal of Colorectal Disease*. 2017; 32(4): 567–573.
79. HOHENBERGER W, WEBER K, MATZEL K, et al. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis*. 2009;11(4): 354-364.
80. NANJI S, MACKILLOP WJ, WEI X, et al. Simultaneous resection of primary colorectal cancer and synchronous liver metastases: a population-based study. *Can J Surg*. 2017; 60(2): 122-128.
81. NAKAGAWA WT, ROSSI BM, DE O FERREIRA F, et al. Chemoradiation instead of surgery to treat mid and low rectal tumors: is it safe?. *Ann Surg Oncol*. 2002; 9(6): 568-573.
82. SAUER R, BECKER H, HOHENBERGER W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(17): 1731-1740.
83. ROH MS, COLANGELO LH, O'CONNELL MJ, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol*. 2009; 27(31): 5124-5130.
84. WALZ BJ, GREEN MR, LINDSTROM ER, et al. Anatomical prognostic factors after abdominal perineal resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981; 7(4): 477-484.
85. RICH T, GUNDERSON LL, LEW R, et al. Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer*. 1983; 52(7): 1317-1329.
86. COLORECTAL CANCER COLLABORATIVE GROUP. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet*. 2001; 358(9290): 1291-1304.
87. STOCKHOLM COLORECTAL CANCER STUDY GROUP. Randomized study on preoperative radiotherapy in rectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 1996; 3(5): 423-430.
88. BUJKO K, NOWACKI MP, NASIEROWSKA-GUTTMEJER A, et al. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg*. 2006; 93(10): 1215-1223.

89. NGAN SY, BURMEISTER B, FISHER RJ, et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group trial 01.04. *J Clin Oncol.* 2012; 30(31): 3827-3833.
90. PETERSSON D, CEDERMARK B, HOLM T, et al. Interim analysis of the Stockholm III trial of preoperative radiotherapy regimens for rectal cancer. *Br J Surg.* 2010; 97(4): 580-587.
91. MAAS M, NELEMANS PJ, VALENTINI V, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2010; 11(9): 835-844.
92. FIGUEREDO A, GERMOND C, MAROUN J, et al. Adjuvant therapy for stage II colon cancer after complete resection. Provincial Gastrointestinal Disease Site Group. *Cancer Prev Control.* 1997; 1(5): 379-392.
93. Modrá kniha České onkologické společnosti. Linkos [online]. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2020, 1. 3. 2020 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/diagnostika-a-lecba/modra-kniha-cos/aktualni-vydani-modre-knihy/26-4-zhoubny-novotvar-kolorekta-c18-20/>
94. RIBIC CM, SARGENT DJ, MOORE MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349(3): 247-257.
95. DES GUETZ G, NICOLAS P, PERRET GY, et al. Does delaying adjuvant chemotherapy after curative surgery for colorectal cancer impair survival? A meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2010; 46(6): 1049-1055.
96. ANDRÉ T, BONI C, MOUNEDJI-BOUDIAF L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350(23): 2343-2351.
97. HALLER DG, CATALANO PJ, MACDONALD JS, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol.* 2005; 23(34): 8671-8678.
98. DES GUETZ G, UZZAN B, MORERE JF, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for patients with non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (1): CD007046.
99. GROTHEY A, SOBRERO AF, SHIELDS AF, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2018; 378(13): 1177-1188.

100. ALLEGRA CJ, YOTHERS G, O'CONNELL MJ, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol.* 2011; 29(1): 11-16.
101. ANDRÉ T, VERNEREY D, IM SA, et al. Bevacizumab as adjuvant treatment of colon cancer: updated results from the S-AVANT phase III study by the GERCOR Group. *Ann Oncol.* 2020; 31(2): 246-256.
102. HUANG J, NAIR SG, MAH ONEY MR, et al. Alliance for Clinical Trials in Oncology. Comparison of FOLFIRI with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer; NCCTG (Alliance) intergroup trial N0147. *Clin Colorectal Cancer.* 2014; 13(2): 100-109.
103. PIEDBOIS P, ROUGIER P, BUYSE M, et al.. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1998; 16(1): 301-308.
104. GROTHEY A, SARGENT D, GOLDBERG RM, et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol.* 2004; 22(7): 1209-1214.
105. TOURNIGAND C, ANDRÉ T, ACHILLE E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004; 22(2): 229-237.
106. HOCHSTER HS, HART LL, RAMANATHAN RK, et al. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study. *J Clin Oncol.* 2008; 26(21): 3523-3529.
107. LEAL F, FERREIRA FP, SASSE AD. FOLFOXIRI Regimen for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 2017; 16(4): 405-409.
108. FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235(4787): 442-447.
109. BALUK P, MORIKAWA S, HASKELL A, et al. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 2003; 163(5): 1801-1815.
110. LEE JJ, CHU E. Sequencing of antiangiogenic agents in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2014; 13(3): 135-144.
111. VASUDEV NS, REYNOLDS AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis.* 2014; 17(3): 471-494.

112. HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350(23): 2335-2342.
113. GOLDBERG RM, SARGENT DJ, MORTON RF, et al. Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial. *J Clin Oncol*. 2006; 24(21): 3347-3353.
114. SALTZ LB, CLARKE S, DÍAZ-RUBIO E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2008 Jun;26(18):3110] [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2009 Feb 1;27(4):653]. *J Clin Oncol*. 2008; 26(12): 2013-2019.
115. PETRELLI F, BORGONOVO K, CABIDDU M, et al. FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials. *Clin Colorectal Cancer*. 2013; 12(3): 145-151.
116. HADDAD TC, GREENO EW. Chemotherapy-induced thrombosis. *Thromb Res*. 2006; 118(5): 555-568.
117. TABERNERO J, VAN CUTSEM E, LAKOMÝ R, et al. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *Eur J Cancer*. 2014; 50(2): 320-331.
118. MURO K, SALINARDI T, SINGH AR, et al. Safety of Aflibercept in Metastatic Colorectal Cancer: A Literature Review and Expert Perspective on Clinical and Real-World Data. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(4): 844.
119. TABERNERO J, YOSHINO T, COHN AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blind. *Lancet Oncol*. 2015; 16(5): 499-508.
120. GROTHEY A, VAN CUTSEM E, SOBRERO A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2013; 381(9863): 303-312.
121. VAN CUTSEM E, MARTINELLI E, CASCINU S, et al. Regorafenib for Patients with Metastatic Colorectal Cancer Who Progressed After Standard Therapy: Results of the Large, Single-Arm, Open-Label Phase IIIb CONSIGN Study. *Oncologist*. 2019; 24(2): 185-192.

122. NOVAKOVA-JIRESOVA A, KOPECKOVA K, BOUBLIKOVA L, et al. Regorafenib for Metastatic Colorectal Cancer: An Analysis of a Registry-Based Cohort of 555 Patients. *Cancer Manag Res.* 2020; 12: 5365-5372.
123. HARARI PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer.* 2004; 11(4): 689-708.
124. SPANO JP, FAGARD R, SORIA JC, et al. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol.* 2005; 16(2): 189-194.
125. LUO HY, XU RH. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(14): 3858-3874.
124. SPANO JP, FAGARD R, SORIA JC, et al. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol.* 2005; 16(2): 189-194.
126. CUNNINGHAM D, HUMBLET Y, SIENA S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351(4): 337-345.
127. VAN CUTSEM E, KÖHNE CH, LÁNG I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011; 29(15): 2011-2019.
128. BOKEMEYER C, BONDARENKO I, HARTMANN JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol.* 2011; 22(7): 1535-1546.
129. MAUGHAN TS, ADAMS RA, SMITH CG, et al. MRC COIN Trial Investigators. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011; 377(9783): 2103-2114.
130. GUREN TK, THOMSEN M, TVEIT KM, et al. Cetuximab in treatment of metastatic colorectal cancer: final survival analyses and extended RAS data from the NORDIC-VII study. *Br J Cancer.* 2017; 116(10):1271-1278.
131. KARAPETIS CS, KHAMBATA-FORD S, JONKER DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359(17): 1757-1765.
132. VAN CUTSEM E, PEETERS M, SIENA S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone

in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(13): 1658-1664

133. DOUILLARD JY, SIENA S, CASSIDY J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010; 28(31): 4697-4705.

134. DE ROOCK W, DE VRIENDT V, NORMANNO N, et al. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12(6): 594-603.

135. FRANSÉN K, KLINTENÄS M, OSTERSTRÖM A, et al. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004; 25(4): 527–533.

136. TOL J, NAGTEGAAL ID, PUNT CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer [published correction appears in *N Engl J Med*. 2011 Sep 1;365(9):869]. *N Engl J Med*. 2009; 361(1): 98-99.

137. ROTH AD, TEJPAR S, DELORENZI M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC. 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(3): 466–474.

138. PEETERS M, OLINER KS, PRICE TJ, et al. Updated analysis of KRAS/ NRAS and BRAF mutations in study 20050181 of panitumumab (pmab) plus FOLFIRI for second-line treatment (tx) of metastatic colorectal cancer (mCRC). [online], [cit. 2021-3-05] Dostupné z: https://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.3568

139. KOPETZ S, DESAI J, CHAN E, et al. Phase II pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(34): 4032–4038.

140. KOPETZ, S, MCDONOUGH SL, MORRIS VK, et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *J Clin Oncol* 2017; 35 (4): 520–520

141. KOPETZ S, GROTHEY A, VAN CUTSEM E, et al. Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib for BRAF V600E metastatic colorectal cancer: Updated survival results from a randomized, three-arm, phase III study versus choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab (BEACON CRC). *J Clin Oncol* 2020; 38 (15): 4001– 4001.

142. BRAF V600E-mutant Colorectal Cancer Study of Encorafenib Taken With Cetuximab Plus or Minus Chemotherapy (BREAKWATER) - Full Text View -

ClinicalTrials.gov. Home - ClinicalTrials.gov [online], [cit. 2021-2-16]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04607421>

143. CITRI A, SKARIA KB, YARDEN Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. 2003; 284(1): 54-65.

144. KLAPPER LN, GLATHE S, VAISMAN N, et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(9): 4995-5000.

145. MARX AH, BURANDT EC, CHOSCHZICK M, et al. Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Hum Pathol*. 2010; 41(11): 1577-1585.

146. SARTORE-BIANCHI A, AMATU A, PORCU L, et al. HER2 Positivity Predicts Unresponsiveness to EGFR-Targeted Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2019; 24(10): 1395-1402

147. HUDIS CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007; 357(1): 39-51.

148. YAN Q, GUO K, FENG G, et al. Association between the overexpression of Her3 and clinical pathology and prognosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(37): e12317.

149. SARTORE-BIANCHI A, TRUSOLINO L, MARTINO C, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17(6): 738-746.

150. VIGNERON N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int*. 2015 ;2015: 948501.

151. SCHREIBER RD, OLD LJ, SMYTH MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331(6024): 1565-1570.

152. JÄGER E, RINGHOFFER M, ALTMANNBERGER M, et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997; 71(2): 142-147.

153. PENG G, GUO Z, KINIWA Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*. 2005; 309(5739): 1380-1384.

154. TURNIS ME, ANDREWS LP, VIGNALI DA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 2015; 45(7): 1892–1905.

155. ANDRÉ T, SHIU KK, KIM TW, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2020; 383(23): 2207-2218.
156. LE DT, URAM JN, WANG H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-2520.
157. POSTOW MA, CHESNEY J, PAVLICK AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma [published correction appears in *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2185]. *N Engl J Med.* 2015; 372(21): 2006-2017.
158. OVERMAN MJ, MCDERMOTT R, LEACH JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017; 18(9): 1182-1191.
159. LECH G, SŁOTWIŃSKI R, SŁODKOWSKI M, et al. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(5): 1745-55.
160. LECH G, SŁOTWINSKI R, KRASNODEBSKI IW. The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma.* 2014; 61(1): 1-8.
161. KOPETZ S. "Right drug for the right patient": hurdles and the path forward in colorectal cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2013.
162. PETRELLI F, BORGONOVO K, BARNI S. The predictive role of skin rash with cetuximab and panitumumab in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis of published trials. *Target Oncol.* 2013; 8(3): 173-181.
163. DE STEFANO A, CARLOMAGNO C, PEPE S, BIANCO R, et al. Bevacizumab-related arterial hypertension as a predictive marker in metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; 68(5): 1207-1213.
164. DOUILLARD JY, OLINER KS, SIENA S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013; 369(11): 1023-1034
165. HEINEMANN V, VON WEIKERSTHAL LF, DECKER T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15(10): 1065-1075.
166. NORMANNO N, TEJPAR S, MORGILLO F, et al. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6(9): 519-527.
129. VAN CUTSEM E, KÖHNE CH, LÁNG I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer:

updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011; 29(15): 2011-2019.

167. AMADO RG, WOLF M, PEETERS M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(10): 1626-1634.

168. Společné stanovisko VZP ČR, ČOS ČLS JEP a SČP ČLS JEP - Prediktivní testování solidních nádorů » Linkos.cz. Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně » Linkos.cz [online]. ČOS ČLS JEP, [cit. 2021-3-21]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/ceska-onkologicka-spolecnost-cls-jep/spoluprace-cos/dohody-s-platci-pece/spolecne-stanovisko-vzp-cr-cos-cls-jep-a-scp-cls-jep-prediktivni-testovani-solid/>

169. VAN CUTSEM E, LENZ HJ, KÖHNE CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(7): 692-700.

170. BRAND TM, WHEELER DL. KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases.* 2012; 3(1): 34-39.

171. DOUILLARD JY, SIENA S, CASSIDY J, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2014; 25(7): 1346-1355.

172. SORICH MJ, WIESE MD, ROWLAND A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol.* 2015; 26(1): 13-21.

173. IKENOUE T, HIKIBA Y, KANA I F, et al. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(23): 8132-8137.

174. LEE MS, KOPETZ S. Current and Future Approaches to Target the Epidermal Growth Factor Receptor and Its Downstream Signaling in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2015; 14(4): 203-218.

175. THIEL A, RISTIMÄKI A. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Front Oncol.* 2013; 3: 281.

136. TOL J, NAGTEGAAL ID, PUNT CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer [published correction appears in *N Engl J Med.* 2011 Sep 1;365(9):869]. *N Engl J Med.* 2009; 361(1): 98-99.

176. SARIDAKI Z, TZARDI M, SFAKIANAKI M, et al. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. *PLoS One.* 2013; 8(12): e84604.

177. ROWLAND A, DIAS MM, WIESE MD, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015; 112(12): 1888-1894.
178. COURTNEY KD, CORCORAN RB, ENGELMAN JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(6): 1075-1083.
179. NOSHO K, KAWASAKI T, OHNISHI M, et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*. 2008; 10(6): 534-541.
180. VIVANCO I, SAWYERS CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(7): 489-501.
181. MEI ZB, DUAN CY, LI CB, et al. Prognostic role of tumor PIK3CA mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2016; 27(10): 1836-1848.
182. DE ROOCK W, CLAES B, BERNASCONI D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010; 11(8): 753-762.
183. YANG Z-Y, WU X-Y, HUANG Y-F, et al. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *Int J cancer*. 2013; 133(8): 1914-1925.
184. YONESAKA K, ZEJNULLAHU K, OKAMOTO I, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med*. 2011; 3(99): 99ra86.
185. JEONG JH, KIM J, HONG YS, et al. HER2 Amplification and Cetuximab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Harboring Wild-type RAS and BRAF. *Clin Colorectal Cancer*. 2017; 16(3): 147-152.
186. CHUNG KY, SHIA J, KEMENY NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2005; 23(9): 1803-1810.
187. PEETERS M, SIENA S, VAN CUTSEM E, et al. Association of progression-free survival, overall survival, and patient-reported outcomes by skin toxicity and KRAS status in patients receiving panitumumab monotherapy. *Cancer*. 2009; 115(7): 1544-1554.
188. VAN CUTSEM E, TEJPAR S, VANBECKEVOORT D, et al. Inpatient cetuximab dose escalation in metastatic colorectal cancer according to the grade

of early skin reactions: the randomized EVEREST study. *J Clin Oncol*. 2012; 30(23): 2861-2868.

189. PERSONENI N, HENDLISZ A, GALLEZ J, et al. Correlation between the response to cetuximab alone or in combination with irinotecan and the activated/phosphorylated epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2005; 32(6): 59-62.

190. KUBO A, HASHIMOTO H, TAKAHASHI N, et al. Biomarkers of skin toxicity induced by anti-epidermal growth factor receptor antibody treatment in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(2): 887-894.

191. TEJPAR S, STINTZING S, CIARDIELLO F, et al. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials [published correction appears in *JAMA Oncol*. 2017; 3(12): 1742.

192. BOECKX N, KOUKAKIS R, OP DE BEECK K, et al. Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: results from two randomized first-line panitumumab studies. *Ann Oncol*. 2017; 28(8): 1862-1868.

193. BRULÉ SY, JONKER DJ, KARAPETIS CS, et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *Eur J Cancer*. 2015; 51(11): 1405-1414.

194. MODEST DP, STINTZING S, VON WEIKERSTHAL LF, et al. Exploring the effect of primary tumor sidedness on therapeutic efficacy across treatment lines in patients with metastatic colorectal cancer: analysis of FIRE-3 (AIOKRK0306). *Oncotarget*. 2017; 8(62): 105749-105760.

195. TAPIA RICO G, PRICE T, TEBBUTT N, et al. Right or Left Primary Site of Colorectal Cancer: Outcomes From the Molecular Analysis of the AGITG MAX Trial. *Clin Colorectal Cancer*. 2019; 18(2): 141-148.

196. LOUPAKIS F, YANG D, YAU L, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107(3): 427.

197. WONG HL, LEE B, FIELD K, et al. Impact of Primary Tumor Site on Bevacizumab Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2016; 15(2): 9-15.

198. VAN CUTSEM E, CERVANTES A, NORDLINGER B, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [published correction appears in *Ann Oncol*. 2015 Sep;26 Suppl 5:v174-7]. *Ann Oncol*. 2014; 25(3): 1-9.

199. FIALA O, OSTASOV P, HOSEK P, et al. The Predictive Role of Primary Tumour Sidedness in Metastatic Colorectal Cancer Treated With Targeted Agents. *Anticancer Res.* 2019; 39(10): 5645-5652.
200. BRENNECKE J, ARAVIN AA, STARK A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* 2007; 128(6): 1089-1103.
201. ARAVIN AA, SACHIDANANDAM R, BOURC'HIS D, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell.* 2008; 31(6): 785-799.
202. WANG G, REINKE V. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol.* 2008; 18(12): 861-867.
203. ZENG Y, QU LK, MENG L, et al. HIWI expression profile in cancer cells and its prognostic value for patients with colorectal cancer. *Chin Med J (Engl).* 2011; 124(14): 2144-2149.
204. GROCHOLA LF, GREITHER T, TAUBERT H, et al. The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer.* 2008; 99(7): 1083-1088.
205. LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75(5): 843-854.
206. miRBase [online], [cit. 2021-3-10]. Dostupné z: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa
207. WEINSTEIN LB, STEITZ JA. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11(3): 378-384.
208. KISS T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell.* 2002; 109(2): 145-148.
209. RODRIGUEZ A, GRIFFITHS-JONES S, ASHURST JL, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004; 14(10A): 1902-1910.
210. LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23(20): 4051-4060.
211. GWIZDEK C, OSSAREH-NAZARI B, BROWNAWELL AM, et al. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem.* 2003; 278(8): 5505-5508.
212. FILIPOWICZ W, BHATTACHARYYA SN, SONENBERG N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(2): 102-114.

213. DOENCH JG, SHARP PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 2004; 18(5): 504-511.
214. VASUDEVAN S, TONG Y, STEITZ JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007; 318(5858): 1931-1934.
215. GARZON R, CALIN GA, CROCE CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009; 60: 167-179.
216. KENT OA, MENDELL JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene.* 2006; 25(46): 6188-6196.
217. NAKAMURA T, CANAANI E, CROCE CM. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(26): 10980-10985.
218. CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(24): 15524-15529.
219. MICHAEL MZ, O'CONNOR SM, VAN HOLST PELLEKAAN NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003; 1(12): 882-891.
220. LUO X, BURWINKEL B, TAO S, et al. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20(7): 1272-1286.
221. MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(30): 10513-10518.
222. REDOVA M, SANA J, SLABY O. Circulating miRNAs as new blood-based biomarkers for solid cancers. *Future Oncol.* 2013; 9(3): 387-402.
223. HUANG Z, HUANG D, NI S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010; 127(1): 118-126.
224. CHEN X, BA Y, MA L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008; 18(10): 997-1006.
225. YAMADA NO, SENDA T. Circulating microRNA-92a-3p in colorectal cancer: a review [published online ahead of print, 2021 Feb 23] [published correction appears in *Med Mol Morphol.* 2021 Mar 11]. *Med Mol Morphol.* 2021; 10.1007/s00795-021-00282-w.

226. KANAAN Z, RAI SN, EICHENBERGER MR, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg.* 2012; 256(3): 544-551.
227. GIRÁLDEZ MD, LOZANO JJ, RAMÍREZ G, et al. Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013; 11(6): 681-8.e3.
228. KANAAN Z, ROBERTS H, EICHENBERGER MR, et al. A plasma microRNA panel for detection of colorectal adenomas: a step toward more precise screening for colorectal cancer. *Ann Surg.* 2013; 258(3): 400-408.
229. GALVÃO-LIMA LJ, MORAIS AHF, VALENTIM RAM, et al. miRNAs as biomarkers for early cancer detection and their application in the development of new diagnostic tools. *Biomed Eng Online.* 2021; 20(1): 21.
230. XI Y, FORMENTINI A, CHIEN M, et al. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights.* 2006; 2: 113-121.
231. TOIYAMA Y, HUR K, TANAKA K, et al. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg.* 2014; 259(4): 735-743.
232. HUR K, TOIYAMA Y, TAKAHASHI M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut.* 2013; 62(9): 1315-1326.
233. VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(7): 2257-2261.
234. SLABY O, SVOBODA M, FABIAN P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology.* 2007; 72(5-6): 397-402.
235. SCHETTER AJ, LEUNG SY, SOHN JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 2008; 299(4): 425-436.
236. KJAER-FRIFELDT S, HANSEN TF, NIELSEN BS, et al. The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: a population-based study. *Br J Cancer.* 2012; 107(7): 1169-1174.
237. OUE N, ANAMI K, SCHETTER AJ, et al. High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Int J Cancer.* 2014; 134(8): 1926-1934.
238. KARAYVAZ M, ZHAI H, JU J. miR-129 promotes apoptosis and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2013; 4(6): 659.

239. WEIRAUCH U, BECKMANN N, THOMAS M, et al. Functional role and therapeutic potential of the pim-1 kinase in colon carcinoma. *Neoplasia*. 2013; 15(7): 783-794.
240. BORRALHO PM, KREN BT, CASTRO RE, et al. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS J*. 2009; 276(22): 6689-6700.
241. ZHANG L, PICKARD K, JENEI V, et al. miR-153 supports colorectal cancer progression via pleiotropic effects that enhance invasion and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res*. 2013; 73(21): 6435-6447.
242. MOSAKHANI N, LAHTI L, BORZE I, et al. MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genet*. 2012; 205(11): 545-551.
243. HANSEN TF, CARLSEN AL, HEEGAARD NH, et al. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015; 112(4): 624-629.
244. SARIDAKI Z, WEIDHAAS JB, LENZ HJ, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in KRAS predicts improved outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with salvage cetuximab/panitumumab monotherapy. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(17): 4499-4510.
245. KHATTAK MA, MARTIN H, DAVIDSON A, et al. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Colorectal Cancer*. 2015; 14(2): 81-90.
246. WEIDLE UH, SCHMID D, BIRZELE F, et al. MicroRNAs Involved in Metastasis of Hepatocellular Carcinoma: Target Candidates, Functionality and Efficacy in Animal Models and Prognostic Relevance. *Cancer Genomics Proteomics*. 2020; 17(1): 1-21.
247. WEIDLE UH, BIRZELE F, NOPORA A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: MicroRNAs Affecting Tumor Growth and Metastasis in Preclinical In Vivo Models. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019; 16(6): 451-464.
248. VAN SOLINGEN C, SEGHERS L, BIJKERK R, et al. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009;13 (8A): 1577-1585.
249. FISH JE, SANTORO MM, MORTON SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008; 15(2): 272-284.

250. PARKER LH, SCHMIDT M, JIN SW, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature*. 2004; 428(6984): 754-758.
251. GUO C, SAH JF, BEARD L, et al. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 47(11): 939-946.
252. LI JJ, YANG XM, WANG SH, TANG QL. Prognostic role of epidermal growth factor-like domain 7 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*. 2011; 125(11): 1152-1157.
253. MEISTER J, SCHMIDT MHH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer. *ScientificWorldJournal*. 2010; 10: 2090-2100.
254. SCHEPELER T, HOLM A, HALVEY P, et al. Attenuation of the beta-catenin/TCF4 complex in colorectal cancer cells induces several growth-suppressive microRNAs that target cancer promoting genes. *Oncogene*. 2012; 31(22): 2750-2760.
255. SCHOBER A, NAZARI-JAHANTIGH M, WEI Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med*. 2014; 20(4): 368-376.
256. POISSONNIER L, VILLAIN G, SONCIN F, et al. miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. *Cardiovasc Res*. 2014; 102(3): 436-447.
257. BOTTOS A, DESTRO E, RISSONE A, et al. The synaptic proteins neurexins and neuroligins are widely expressed in the vascular system and contribute to its functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(49): 20782-20787.
258. HANSEN TF, CHRISTENSEN RD, ANDERSEN RF, et al. MicroRNA-126 and epidermal growth factor-like domain 7-an angiogenic couple of importance in metastatic colorectal cancer. Results from the Nordic ACT trial. *Br J Cancer*. 2013; 109(5): 1243-1251.
259. RISSONE A, FOGLIA E, SANGIORGIO L, et al. The synaptic proteins β -neurexin and neuroligin synergize with extracellular matrix-binding vascular endothelial growth factor a during zebrafish vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32(7): 1563-1572.
260. HE JH, HAN ZP, LIU JM, et al. Overexpression of Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells via Negative Modulation of miRNA-664. *J Cell Biochem*. 2017; 118(11): 3713-3721.
261. WANG Y, ZENG G, JIANG Y. The Emerging Roles of miR-125b in Cancers. *Cancer Manag Res*. 2020; 12: 1079-1088.

262. BANZHAF-STRATHMANN J, EDBAUER D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun Signal*. 2014; 12: 30.
263. LE MT, SHYH-CHANG N, KHAW SL, et al. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. *PLoS Genet*. 2011; 7(9): 1002242.
264. SCOTT GK, GOGA A, BHAUMIK D, et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. 2007; 282(2): 1479-1486.
265. CHEN H, XU Z. Hypermethylation-Associated Silencing of miR-125a and miR-125b: A Potential Marker in Colorectal Cancer. *Dis Markers*. 2015; 2015: 345080.
266. CAPPUZZO F, SACCONI A, LANDI L, et al. MicroRNA signature in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies. *Clin Colorectal Cancer*. 2014; 13(1): 37-45.
267. RUBY JG, JAN C, PLAYER C, et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*. 2006; 127(6): 1193-1207.
268. BOYERINAS B, PARK SM, HAU A, MURMANN AE, PETER ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17(1): 19-36.
269. JOHNSON SM, GROSSHANS H, SHINGARA J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005; 120(5): 635-647.
270. JUNG HJ, SUH Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*. 2015; 5: 472.
271. ZHANG K, GAO H, WU X, et al. Frequent overexpression of HMGA2 in human atypical teratoid/rhabdoid tumor and its correlation with let-7a3/let-7b miRNA [published correction appears in *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 15;23 (12):3225]. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(5): 1179-1189.
272. MIZUNO R, KAWADA K, SAKAI Y. The Molecular Basis and Therapeutic Potential of Let-7 MicroRNAs against Colorectal Cancer. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018; 2018: 5769591.
273. HAN HB, GU J, ZUO HJ, et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol*. 2012; 226(3): 544-555.
274. MEI LL, QIU YT, HUANG MB, et al. MiR-99a suppresses proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells through inhibiting the IGF1R signaling pathway. *Cancer Biomark*. 2017; 20(4): 527-537.

275. FANG LL, WANG XH, SUN BF, et al. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). *Int J Mol Med*. 2017; 40(6): 1624-1630.
276. HUANG C, LIU J, XU L, et al. MicroRNA-17 promotes cell proliferation and migration in human colorectal cancer by downregulating SIK1. *Cancer Manag Res*. 2019; 11: 3521-3534.
277. LAI H, ZHANG J, ZUO H, et al. Overexpression of miR-17 is correlated with liver metastasis in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(9): 19265.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1** - Zastoupení klinických stadií kolorektálního karcinomu v ČR
- Obrázek 2** - Vývoj incidence a mortality kolorektálního karcinomu v ČR
- Obrázek 3** - Věková struktura pacientů s kolorektálním karcinomem v ČR.
- Obrázek 4** - Sled genetických změn asociovaných s kancerogenezí kolorektálního karcinomu dle Vogelsteinova modelu.
- Obrázek 5** - Model kancerogeneze kolorektálního karcinomu s deficientní funkcí mismatch repair (MMR) systému
- Obrázek 6** - Nejčastější typy somatických mutací u kolorektálního karcinomu
- Obrázek 7** – Subtypizace kolorektálního karcinomu dle Consensus Molecular Subtypes (CMS)
- Obrázek 8** - Srovnání celkového přežití (OS) dle klinického stadia; u stadia II i dle rizikových faktorů
- Obrázek 9** - Srovnání celkového přežití (OS) dle klinického stadia a podané adjuvantní chemoterapie (**A**: st. II bez rizikových faktorů, **B**: st. II s rizikovými faktory, **C**: st. III)
- Obrázek 10** - Srovnání celkového přežití (OS) podle podání adjuvantní chemoterapie u pacientů II. a III. stadia s **MSS** karcinomy (**A**: dosaženo prodloužení OS při podání adjuvantní chemoterapie) a **MSI-H** karcinomy (**B**: nesignifikantní rozdíl, trend delšího OS u pacientů bez adjuvantní chemoterapie)
- Obrázek 11** - Srovnání přežití bez nemoci (DFS) u pacientů léčených režimem FU/FA (5-fluorouracil + leukovorin - FL) a režimem FOLFOX (FL + oxaliplatin), se zohledněním klinického stadia
- Obrázek 12** - Srovnání přežití bez nemoci (DFS) mezi pacienty stadia III podstupujícími adjuvantní chemoterapii FOLFOX/CAPOX ve tříměsíčním vs. šestiměsíčním režimu (celková populace) ve studii IDEA
- Obrázek 13** - Srovnání přežití bez nemoci (DFS) pacientů léčených adjuvantní chemoterapií FOLFOX (mFOLFOX6 = mFF6) a kombinací FOLFOX + bevacizumab (mFF6+Bev) ve studii NSABP C-08
- Obrázek 14** - Srovnání přežití bez progresu (PFS) u pacientů s mCRC léčených v první linii paliativní léčby režimem FOLFIRI a režimem FOLFOX
- Obrázek 15** - Signální dráhy vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF)
- Obrázek 16** – Různé strategie blokady signální dráhy vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF)
- Obrázek 17** - Srovnání přežití bez progresu (PFS) při užití režimů FOLFOX/CAPOX s bevacizumabem nebo s placebem ve studii NO16966

Obrázek 18 - Celkové přežití (OS) u pacientů léčených kombinací aflibercept a FOLFIRI ve srovnání s FOLFIRI a placebo ve studii VELOUR

Obrázek 19 - Celkové přežití (OS) u pacientů léčených kombinací ramucirumab a FOLFIRI ve srovnání s FOLFIRI a placebo ve studii RAISE

Obrázek 20 - Srovnání celkového přežití (OS) u pacientů léčených regorafenibem oproti placebo ve studii CORRECT

Obrázek 21 - Celkové přežití (OS) u pacientů s mCRC léčených regorafenibem v českém registru CORECT

Obrázek 22 - Strategie blokády signalizace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR)

Obrázek 23 - Srovnání celkového přežití (OS) u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených kombinací cetuximabu s chemoterapií FOLFIRI ve srovnání s chemoterapií samotnou ve studii CRYSTAL

Obrázek 24 - Přežití bez progresu (PFS) u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených panitumumabem ve srovnání s podpůrnou léčbou (BSC)

Obrázek 25 - Celkové přežití (OS) u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem wtKRAS léčených kombinací panitumumabu s chemoterapií FOLFOX ve srovnání se samotnou chemoterapií ve studii PRIME

Obrázek 26 - Schéma znázorňující přenos signálu dráhy RAS/RAF/MEK/ERK a místo působení BRAF inhibitoru

Obrázek 27 - Srovnání celkového přežití (OS) pacientů léčených tripletem enkorafenib + cetuximab + binimetinib oproti pacientům léčeným dubletem enkorafenib + cetuximab a oproti kontrolní skupině léčené chemoterapií

Obrázek 28 - Schéma blokády receptorů EGFR a HER2/neu

Obrázek 29 - Mechanismy protinádorové imunity

Obrázek 30 - Srovnání celkového přežití (OS) pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem se zohledněním dMMR a pMMR (proficientní, bez defektu) léčených pembrolizumabem

Obrázek 31 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) a celkového přežití (OS) pacientů léčených kombinací nivolumab + ipilimumab vs. nivolumab samotný ve studii CheckMate 142

Obrázek 32 - Srovnání celkového přežití (OS) pacientů léčených cetuximabem oproti základní podpůrné léčbě (BSC) u pacientů s mKRAS nádory (Graf A) a u pacientů s wtKRAS nádory (Graf B)

Obrázek 33 - Výsledky metaanalýzy klinických studií ukazující význam mutací BRAF u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených anti-EGFR cílenou léčbou

Obrázek 34 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) u pacientů léčených cetuximabem podle HER2/neu amplifikace

Obrázek 35 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) u pacientů léčených panitumabem dle stupně kožní toxicity

Obrázek 36 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) a celkového přežití (OS) u pacientů léčených anti-EGFR protilátkami a bevacizumabem podle lokalizace primárního nádoru

Obrázek 37 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) a celkového přežití (OS) mezi léčebnými přístupy: anti-EGFR protilátky pro levostranné wtRAS mCRC a bevacizumab pro pravostranné wtRAS mCRC vs. anti-EGFR protilátky pro pravostranné wtRAS mCRC a bevacizumab pro levostranné wtRAS mCRC

Obrázek 38 - Biogeneze miR v buňce

Obrázek 39 - Schéma působení miR procesem RNA interference

Obrázek 40 - Změny exprese miR-126-3p, miR-126-5p a miR-664-3p v nádorové oproti přilehlé nenádorové tkáni

Obrázek 41 - Korelační analýza exprese miR-126-3p a miR-126-5p (a), miR-126-3p a miR-664-3p (b) a miR-664-3p a miR-126-5p (c).

Obrázek 42 - Asociace mezi změnou exprese miR-126-3b, miR-126-5b a miR-664-3p a dosažením objektivní léčebné odpovědi (ORR)

Obrázek 43 - Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) dle exprese miR-126-3p v nádoru

Obrázek 44 - Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) dle exprese miR-126-5p v nádoru

Obrázek 45 - Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) dle exprese miR-664-3p v nádoru

Obrázek 46 - Exprese miR v nádoru ve srovnání s přilehlou nenádorovou tkání

Obrázek 47 - Asociace mezi změnou exprese miR-125b a dosažením objektivní léčebné odpovědi (ORR)

Obrázek 48 - Asociace mezi změnou exprese miR-125b (B), miR-17 (C) a let-7c (D) a dosažením kontroly onemocnění (DCR)

Obrázek 49 - Srovnání přežití bez progresu (PFS) (A) a celkového přežití (OS) (B) dle změny exprese miR-125b s využitím automatizované optimalizace prahové hodnoty stratifikace (down-regulace miR-125b v nádorové tkáni)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Dukesova klasifikace

Tabulka 2 - TNM staging

Tabulka 3 - Rozdělení do klinických stádií

Tabulka 4 - Pravděpodobnost pětiletého přežití dle klinického stádia

Tabulka 5 - ECOG performance status popisující funkční stav pacienta

Tabulka 6 - Základní charakteristiky souboru pacientů

Tabulka 7 - Přežití bez progrese (PFS) a celkové přežití (OS) dle exprese miR-126-3p

Tabulka 8 - Přežití bez progrese (PFS) a celkové přežití (OS) dle exprese miR-126-5p

Tabulka 9 - Přežití bez progrese (PFS) a celkové přežití (OS) dle exprese miR-664-3p

Tabulka 10 - Coxův vícerozměrný model rizik pro přežití bez progrese (PFS) a celkové přežití (OS)

Tabulka 11 - Základní charakteristiky souboru pacientů

PŘEDNÁŠKOVÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

Přednášky

ŠOREJS O, VOJTÍŠEK J, LIŠKA V, PITULE P. Prognóza kolorektálního karcinomu pomocí skórovacího systému na základě expresní hladiny vybraných genů. 54. SVK LF UK Plzeň. 15.5.2014. Plzeň.

ŠOREJS O, FIALA O, OSTAŠOV P, HOŠEK P, LIŠKA V, ŠUSTR J, ŠEDIVCOVÁ M, FÍNEK J. Prediktivní význam lokalizace primárního nádoru u mCRC a její význam pro volbu cílené léčby v první linii. Večer Onkologické a Radioterapeutické kliniky. 27.3.2019. Plzeň.

ŠOREJS O, PITULE P, HOŠEK P, OSTAŠOV P, LIŠKA V, FÍNEK J, FIALA O. Vztah exprese vybraných miRNA k odpovědi na léčbu anti-EGFR monoklonální protilátkou u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. 59. SVK LF UK Plzeň. 21.5.2019. Plzeň.

FIALA O, PEŠEK M, FÍNEK J, RACEK J, TOPOLČAN O, SVATOŇ M, **ŠOREJS O**, BENEŠOVÁ L, BORTLÍČEK Z, CHLOUPKOVÁ R, MINÁRIK M. Dynamika LDH v séru při monitorování efektu léčby erlotinibem u pacientů s pokročilým NSCLC. 23. Západočeské pneumoonkologické dny. 5.6. 2015. Darová.

FIALA O, PITULE P, HOŠEK P, LIŠKA V, BRŮHA J, VYČÍTAL O, FÍNEK J, BUCHLER T, POPRACH A, TOPOLČAN O, **ŠOREJS O**. Význam exprese miR-126 a miR-664 u pacientů s mCRC léčených bevacizumabem. Večer Onkologické a Radioterapeutické kliniky. 2017. Plzeň.

FIALA O, HOŠEK P, **ŠOREJS O**, LIŠKA V, BUCHLER T, POPRACH A, KUCERA R, TOPOLČAN O, ŠEDIVCOVÁ M, FINEK J. The association of baseline serum tumour markers with outcome of patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with first-line anti-EGFR monoclonal antibodies. 45th ISOBM Congress. November 24–27. 2018. Hamburg. Germany.

FIALA O, OSTAŠOV P, HOŠEK P, **ŠOREJS O**, LIŠKA V, BUCHLER T, POPRACH A, KUCERA R, TOPOLČAN O, ŠUSTR J, ŠEDIVCOVÁ M, FÍNEK J. Predictive role of primary tumour sidedness in patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR monoclonal antibodies or bevacizumab in the first line. EPMA World Congress. September 19-22.2019. Pilsen. Czech Republic.

Postery

FIALA O, PESEK M, FINEK J, RACEK J, TOPOLCAN O, SVATON M, **SOREJS O**, MINARIK M, BENESOVA L, BORTLICEK Z, CHLOUPKOVA R, POPRACH A, BUCHLER T. Change in serum lactate dehydrogenase in patients with advanced-stage NSCLC treated with erlotinib. 15th Central European Lung Cancer Congress (CELCC), 28.11.-30.11. 2015. Praha.

Publikace

SOREJS O, PESEK M, FINEK J, FIALA O. Octreotide in the treatment of malignant thymoma - Case report. Rep Pract Oncol Radiother. 2020; 25(6): 882-885.

FIALA O, PESEK M, FINEK J, **SOREJS O**, et al. Prognostic Significance of Serum Tumor Markers in Patients with Advanced-stage NSCLC Treated with Pemetrexed-based Chemotherapy. Anticancer Res. 2016; 36(1): 461-466. **IF: 1,895**

FIALA O, PESEK M, FINEK J, MINARIK M, BENESOVA L, **SOREJS O**, SVATON M, BORTLICEK Z, KUCERA R, TOPOLCAN O. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification in Patients with Advanced-stage NSCLC. Anticancer Res. 2016; 36(1): 455-460. **IF: 1,895**

FIALA O, PESEK M, FINEK J, KUCERA R, **SOREJS O**, TOPOLCAN O. Serum albumin is a strong predictor of survival in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer treated with erlotinib. Neoplasma. 2016; 63(3): 471-476. **IF:1,961**

FIALA O, PESEK M, FINEK J, SVATON M, MINARIK M, BENESOVA L, BORTLICEK Z, KUCERA R, **SOREJS O**, TOPOLCAN O. Pemetrexed Versus Erlotinib in the Second-line Treatment of Patients with Advanced-stage Non-squamous NSCLC Harboring Wild-type EGFR Gene. Anticancer Res. 2016; 36(1): 447-453. **IF: 1,895**

FIALA O, PESEK M, FINEK J, SVATON M, **SOREJS O**, SLIPKOVA D, KUCERA R, TOPOLCAN O. Change in Serum Lactate Dehydrogenase is Associated with Outcome of Patients with Advanced-stage NSCLC Treated with Erlotinib. Anticancer Res. 2016; 36(5): 2459-2465. **IF: 1,895**

FIALA O, HOSEK P, PESEK M, KUCERA R, **SOREJS O**, TOPOLCAN O. Prognostic role of serum c-reactive protein in patients with advanced-stage nsclc treated with pemetrexed. Neoplasma. 2017; 64(4): 605-610. **IF:1,961**

VOJTISEK R, KORCAKOVÁ E, MARAN J, **SOREJS O**, FINEK J. Neoadjuvant chemoradiotherapy of the rectal carcinoma – the correlation between the findings

on the restaging multiparametric 3T MRI scanning and the surgical findings. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2017; 22(4): 265-276

FIALA O, PITULE P, HOSEK P, **SOREJS O**, et al. The association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression profiles with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumour Biol.* 2017; 39(7): 1010428317709283. **IF: 3,650**

FIALA O, HOSEK P, PESEK M, **SOREJS O**, et al. Serum Concentration of Erlotinib and its Correlation with Outcome and Toxicity in Patients with Advanced-stage NSCLC. *Anticancer Res.* 2017; 37(11): 6469-6476. **IF: 1,895**

FIALA O, **SOREJS O**, PESEK M, FINEK J. Immunotherapy in the Treatment of Lung Cancer. *Klin Onkol.* 2017; 30(3): 22-31.

FIALA O, HOSEK P, **SOREJS O**, SEDIVCOVA M, FINEK J. The association of baseline serum tumour markers with outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR monoclonal antibodies in the first line. *J Cancer.* 2018; 9(22): 4255-4262. **IF: 3,565**

FIALA O, **SOREJS O**, SVOBODA T, FÍNEK J. Axitinib ve druhé linii léčby metastatického renálního karcinomu. *Onkologie* 2018; 12(1): 34-37.

FIALA O, OSTASOV P, **SOREJS O**, POPRACH A, FINEK J. Incidental use of beta-blockers is associated with outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab-based therapy: A single-institution retrospective analysis of 514 patients. *Cancers*, 2019, 11(12), 1856. **IF: 6,126**

FIALA O, OSTASOV P, HOSEK P, SEDIVCOVA M, **SOREJS O**, FINEK J. The predictive role of primary tumour sidedness in metastatic colorectal cancer treated with targeted agents. *Anticancer Research*, 2019, 39(10), 5645-5652. **IF: 1,895**

FIALA O, **SOREJS O**, SUSTR J, FINEK J. Side effects and efficacy of immunotherapy. *Klinicka Onkologie*, 2020, 33(1), 8-10.

FIALA O, **SOREJS O**, SUSTR J, TOPOLCAN O, FINEK J. Immune-related adverse effects and outcome of patients with cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Anticancer Research*, 2020, 40(3), 1219-1227. **IF: 1,994**

FIALA O, **SOREJS O**, HOSEK P, MACECKOVA D, PITULE P. Association of miR-125b, miR-17 and let-7c dysregulations with response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Genomics and Proteomics*, 2020, 17(5), 605-613. **IF: 3,280**

FIALA O, OSTAŠOV P, ROZSYPALOVÁ A, HORA M, **ŠOREJS O**, ŠUSTR J, BENDO VÁ B, TRÁVNÍČEK I, FILIPOVSKÝ J, FÍNEK J, BÜCHLER T. Metformin Use and the Outcome of Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib or Pazopanib. *Cancer Manag Res.* 2021; 13: 4077-4086. **IF: 2,886**