

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Postgraduální doktorský program v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Ladislav Sojka

**Klinicko-patologická charakteristika kolorektálního karcinomu
produkujícího mucin**

**Clinico-pathological characteristics of mucin-producing
colorectal carcinoma**

Disertační práce

Školitel: MUDr. Miroslav Levý, Ph.D., MBA.

Praha 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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 Praze 25.11.2022

MUDr. Ladislav Sojka

Podpis

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu Experimentální chirurgie na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze a chirurgické klinice Fakultní Thomayerovi nemocnice, ve spolupráci s Akademií věd České republiky. Poděkování patří především mému školiteli MUDr. Miroslavu Levému, Ph.D., MBA., za jeho odborné vedení v průběhu celého studia, ale i během chirurgické praxe. Dále bych rád poděkoval MUDr. Pavlu Vodičkovi, CSc., MUDr. Ludmile Vodičkové, CSc. a Ing. Veronice Vymetálkové, Ph.D. za pomoc s experimentální částí mé disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. MUDr. Jaromíru Šimšovi, Ph.D. za jeho chirurgické vedení a za to, že mi vytvořil optimální podmínky a umožnil Ph.D. studium. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu a toleranci během mého studia.

Identifikační záznam:

MUDr. Ladislav Sojka, Klinicko-patologická charakteristika kolorektálního karcinomu produkujícího mucin [Clinico-pathological characteristics of mucin-producing colorectal carcinoma]. Praha, 2022. 109 s. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Chirurgická klinika 1. LF UK a FTN, Školitel: MUDr. Miroslav Levý, Ph.D., MBA.

Obsah

1. Úvod.....	13
2. Vymezení cílů práce a stanovení hypotéz.....	14
2.1. Cíle práce.....	14
2.2. Hypotéza.....	14
3. Epidemiologie.....	15
3.1. Česká republika – incidence a mortalita CRC.....	15
3.2. Výskyt CRC ve světě.....	17
3.3. Rozložení CRC v populaci dle pohlaví a věku.....	19
3.4. Mortalita CRC.....	20
4. Rizikové faktory CRC.....	21
4.1. Mužské pohlaví.....	21
4.2. Ženské pohlaví.....	21
4.3. Všeobecné rizikové faktory – nutriční.....	21
4.4. Prekancerózy spojené se vznikem CRC.....	22
4.5. Rizikové genetické variace CRC.....	22
5. Protektivní faktory u CRC.....	23
5.1. Protektivní faktory již známé.....	23
5.2. Nesteroidní antiflogistika NSAID.....	23
6. Screening CRC.....	23
6.1. Screeningové programy v ČR.....	23
6.2. Screeningový program – požadavky.....	24
6.3. Typy screeningových testů ze stolice, krve i moči.....	24
6.3.1. Guaiakový test okultního krvácení ze stolice (gFOBT).....	24
6.3.2. Imunohistochemické testy na krvácení ze stolice (FIT).....	24
6.3.3. DNA a RNA testy detekce CRC ze stolice.....	24
6.3.4. Testy ve fázi výzkumů.....	25
6.4. Srovnání screeningových vyšetření.....	25
7. Staging CRC.....	26
7.1. Stanovení diagnózy na základě histopatologického vyšetření.....	26
7.2. Zobrazovací vyšetření.....	26
7.3. Stádia onemocnění (TNM klasifikace).....	27
8. Tumor - specifické markery (biomarkery, onkomarkery)	29
8.1. Biomarkery.....	29
8.2. Klasické sérové nádorové markery	29

8.2.1. Karcinoembryonální antigen (CEA).....	29
8.2.2. Nádorový antigen CA 19-9.....	30
8.2.3. Méně známé onkomarkery.....	30
9. Prognostické markery a prognóza pacientů s CRC.....	31
9.1. TNM klasifikace.....	31
9.2. Prognostické markery molekulární a genetické.....	31
9.2.1. Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR).....	32
9.2.2. Mutace genu <i>KRAS</i>	33
9.2.3. Mutace genu <i>BRAF</i>	33
9.2.4. Fosfatidylinositid-3-kináza (PI3K).....	33
9.2.5. Mutace genu <i>TP53</i>	33
9.2.6. Ztráta heterozygoty chromozomu 18q.....	33
9.2.7. Mikrosatelitní instabilita (MSI).....	33
10. Vznik a šíření kolorektálního karcinomu.....	34
10.1. Hereditárně vázané syndromy.....	34
10.1.1. Hereditární polypózní kolorektální karcinomy (HPCC).....	34
10.1.2. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinomy (HNPCC).....	35
10.2. Sporadický CRC.....	35
10.2.1. Vznik CRC.....	35
10.2.2. Signalizační dráhy vzniku CRC.....	35
10.3. Šíření kolorektální karcinomu.....	37
11. Dělení kolorektálního karcinomu.....	37
11.1. Pravostranné karcinomy.....	38
11.2. Levostranné karcinomy.....	39
11.3. Dělení kolorektálního karcinomu na základě genové exprese.....	39
12. Klinické příznaky kolorektálního karcinomu.....	39
13. Léčba kolorektálního karcinomu.....	40
13.1. Léčba endoskopická.....	40
13.1.1. Kolon.....	40
13.1.2. Rektum.....	40
13.2. Léčba chirurgická.....	40
13.2.1. Kolon.....	41
13.2.2. Rektum.....	42
13.2.3. Chirurgická léčba metastatického onemocnění.....	43
13.3. Nechirurgická léčba jaterních metastáz.....	45
13.4. Radioterapie.....	45
13.4.1. Režimy radioterapie.....	46

13.5. Chemoterapie.....	46
13.5.1. Indikační faktory chemoterapie.....	46
13.5.2. Doba podávání chemoterapie.....	47
13.5.3. Chemoterapeutické režimy.....	47
13.6. Biologická léčba.....	47
14. Mucin.....	48
15. Experimentální část.....	51
15.1. Materiál a metodika.....	51
15.1.1. Klinické vzorky.....	51
15.1.2. Genotypizace lidských vzorků.....	53
15.2.3. Reverzní transkripce (RTr) a qPCR <i>MUC13</i>	53
15.2.4. Imunohistochemie proteinu MUC13.....	55
15.2.5. MiRNA selekce.....	57
15.2.6. Reverzní transkripce (RTr) miR-4647.....	57
15.2.7. cDNA preamplifikace miR-4647.....	57
15.2.8. Vysokokvantitativní qPCR miR-4647.....	58
15.2.9. Buněčné linie.....	58
15.2.10. Přechodná buněčná transfekce.....	58
15.2.11. Genotypizace a sekvenování buněčných linií.....	59
15.2.12. <i>In vitro</i> testy.....	59
15.2.13. Western blot test.....	60
15.2.14. Statistická analýza.....	60
16. Výsledky.....	61
16.1. Klinický výzkum.....	61
16.2. Výzkum založený na buněčných liniích.....	72
17. Diskuze.....	79
18. Závěr.....	83
19. Souhrn/Summary.....	84
20. Legenda k obrázkům.....	86
21. Literatura.....	92
22. Seznam zkratk.....	105
23. Publikační činnost, granty.....	109
23.1. Publikační činnost.....	109
23.2. Grant.....	109

Klíčová slova: kolorektální karcinom, prognostické faktory, mucin, nádorové markery, biomarker, staging, screening, gen *MUC13*, miRNA, miRNA-4647

Key words: colorectal cancer, prognostic factors, mucin, tumor markers, biomarker, staging, screening, gene *MUC13*, miRNA, miRNA-4647

Abstrakt

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově k nejčastějším malignitám s přetrvávající vysokou mortalitou. Z toho důvodu jsou kladeny vysoké nároky na výzkum tohoto onemocnění. Cílem naší práce bylo zhodnocení epidemiologie CRC v České republice v porovnání se světem. Zaměřili jsme se na zhodnocení nejnovějších poznatků ve screeningu, diagnostice, zkoumali jsme prognostické faktory a v neposlední řadě terapeutické možnosti u CRC. Dále jsme podrobněji popsali karcinomy produkující mucin a samotný mucin, jako rizikový faktor pro prognózu pacientů s CRC.

V experimentální části práce jsme se zabývali genem mucinu *MUC13* a osou *MUC13* - miR-4647, které jsou právě spojeny s horší prognózou u pacientů s CRC.

V naší práci jsme použili vzorky CRC a okolní tkáň bez karcinomu odebraných od pacientů, kteří podstoupili chirurgický zákrok ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, ve Fakultní Thomayerově nemocnici v Praze a ve Fakultní nemocnici v Plzni. Odběr proběhl v letech 2011 až 2015. Bylo odebráno 187 vzorků od pacientů se sporadickým kolorektálním karcinomem. Subjekty studie poskytly informace o svých životních návycích, body mass index (BMI), cukrovce a rodinném či osobním výskytu rakoviny v anamnéze.

Pacienti s kolorektálním karcinomem s vyšší hladinou exprese genu *MUC13* v nádorové tkáni měli horší prognózu a kratší přežití v porovnání s pacienty s nižší hladinou exprese (Gupta, 2012, Chauhan, 2009 a 2012, Shimamura, 2005, Walsh, 2007). V experimentu na buněčných liniích jsme stanovili, že hladina exprese *MUC13* poklesla po ektopické nadměrné expresi miR-4647 pomocí RT-qPCR. Mucinózní tumory v naší studii exprimovaly *MUC13* s nižší intenzitou, v porovnání s adenokarcinomy (25 % vs. 34 %).

In vitro jsme potvrdili, že při vyšším stupni exprese *MUC13* mají buňky delší přežívání a vyšší schopnost migrace a naopak, buňky kolorektálního karcinomu se zvýšenou expresí miR-4647 tvořily významně méně kolonií a projevovaly nižší schopnost migrace. Tato pozorování potvrdila, že horší přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem může být asociováno s genem *MUC13*. Je zajímavé, že jsme pozorovali i vyšší hladiny exprese miR-4647 v asociaci s horším přežíváním pacientů, což je v rozporu s naším pozorováním negativní korelace mezi hladinami miR-4647 a *MUC13*. Zjevně je vliv na prognózu složitějšího charakteru a mohou zde hrát roli další faktory. Až další studie prokáží, přesnější vztah mezi expresí *MUC13*, stádiem tumoru a prognózou maligního procesu.

MUC13 uvolněný z povrchu nádorových buněk a jeho hodnoty hladiny v séru u pacientů s gastrointestinálními karcinomy by mohly být důležitým diagnostickým cílem. Vzhledem k uvedeným výsledkům se osa *MUC13* – miR-4647 u kolorektálního karcinomu zdá být velice nadějná s ohledem na nové terapeutické přístupy. Předpokládáme, že gen *MUC13* by mohl představovat významný potenciál pro screening, diagnózu a léčbu rakoviny.

Abstract

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most common malignancies worldwide with persistently high mortality. As a consequence, high demands are placed on research into this disease. The aim of this study was to evaluate the epidemiology of colorectal carcinoma in the Czech Republic in comparison with worldwide data. We focused on the evaluation of the latest findings in screening and diagnosis, investigated prognostic factors, and also focused on the therapeutic options of CRC. Furthermore, mucin-producing carcinomas are described in detail and mucin itself was confirmed as a risk factor for the prognosis of CRC patients.

The experimental part of the study focused on gene mucin *MUC13* and the *MUC13* - miR-4647 axis, which is associated with adverse prognosis in CRC patients. Samples of CRC and samples of adjacent non-malignant mucosa tissue were used. The samples were collected from patients who underwent surgery at the General University Hospital in Prague, at the Thomayer University Hospital in Prague and at the University Hospital in Pilsen (Czech Republic). The collection of samples took place between 2011 and 2015. The total of 187 samples were collected from patients with sporadic colorectal cancer. The subjects of the study all provided information on their lifestyle habits, body mass index (BMI), diabetes, and family or personal history of cancer.

CRC patients with higher levels of gene *MUC13* expression in tumor tissue showed a worse prognosis and shorter survival compared to patients with lower levels of expression (Gupta, 2012, Chauhan, 2009 a 2012, Shimamura, 2005, Walsh, 2007). In a cell line experiment, we determined that *MUC13* expression levels decreased after ectopic overexpression of miR-4647 by RT-qPCR. In the present study mucinous tumors expressed *MUC13* at a lower level compared to adenocarcinomas (25 % vs. 34 %).

In vitro, we confirmed that higher levels of *MUC13* expression were associated with longer survival and higher migration ability of the cancer cells, and conversely, colorectal cancer cells with increased miR-4647 expression formed significantly fewer colonies and exhibited decreased migration ability. These observations confirmed that the decreased survival of CRC patients may be associated with the gene *MUC13* and with decreased miR-4647 expression. Interestingly, also higher expression levels of miR-4647 were associated with shorter patient survival, which is in contrast to our observations of a negative correlation between miR4647 and *MUC13* levels. Clearly the effect on prognosis is of a more complex

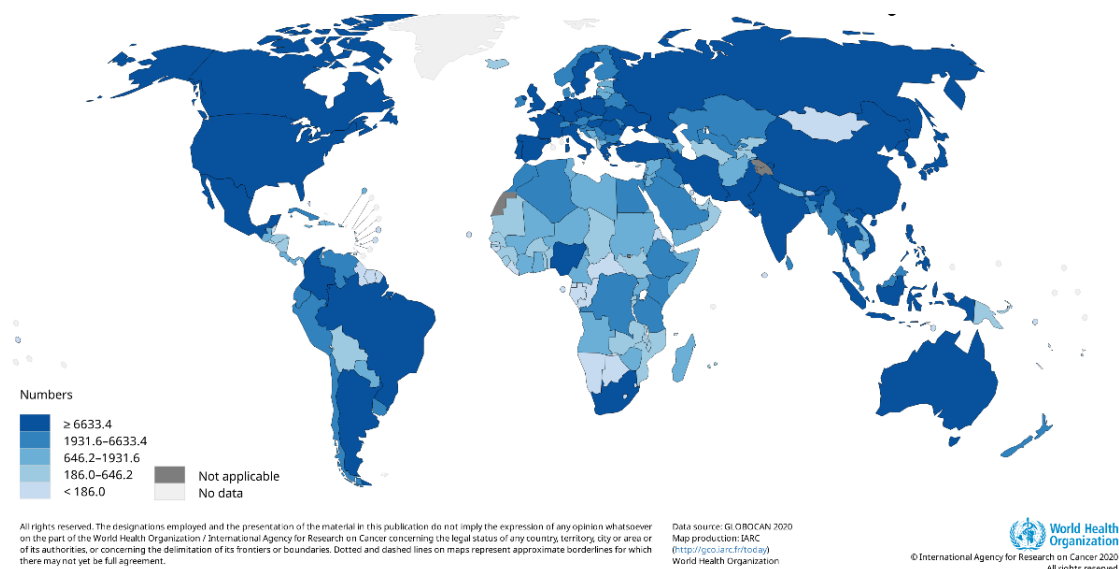
nature, where other factors may play a role. Further research should clarify the relationship between *MUC13* expression, tumor stage, and prognosis of the malignant process.

MUC13 released from the surface of tumor cells and its serum levels in patients with gastrointestinal carcinomas may be an important diagnostic tool. Given these results, the *MUC13* - miR-4647 axis in colorectal cancer seems very promising with regards to novel therapeutic approaches. We believe that gene *MUC13* might have a significant potential for screening, diagnosis, and treatment of cancer.

1. Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) je nádorové onemocnění tlustého střeva a jeho operativní řešení patří dnes již k základním chirurgickým výkonům. První, kdo navrhl vyvedení stomie pro obstrukci střeva tumorem, byl Paracelsus v 15. století. První operace tlustého střeva je připisována v roce 1823 Reybardovi, který provedl resekci sigmatu. Do roku 1880 bylo zaznamenáno pouze 10 resekcí tlustého střeva a pouze 3 byly považovány za úspěšné (Meade, 1968).

Kolorektální karcinomy představují závažný zdravotní problém s celosvětovým výskytem, kdy se jedná se o třetí nejčastější malignitu. **(Obrázek č. 1.)** Právě z toho důvodu je ve vyspělých státech zaveden screeningový program, který má za úkol vyhledávat CRC v nejčasnější fázi onemocnění. Základní léčebnou modalitou zůstává léčba chirurgická, ale i léčba systémová u metastatického a lokálně pokročilého onemocnění hraje zásadní roli. Výzkum je zaměřen na screening, stanovení rizikových markerů, ale i na všechny terapeutické možnosti, které by měly vést ke snížení incidence, a hlavně mortality na toto onemocnění.



Obrázek č. 1. Mapa zobrazující odhadované míry incidence standardizované podle věku (svět) v roce 2020 (poslední aktualizace) CRC, obě pohlaví, všechny věkové kategorie, převzato z <http://globocan.iarc.fr/> (GCO, 2021).

2. Vymezení cílů práce a stanovení hypotéz

2.1. Cíle práce

1. Všeobecná charakteristika CRC - v teoretické části práce se zabýváme etiologií, screeningem, rizikovými a prognostickými faktory, stagingem, průběhem onemocnění a terapií.
2. Podrobnější popis CRC produkujícího mucin a samotného mucinu.
3. Role *MUC13* v nádorové tkáni oproti tkáni bez tumoru se zaměřením na jeho vliv na prognózu a celkové přežití pacientů.
4. Expresí miR-4647 a osy *MUC13* – miR-4647 jako možný terapeutický a prognostický cíl u CRC.

2.1. Hypotéza

V současné době se výzkum zaměřuje na zkoumání nádorových markerů (biomarkerů, onkomarkerů) karcinomů a možnost jejich využití v screeningu, diagnostice, pro stanovení prognózy i v terapii karcinomů. Předpokládáme, že gen *MUC13* a osa *MUC13* – miR-4647 by mohly představovat jeden takový slibný marker u CRC s prognostickým a terapeutickým potenciálem.

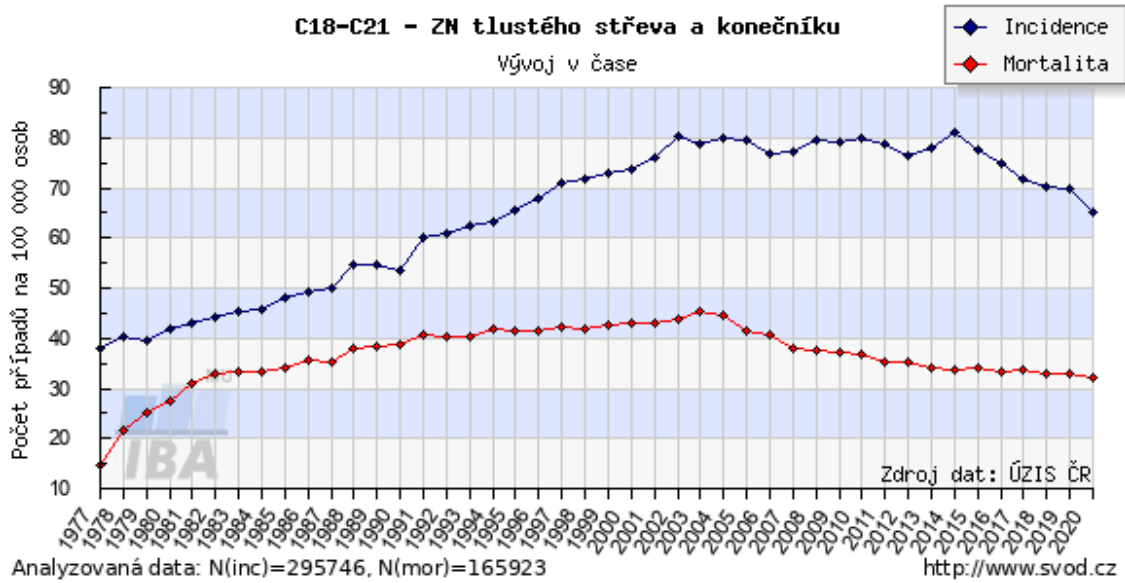
3. Epidemiologie

3.1. Česká republika – incidence a mortalita CRC

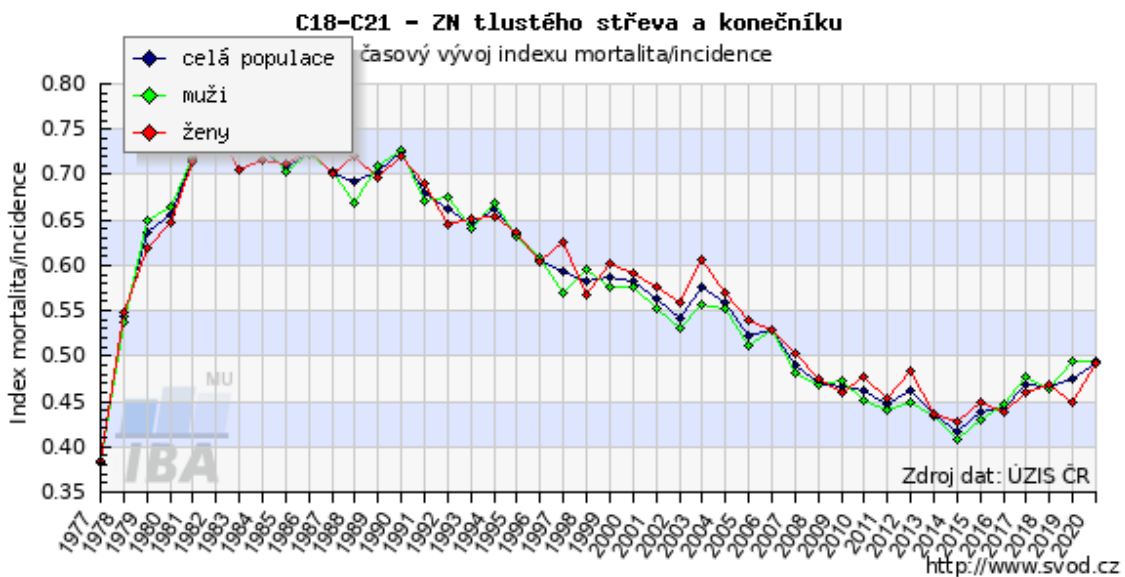
V České republice patří kolorektální karcinom k nejčastějším malignitám. Dle poslední dostupné statistiky novotvarů ÚZIS z roku 2018 se jednalo o druhou nejčastější malignitu u obou pohlaví, která tvořila 12,4 % ze všech nově diagnostikovaných tumorů (ÚZIS, 2018). Na prvním místě u mužů přetrvával karcinom prostaty a u žen karcinom prsu (do statistiky nejsou zahrnuty nádory kůže). Během statistického sledování, které je v České republice dle ÚZIS elektronicky dohledatelné od roku 1977, incidence CRC stoupala až do roku 2002, kde po dlouhou dobu setrvala na prakticky stacionární hodnotě až do roku 2015, kdy dokonce nastal pozvolný pokles (Dušek, 2022). **(Obrázek č. 2.)** Tento pokles byl s největší pravděpodobností způsoben zavedením screeningového programu pro kolorektální karcinom v roce 2000. Screeningový program má za úkol vyhledávání a odstraňování tumorů nejlépe ještě ve stádiu prekarceróz. U kolorektálního karcinomu se konkrétně jedná o snesení polypů endoskopicky ještě před vznikem karcinomu. V případě, nebude-li tumor zachycen ve stádiu prekarcerózy, tak je potřebné detekovat již vzniklý karcinomů v co nejčasnějším stádiu (Bernard, 2008).

V ČR u vývoje mortality v čase můžeme pozorovat prakticky stacionární stav od roku 2005, dále mírný setrvalý pokles do roku 2015. Bohužel od roku 2015 nepozorujeme významnější pokles v mortalitě, který by kopíroval křivku incidence. **(Obrázek č. 2.)**

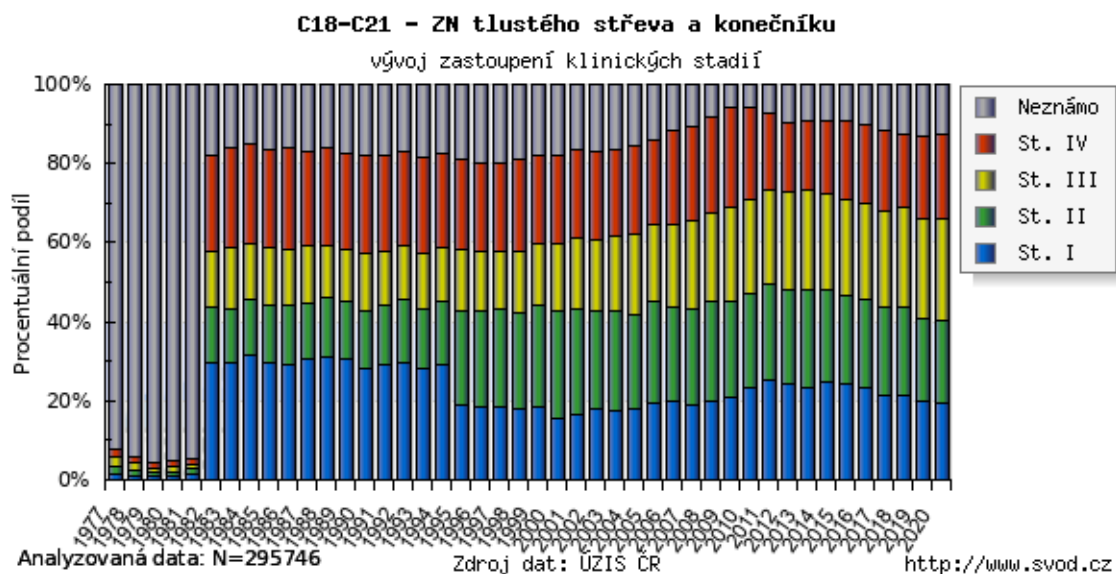
Index mortality/incidence od roku 2015 dokonce jasně stoupá. **(Obrázek č. 3.)** Z toho lze usuzovat, že stále přetrvává vysoké procento nálezů pokročilého kolorektálního karcinomu u pacientů, které uniká screeningovým vyšetřením. Tento poznatek si můžeme potvrdit i na základě grafu incidence a mortality **(Obrázek č. 4.)**, kde vidíme pokles incidence karcinomu ve stádiu I, pouze mírný pokles ve stádiu IV, a naopak nárůst ve stádiu II a III.



Obrázek č. 2. Vývoj incidence a mortality v čase v České republice, převzato ze SVOD (Dušek, 2022).



Obrázek č. 3. Vývoj Indexu mortality/incidence v čase v České republice, převzato ze SVOD (Dušek, 2022).

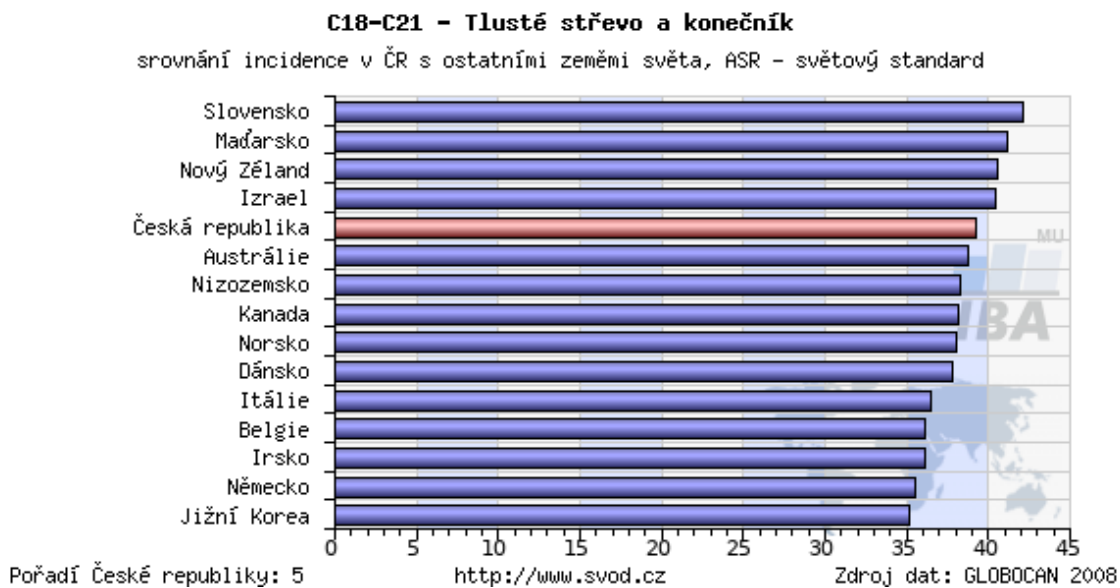


Obrázek č. 4. Vývoj stádií kolorektální karcinomu v čase v České republice, převzato ze SVOD (Dušek, 2022).

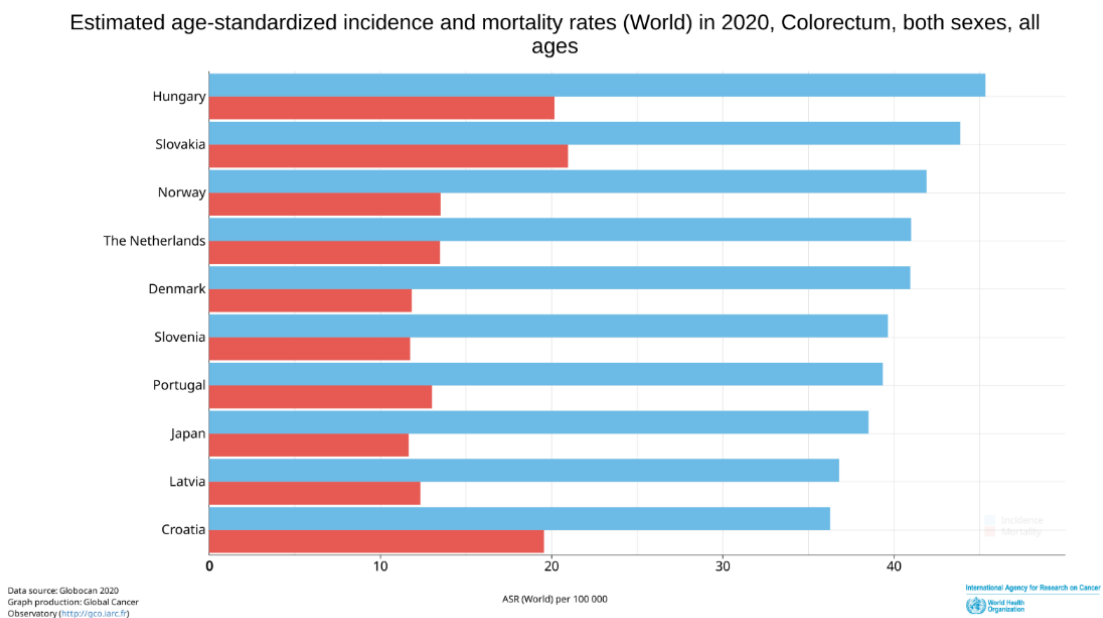
3.2. Výskyt CRC ve světě

Celosvětově se jedná o třetí nejčastější malignitu a tvoří 11 % ze všech malignit (Bray, 2018, GCO, 2022). Incidence ve vyspělých zemích je prakticky srovnatelná s Českou republikou. Na prvních místech se dlouhodobě drží Slovensko a Maďarsko. Grafy incidence CRC jednotlivých států ukazují srovnání v čase v roce 2008 a 2020, kde první místa světa v incidenci zůstávají kromě drobných obměn stacionární. **(Obrázky č. 5. a č. 6.)** V případě srovnání rozsáhlejších oblastních celků než jednotlivých států můžeme vidět, že první místa zaujímají sociálně vyspělé oblasti. **(Obrázek č. 7.)** Naopak v zemích s nízkým socioekonomickým statusem je incidence nižší. To je jistě dáno i horším sběrem dat z těchto oblastí (Rabeneck, 2019)

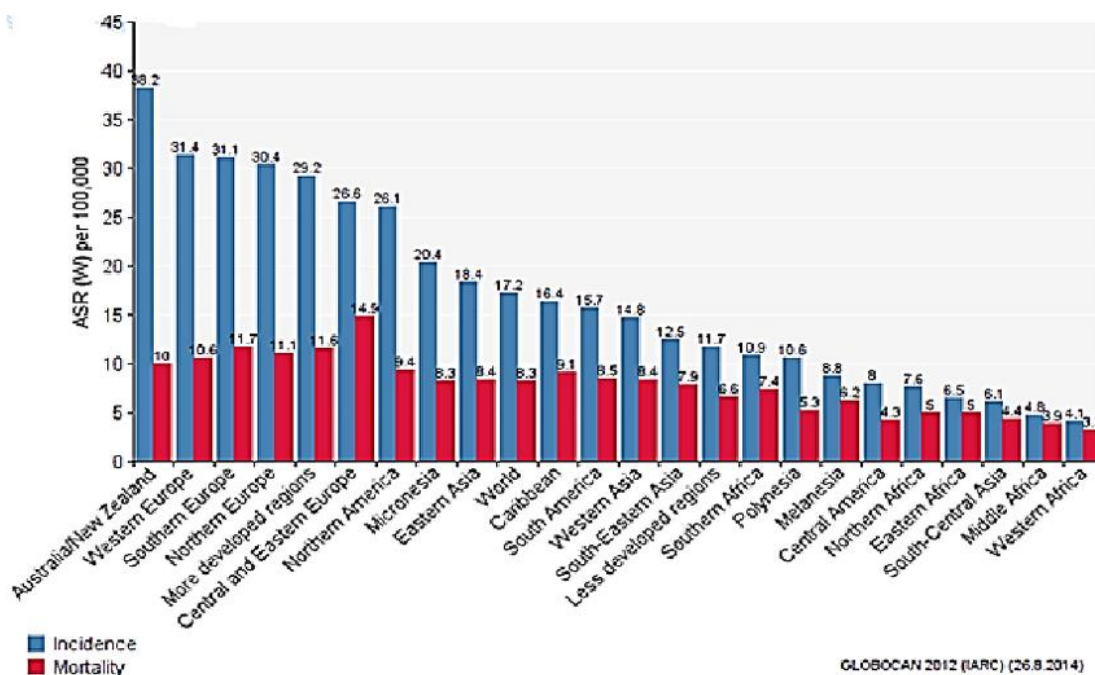
Americká studie publikovaná v roce 2021 sledovala vliv screeningového programu na incidenci a mortalitu od jeho zavedení v roce 2003 v USA. V závěru studie je uvedeno, že po významném vzestupu incidence, hlavně časných fází kolorektálního karcinomu dochází k signifikantnímu poklesu, jak incidence, tak mortality, a to napříč všemi etnickými skupinami. Rozdíl mezi etnickými skupinami byl způsoben hlavně rozdílným přístupem ke screeningovému programu, takže i množstvím vyšetřených pacientů (Brown, 2021).



Obrázek č. 5. Incidence CRC v roce 2008 mezi jednotlivými státy, převzato ze SVOD (Dušek, 2022).



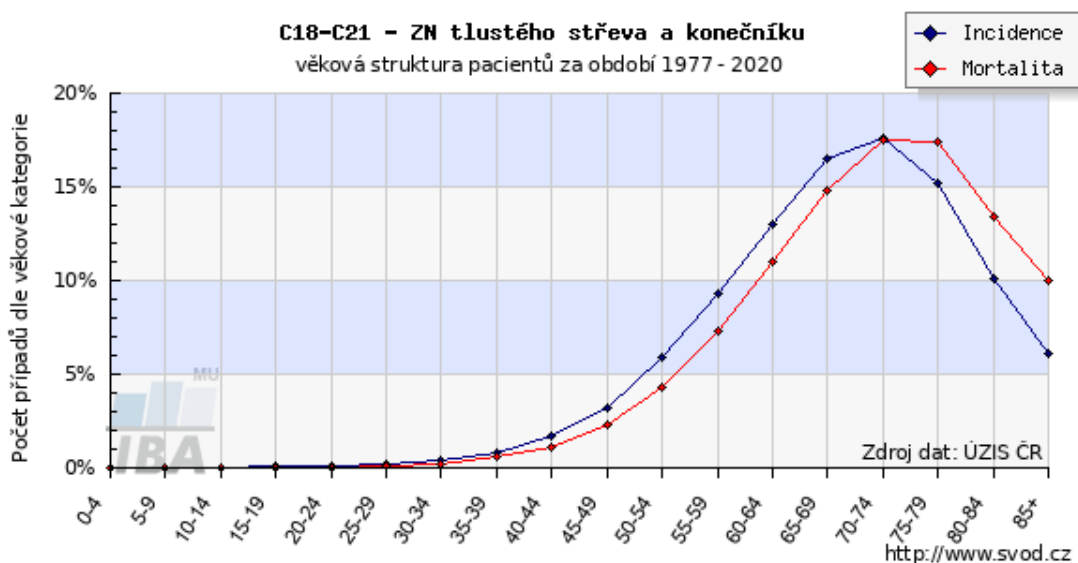
Obrázek č. 6. Incidence CRC v roce 2020 mezi jednotlivými státy, převzato z Global Cancer Observatory (iarc.fr) (GCO, 2021).



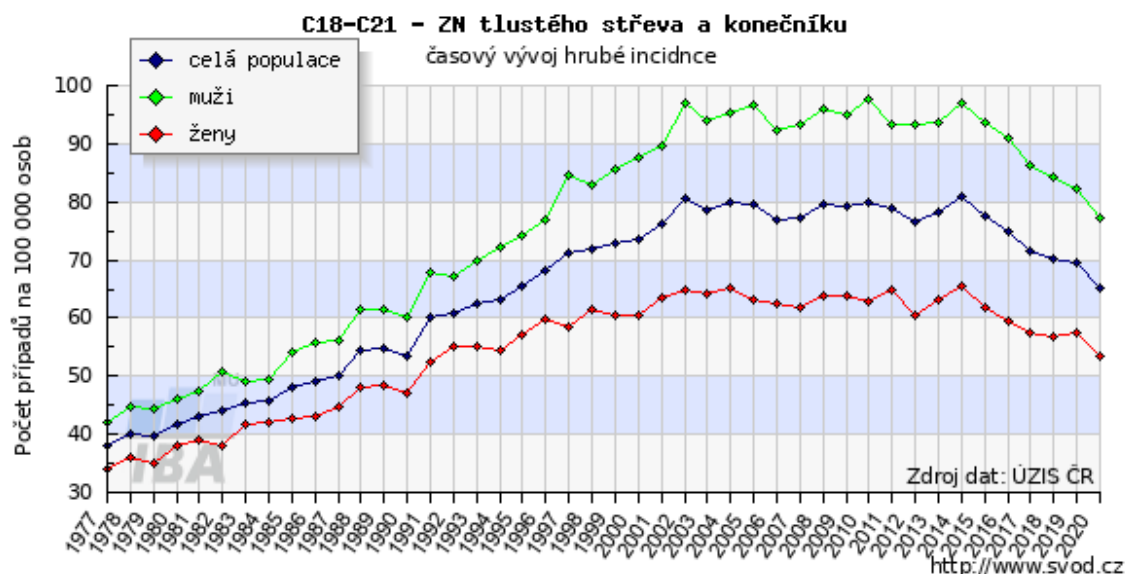
Obrázek č. 7. Incidence/mortalita CRC v roce 2012 mezi jednotlivými oblastními celky, převzato z Global Cancer Observatory (iarc.fr) (GCO, 2014).

3.3. Rozložení CRC v populaci dle pohlaví a věku

Dle souboru věkového rozložení v české populaci podle Gaussovy křivky můžeme pozorovat maximum výskytu ve věku mezi 65-79 rokem (**Obrázek č. 8**), se stálou převahou mužů s CRC nad ženami (**Dušek, 2020**). (**Obrázek č. 9**)



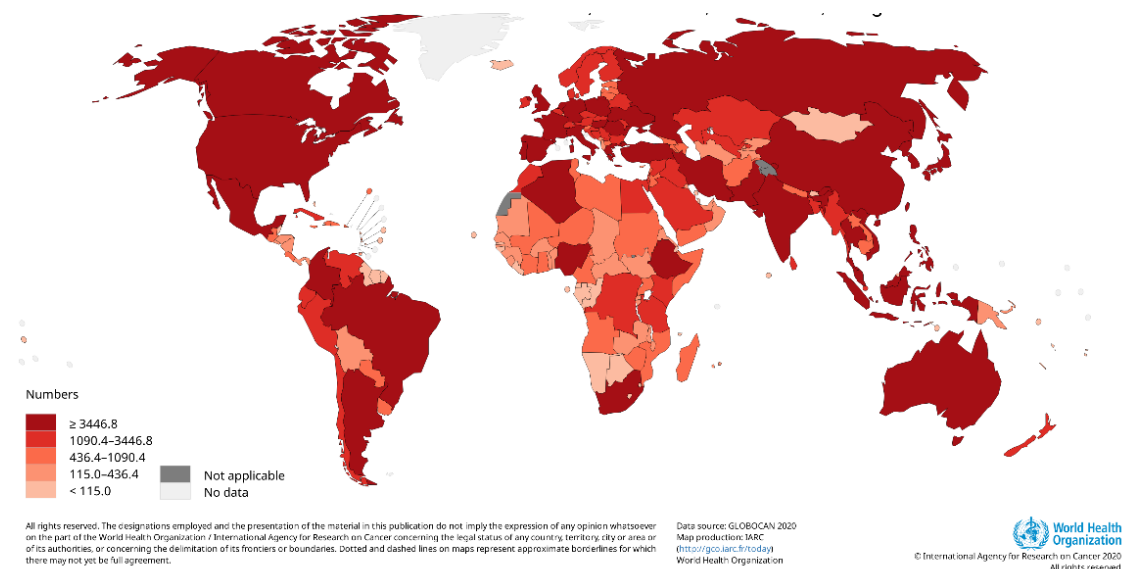
Obrázek č. 8. Rozložení CRC dle věku – incidence, mortalita, převzato ze SVOD (Dušek, 2022).



Obrázek č. 9. Rozložení CRC v populaci dle pohlaví a vývoje v čase, převzato ze SVOD (Dušek, 2022).

3.4. Mortalita CRC

Z důvodu, že ve světě i v České republice se jedná o častou malignitu s přetrvávající vysokou mortalitou, bylo by velice přínosné zasáhnout do diagnostického procesu a ovlivnit tak mortalitu nemocných vhodnou a cílenou léčbou. **(Obrázek č. 10.)**



Obrázek č. 10. Mapa znázorňující odhadované věkově standardizované míry úmrtnosti (svět) v roce 2020 (poslední aktualizace) na 100 000 CRC, kolorektum, obě pohlaví, všechny věkové kategorie, převzato z <http://globocan.iarc.fr/> (GCO, 2021).

4. Rizikové faktory CRC

4.1. Mužské pohlaví

Mužské pohlaví by v širším měřítku mohlo být bráno jako rizikový faktor pro vznik CRC. Rozdíly v incidenci mezi pohlavími u kolorektálního karcinomu se zabývala přehledová studie z Velké Británie roku 2018 (White, 2018). Incidence kolorektálního karcinomu je tam kolem 42 případů na 100 000 obyvatel dle Cancer Research UK (Londýn, VB) a jedná se o třetí nejčastější malignitu po karcinomu prostaty u mužů, karcinomu prsu u žen a karcinomu plic u obou pohlaví. I zde jasně převažuje častější výskyt kolorektálního karcinomu u mužů, který je i spojen s vyšší mortalitou. V závěru studie je uvedeno, že tato skutečnost je nejspíše způsobena biologickými i behaviorálními rozdíly mezi pohlavím. Muži požívají více červeného masa, uzenin, či jinak zpracovaného masa (Bates, 2016), pijí více alkoholu (Schütze, 2011) i více kouří (Chang, 2014). Dalším rizikovým faktorem, který se vyskytuje více u mužské populace, je procento viscerálního tuku, které je spojeno s vyšším výskytem kolorektálního karcinomu (Bassett, 2010).

4.2. Ženské pohlaví

Naopak u žen se častěji nachází karcinom na pravé polovině tračnicku, která je spojena s horší prognózou (Hansen, 2012). U žen byly zjištěny rozdíly v hypermetylaci, mikrosatelitní nestabilitě, mutace *BRAF V600E* a určitý fenotyp metylace CpG ostrůvků (CIMP). Je u nich také vyšší frekvence mutací genu *KRAS* v kodonu 12, které jsou spojeny s vyšším výskytem adenomů a agresivnější formou rakoviny.

V pravé polovině tračnicku bývají karcinomy spíše plochého charakteru ve srovnání s levou polovinou tračnicku, kde se nachází spíše polypoidní léze. Ploché tumory jsou častěji přehlédnuté při preventivní koloskopii (Lorentzen 2016, Peake 2014).

4.3. Všeobecné rizikové faktory – nutriční

Rizikové faktory podílející se na vzniku kolorektálního karcinomu jsou konzumace červeného masa, uzeného masa, kouření, alkohol, obezita, množství intraabdominálního tuku, dále stárnutí a rodinná anamnéza (Basset 2010, Bates 2016, Chang 2014, Inoue 2009, Schütze 2011). Předpokládá se, že dietní faktory se na vzniku rakoviny podílejí až z 30 % (Koo, 2011).

4.4. Prekancerózy spojené se vznikem CRC

Dnes jsou již známá onemocnění, která se podílejí na vzniku karcinomu kolorekta. Jedná se o zvýšený výskyt prekanceróz – adenom, zánětlivá onemocnění střev, diabetes II. typu, hypertriglyceridémie. Jsou známá onemocnění s jasně prokázanou dědičností jako je familiární polypóza tlustého střeva, syndromy adenomatozní i hamartozní, dědičný nepolypózní kolorektální karcinom a další (Sinicrope, 2011).

Zajímavá zjištění, na která bohužel neexistují dohledatelná data v České republice, je existence významných rozdílů v incidenci kolorektálního karcinomu v různých socioekonomických skupinách. Pacienti byli zkoumáni dle svých udaných příjmů, kde pacienti s nejnižším příjmem mají vyšší riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Tento fakt je nejspíše spojen s rozdílným chováním a životním stylem, který nese řadu rizikových faktorů, jak bylo uvedeno výše (Doll, 1981).

4.5. Rizikové genetické variace CRC

Pokud vezmeme v úvahu výzkum spojující genetiku s rizikem vzniku kolorektálního karcinomu, předpokládá se, že asi 35 % případů kolorektálního karcinomu je ovlivněno genetickými faktory (Zhang 2014).

Rodinné genetické studie a experimentální důkazy identifikovaly vzácné patogenní genetické varianty s vysokou penetrací v 16 genech se signifikantní asociací s dědičným CRC, polypózou tlustého střeva (Seifert, 2019) a geny s náchylností ke vzniku CRC i polypóze (Belhadj, 2020). Paralelně platforma celogenomové asociační studie (GWAS) identifikovala více než 140 společných rizikových lokusů (Huyghe, 2019).

Tyto studie naznačují, že jednonuklidové polymorfismy (SNP) mohou být spojeny se vznikem CRC. I když vysvětlují pouze malý zlomek celkové dědičnosti CRC (Zhang, 2014). Genetické varianty například miR-196a2, SNP rs6017342 a alela C SNP rs11614913 propůjčují jejich nosičům zvýšené riziko rozvoje kolorektálního karcinomu (Wu, 2015). Bylo také prokázáno, že tyto geny ovlivňují nejen incidenci kolorektálního karcinomu, ale také mortalitu, protože rs4939827 SNP lokalizovaný v genu *SMAD7* je spojován s kratším přežitím pacientů.

5. Protektivní faktory u CRC

5.1. Protektivní faktory již známé

Jako protektivní faktor je považována konzumace ryb, vlákniny (Caygill, 1995), vyšší konzumace vitamínu D a vápníku (Gorham, 2005) s pravidelnou fyzickou aktivitou (Schmid, 2014).

5.2. Nesteroidní antiflogistika NSAID

V poslední době je často zmiňován protektivní vliv nesteroidních protizánětlivých léků (NSAID) na vznik kolorektálního karcinomu. Randomizované studie ukazují za 20 let pozorování, že užívání kyseliny acetylsalicylové po dobu pěti let, snižuje riziko vzniku a mortalitu kolorektálního karcinomu o 30-40 %. Je nutné současně zmínit, že NSAID zvyšují riziko selhání ledvin a krvácení se zažívacího traktu (Rothwell, 2010).

Bohužel stále není jasný mechanismus účinku. Předpokládá se vliv protizánětlivého efektu NSAID a ovlivnění chronického zánětu, který je společný většině rizikových faktorů. Nesteroidní antiflogistika tím pádem v různé míře ovlivňují či tlumí rizikové faktory (Kosami, 2013).

6. Screening CRC

6.1. Screeningové programy v ČR

Jak již bylo zmíněno výše, v České republice existuje screeningový program od roku 2000, který cílí na pacienty v rizikovém věku. Pacienti nad 50 let mohou volit mezi dvěma typy screeningových vyšetření. Jedná se o test na okultní krvácení, který pacienti do věku 55 let mohou opakovat jednou ročně a nad 55 let jedenkrát za dva roky. Další možností je screeningová koloskopie, která se při negativním nálezu opakuje jedenkrát za 10 let. Tyto screeningové programy jsou v ČR dostupné zdarma pro plátce zdravotního pojištění.

6.2. Screeningový program – požadavky

Cíl screeningových programů je co nejvyšší možná senzitivita a specificita. Ideální screeningový program by měl být takový, aby obsáhl co největší množství rizikové populace, byl by levný a v neposlední řadě neinvazivní a tím pádem bezpečný. Další podmínkou vhodného screeningového programu je odhalení lézí v počátečních stádiích onemocnění, ideálně ve stadiu prekarceróz (Torre, 2015).

6.3. Typy screeningových testů ze stolice, krve i moči

Typy screeningových testů kolorektálního karcinomu jsou založeny na detekci krve ve stolici – test takzvaného okultního neboli skrytého krvácení (FOBTs) a na detekci uvolňujících se částí přímo z nádoru. Nyní jsou dostupné tři metody detekce.

6.3.1. Guaiakový test okultního krvácení ze stolice (gFOBT)

Guaiakový test okultního krvácení ze stolice (gFOBT) je založený na detekci krve ve stolici. Ta je stanovována pomocí reakce hemoglobinu (Hb) s chemikálií guaiak. Tento test pro svojí nižší specificitu a senzitivu je již prakticky vytlačen novějšími imunohistochemickými testy na okultní krvácení za stolice (FIT).

6.3.2. Imunohistochemické testy na krvácení za stolice (FIT)

FIT jsou založeny na detekci krve pomocí specifické protilátky, která se váže na lidský hemoglobin. Tyto testy jsou citlivější než testy na okultní krvácení založené na guaiaku (Allison, 2007). Současné evropské směrnice doporučují FIT ve screeningu kolorektálního karcinomu (Karsa, 2013).

6.3.3 DNA a RNA testy detekce CRC ze stolice

DNA a RNA testy detekce kolorektálního karcinomu ze stolice jsou založeny na detekci částí tumoru uvolněných do stolice. Metody založené na detekci DNA jsou rychle se rozvíjející skupinou s velmi slibnou senzitivitou (Dickinson, 2015). V České republice testy nejsou t.č. běžně dostupné.

6.3.4. Testy ve fázi výzkumů

Další možnou metodou je stanovení proteinů z krve nebo ze stolice, a to buď detekce proteinů typických pro tumorózní tkáň nebo detekce proteinů uvolňujících se z krvácející či zanícené tkáně (Uppara, 2015). Ve stádiu výzkumu je zkoumání mikrobiomu u pacientů s CRC. Bylo prokázáno, že pacienti s CRC mají jiný mikrobiom než pacienti bez nádoru. Zkoumané bakterie jsou například *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori*, a *Fusobacterium nucleatum* (Kuipers, 1990, Narayanan, 2014).

6.4. Srovnání screeningových vyšetření

Americká vědecká skupina pro prevenci v USA zkoumala a porovnávala randomizované studie zaměřené na různé typy možných screeningových programů v USA 2018. Sledovala flexibilní sigmoideoskopii, gFOBT, kolonografii pomocí CT, klasickou koloskopii, imunohistochemické testy stolice a DNA testy stolice. Všechna vyšetření se ukázala jako přínosná v detekci kolorektálního karcinomu či jejich prekurzorů, bohužel, žádné vyšetření nevykazuje 100 % senzitivitu a specifitu (Lin, 2016).

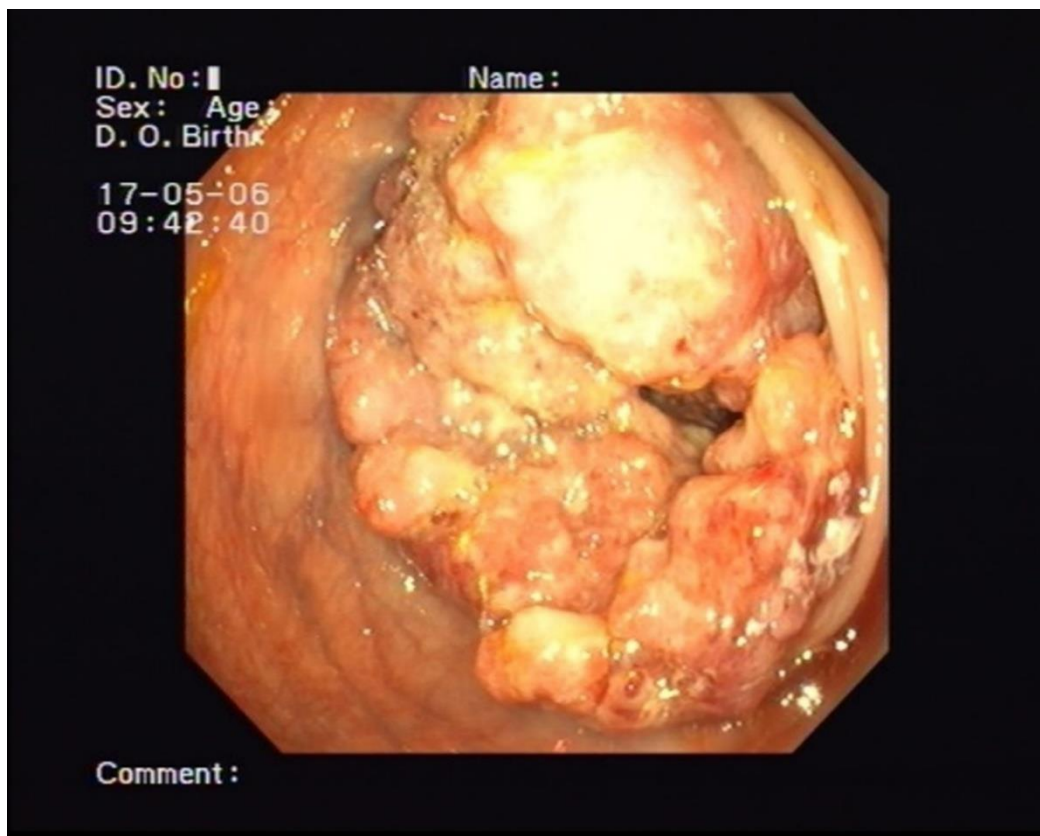
Stejná pracovní skupina provedla další výzkum dostupných studií znovu v roce 2021, kde výsledky známých testů zůstávaly stacionární. Novější imunochemické testy stolice se jeví jako slibný a stále se rozvíjející způsob detekce kolorektálního karcinomu. Nově zmiňují test na detekci kolorektálního karcinomu ze séra, který rovněž vykazuje vysokou specifitu i senzitivitu. Dále ještě popisují i test PolypDx k detekci kolorektálního karcinomu v moči. Na tento test existuje zatím pouze malá klinická studie, která vyhodnotila test jako slibný (Lin, 2021).

Americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro screening s CRC s poměrným rizikem bylo schváleno vícecílové testování DNA stolice (MT-sDNA). Prokázalo se, že pozitivní výsledek MT-sDNA má příznivý dopad na diagnostickou výtěžnost a kvalitu následné kolonoskopie (Johson, 2017).

7. Staging CRC

7.1. Stanovení diagnózy na základě histopatologického vyšetření

Zásadní ke stanovení terapeutického postupu je znalost histologického typu tumoru. Vzorek tkáně tumoru, který je odeslán k histologické verifikaci je nejčastěji získán při koloskopickém vyšetření. (Obrázek č. 11.)



Obrázek č. 11. Endoskopický nálezn stenozujícího CRC (archiv autora).

7.2. Zobrazovací vyšetření

V rámci stanovení stadiu – neboli rozsahu a pokročilosti tumoru se využívají zobrazovací vyšetření. Dle směrnic NCCN je doporučeno provedení CT hrudníku a břicha se stanovením onkomarkerů CEA a CA 19-9. Při podezření na metastatické onemocnění může být vyšetřovací proces ještě doplněn o PET/CT. Ke stanovení rozsahu karcinomu rektu se používá MRI nebo endorektální ultrazvuk (ERUS). U stadia T1 tumorů rektu je pro detailnější rozlišení rozsahu prorůstání nádoru ve stěně střeva doporučeno ERUS (Benson, 2022).

7.3. Stádia onemocnění (TNM klasifikace)

Do klinické praxe bylo zavedeno několik skórovacích systémů, ze kterých je nejvíce užívaný systém tumor-node-metastasis (TNM) klasifikace. **(Tabulka I.)** Z této klasifikace se dále stanovuje stádium onemocnění. TNM klasifikace je využívána k vyjádření pokročilosti onemocnění, ale také ke stanovení terapeutického procesu, prognózy onemocnění pacienta, ale i jako komunikační systém celosvětového charakteru, pro účely výzkumu a při porovnání v nejrůznějších databázích. Tento stagingový systém je stále nedostatečný z toho důvodu, že i u počátečního stadia I, které je považováno za relativně bezpečné, se mohou do budoucna vytvořit vzdálené metastázy. Z toho důvodu je výzkum intenzivně zaměřen na hledání dalších prognostických faktorů (Yin, 2011). Pětileté přežití u kolorektální karcinomu je 96,6 % pro stádium I, 88,7 % pro stádium II, 69,9 % pro stádium III a 34,3 % pro stádium IV (Pang, 2022).

Tabulka I. TNM klasifikace poslední 8. vydání, převzato z UICC (UICC, 2017).

TNM Klinická Klasifikace	
T—Primární tumor	
TX	Primární tumor nelze posoudit
T0	Žádný důkaz primárního tumoru
Tis	Karcinoma <i>in situ</i> : invaze do lamina propria
T1	Tumor prorůstá do submucosy
T2	Tumor prorůstá do muscularis propria
T3	Tumor prorůstá do subserosy nebo do perikolické nebo perirektální tkáně
T4	Tumor přímo prorůstá do jiného orgánu nebo struktury a/nebo perforuje viscerální peritoneum
T4a	Tumor perforuje viscerální peritoneum
T4b	Tumor přímo prorůstá do jiného orgánu nebo struktury

N—Regionální lymfatické uzliny	
NX	Regionální lymfatické uzliny nelze posoudit
N0	Regionální lymfatické uzliny bez metastáz
N1	Metastázy v 1–3 regionálních lymfatických uzlinách
N1a	Metastáza v 1 regionální lymfatické uzlině
N1b	Metastázy ve 2–3 regionálních lymfatických uzlinách
N1c	Nádorové ložisko nebo ložiska, tj. satelity, v subseróze nebo v perikolické nebo perirektální tkáni bez metastáz v regionálních lymfatických uzlinách
N2	Metastázy ve 4 nebo více regionálních lymfatických uzlinách
N2a	Metastázy ve 4–6 regionálních lymfatických uzlinách
N2b	Metastázy v 7 nebo více regionálních lymfatických uzlinách
M—Vzdálené metastázy	
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy
M1a	Metastáza omezená na jeden orgán (játra, plíce, ovaria), nebo neregionální lymfatické uzliny, bez metastáz na peritoneu
M1b	Metastázy ve více než jednom orgánu
M1c	Metastázy na peritoneu s nebo bez postižení dalšího orgánu

8. Tumor – specifické markery (biomarkery, onkomarkery)

8.1. Biomarkery

Velkou rozvíjející se skupinou jsou biomarkery, které slouží k diagnostice, stanovení prognózy, ale také při výběru vhodné terapie. National Institute of Health (NIH) definuje biomarker jako biologickou molekulu nacházející se v krvi, ale také v jiných tělesných tekutinách nebo tkáních, která je známkou normálního, abnormálního procesu, stavu nebo nemoci (Langan 2013). Nejčastěji se jedná o DNA (hlavně na mutace genů *TP53*, *APC*, *KRAS* a mikrosatelitní nestabilitu – MSI) (Bosch, 2011), RNA, mikroRNA (miRNA), hypermethylace promotoru DNA, další epigenetické změny či výskyt protilátek (Koga, 2008). Jediný z výše uvedených testů, který je již používán, je test DNA ze stolice, který je v USA dostupný již přes 10 let, se specificitou 94-98 %, citlivostí 25-92 % (Diehl, 2008). Podrobněji budou zmíněny v kapitole 9.2. Prognostické markery molekulární a genetické.

8.2. Klasické sérové nádorové markery

Mezi již známé onkomarkery kolorektálního karcinomu patří CEA a CA 19-9. Nádorové markery jsou látky, které vznikají při karcinogenezi, ale i při normálním vývoji. Mezi nejpočetnější skupinu patří tumor associated antigens (TAAs), u kterých stanovené hodnoty v krvi korelují s počtem neoplastických buněk. Onkomarkery by měly mít pozitivní prediktivní hodnotu, a hlavně vysokou specificitu i senzitivitu. Kromě stanovení koncentrace onkomarkeru je důležité také sledování dynamiky v čase, jako reakce na léčbu hlavně po R0 resekcích. Nejčastěji se stanovují proteinové markery z krve a stolice. Jedná se o protilátky proti TAA, nádorové TAA a CRC relevantní proteiny. Dnešní výzkumy se zaměřují na hledání dalších onkomarkerů i vývoj možných terapeutik, které cílí na podporu imunitního systému v boji proti nádorovému bujení (Lech, 2014).

8.2.1. Karcinoembryonální antigen (CEA)

Nejznámější onkomarker používaný u kolorektálního karcinomu je CEA, který byl objeven v roce 1965. Vyšší hladiny nacházíme také u tumorů žaludku, pankreatu nebo při zánětu.

Jedná se o jediný onkomarker, který je uznávaným při monitorování léčby pacientů s CRC (Gold, 1965, Lech, 2014). Dle Evropské i Americké vědecké skupiny pro klinickou onkologii se nedoporučuje jeho použití při screeningu (Duffy, 2014, Locker, 2006).

U stádia I prakticky není detekovatelný, ve stádiu II a III může indikovat agresivnější tumor. Po radikální operaci se vrací k normálním hodnotám po 4-6 týdnech, tedy při postupném zvyšování hladiny můžeme mít podezření na recidivu onemocnění (Chen, 2005, Weissenberger, 2005). Zvyšování hladiny CEA u diseminového onemocnění je asociováno s progresí onemocnění, které nemusí být viditelné na zobrazovacích metodách. Chemoterapie může přechodně hladiny CEA zvyšovat (Duffy, 2014, Locker 2006). V rámci dispenzarizace je doporučeno stanovení hladiny každé tři měsíce první tři roky po operaci, dále jedenkrát za šest měsíců a následně každé dva až tři roky (Diehl, 2008). V žádné studii nebylo potvrzeno, že by hladina CEA ve stadiu II měla identifikovat rizikové pacienty, kteří by měli podstoupit chemoterapii (Thirunavukarasu, 2011).

8.2.2. Nádorový antigen CA 19-9

Dalším onkomarkerem, který se standardně stanovuje u kolorektálního karcinomu je nádorový antigen CA 19-9. Není specifický pouze pro CRC, ale jeho zvýšená hladina může být nalezena u většiny gastrointestinálních tumorů. Nevyšší specifitu a senzitivitu pak vykazuje u karcinomu pankreatu. Ve studiích je uváděno, že u CRC má nižší citlivost a jeho zvýšené hladiny jsou spojeny se špatnou prognózou (Labianca, 2010, Locker, 2006, Nicolini, 2010).

8.2.3. Méně známé onkomarkery

Další onkomarkery zkoumané k detekci kolorektálního karcinomu jsou např. CYFRA 21-1, CA 242 a CA 72-4, které se stanovují pouze v kombinaci s CEA a CA 19-9. Samotné zatím nemají žádné relevantní využití u CRC. CYFRA 21-1 je nyní nejvíce spojována s nemalobuněčným plicním karcinomem, CA 242 je intenzivně zkoumána v souvislosti s karcinomem pankreatu a CA 72-4 vykazuje vyšší specifitu pro karcinom žaludku a hlavně pro ovariální karcinom (Levý, 2008, Nicolini, 2010).

Onkomarker, který se ve fázi výzkumu zdá být nadějný, je nádorově specifická M2 izoforma pyruvátkinázy (M2-PK), která se stanovuje ze stolice. Vykazuje až 91% senzitivitu u kolorektální karcinomu, u adenomů je skoro vždy negativní (Koss, 2008).

Další zkoumané onkomarkery jsou tkáňový inhibitor matrix metaloproteinázy1 (TIMP1) ze stolice, tkáňový polypeptidový antigen (TPA) a tkáňový polypeptid-specifický antigen (TPS) a další, které zatím nevykazují vyšší specifitu ani senzitivitu než CEA (Holdenrieder, 2012, Levý, 2008).

9. Prognostické markery CRC

Prognózu pacientů s kolorektálním karcinomem ovlivňuje mnoho faktorů. Mezi nevýznamnější samozřejmě patří pokročilost primárního onemocnění a reziduální nemoc po operaci – mikrometastázy. Mezi další již všeobecně známé prognostické faktory, které jsou spojeny s horší prognózou onemocnění, se řadí obstrukce či perforace tumoru (všeobecně – akutní stavy), dále perineurální, cévní či lymfatická invaze. Agresivnější forma onemocnění je spojena s mladším věkem pacientů, ženským pohlavím, i genetickými abnormalitami tumoru (Skibber, 2001).

9.1. TNM klasifikace

V praxi se pro hodnocení prognózy onemocnění a tím i potřebu následné systémové léčby používá TNM klasifikace. Výjimečně i kolorektální karcinom ve stadiu I je schopný vytvořit vzdálené metastázy. Zde nám nastává další možnost intenzivního výzkumu. Aktivně vyhledávat další rizikové faktory, které by TMN klasifikaci doplnily, případně zpřesnily a tím určily přesnější prognózu onemocnění. V ideálním případě by měly být terapeuticky ovlivnitelné (Benson, 2022).

9.2. Prognostické markery molekulární a genetické

V poslední době je výzkum zaměřen na molekulární a genetické prognostické markery, jako je stav mikrosatelitové nestability (MSI-H) nebo deficit opravy chybného párování (dMMR), mutace genů *KRAS* nebo *BRAF*. Tento výzkum nabývá na významu při stanovení prognózy časného i pokročilého CRC (Clinton, 2022, Wieduwilt, 2008).

9.2.1. Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR)

Mezi další markery již známé, které nám předpovídají horší prognózu se řadí například receptor epidermálního růstového faktoru, který je právě často exprimován u pacientů s kolorektálním karcinomem, ale také u jiných typů karcinomů (prs, ovaria a jiné). Je spojen s horší prognózou a přežíváním pacientů, i s horší odpovědí na systémovou léčbu (Wee, 2017). Epidermální růstový faktor objevil v roce 1986 Stanley Cohen (**Obrázek č. 12.**), který za tento objev obdržel Nobelovu cenu za medicínu.

Je to transmembránový glykoprotein složený z intracelulární tyrosin-kinázové domény, transmembránového lipofilního segmentu a extracelulární vazebné domény, jejíž hlavními ligandy jsou epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor-alfa ($TGF\alpha$). Tento receptor přes své signalizační dráhy ovlivňuje proliferaci buněk (RAS-RAF-MAPK) i přežívání buněk (JAK-STAT3 nebo PI3K-AKT) (Bogdan, 2001).

EGFR je členem rodiny receptorů ErbB (erythroblastic leukemia viral oncogene), která je tvořena celkem čtyřmi členy úzce příbuzných receptorových tyrosinkináz: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2/neu (HER2), ErbB3 (HER3) a ErbB4 (HER4) (Baselga, 2002, Roth, 2009). Právě EGFR je vhodný k cílené terapii u nádorů, které tento receptor exprimují (Kawamoto, 1983).



Obrázek č. 12. Stanley Cohen obdržel Nobelovu cenu za medicínu v roce 1986 objev EGFR, převzato z <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1986/cohen//> (Nobelprize, 2022).

9.2.2. Mutace genu *KRAS*

Mutace genu *KRAS* se vyskytuje u 35-45 % pacientů s CRC (Markowitz, 2009). Její přítomnost predikuje špatnou odpověď na léčbu anti-EGFR protilátkami cetuximab a panitumumab, protože se jedná o aktivační mutaci, která je lokalizovaná downstream od vlastního receptoru EGFR (De Roock, 2010).

9.2.3. Mutace genu *BRAF*

Další mutace genu *BRAF* se vyskytuje v menší míře než u genu *KRAS*. Dle dostupné literatury se udává přibližně u 5-20 % CRC. Častěji se zde vyskytují špatně diferencované varianty CRC, výskyt je častější u žen a v pravé polovině tračníku. Tato mutace opět činí nádor odolnější vůči monoklonálním protilátkám a zhoršuje prognózu pacientů (Roth, 2010).

9.2.4. Fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K)

PI3K podporuje buněčnou proliferaci. Nádory s touto mutací mají obecně horší odpověď na cílenou terapii EGFR a horší prognózu (Grandy, 2014).

9.2.5. Mutace genu *TP53*

Tato mutace se vyskytuje u 50-70 % všech kolorektálních karcinomů a je spojena s horšími výsledky léčby. Mutace genu *TP53* se nachází u karcinomů, které vykazují kratší dobu do relapsu onemocnění, ale i celkovou dobu přežití (Tejpar, 2010).

9.2.6. Ztráta heterozygosity chromozomu 18q.

Dle dostupných studií převažuje názor, že delece chromozomu 18q je spojená s horší prognózou pacientů (Popat, 2005), i když některé studie naopak toto tvrzení vyvracejí (Popat, 2007). Ohledně výběru vhodné systémové terapie doposud neexistují relevantní data (Wanatabe, 2001).

9.2.7. Mikrosatelitní instabilita (MSI)

Mikrosatelity jsou krátké nekódující repetitivní sekvence v DNA, které jsou díky svému charakteru náchylnější ke vzniku chyb při replikaci DNA. Tyto chyby jsou důsledkem přidání nebo ztráty repetitivní sekvence a projevují se změnou délky mikrosatelitu, která je snadno detekovatelná.

Sekvence jsou opravovány systémy DNA oprav, především systémem pro opravu chybného párování (MMR). Při mutacích v genech tohoto systému jsou mutace v mikrosatelitech častější a délka mikrosatelitů tím pádem různorodější, což je podstatou jevu nazývaném mikrosatelitová instabilita (Baba, 2009). Nádorové buňky bez MSI jsou označovány jako mikrosatelitově stabilní (MSS). Mikrosatelitní instabilita může být vysoká – MSI-H nebo nízká MSI-L, podle počtu lokusů. MSI-H značí lepší prognózu, než MSI-L nebo MSS (Popat, 2005) MSI – H vykazuje rezistenci vůči adjuvantní léčbě 5-FU (Meyers, 2001).

10. Vznik a šíření kolorektálního karcinomu

V literatuře je uváděno, že 80-84 % karcinomů je sporadických a 16-20 % je hereditárních, tedy geneticky vázaných (Valle, 2019).

10.1. Hereditárně vázané syndromy

Geneticky vázané kolorektální karcinomy představují celou skupinu onemocnění. Vyskytují se častěji u nemocných před 50 rokem života s rodinnou anamnézou CRC a mohou být asociovány s jinými nádorovými onemocněními (Sung, 2019, Valle, 2019).

Dělí se dle přítomnosti polypů na hereditární polypózní kolorektální karcinom (HPCC) a hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) (Hampel, 2018).

10.1.1. Hereditární polypózní kolorektální karcinomy (HPCC)

HPCC představují asi 3-5 % ze všech CRC. Dělí se na adematózní a hamartózní formu. K onemocněním HPCC se řadí familiární adematózní polypóza (FAP) způsobená mutací genu *APC*, který je zodpovědný za buněčnou proliferaci. Jedná se o nejčastější syndrom z HPCC. Je charakteristický nálezem stovek až tisíců polypů s tendencí k malignizaci. Časté je i mimostřevní postižení s výskytem cyst, karcinomů GIT, ale i například CNS (Karetnsen, 2019). Mezi další onemocnění patří Turcotův syndrom II. typu (Buecher, 2016), Gardnerův syndrom (Charifa, 2022), adematózní polypózní syndrom (Sutcliffe, 2019), juvenilní polypóza střeva (Beosens, 2011), *PTEN* hamartogenní tumorózní syndrom způsobený mutací genu *PTEN* (Eissing, 2019), Peutz – Jeghersův syndrom (Sengupta, 2019) a Cowdenův syndrom (Pilarski, 2009).

10.1.2. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinomy (HNPCC)

HNPCC jsou autozomálně dominantně dědičná onemocnění a představují asi 1,7-4,2 % ze všech CRC (Lee, 2017). Mezi onemocnění HNPPC se řadí Lynchův syndrom. Lynchův syndrom je nejčastější hereditárně vázaný CRC. Jak bude zmíněno dále, je způsoben mutací genů zahrnutých do mismatch DNA opravy (MMR). Charakteristickým rysem jsou ploché léze lokalizované v pravém tračníku. Je spojen i dalšími typy malignit například slinivky, urotraktu, endometria a další (Porka, 2019). K těmto onemocněním spadá i Turcotův syndrom typu I. (Hu, 2018), Muir – Torreův syndrom (Schierbeck, 2019) a kolorektální karcinomy s deficitem MLH1-/PMS2 (Tarancón, 2020).

10.2. Sporadický CRC

10.2.1. Vznik CRC

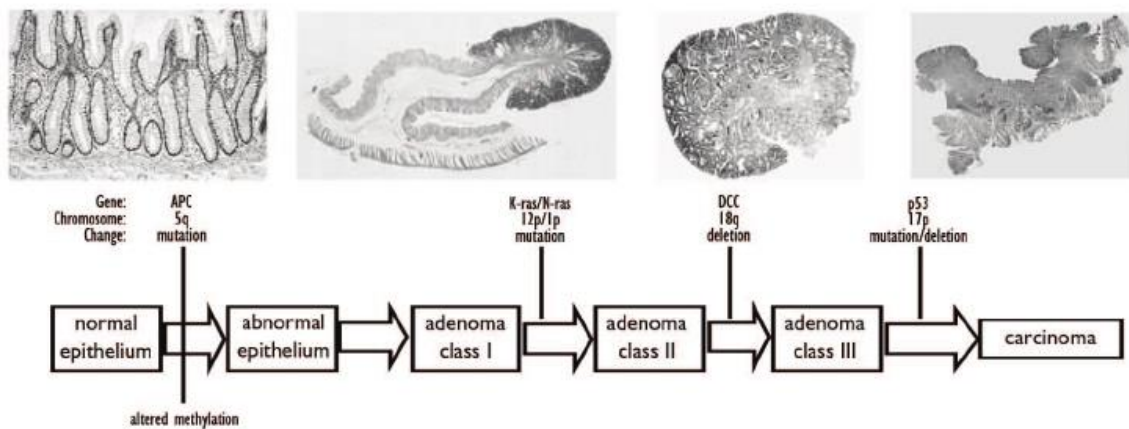
CRC obvykle začíná nerakovinnou proliferací slizničních epiteliálních buněk. Tyto výrůstky jsou známé jako polypy a mohou postupně růst po dobu 10–20 let, než se stanou maligními. Střevní buňky mají významnou plasticitu. Obnova střevního epitelu probíhá každých 4-5 dní. Za tuto obnovu mohou střevní kmenové buňky, které jsou dlouhověké a sídlí na dně krypt. Z toho důvodu se předpokládalo, že by právě tyto buňky mohly být klíčové při procesu karcinogeneze u tumorů střeva. Další výzkumy ale potvrdily, že i ostatní buňky se mohou dediferencovat do buněk podobných kmenovým buňkám a stát se tak dlouhověkými. Z toho důvodu stále není jasné, které buňky se přesně podílejí na vzniku kolorektálního karcinomu (Huels, 2015). Nejběžnější formou je adenom nebo polyp, který vznikl z granulárních buněk, jejichž funkcí je produkce hlenu, který vystýlá tlusté střevo (Sryker, 1987). Pouze asi 10 % všech adenomů progreduje do invazivního tumoru, i když riziko malignity se zvyšuje tím, jak se polyp zvětšuje. Invazivní karcinom vznikající z takových polypů je známý jako adenokarcinom a tvoří 96 % všech kolorektálních karcinomů (Stewart, 2006).

10.2.2. Signalizační dráhy vzniku CRC

V etiologii CRC je pozorován výskyt mutací v rámci tří hlavních rozdílných genových tříd. Jedná se o onkogeny, tumorsupresorové geny a geny účastníci se oprav DNA (Calvert, 2002). Vývoj kolorektálního karcinomu může probíhat v rámci tří hlavních signalizačních drah – dráha chromozomální nestability (CIN), MSI dráha a CIMP.

Signalizační dráhy jsou dostatečně odlišné, aby byly koncepčně platné, ale také se významně překrývají (Snover, 2011).

Dnes již klasická dráha chromozomální instability je založena na publikaci Volgesteina z roku 1990. **(Obrázek č. 13.)** Vogelsteinův model vícečetné kolorektální neoplazie je označován jako adenoma–carcinoma sequence. Tato práce uvádí, že akumulací a hromaděním genetických změn dochází k narušení proliferace, diferenciaci a apoptózy buněk intestinálního epitelu (Fearon, 1990). Výsledkem je transformace střevní sliznice na adenomatózní polypy až do stádia invazivního karcinomu. Jedná se tedy o následek akumulace epigenetických a genetických změn (Al-Sohaily, 2012).



Obrázek č. 13. Vogelsteinův model vícečetné kolorektální neoplazie (označované jako adenoma–carcinoma sequence), převzato z Promoter Methylation Precedes Chromosomal Alterations in Colorectal Cancer Development (Derks, 2016).

Nejčastější genetické změny, které obsahuje CRC, jsou aktivace mutací protoonkogenu *KRAS*, která se vyskytuje až u 40 % CRC (Neumann, 2009, Sansom, 2013), inaktivace mutací tumorsupresorových genů *APC* (adenomatosis polyposis coli) vyskytující se až u 70 % CRC a *TP53* nebo DNA repair genů (především mismatch repair genů), které umožňují buňce opravovat chyby DNA (Bandrés, 2006). Vědecké studie uvádí, že mezi klíčové geny, u nichž důsledky mutací způsobují ztrátu heterozygostnosti, patří kromě již zmíněných *KRAS*, *TP53*, také *APC* a *DCC* (Chung, 2004).

Dráha MSI spojená s nedostatečnou opravou mismatch repair genů byla objevena prostřednictvím genových mutací odpovědných za Lynchův syndrom a je charakterizována výskytem mutací genů MMR, také častou mutací proto-onkogenu *BRAF V600E*, kódující serin/threonin kinázu (Porkka, 2019).

Za vznik serátních (pilovitých adenomů) je zodpovědná třetí dráha vzniku CRC, která je způsobená hypermetylací CpG ostrůvků mutátorových genů a to v jejich regulačních oblastech tzv. fenotyp CIMP (CpG Island Methylator Phenotype). Tato dráha silně souvisí s dráhou MSI, označovanou také jako microsatellite mutator phenotype (MMP) (Jass, 2007).

10.3. Šíření kolorektální karcinomu

CRC se šíří buď přímým prorůstáním do okolí s vaskulární, lymfatickou a perineurální invazí, nebo metastazováním. Nejčastější lokalizace vzdálených metastáz u CRC jsou játra a plíce. Dále může tvořit i implantační metastázy na peritoneu (Ferley, 2010). Levostranné karcinomy častěji metastazují do jater, pravostranné karcinomy více tvoří metastázy na peritoneu, rektum má vyšší riziko metastazování do plic a častěji tvoří lokální recidivy (Augestad, 2015, De Rock, 2010). U 20 % pacientů jsou při stanovení základní diagnózy již přítomny synchronní metastázy a až u 60 % karcinomů se objeví metachronní metastázy do 5 let (Cook, 1988, Desch, 2005). Solitární metastázy CRC do jater a plic mohou být teoreticky kurabilním onemocněním, na rozdíl od diseminace po peritoneu, která je považována za pokročilé onemocnění s minimální šancí na kompletní vyléčení (Thomassen, 2013).

11. Dělení kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom vykazuje různé molekulární a patologické charakteristiky v závislosti na lokalizaci nádoru. Vzhledem k rozdílným epidemiologickým a histologickým vlastnostem kolorektálního karcinomu se nejčastěji dělí dle lokalizace na pravý a levý nebo také na proximální a distální (Meguid, 2008). Kompletně zvlášť je pak vymezeno rektum (Benedix, 2010). Jako hranice mezi pravým a levým tračníkem je nejčastěji považováno lienální ohbí (Iacopetta, 2002).

I ve zdravém střevě existují rozdíly mezi pravým a levým tračníkem. Pocházejí z jiného embryonálního základu (většina pravostranného tračníku pochází ze středního střeva, ale distální tračník je ze zadního střeva) (Schoenwolf, 2015).

Mezi pravostranným a levostranným CRC jsou rozdíly i na úrovni genové exprese. Rozdíly existují v četnosti mutací v klíčových onkogenech a tumor supresorových genech viz dále (Munzy, 2012). Mikrobiom tlustého střeva je relativně stacionární. Avšak existuje rozdíl ve složení mikrobiologické flóry mezi pravým a levým tračníkem pacientů, u kterých se vyvinul kolorektální karcinom (Johnson, 2015, Lepage, 2005). Vykazují i rozdíly ve složení žlučových kyselin (Flemer, 2017, Missiaglia, 2001).

11.1. Pravostranné karcinomy

Pravostranné karcinomy se vyskytují častěji u žen ve vyšším věku. Převažuje jejich histologická mucinózní povaha, obsahují buňky pečetního prstu a častěji se vyskytují dediferencované varianty (Benedix, 2010, Gonzeles, 2001, Missiaglia, 2014). Jak již bylo zmíněno, adenomy pravého tračníku jsou obvykle přisedlé a mají vyšší riziko zvratu do maligního karcinomu i při menší velikosti (Gupta, 2012). U pravostranného karcinomu tlustého střeva je často pozorována vysoká mikrosatelitní nestabilita (MSI), fenotyp CIMP-high (Missiaglia, 2014) a mutace genu *BRAF V600E*, která je spojena s významně horší prognózou (Gonsalves, 2014). Nádory s vysokou MSI jsou spíše pravostranné, naopak nádory s chromozomální nestabilitou jsou spíše levostranné (Dahlin, 2010). Prognóza pacientů ve stádiích III a IV s pravostranným karcinomem je horší ve srovnání s levostrannými karcinomy i při absolvování systémové léčby (Schrang, 2016).

U dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu se pravděpodobněji vyvinou nádory na pravé straně tlustého střeva (Lynch, 1988). Pravostranné karcinomy častěji tvoří implantační metastázy po peritoneu (Iacopetta, 2002).

Mají i odlišné vnitřní prostředí střeva. Liší se v rozdílných hladinách žlučových kyselin, kde v pravém tračníku je desetkrát vyšší koncentrace žlučových kyselin než v levém. Vyšší hladiny žlučových kyselin a jejich metabolity jsou nacházeny ve vyšší míře ve stolici pacientů s kolorektálním karcinomem (Hill, 1982). Z těchto zjištění a z několika studií vyplývá, že by se mohly nějakým způsobem podílet na karcinogenezi. Nejspíše způsobují poškození DNA tvorbou reaktivních forem dusíku a kyslíku (Venturi, 1997). U pacientů, u kterých se vyvinul pravostranný kolorektální karcinom, existují značné rozdíly ve složení mikrobiomu (Lepage, 2005).

Je zde častěji přítomen bakteriální biofilm, který je suspektní, že reaguje s epitelem tračnicku a tím přispívá k proliferaci buněk, tedy ke karcinogenezi (Johnson, 2015).

11.2. Levostranné karcinomy

Chromozomální nestabilita, která je spojena s 60-70 % kolorektálního karcinomu, je častěji pozorována u levostranného karcinomu tlustého střeva. Je spojována s mutacemi genů *APC*, *KRAS* a *TP53* (Ben, 2011, Gonzalez, 2001, Markowitz, 2009, Schell, 2016). Dále jsou levostranné kolorektální karcinomy charakteristické častějším výskytem amplifikace receptorových kináz, jako je EGFR a ERBB3 (Gupta, 2012). Levostranné karcinomy častěji metastazují do plic (Iacopetta, 2002).

11.3. Dělení kolorektálního karcinomu na základě genové exprese

Již delší dobu se různé organizace snažily rozdělit kolorektální karcinom na základě genové exprese. Vzniklo tak několik schémat, které obsahovaly mezi třemi až šesti subtypy, ale nebyly jednotné. Z toho důvodu mezinárodní Colorectal Cancer Subtyping Consortium rozdělovalo kolorektální karcinom na základě genové exprese do 4 konsenzuálních molekulárních subtypů (CMS). Liší se dle svých rozdílných biologických vlastností, které vedou k aktivaci rozdílných biologických drah, mutací, ale i prognózy (Guinney, 2015).

12. Klinické příznaky kolorektálního karcinomu

Tumory pravé poloviny tračnicku zůstávají dlouho bezpříznakové. Nejčastější příznak je intermitentní krvácení z konečnicku a následná anemizace v krevním obraze díky dlouhodobým krevním ztrátám. Perforací či obstrukcí se projevují až pokročilé karcinomy, často již ve stádiu generalizovaného onemocnění.

Karcinomy levé poloviny tračnicku se projevují vyšší plynatostí, změnou vyprazdňovacího režimu – střídáním zácpy a průjmů. Tumory se méně často projevují krvácením z konečnicku. Prvním příznakem může být obstrukční ileus.

Karcinomy rekta se projevují krvácením z konečnicku, změnou vyprazdňování a tenesmy. Úbytek váhy, zhoršení chuti k jídlu a hmatná rezistence v dutině břišní jsou považovány za pozdní příznaky (Zeman, 2014).

13. Léčba kolorektálního karcinomu

O léčbě kolorektálního karcinomu by měl rozhodnout multidisciplinární tým. Léčba maligního tumoru na volném tračnίκu a rektu je v mnoha faktorech shodná, avšak obsahuje i určité odlišnosti.

13.1. Léčba endoskopická

13.1.1. Kolon

Léčbou maligního tumoru tračnίκu ještě ve stadiu prekancerózy – polypu může být pouze endoskopické snesení při koloskopii. Endoskopické odstranění je také možné ve stadiu časného karcinomu, kde je histologicky jasné, že tumor byl kompletně odstraněn bez invaze do spodiny (Kukuchi, 1995).

13.1.2. Rektum

U karcinomu středního a dolního rekta je postup v terapii odlišný. Transanální endoskopická mikrochirurgie (TEM) je metodou volby u polypu či Tis a T1 karcinomů, který nezasahuje do spodiny resekce. Případná invaze spodiny po TEM je potvrzena definitivním histologickým vyšetřením. Předpokládaný rozsah invaze tumoru, který rozhodne o terapeutickém postupu, je určován pomocí zobrazovacích metod, a to nejčastěji MRI nebo endosonografickým vyšetřením. ERUS je v časných stádiích CRC přesnější (Sgourakis, 2011).

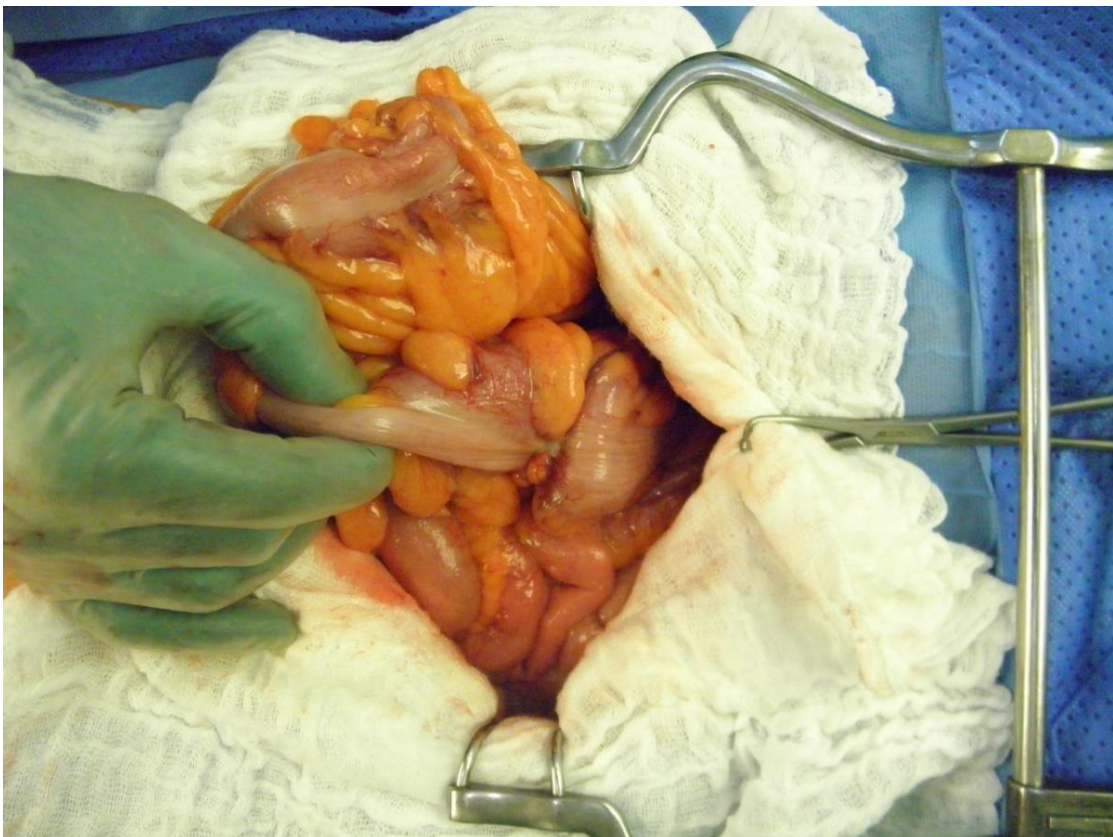
13.2. Léčba chirurgická

Základní léčebnou modalitou u kolorektálního karcinomu stále zůstává léčba chirurgická. Klasická otevřená operace, laparoskopická resekce či robotický výkon jsou brány jako ekvivalentní. Měly by být vždy prováděny zkušeným operátorem s ohledem na celkový stav pacienta, jeho komorbidity i preference, nejlépe v onkochirurgických centrech (Benson, 2022).

13.2.1. Kolon

Resekce střeva by měla být provedena radikálně, to znamená za cílem dosažení R0 resekce v dostatečném rozsahu do zdravé tkáně i se spádovou lymfadenektomií. (**Obrázek č. 14. a č. 15.**) V případě invaze kolorektálního karcinomu do okolních orgánů a pokud je nález chirurgicky řešitelný, měla by být resekce provedena en bloc do histologicky zdravé okolní tkáně. Při suspekci na ponechání mikroskopického rezidua tumoru je výkon hodnocen, jako R1 resekce. Když je ponecháno pozitivní reziduum tumoru nebo makroskopicky jasná pozitivní uzlina je výkon považován za R2 resekci (Benson, 2022, Glyne-Jones, 2017, Schmoll, 2012).

Při operačním výkonu by mělo být odstraněno minimálně 12 lymfatických uzlin ke stanovení N klasifikace (stupeň postižení lymfatických uzlin). Po resekčním výkonu dle definitivní histologie následuje adjuvantní chemoterapie. U inoperabilního onemocnění se léčba zahajuje pomocí chemoterapie, která může vést k regresi nálezu a změně z inoperabilní nálezu na nález operabilní (Schmoll, 2012).



Obrázek č. 14. Stenozující CRC sigmatu (archiv autora).



Obrázek č. 15. Stenozující CRC sigmatu na rozstřiženém preparátu (archiv autora).

13.2.2 Rektum

U stádia T2N0M0 se provádí primárně resekční výkon, u pokročilejších nálezů je před operačním výkonem předřazena neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapie (Benson, 2022, Schmoll, 2012). Zásadní při resekčním výkonu na rektu se ukázala být totální mezorektální excize (TME) (Heald, 1992). **(Obrázek č. 16.)**

Je-li karcinom rekta nízko uložený, může být svěrač zachován, pokud zbývá minimálně 1 cm zdravé tkáně pod tumorem (Benson, 2022).



Obrázek č. 16. CRC na rozstřiženém preparátu po amputaci rekta (archiv autora).

13.2.3. Chirurgická léčba metastatického onemocnění

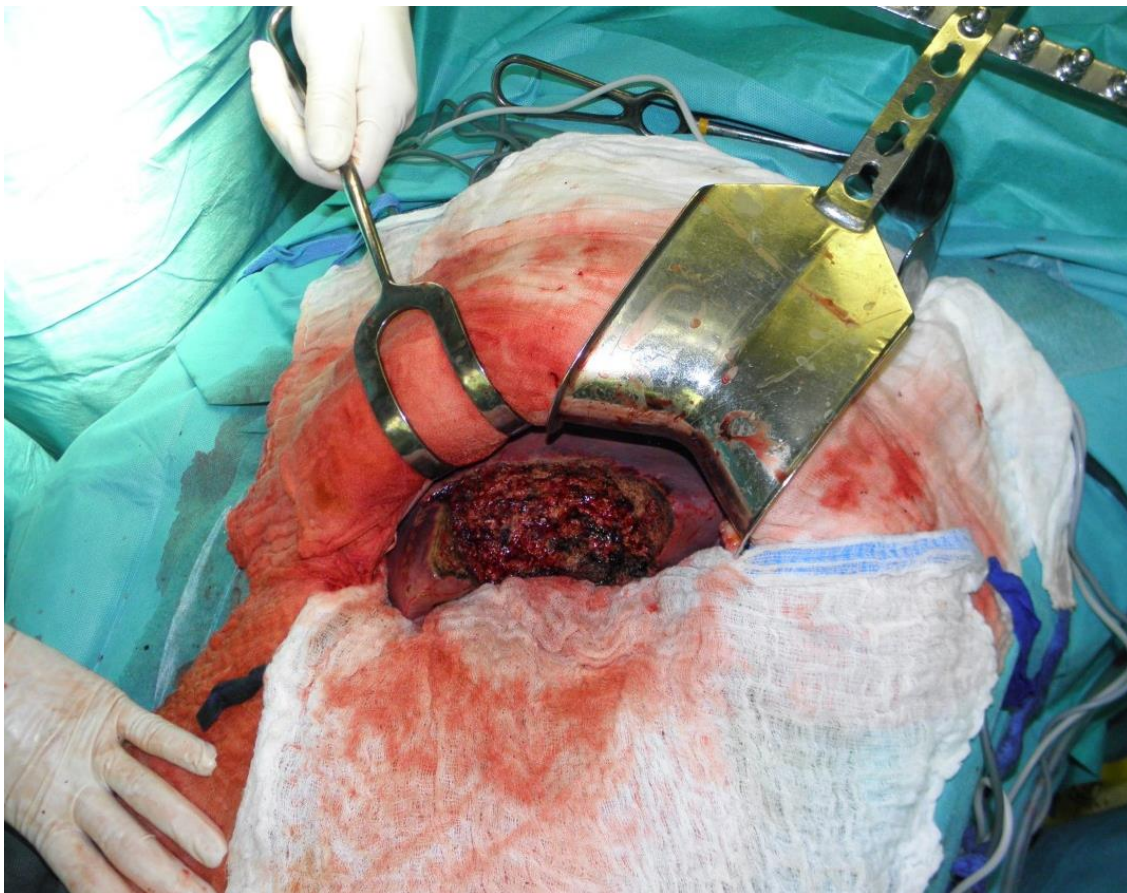
U metastatického onemocnění musí být zvažováno, zdali jsou metastázy resekovatelné. Pokud je možnost provést resekci primárního tumoru i metastáz a je pacient z interního hlediska schopen takového rozsáhlého operačního výkonu, může být proveden výkon v jedné době. V ostatních případech je potřeba volit, kde je vyšší riziko progresu onemocnění. Ve většině případů je provedena resekce primárního tumoru, poté se pokračuje systémovou léčbou a následuje resekční výkon na játrech.

V určitých případech, kde převažuje riziko progresu metastatického onemocnění jater, které by se stalo inoperabilním, může být zvolen postup „liver first“, kdy je primárním výkonem resekční výkon na játrech, před resekcí střeva. Systémová léčba může být vmezeřena mezi oba resekční výkony, nebo následuje až po obou operačních výkonech

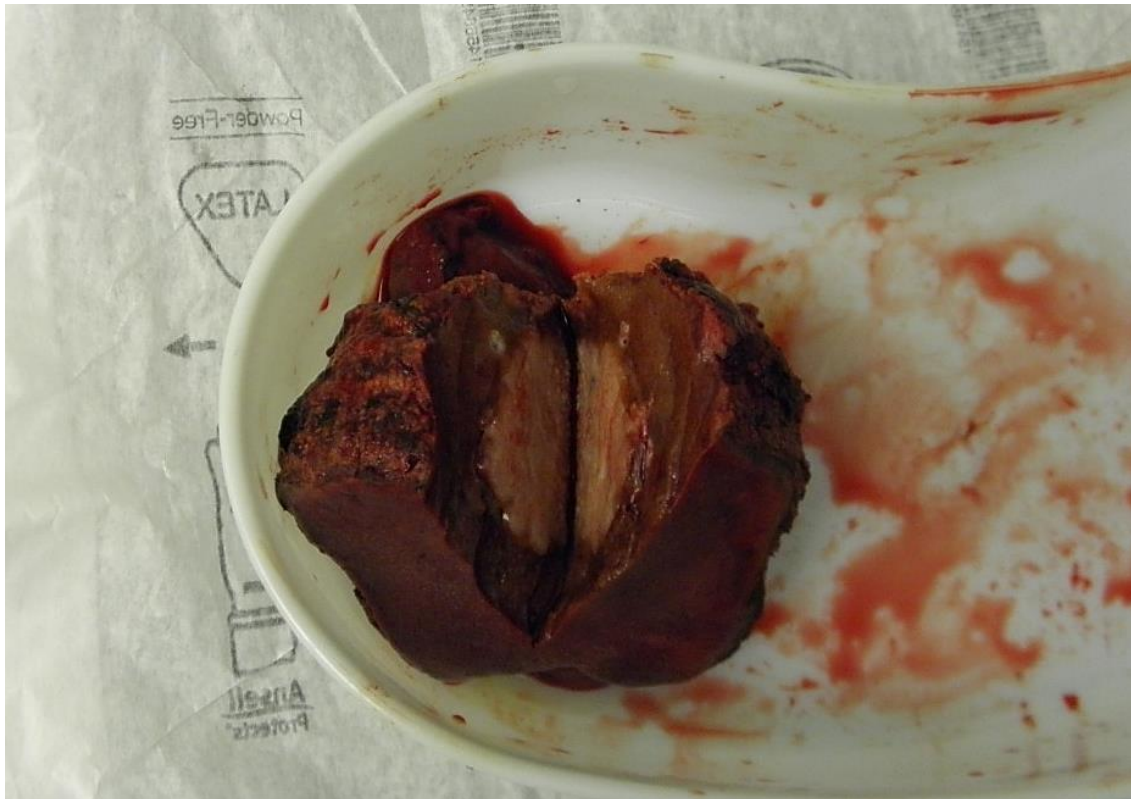
(Benson, 2022, Schmoll, 2012, Glyne–Jones, 2017). Zvolený postup, by měl být rozhodnutím multidisciplinárního týmu s ohledem na největší benefit pro pacienta.

Při léčbě jaterních metastáz jsou nejčastěji prováděny neanatomické resekce, aby bylo zachováno co nejvíce jaterní tkáně. Za dostatečný resekční okraj je považováno 5 mm zdravé tkáně. **(Obrázek č. 17. a č. 18.)** Pokud metastázy nejsou primárně resekabilní, měl by operačnímu výkonu předcházet pokus o konverzní terapii za pomoci chemoterapie, která má za cíl dosáhnout resekability metastáz. Průběh terapie by měl být sledován pomocí zobrazovacích metod ještě před kompletní remisí. Je vhodné vmezeřit chirurgický resekční výkon před úplným vymizením metastáz (Benoist, 2006). Léčba plicních metastáz by měla být obdobná, jako u metastáz jaterních (Inoue, 2004).

Radikální resekce metastáz jater a plic je považována za léčbu s kurabilním potenciálem. V kontrolovaných studiích je popisováno pětileté přežití 20-45 % u jaterních metastáz (Adam, 2011, Choti, 2002). U plicních metastáz je pětileté přežití uváděno poněkud nižší a to 25-35 % (Inoue, 2004).



Obrázek č. 17. Neanatomická resekce jater pro metastázu CRC (archiv autora).



Obrázek č. 18. Resekát metastázy CRC (archiv autora).

13.3. Nechirurgická léčba jaterních metastáz

Metastázy, které nejsou radikálně odstranitelné chirurgicky, mohou být destruovány pomocí ablačních metod. Mezi často využívané patří radiofrekvenční ablace (RFA), kryoablace, mikrovlnná ablace (MWA), stereotaktická radioterapie (SBRT) a další. Při odstranění metastáz výše uvedenými metodami zůstávají po roce sledování pacienti bez recidivy onemocnění v 56-100 % (Sterzing, 2014).

13.4. Radioterapie

Radioterapie u kolorektálního karcinomu je vymezena pouze pro rektum a byla zavedena do léčby karcinomu rekta postupně na konci 80 let minulého století. Swedish Rectal Cancer Trial byla první randomizovaná studie, která přinášela důkazy o tom, že radioterapie je účinná přídatná léčebná metoda při léčbě kolorektálního karcinomu (Folkesson, 2005).

13.4.1. Režimy radioterapie

V současnosti se používají dva základní režimy. Při standardní radioterapii je celková aplikovaná dávka 45-50,4 Gy v 25-28 frakcích, a pokud nejsou kontraindikace, kombinuje se konkomitantně s chemoterapií kapecitabinem. U krátkého režimu (SCRT) se aplikuje celkem 25 Gy v 5 frakcích během jednoho týdne a často se kombinuje s kombinovanou chemoterapií aplikovanou sekvenčně. Po 4 až 8-týdenní pauze následuje chirurgický zákrok. Po SC-RT může následovat operační výkon ihned – do deseti dnů od zahájení radioterapie. Neoadjuvatní chemoradioterapie v kombinaci s TME významně snižuje riziko lokální recidivy u CRC rekta a zvyšuje celkové přežití pacientů (Quirke, 2009, Van Gijn, 2011).

13.5. Chemoterapie

Chemoterapie je indikovaná u většiny pokročilejších stádií CRC, a to buď v indikaci adjuvantní (u lokálně pokročilých nádorů, jako doplnění radikální chirurgické léčby) nebo paliativní (u metastazujících nádorů).

Chemoterapeutické režimy u kolorektálního karcinomu jsou stále založené na 5-fluorouracilu (5-FU), který je podáván v kontinuální infuzi. Jako náhrada může být použit kapecitabin. Účinnost se zdá být ekvivalentní (Hofheinz, 2012). Kombinuje se s oxalplatinou nebo irinotekanem, případně s oběma. Kombinované režimy jsou účinnější, ale také toxičtější (Kiss, 2022, Vodenková, 2020).

13.5.1. Indikační faktory chemoterapie

U karcinomu rekta bylo prokázáno, že neoadjuvatní chemoradioterapie následovaná adjuvatní chemoterapií po operaci, má nižší toxicitu, vyšší procento výkonů svěrač zachovávajících a v neposlední řadě nižší riziko recidivy onemocnění oproti samotné adjuvantní chemoterapii (Sauer, 2004, Vodenková, 2020). Samotná adjuvantní terapie by měla být podána pouze pacientům, kteří z nějakého důvodu neabsolvovali neoadjuvantní léčbu a mají rizikové faktory pro recidivu onemocnění. U karcinomu volného střeva se užívá hlavně adjuvantní chemoterapie, a to v případech s vysokým rizikem recidivy onemocnění. Rozhodující rizikové faktory jsou staging tumoru T3 a výše, pozitivní lymfatické uzliny, perforace tumoru nebo pozitivní resekcční okraj karcinomu, nepříznivá histologie, přítomnost hlenotvorby apod. Neoadjuvatní chemoterapie je vymezena

pro lokálně inoperabilní nebo oligometastatické onemocnění a jejím cílem je regrese nálezu s následnou operací. Bohužel tato léčba často přechází v léčbu paliativní (Kim, 2011, Kiss, 2022, Kook, 1991).

13.5.2. Doba podávání chemoterapie

Celková doba chemoterapie by měla být 5,5 až 6 měsíců, Pokud byla podávána neoadjuvantní terapie, adjuvantní léčba by měla trvat pouze 4 až 4,5 měsíců (Andre, 2003, Kiss, 2022).

Adjuvantní chemoterapie by měla být podána nejdříve tři týdny po operaci, ale nejpozději 8 až 12 týdnů po operaci. V pozdější době se musí zvážit přínos a účinnost oproti toxicitě (Biagi, 2011, Kiss, 2022).

13.5.3. Chemoterapeutické režimy

U pokročilého karcinomu kolon jsou užívány léčebné režimy v kombinaci 5-fluorouracil/leukovorin, kapecitabin či irinotekan v monoterapi, nebo kombinace 5FU/LV s oxaliplatinou, irinotekanem nebo s oběma. Další možné režimy jsou FU/FA (5-fluorouracil + leukovorin), FOLFOX (5-fluorouracil, oxaliplatin, leukovorin), CAPOX (kapecitabin, oxaliplatin), FOLFIRI (5-fluorouracil, irinotekan, leukovorin), XELIRI (kapecitabin, irinotekan), FOLFIRINOX/FOLFOXIRI (5-fluorouracil, leukovorin, oxaliplatin, irinotekan) (Benson, 2022, Kiss, 2022).

Nejčastěji jsou užívány režimy FOLFOX a FOLFIRI, které prodlužují medián přežití až o 20 měsíců, vykazují i takovou regresi onemocnění, že umožňuje operační řešení. V odborných textech se objevují informace i o kompletních remisích (Tournigand, 2004).

13.6. Biologická léčba

U nádorových onemocnění byly identifikovány specifické molekuly, na které se váže a přímo působí takzvaná biologická nebo také cílená léčba. Jedná se tedy o léčbu, která je specificky cílená na místo, které se podílí na procesu karcinogeneze. Využívá se u metastatického či lokálně inoperabilního onemocnění, kdy základem systémové léčby stále zůstává chemoterapie a k ní je do kombinace, přidána cílená léčba. Výběr systémové léčby závisí na genetických vlastnostech tumoru, prediktivních a prognostických faktorech i na komorbiditách pacienta. Zhodnocení terapie by mělo být provedeno

po 2 až 3 měsících. Již užívaná léčiva jsou bevacizumab, aflibercept, ramucirumab, které mají cílové místo na receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Další možnosti jsou cetuximab a panitumumab, které mají cílové vazebné místo na receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), enkorafenib v kombinaci s cetuximabem u mutací *BRAF*. Nově se začíná uplatňovat i imunoterapie u MSI nádorů - pembrolizumab nebo kombinace nivolumab a ipilimumab (Kiss, 2022).

14. Mucin

Muciny jsou glykoproteiny, komplexy buněčného povrchu, vylučovány buňkami epitelu. Funkce mucinu je chránit a zvlhčovat povrch tkání sliznic či epitelů. Jsou to proteiny s vysokým podílem prolinů, threoninů a serinů, tvoří dohromady PTS doménu, která je glykosylována. Rodina lidského mucinu (MUC) se skládá z mnoha členů označovaných jako MUC1 až MUC21. Tvoří fyzikální bariéru a poskytují ochranu epiteliálním buňkám. Vyskytují se v gastrointestinálním a dýchacím traktu, ale i uvnitř orgánů, jako je prs, pankreas, játra a jiné (Kufe, 2009).

Nádory secernující mucin mají horší prognózu, vyšší rychlost růstu, ve vyšším procentu je u nich nacházeno postižení lymfatických uzlin. Dále mají vyšší metastatický potenciál a tím pádem i nižší míru pětiletého přežití (Sasaki, 1987). Nacházíme je u pacientů v mladším věku a v pravé části tračníku (Suma, 1992). Agresivnější chování a horší prognóza koreluje s množstvím mucinózní složky bez ohledu na histologický stupeň diference (Kufe, 2009).

Deregulace v produkci mucinu při styku se zánětem může podporovat karcinogenezi (McGuckin, 2011). I když muciny v epitelových buňkách fungují jako ochrana a bariéra před karcinogeny či chronickým zánětem, a tím jako obrana vůči malignímu bujení, paradoxně v nádorových buňkách fungují stejně. Úloha jejich exprese v rakovinových buňkách je pravděpodobně stejná jako u zdravé tkáně, zvyšují tedy rezistenci buněk a jejich odolnost oproti toxickému působení látek na povrch tkání. Nádorové buňky vzniklé z epitelu, které produkují hlen, jsou více odolné, vykazují vyšší tendenci k růstu, migraci a invazi. Muciny byly právě z tohoto důvodu označeny jako markery špatné prognózy pacienta (Jonckheere, 2014) a stávají se tak atraktivním terapeutickým cílem u různých typů tumorů (Kufe, 2009).

Muciny jsou lokalizovány na apikálních hranicích normálního epitelu. Při reakci na stres dochází ke ztrátě polaritu a tím jsou muciny přemístěny přes celou epitelální buněčnou membránu (Vermeer, 2003). Díky tomu mohou interagovat s buňkami bazální membrány. Tím buňky na mezenchymově-epitelovém přechodu mohou být indukovány k přeměně na maligní buňky, podobné kmenovým buňkám, které jsou více agresivní (Thiery, 2002).

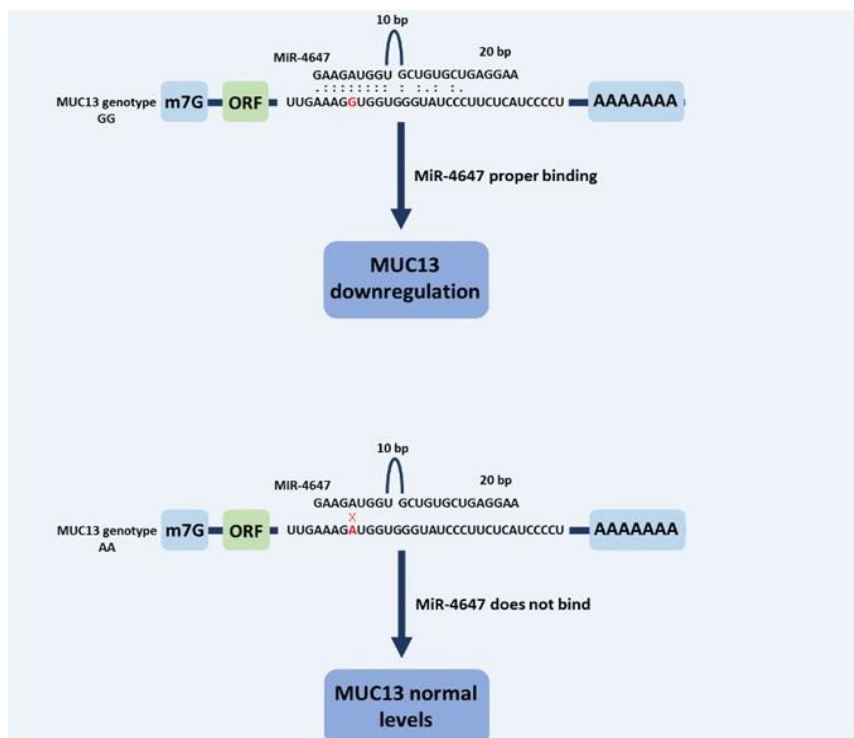
Zvýšená exprese mucinu u různých typů rakoviny se jeví jako nadějný terapeutický cíl. Výzkum se zabývá vývojem protilátek, vakcín a lékových inhibitorů. Tyto látky jsou stále ve fázi klinických výzkumů (Kufe, 2009).

MUC13 je mucin buněčného povrchu, který je ve vyšší míře exprimován u nádorů kolorekta (Gupta, 2012, Shimamura, 2005, Walsch, 2007), žaludku (Shimamura, 2005), ledvin (Khan, 2014) a ovárií (Chauhan, 2012). Ve zdravé tkáni je tento protein produkován na apikální hranici buněčného epitelu střeva a jeho produkce se zvyšuje jako reakce na infekci (Sheng, 2011) či zánět (Linden, 2008). MUC13 má relativně krátkou mimobuněčnou doménu o 151 aminokyselinách v porovnání s ostatními muciny buněčného povrchu. Dále obsahuje tři domény epidermálního růstového faktoru (EGF), jednu doménu proteinové enterokinázy mořského ježka (SEA) obsaženou v extracelulární komponentě následovanou krátkou transmembránovou doménou obsahující 23 aminokyselin a 69 aminokyselin domény cytoplazmy, která zahrnuje osm serinových a dvě tyrosinové rezidua pro potenciální fosforylaci. Navíc obsahuje proteinkinázu C, která působí jako konsenzuální fosforylační motiv. Ta může hrát roli v buněčných signalizačních drahách, regulovat proliferaci a přežívání buněk (Chauhan, 2009, Linden, 2008, Walsh, 2007).

Nedávno bylo verifikováno, že zvýšená cytoplazmatická exprese MUC13 je pozorována u pokročilého a metastatického kolorektálního karcinomu. Dále bylo zjištěno, že MUC13 zvyšuje aktivitu buněčného faktoru κ B (NF κ B), který tak působí proti apoptóze (Sheng, 2011) a také podporuje vznik zánětu (Williamns, 2001). Gupta et al. navrhli, že zvýšená sekrece *MUC13* by mohla prostřednictvím onkogenních proteinů podporovat tumorogenezi a vznik metastáz (2014). Předpokládá se, že MUC13 podporuje přežívání nádorových buněk kolorekta a tím představuje potencionálně slibný léčebný cíl pro individuální terapii u pokročilého kolorektálního karcinomu (Gupta, 2014). Nicméně molekulární mechanismy zodpovědné za zvýšenou sekreci *MUC13* nejsou dobře známky.

Jako jedna z možností je zvažována deregulace microRNAs (miRs), které regulují hladinu mRNA *MUC13*. V předchozích studiích vypracovaných na Ústavu experimentální medicíny AV ČR týkajících se polymorfismu ve vazebných místech miRs v mucinových genech, zjistili signifikantní souvislost mezi homozygotní variantou rs1532602 v genu *MUC13* a zvyšujícím se rizikem kolorektálního karcinomu (Schmith, 2015). Genetická variace v 3'UTRs cílových genů může ovlivnit miRNA vazby, což vede k funkční variabilitě mRNA a různé expresi proteinů.

Tato práce se věnuje roli miR-4647, o které se předpokládá, že se váže na polymorfni sekvenční místo *MUC13*, SNP spot rs1532602. **(Obrázek č. 19)** My jsme analyzovali osu *MUC13* – miR-4647 a sledovali jsme rozdílné exprese u pacientů s kolorektálním karcinomem se zaměřením na jejich přežití.



Obrázek č. 19. Grafické znázornění *in silico* predikované vazby miR-4647 v polymorfni sekvenci *MUC13* rs1532602.

15. Experimentální část

15.1. Materiál a metodika

15.1.1. Klinické vzorky

Ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, ve Fakultní Thomayerově nemocnici v Praze a ve Fakultní nemocnici v Plzni bylo v letech 2011 až 2015 léčeno a podstoupilo chirurgický zákrok 187 pacientů se sporadickým kolorektálním karcinomem. Všichni tito pacienti podepsali písemný souhlas s účastí ve studii a schválili využití svých biologických vzorků pro genetickou analýzu dle Helsinské úmluvy (G 14-08-67). Etické komise výše uvedených nemocnic udělily souhlas s výzkumem. Subjekty studie poskytly informace o svých životních návycích, body mass index (BMI), cukrovce a rodinném či osobním výskytu rakoviny v anamnéze. Data byla od subjektů odebrána pomocí strukturovaného dotazníku s ohledem na stanovené demografické charakteristiky a potenciační rizika související se vznikem kolorektálního karcinomu. Klinické charakteristiky pacientů jsou uvedeny níže. (**Tabulka II.**)

Tabulka II. Klinické charakteristiky pacientů.

^aČísla nemusí 100% odpovídat kvůli chybějícím klinickým údajům.

		N (celkem =113)
Věk	roky	65±10
Pohlaví	muž	69
	žena	44
SNP		
stratifikace^a (rs1532602)	G:G	30
	A:G	54
	A:A	17
CRC stratifikace	kolon	44
	rektum	69
T^a	1	6
	2	19

	3	76
	4	10
N^a	0	51
	>1	50
M^a	0	87
	>1	21
Grade^a	1	19
	2	77
	3	8
Lokální recidiva^a	ne	79
	ano	33
Neoadjuvantní terapie^a	ne	94
	ano	16
Adjuvantní terapie^a	ne	65
	ano	42
Životní stav^a	zemřelí	30
	žijící	82

Pacienti s CRC podstoupili chirurgický výkon a byla u nich provedena resekce tumoru i okolní tkáně (v 5 až 10 cm vzdálenosti od tumoru). Materiál byl ihned po resekci hluboce zamrazen. Klinické stádium bylo stanoveno s ohledem na metastázy v lymfatických uzlinách dle UICC (Union for International Cancer Control), detailní charakteristika je uvedena viz. výše. **(Tabulka II.)**

Všechny subjekty s kolorektální karcinomem byly monitorovány do 31. března 2021. Celkové přežití (OS) bylo definováno jako časový interval od stanovení diagnózy do data úmrtí z jakékoliv příčiny.

Sběr dat a vzorků tkáně CRC a okolní tkáně bez tumoru byl prováděn i na chirurgické klinice 1. LF UK a Fakultní Thomayerovy nemocnice. Vzorky tumoru byly použity k experimentu na myších. Bohužel ten neměl relevantní výsledek.

Experimentální část probíhala na Ústavu experimentální medicíny AV ČR pod vedením MUDr. Pavla Vodičky, CSc., Ing. Veroniky Vymetákové, Ph.D. a mé aktivní účasti v jednotlivých fázích experimentu. Histologické zpracování vzorů tkání probíhalo ve spolupráci s patologií Fakultní nemocnice v Plzni. Statistická analýza a zpracování dat byla provedena Ing. Vendulou Novosadovou Ph.D. Výsledky práce byly již publikovány (Sojka, 2022).

Tumor a přilehlá slizniční tkáň byly homogenizovány pomocí MagNA Lyser (Hoffmann-La Roche). Genomová DNA, celková RNA a miRNA byly izolovány z tkáně tumoru a z přilehlé tkáně bez tumoru pomocí miRVana isolation kit protocol podle pokynů výrobce (Thermo Fischer Scientific, USA). Koncentrace a čistota RNA se stanovila spektrofotometricky s měřením optimální denzity pomocí Nanodrop (ThermoScientific, USA). Integrita celkové mRNA byla měřena metodou kapilární elektroforézy Agilent 2100 Bioanalyzer s Agilent RNA 6000 Nano Kitem (Agilent Technologies, USA).

15.1.2. Genotypizace lidských vzorků

Genetický polymorfismus v *MUC13* genu rs1532602 byl stanoven pomocí diskriminační analýzy TaqMan allelic diskriminačního testu (ThermoFisher Scientific, USA; Assay-on-demand, SNP genotyping products: C_11906718_1_). TaqMan genotypizační reakce byla amplifikována v systému 7500 Real-Time PCR systém (ThermoFisher Scientific, USA) následovně: 95 °C na 10 minut, 92 °C na 15 sekund, a 60 °C na 1 minutu ve 40 cyklech.

Genotypový screening byl prováděn současně pro tumor tlustého střeva a přilehlou tkáň bez nádoru. Korelace obou genotypů mezi duplicitními vzorky byla více než 99 %. Výtěžnost genotypové reakce se pohybovala mezi 97,0-99,5 %.

15.2.3. Reverzní transkripce (RTr) a qPCR genu *MUC13*

V této studii jsme analyzovali hladinu exprese *MUC 13* a miR-4647. Pro detekci genu *MUC13* (ID Hs00217230_m1 (**Tabulka III.**)) byla cDNA syntetizována z 80 ng celkové mRNA v 10 µl RTr, reakcí pomocí TATAA GrandScript cDNA SuperMix Kit (TATAA), podle protokolu výrobce v C1000 PCR přístroji (Bio-Rad). Před qPCR byla cDNA zředěna 1:1 vodou bez nukleázy.

Deset μ l kvantitativní PCR reakce obsahovalo 2 μ l zředěné cDNA, 5 μ l Taqman universálního mastermixu bez UNG (ThermoFisher Scientific, USA), 2,5 μ l vody bez nukleázy a 0,5 μ l primerů zakoupených od ThermoFisher Scientific. Teplotní protokol byl: 95 °C na 10 min, a 45 cyklů na 15 s na 95 °C, 1 min na 60 °C v CFX384 (Bio-Rad, USA). Exprese *MUC13* byla normalizována k genu *ACTB* (Hs99999903_m1). Gen *ACTB* byl použit jako referenční gen a byl vybrán z testů TaqMan Endogenous Control (*ACTB*, *GAPDH*, a 18S, ThermoFisher Scientific) od Normfinder (GenEx Enterprise). Všechna data byla analyzována metodou $2^{-\Delta Cq}$ (Limak, 2001).

Tabulka III. Seznam validovaných testů TaqMan, referenčních genů, miRNA mimics a testů siRNA, které byly použity.

Geny	ID	Sekvence
RT-PCR		
miR-4647	MI0017274	ID testu 479880_mir - ThermoFisher Scientific, USA
<i>MUC13</i>	56667	ID testu Hs00217230_m1 - ThermoFisher Scientific, USA
miRNA mimics		
miR-4647	MIMAT0019709	ID testu 4464066 - ThermoFisher Scientific, USA
miRNA mimics negativní kontrola		ID testu HMC0003 - Sigma Aldrich, USA
siRNA		
<i>MUC13</i>	56667	ID testu am16708 – Ambion od Life Technologies, USA
kontrola siRNA #1		ID testu 464058 - Ambion od Life Technologies, USA
RNU48	NR_002745	ID testu 001006 - ThermoFisher Scientific, USA
<i>ACTB</i>		Test DHS99999903_m1 - ThermoFisher Scientific, USA

15.2.4. Imunohistochemie proteinu MUC13

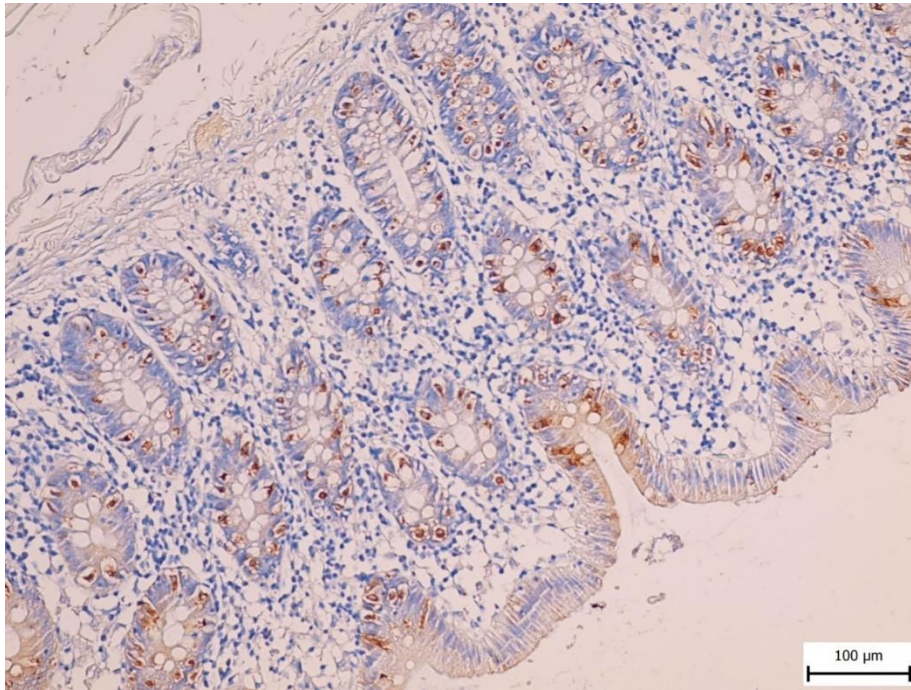
Zafixované preparáty odebrané z tlustého střeva (od pacientů s kolorektálním karcinomem odebrané od pacientů zařazených do studie a zpracované na patologii ve Fakultní nemocnici v Plzni) byly zbaveny vody a zality do parafínu s použitím běžných metod. Bločky tkáně byly nakrájeny na 5 µm řezy, připevněny na podložní skříčka Super Frost potažené (3-aminopropyl)-triethoxysilanem (Sigma Aldrich, Vienna, Austria).

Byly zbaveny parafínu, rehydratovány, a zpracovány následovně: jedna část bločků byla nabarvena hematoxylin-eosinem a další část byla nabarvena Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem k rozlišení tkáňových komponent. Řezy s majoritní částí rakovinové tkáně byly vybrány k imunohistochemickému stanovení. Imunohistochemie (IHC) byla provedena manuálně s použitím primární protilátky MUCIN 13 ((D-5): sc-373857, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Europe). Byly použity doporučené kontroly, jak pozitivní, tak negativní.

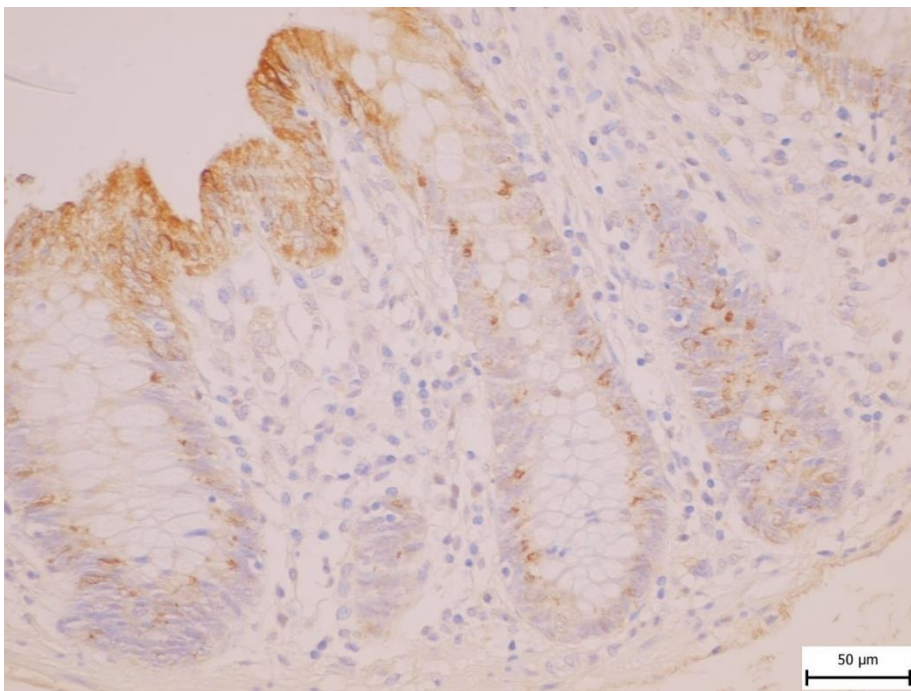
Histologická kvantifikace byla provedena pomocí stereologických metod a softwaru Ellipse (ViDiTo, Slovakia) (Balaguer, 2010, Brenner, 2014). Metoda je založena na počítání průsečíků detekovaných struktur se stereologickými mřížkami náhodně superponovanými na mikrofotografie. Tato metoda počítání bodů byla použita pro odhad plošného zlomku MUC13 ve střevní stěně.

Objektiv mikroskopu a zvětšení použité pro kvantitativní hodnocení MUC13 byly nastaveny na nejnižší nastavení, které umožňovalo přesnou a jednoznačnou identifikaci s ohledem na imunohistochemickou metodu detekce. Výsledná data jsou prezentována jako aritmetický průměr vypočítaný ze stochastických metod. Kvantifikace MUC13 ve vzorcích byla založena celkem na 568 mikrosnímčích.

Vzorek lidské stěny střeva byl požit jako pozitivní kontrola. Bylo použito ileum a tlusté střevo, které byly bez patologických změn. **(Obrázek č. 20 a č. 21.)** Kontrolní vzorek tlustého střeva byl použit od pacienta zařazeného do této studie. Výsledek imunohistochemické detekce se stanovil v souladu s datovými listy výrobce. Negativní kontrolou byl kontrolní vzorek lidské střevní stěny (tlusté střevo; tj. vzorek obsahující prokázaný glykoprotein MUC13), ale reakce s primární protilátkou byla při imunohistochemickém postupu vynechána. Preparát byl negativní (MUC13 byl neprůkazný) a tak byla vyloučena nespecifická reakce detekčního systému.



Obrázek č. 20. Lidské ileum pozitivní na protein MUC13. Pohárkové buňky pozitivní na MUC13 se nachází na spodině střevních krypt ilea.



Obrázek č. 21. Colon pozitivní na MUC13. Odlišná pozitivita MUC13-enterocytů v blízkosti lumen střeva a pohárkových buněk v kryptách.

15.2.5. MiRNA selekce

Předpokládá se, že miR-4647 se váže na *MUC13* jen v přítomnosti homozygotního GG genotypu rs1532602 v *MUC13* podle volně dostupného softwaru:

MicroSNiper (<http://epicenter.ie-freiburg.mpg.de/services/microsniper/>).

Podle mirDIP (<https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>),

Targetsan (https://www.targetsan.org/vert_80/)

a miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) miR-4647 se váže na *MUC13* se středním integrovatelným skóre (mirDIP = 0,18, Targetsan = -0,06, miRWalk = 0,85).

15.2.6. Reverzní traskripce (RTr) miR-4647

Pro detekci miRNA (miR-4647 test ID 461900_mat) byla celková mRNA reverzně přepsána do cDNA za použití souborů genově specifických primerů, navržených pro analýzu miRNA TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Soubor 5x Taqman microRNA primer, každý 100x zředěný, obsahoval všechny cílové primery a další kontrolní miR-39 a potenciálně referenční geny: testy 18S a sRNA: *RNU6B*, *RNU44*, a *RNU48*. *RNU48* byly použity jako referenční geny vybrané společností Normfinder (GenEx Enterprise, Sweden). Deset µl RTr reakce obsahovalo: 8 ng/µl RNAsy, 4 µl souborů primerů, 2 µl RTr enzymů, 0,2 µl 100 mM dNTPs, 1 µl 10x RTr pufru, 0,13 µl RNA inhibitorů a 0,67 µl RNAsy. Teplotní protokol byl následující: 16 °C po dobu 30 min, 42 °C po dobu 30 min a 85 °C po dobu 5 min v C1000 (Bio-Rad).

15.2.7. cDNA preamplifikace miR-4647

Všechny vzorky jsme primárně preamplifikovali za užití vysoce kvantitativního přístroje pro stanovení PCR v reálném čase Biomark (Fluidigm, USA). Preamplifikovaný mix byl připraven z 20x TaqMan MicroRNA Assays (ThermoFisher Scientific, USA) a každý test byl zředěn 100x. Deset µl preamplifikované reakce obsahovalo: 2 µl cDNA (nezředěné), 1,5 µl preamplifikovaného mixu, 5 µl iQ Supermix (Bio-Rad, USA), 1,5 µl vody bez RNAsy. Preamplifikace byla provedena při C1000 (Bio-Rad) následovně: 95 °C po dobu 3 min, 18 cyklů při 95 °C po dobu 15 s a 59 °C po dobu 4 min. Po preamplifikaci byla každá reakce 20x zředěna.

15.2.8. Vysokokvantitativní qPCR miR-4647

MicroRNA qPCR byla připravena pomocí vysoce výkonné platformy BioMark™ HD System (Fluidigm, USA) a 48,48 GE Dynamic Arrays nebo 96,96 GE Dynamic Arrays. Pět µl premixu vzorků obsahovalo: 1 µl vzorku (20x zředěná preamp cDNA), 2,5 µl Taqman Universal Mastermix bez UNG (Thermo Fisher Scientific), 0,25 µl 20x GE nanášecího činidla pro vzorky (Fluidigm, USA) a 1,25 µl vody. Pět µl testovacího premixu obsahovalo 2,5 µl 20x Taqman microRNA testů a 2,5 µl 2x testovacího nanášecího činidla (Fluidigm, USA). Teplotní protokol byl: 95 °C po dobu 10 min, 40 cyklů o 95 °C po dobu 15 s, a 60 °C po dobu 1 min. Všechna data byla analyzována metodou $2^{-\Delta Cq}$ (Limak, 2001).

15.2.9. Buněčné linie

Výběr buněčných linií kolorektálního karcinomu byl založen na stupni bazální exprese *MUC13* v několika liniích kolorektálního karcinomu, jako je HCT-116, DLD-1, HT29, SW480.

Obě buněčné linie kolorektálního karcinomu (HCT-116 (ATCC®CCL247™) a DLD-1 (ATCC® CCL221™) byly původně získány od ECACC (Sigma Aldrich, USA). Buněčné linie byly kultivovány při 37 °C ve zvlhčené atmosféře 5 % CO₂ v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich, USA) a doplněné 10 % fetálním bovinním sérem (FBS; Gibco, USA), 1 mmol L-Glutaminu, 100 U/ml penicillin/streptomycinu. Obě buněčné linie byly testovány pomocí MycoAlert (Lonza Group Ltd, Switzerland), aby se vyloučila mykoplasmatická kontaminace.

15.2.10. Přejídná buněčná transfekce

Buňky byly transfektovány 24 hodin 10 nmol odpovídající hsa-miR-4647 (cat. 4464066; Sigma Aldrich, USA) a miRNA negativní kontrolou bez homologie s lidským genomem (HMC0003; Sigma Aldrich, USA) pomocí Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen™, USA) podle protokolu výrobce. Všechny experimenty byly provedeny ve třech nezávislých replikátech. Účinnost transfekce, změny hladin v miR-4647 a její dopad na hladiny mRNA *MUC 13* byly potvrzeny pomocí real-time RT-qPCRm, jak je popsáno výše.

Specificer® Select siRNA pro lidský *MUC13* (am16708) a Silencer® Select pro negativní kontroly siRNA #1 (cat. 4464058) byly zakoupeny od Ambion by Life Technologies (USA) a transfektovány pomocí Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Invitrogen by Life Technologies, USA) dle protokolu výrobce. Efekt silencingu byl verifikován pomocí qRT-PCR 48 hodin po transfekci pomocí testu TaqMan® Gene Expression Assay (ThermoFisher Scientific, USA) pro *MUC13* (ID Hs00217230_m1).

15.2.11. Genotypizace a sekvenování buněčných linií

Hodnocení genotypu *MUC13* pro rs1532602 v obou buněčných liniích bylo provedeno podobně, jak bylo uvedeno výše pro lidské vzorky. Korelace genotypů mezi duplicitními vzorky byla 100 %. Míra genotypů byla 100%. Pro účely stanovení, která alela z SNP *MUC13* rs1532602 byla aktivně přepsána, celková mRNA byla zpětně přepsána z obou buněčných linií do cDNA pomocí standardního laboratorního postupu.

Oblast zájmu byla vymezená primery 5'CCATTGGAGGGATAGAAGCA3' a 5'CTTTTCCTGGTAGGGCAACA 3' navrženými online pomocí primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Produktem byl amplikon dlouhý 233bp. Konečný produkt byl 100x zředěn v následné přímé sekvenční reakci za použití sady BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific USA) - sekvenován za standardních podmínek. DNA sekvenování bylo provedeno na ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific USA) a výsledky byly vyhodnoceny software Mutation Surveyor (Softgenetics, USA).

15.2.12. *In vitro* testy

Pro test tvorby kolonií byly transfekované buňky umístěny na 6-jamkové destičky (500 buněk na jamku) za 48 hodin od transfekce. Po 12 dnech byly kolonie fixovány 3% formaldehydem a obarveny 1% krystalickou violetí. Počet kolonií byl spočítán manuálně. Všechna měření se opakovala v triplikátech. Testy buněčné migrace byly provedeny 48 hodin po transfekci pomocí Transwell Permeable Supports 6,5 mm Insert (24-jamková destička; velikost pórů 8- μ m; Corning Costar, USA). Transfekované buňky (1×10^4) byly zasazeny do DMEM s 0,5% FBS do horní části Transwell komůrky. Spodní komůrka byla naplněna 20% FBS-DMEM. Buňky byly kultivovány 24 hodin. Po uplynutí doby byly migrující buňky fixovány 3% studeným formaldehydem po dobu

30 min, promyty PBS, obarveny 1% krystalickou violetí a počítány v pěti náhodných polích při 200násobném zvětšení. Měření byla opakována 3x.

Integrita plazmatické membrány byla hodnocena pomocí testu ToxiLight od Lonza (Basilej, Switzerland) podle protokolu výrobce. Tento test měří uvolňování adenylátkinázy v extracelulárním prostoru, což odráží integritu plazmatické membrány. Buňky byly kultivovány na 96-jamkové destičce (25 000 buněk na jamku) a vystaveny miRNA-4647 po dobu 24 hodin.

Po inkubaci bylo 20 µl supernatantu z každé jamky přeneseno do nové 96jamkové destičky. Poté bylo do každé jamky přidáno 50 µl testovacího pufru. Po inkubaci ve tmě po dobu 5 minut byla luminiscence měřena pomocí Spectramax iD3 (Molecular Devices, USA).

15.2.13. Western blot test

Proteiny (20 µg) izolované z buněčných linií Ripa pufrům byly nanесeny a separovány v 12% SDS-PAGE gelech při 15 mA po dobu 60 minut a separované proteiny byly poté přeneseny do 0,45 um Amersham Protran Nitrocellulose Blotting Membrane (GE Healthcare, Life science) v methanolovém přenosovém pufru za použití Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories). Membrány byly blokovány 5% BSA v Tris-pufrovaném fyziologickém roztoku obsahujícím Tween 20 (TBST; 20 mmol Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 mol NaCl a 0,1 % Tween 20) po dobu 1 hodiny a inkubovány s Anti-MUC13 (1: 100, protilátka ab235450, Abcam) a Anti-GAPDH (1:500, Abcam) při 4 °C přes noc, následovaná inkubací s anti-králičí sekundární protilátkou (Abcam) konjugovanou s křenovou peroxidázou. Membrány byly vyvolány pomocí SupersignalWest Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) a vizualizovány pomocí Azure c600 (Azure Biosystems).

15.2.14. Statistická analýza

Statistická analýza stupně exprese byla provedena pomocí BM SPSS Statistics 20. Všechny qPCR reakce byly provedeny ve třech replikách. Úroveň exprese každého vzorku byla normalizována pomocí předem vybraných referenčních genů a následně zprůměrována. Exprese miR-4647 u pacientů s kolorektálním karcinomem byla normalizována s expresí *RNU48*. Exprese *MUC13* byla normalizována k *ACTB* genu.

Cut-off je stanoven dle mediánu hodnot, takže hodnoty nad mediánem jsou vyšší hladiny a pod mediánem jsou nižší.

Stupeň exprese všech studovaných genů nesledoval normální distribuci v populaci, jak analyzoval test Kolmogorov–Smirnov. Data byla logaritmičticky transformována a pro statistické analýzy pro porovnání s mediánem byly použity párové neparametrické Wilcoxonovy testy a neparametrické Mann-Whitneyho testy. Vztahy mezi zkoumanými proměnnými a přežitím byly zkoumány pomocí Spearmanovy korelace, vyjádřené Spearmanovým rho (ρ). Analýza přežití byla provedena pomocí log-rank testu a přístupů podle Kaplan-Meierových grafů.

Pro testy *in vitro* byl použit Mann-Whitney test pro srovnání nepárových dat a test ANOVA byl použit pro srovnání více skupin s Tukey post hoc testem. Všechny statistické testy byly provedeny na 95% stupni spolehlivosti, p-hodnoty $<0,05$ a byly považovány za statisticky významné.

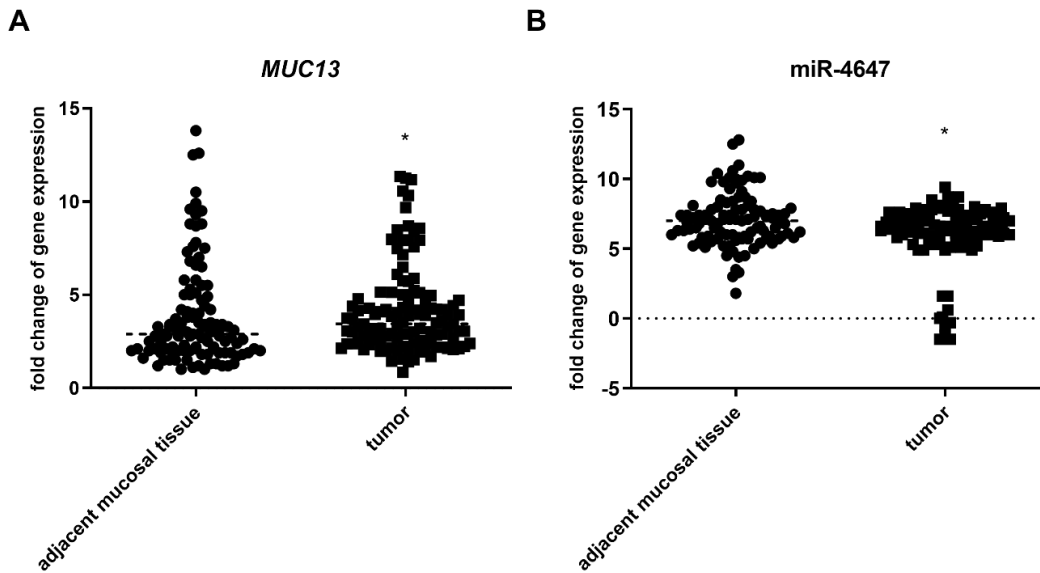
16. Výsledky

16.1. Klinický výzkum

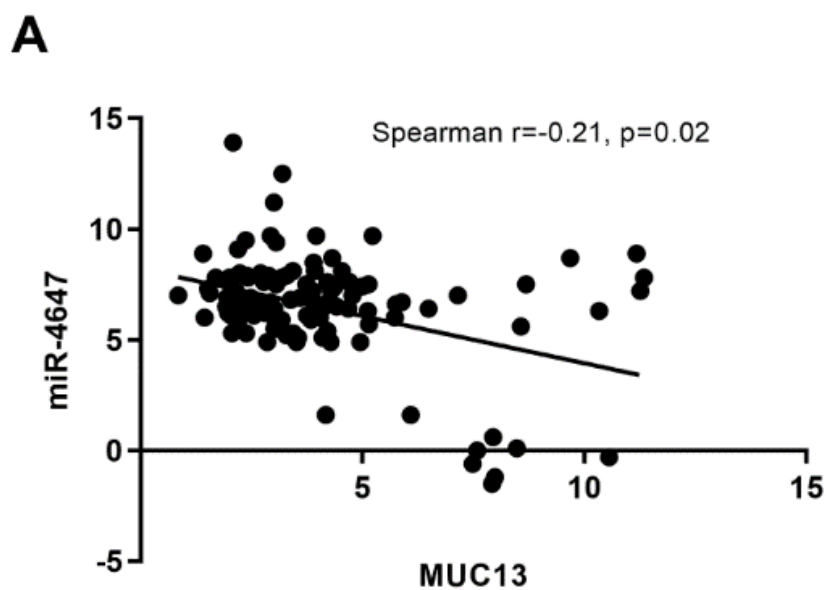
Geny odlišně exprimované v tkáních kolorektálního karcinomu

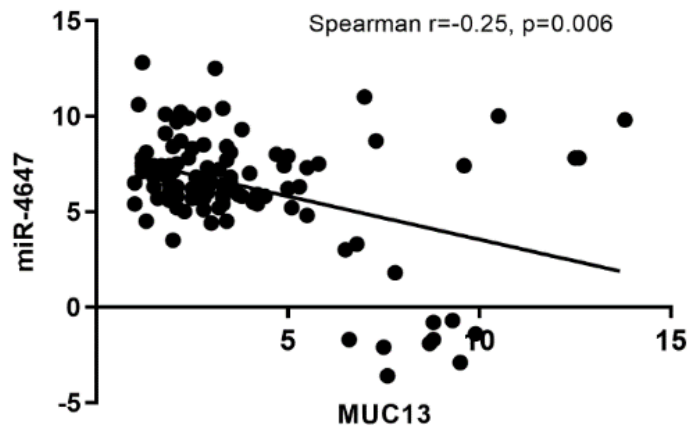
Expresa *MUC13* a miR-4647 byly analyzovány a porovnány. Celkově *MUC13* a miR-4647 byly v naší zkoumané skupině exprimovány odlišně: vyšší hladiny exprese *MUC13* byly pozorovány ve tkáni tumoru ve srovnání s přilehlou slizniční tkání (0,32-násobná změna - 32% zvýšení, $p=0,02$, (**Obrázek č. 22. A**)). Oproti tomu u miR-4647 jsme pozorovali trend opačný, a to nižší hladinu exprese v nádorových tkáních, (0,17-násobná změna - 17% pokles, $p=0,05$, v tomto pořadí, (**Obrázek č. 22. B**)). Negativní korelace mezi hladinami exprese *MUC13* a miR-4647 byla pozorována v tkáni tumoru i v přilehlé nemaligní tkáni, (Spearmanova korelace $r=-0,21$, $p=0,02$ a $r=-0,25$, $p=0,006$, v tomto pořadí, (**Obrázek č. 23. A, B**)). Signifikantně vyšší stupeň exprese miR-4647 byl pozorován u žen s porovnáním k mužům. (0,20-násobná změna - 20% nárůst, $p=0,009$). Pacienti, kteří neabsolvovali neoadjuvantní chemoterapii, měli nižší hladinu exprese miR-4647 v porovnání pacienty po neoadjuvantní chemoterapii (0,53-násobná změna – 53% pokles, $p=0,05$, v tomto pořadí).

Nebyly pozorovány žádné další souvislosti s klinicko – patologickými daty. Všechny údaje jsme shrnuli do následující tabulky a obrázků. (Tabulka IV.) (Obrázky č. 24. A, B, C, D, E, F), kde 100 % představuje zdravou tkáň.



Obrázek č. 22. Expres *MUC13* a související miR-4647 u pacientů s kolorektálním karcinomem (A) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni (B) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni, (celkem N=187), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

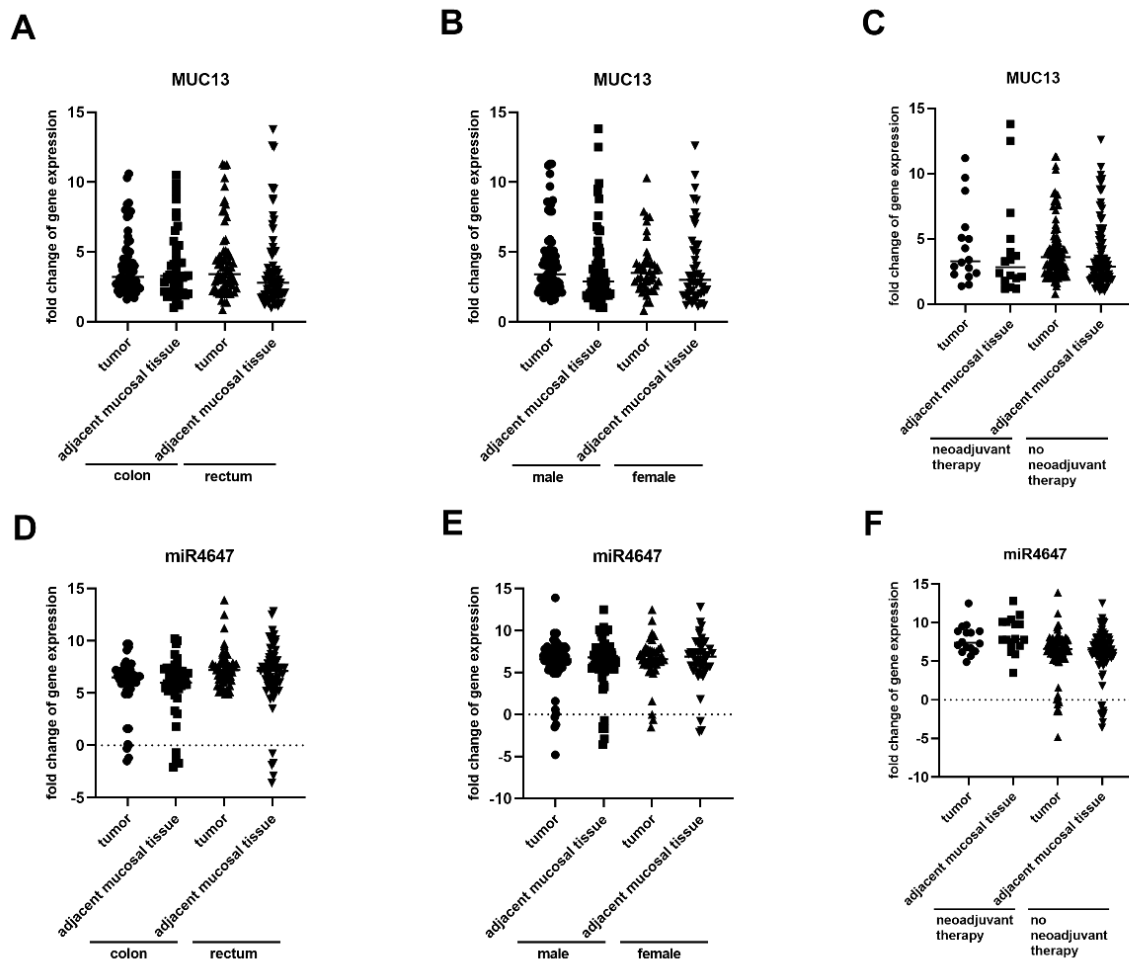


B

Obrázek č. 23. Vyjádření korelace analyzovaných genů (A) Negativní korelace *MUC13* a miR-4647 v nádorové tkáni, (B) Negativní korelace *MUC13* a miR-4647 v nemaligní tkáni, (Celkem N=187).

Tabulka IV. Násobná změna v expresi analyzovaných genů.

	<i>MUC13</i>		miR-4647	
	Násobná změna	Hodnota P	Násobná změna	Hodnota P
Relativní exprese (tumor vs. normální sliznice)	0,32	0,02	-0,17	0,05
Pohlaví (ženské vs.mužské)	0,85	0,23	0,20	0,009
Stratifikace (kolon vs. rektum)	0,58	0,13	-0,29	0,81
Neoadjuvantní terapie (ne vs. ano)	-0,04	0,64	-0,53	0,05

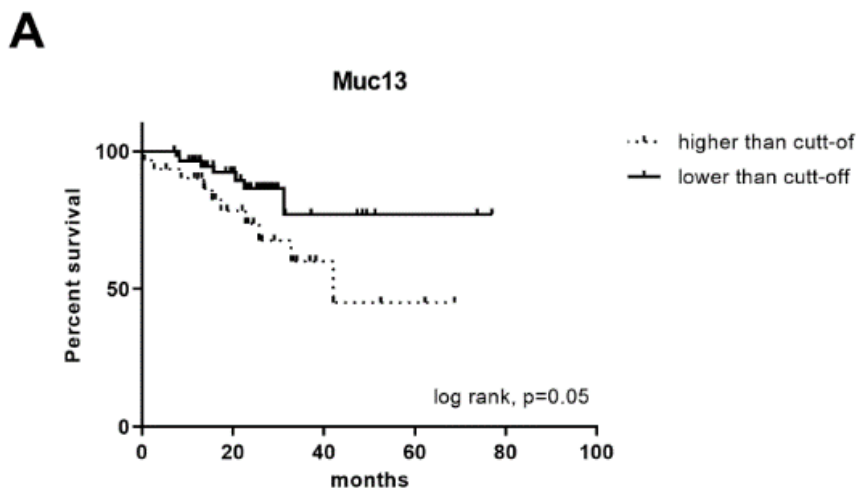


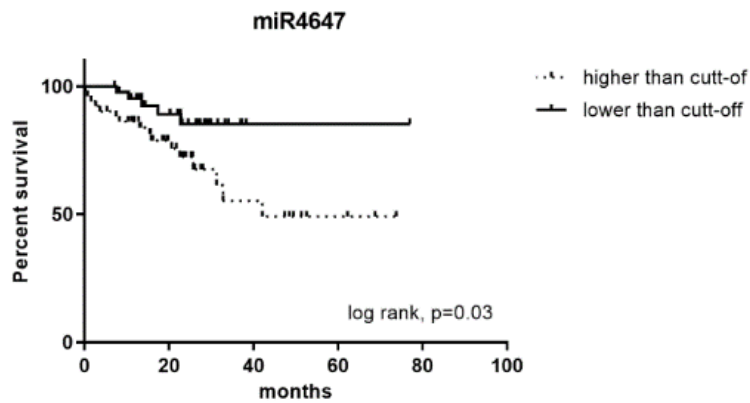
Obrázek č. 24. Rozdíl násobku změny ve vyjádření stupnice \log_2 *MUC13* a miR-4647

(A) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro tlusté střevo a konečník. (B) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro muže a ženy. (C) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro pacienty, kteří dostávají nebo nedostávají neoadjuvantní terapii. (D) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro tlusté střevo a konečník. (E) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro muže a ženy. (F) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro pacienty, kteří dostávají nebo nedostávají neoadjuvantní terapii, (celkem N=187), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

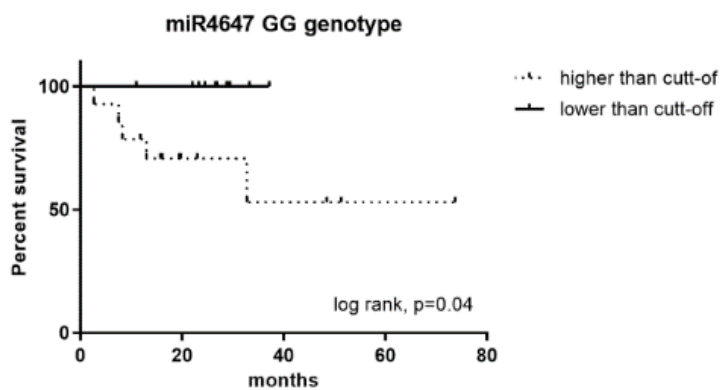
Rozdíl miRNA exprese v tkáni kolorektálního karcinomu

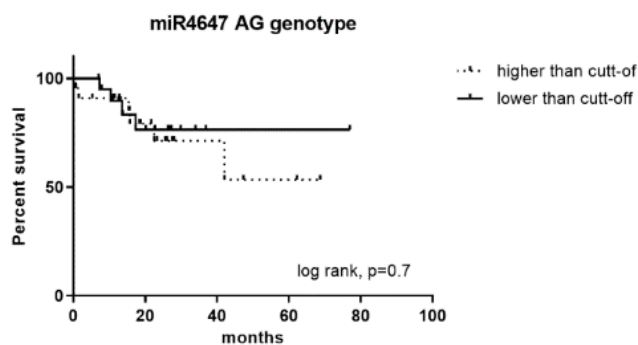
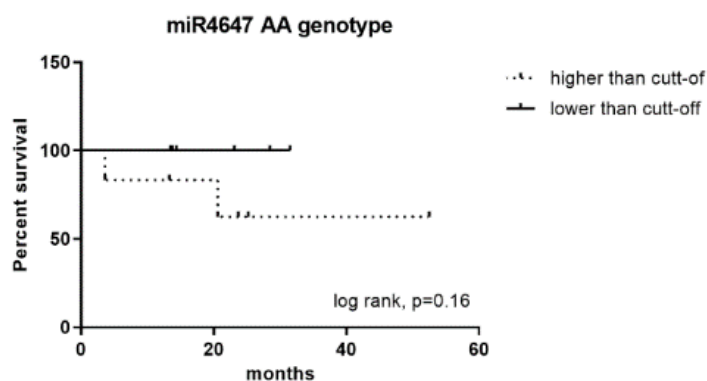
Abychom mohli dále poukázat na důležitost analýzy exprese miR-4647 a MUC13 u kolorektálního karcinomu, analyzovali jsme jejich spojitost s celkovým přežitím (OS). Pozorovali jsme, že vyšší stupeň exprese *MUC13* (**Obrázek č. 25. A**, log rank $p=0,05$) a miR-4647 (**Obrázek č. 25. B**, log rank $p=0,03$) je spojen s horší prognózou a přežitím pacientů. Předpokládáme, že miR-4647 je vázána na rs1532602 v *MUC13* genu u homozygotního GG genotypu. Avšak v přítomnosti varianty homozygotního AA genotypu se miR-4647 na *MUC13* gen neváže. (**Obrázek č. 19.**) Nedávno bylo publikováno, že varianta homozygotního AA genotypu rs1532602 v miRNA ve vazebném místě *MUC13* je spojena s nižším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (Sheng, 2017). Je zajímavé, že pacienti nesoucí homozygotní GG genotyp pro rs1532602 v *MUC13* spolu s vyšší stupněm miR-4647 vykazovali horší OS (log rank $p=0,04$, (**Obrázek č. 26. A**), (**Tabulka V.**)) To by mohlo vysvětlit kontroverzní pozorování vyšších hladin exprese miR-4647 a horšího přežití pacientů. Žádné další signifikantní asociace s přežitím pacientů nebyly pozorovány pro heterozygoty, ani variantní genotypy. (**Obrázek č. 26. B a C**) Kromě toho jsme také provedli analýzy přežití rozdělující pacienty podle miRSNP rs1532602. Nebyly zaznamenány žádné významné souvislosti s prognózou pacientů.



B

Obrázek č. 25. Kaplan-Meierovy OS křivky stratifikované pro vysokou a nízkou expresi pro (A) *MUC13* (p=0,05) (B) miR-4647 (p=0,03), (celkem N=187). Analýza přežití byla provedena pomocí log-rank testu a zobrazena do Kaplan-Meierových grafů.

A

B**C**

Obrázek č. 26. Kaplan-Meierovy OS křivky stratifikované pro rs1532602 *MUC13* u pacientů s CRC s (A) homozygotní genotyp GG ($p=0,04$), (B) heterozygotní genotyp GA, (C) homozygotní variantní genotyp AA. Analýza přežití byla provedena pomocí log-rank testu a zobrazena do Kaplan-Meierových grafů.

Tabulka V. Vztahy mezi zkoumanými proměnnými a přežitím hodnocené pomocí Spearmanovy korelace pro pacienty s kolorektálním karcinomem nesoucí homozygotní genotyp GG pro rs1532602 v genu *MUC13*

	<i>MUC13</i>	miR-4647	čas
<i>MUC13</i>	1	-0,33 0,32	-0,005 0,99
miR-4647		1	0,63 0,04
čas			1

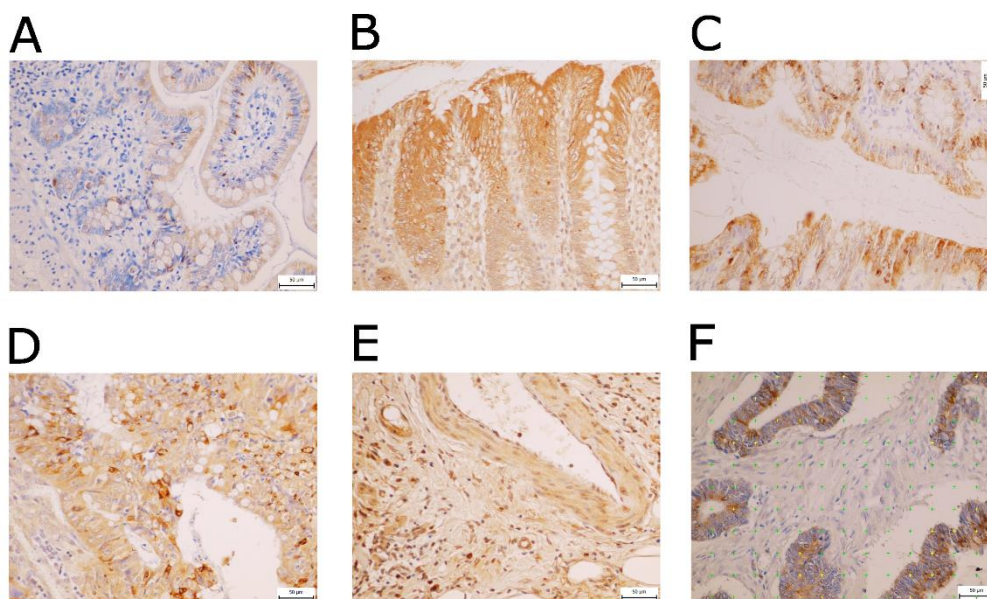
Imunohistochemie

Celkem bylo zahrnuto do studie a analyzováno 44 vzorků od pacientů na pozitivitou MUC13 v tumoru a přilehlé nemaligní tkáni. Tento postup nebyl komerčně dostupný pro miR-4647.

Jako kontroly byly analyzovány vzorky nemaligní tkáně lidského ilea, colon ascendens a rekta. U všech vzorků se imunohistochemicky stanovila relevantní pozitivita MUC13 v buňkách epitelu – enterocytech a pohárkových buňkách. MUC13 byl lokalizován na apexu enterocytů na jejich povrchu. V nemaligní tkáni ilea byl MUC13 detekován hlavně na spodině Lieberkūnových krypt, na vrcholku klků ilea v cytoplazmě enterocytů a také byl s vysokou pozitivitou detekován na spodině pohárkových buněk. **(Obrázek č. 27. A)** V nemaligní tkáni tlustého střeva byla pozorována změna positivity MUC13. Exprese MUC13 byla rovnoměrněji rozmístěna v kryptách a naopak byla výraznější v enterocytech v blízkosti střevního lumen. **(Obrázek č. 27. B)** V rektu byla pozorována výraznější pozitivita v kryptách i v enterocytech. **(Obrázek č. 27. C)**

Tkáň a stroma kolorektálního karcinomu

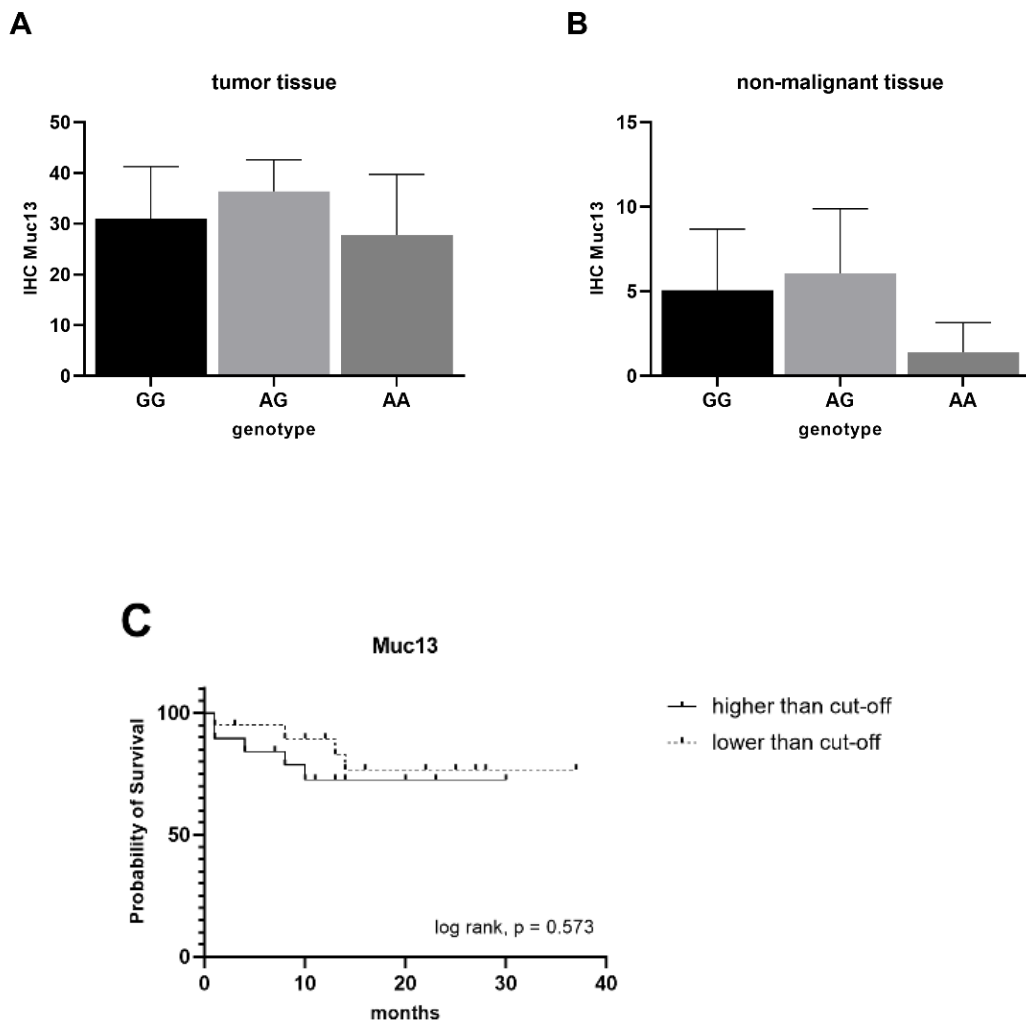
Pozorovali jsme vyšší intenzitu exprese MUC13 v tkáni nádoru při porovnání s okolní tkání bez nádoru (32,57 % versus 5,04 %). Ve většině případů byla detekována pozitivita MUC13 v cytoplazmě nádorových buněk a v některých buňkách stromatu. **(Obrázek č. 27. D)** U některých vzorků nádorových tkání byly detekovány i pozitivní cévy s MUC13. Endoteliální buňky ve vrchní vrstvě luminální části endotelu a leiomyocytů ve stěně cév byly pozitivní na MUC13. **(Obrázek č. 27. E)** Mucinózní tumory exprimovaly MUC13 s nižší intenzitou než adenokarcinomy bez mucinózní komponenty dle intenzity barvení (25 % vs. 34 %).



Obrázek č. 27. Imunohistochemické barvení MUC13 v (A) nezhoubné ileum, (B) nezhoubné tlusté střevo, (C) nezhoubný konečník, (D) pozitivní cytoplazma rakovinných buněk a (E) pozitivní endoteliální buňky (F). Obrázek z Ellipse softwaru rakovinných buněk pomocí metody počítání bodů, kde žluté body znamenají pozitivitu pro mucin 13, zelené body znamenají negativitu.

Abychom zjistili, jestli existuje rozdílná distribuce exprese MUC13 v nádorové tkáni a nemaligní tkáni, stratifikovali jsme populaci pro genotyp rs1532602 genu *MUC13*. Žádná signifikantní distribuce exprese MUC13 nebyla pozorována, ačkoliv pacienti s homozygotní AA variantů genotypu prokázali nižší hladiny exprese MUC13 ve tkáni s tumorem i v tkáni nemaligní v porovnání v homozygotním genotypem GG. **(Obrázek č. 28. A, B)**

Analyzovali jsme vztah MUC13 k OS, abychom dále podpořili potenciální důležitost úrovní exprese MUC13 u kolorektálního karcinomu. Navzdory tomu, že jsme pozorovali vyšší stupeň exprese MUC 13. **((Obrázek č. 28. C)**, log rank $p= 0,5$), který byl spojen s horším přežitím pacientů, tato asociace nebyla statisticky významná.



Obrázek č. 28. (A) Hladiny exprese IHC MUC13 v nádorové tkáni, (B) Hladiny exprese IHC MUC13 v nemaligní tkáni, (C) Kaplan-Meierovy křivky OS stratifikované pro vysoké a nízké hladiny exprese IHC MUC13 (celkem N=44).

Charakteristiky histologických řezů a mikroskopických obrazových polí, které představují každý použitý vzorek kolorektálního tumoru pro odhad parametrů, lze nalézt v následujících tabulkách. **(Tabulka VI. a VII.)**

Tabulka VI. Charakteristika histologických řezů a mikroskopických obrazových polí reprezentujících každý vzorek kolorektálního nádoru použitý pro odhad parametru.

*plocha frakce AA (plocha na plochu, bezrozměrný poměr) mucinu 13 ve střevní stěně

Kvantitativní parametr	Použitý mikroskop	Vzorky odebrané pacientovi na kvantifikaci	Obrázkové pole odebrané na pacienta	Počet sečtených událostí na pacienta
<i>A_A (mucin 13, CRC a jeho stroma)*</i>	40x	1	8	259 průsečíků v průměru s MUC13 pozitivních oblastí
<i>A_A (mucin 13, přilehlá peritumorózní sliznice)*</i>	40x	1	8	40 průsečíků v průměru s MUC13 pozitivních oblastí

Tabulka VII. Plošná frakce MUC13 AA (plocha na plochu, bezrozměrný poměr; na základě imunohistochemické detekce) ve střevní stěně vzorků kolorektálního karcinomu. Kvantitativní histopatologie byla provedena pomocí stereologických metod a softwaru Ellipse.

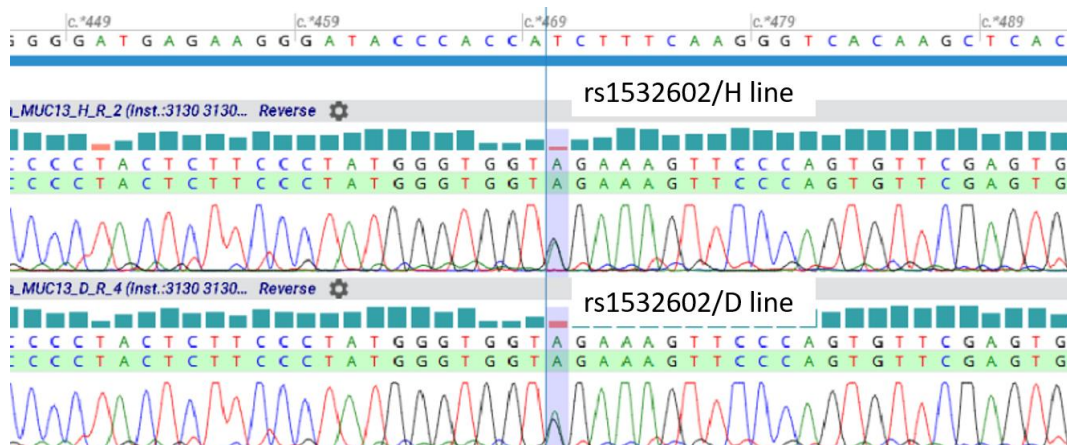
Číslo pacienta	Tkáň tumoru	Přilehlá nemaligní tkáň
	A _A - Plošný zlomek z MUC13 (plocha na plochu) (%)	A _A - Plošný zlomek z MUC13 (plocha na plochu) (%)
1	33,96	4,04
2	35,98	2,53
3	30,18	
4	24,62	3,28
5	45,45	
6	39,77	12,12
7	35,61	
8	17,42	
9	28,79	6,44
10	38,26	
11	50,38	2,78
12	33,84	
13	40,28	
14	26,77	4,55
15	23,36	
16	44,82	0,63
17	31,69	

18	48,86	4,92
19	31,44	1,39
20	20,83	
21	50,00	4,17
22	36,49	7,95
23	17,93	
24	19,95	7,32
25	26,39	
26	12,88	4,29
27	28,28	0,51
28	33,21	4,80
29	29,17	
30	39,27	5,30
31	30,30	
32	36,49	
33	39,52	5,68
34	10,61	3,41
35	38,01	11,36
36	17,55	
37	35,80	5,05
38	42,55	15,78
39	36,99	2,15
40	17,17	2,65
41	32,07	6,94
42	33,59	0,13
43	46,72	5,93
44	40,03	

16.2. Výzkum založený na buněčných liniích

Stanovení stavu genotypu MUC13

K posouzení *MUC13* genotypu pro rs1532602 v obou buněčných liniích byl proveden genotypový screening pomocí testu alelické diskriminace TaqMan. Obě buněčné linie, HCT-116 a DLD-1, prokázaly heterozygotní GA genotyp pro *MUC13* rs1532602. Abychom zjistili, jestli buněčné linie transkribují obě alely nebo ne, sekvenovali jsme odpovídající *MUC13* cDNA. Bylo potvrzeno, že obě buněčné linie exprimovaly obě alely (G a A alelu) *MUC13* rs1532602 ve stejné koncentraci. **(Obrázek č. 29.)**



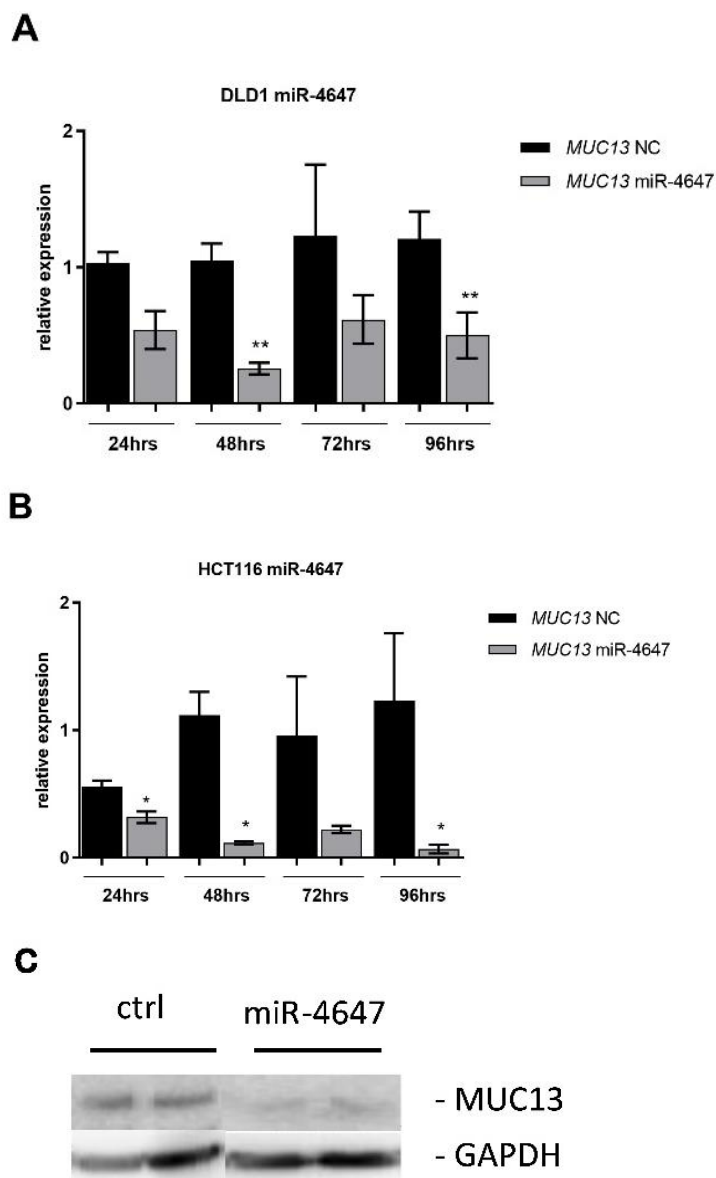
Obrázek č. 29. Stanovení transkribovaných alel v buněčné linii CRC HCT-116 a DLD-1, které prokázaly heterozygotní genotyp GA pro *MUC13* rs1532602.

Stanovení účinnosti transfekce

K analýze efektu miR-4647 na buněčnou migraci a tvorbu kolonií jsme nejprve optimalizovali proces transfekce odpovídajících miR-4647 prekurzorů. Buňky HCT-116 a DLD-1 byly transfektovány pomocí Lipofectamine RNAiMAX s miR-4647 a účinnost byla následně stanovena pomocí RT-qPCR 24, 48, 72 a 96 hodin po transfekci.

(Obrázek č. 30. A, B)

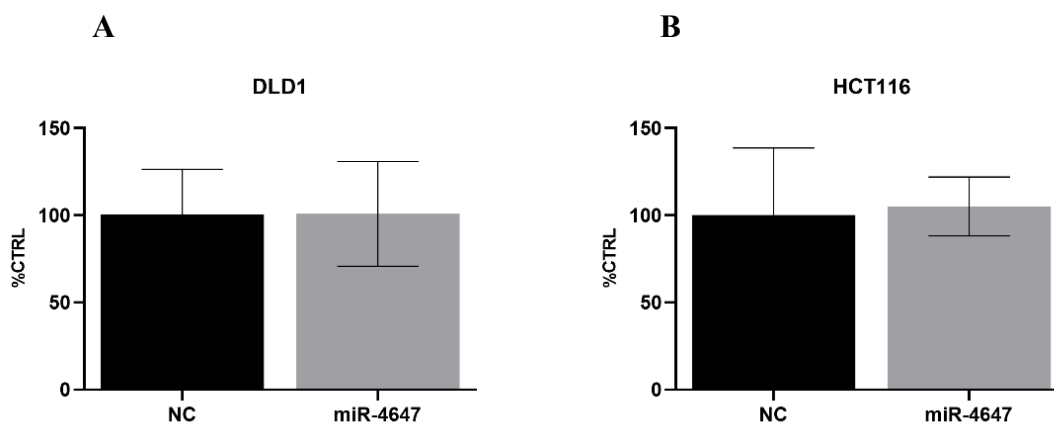
Zaznamenali jsme signifikantně vyšší hladiny tumorsupresorové miR-4647. Ve většině případů byl nejvýznamnější účinek zaznamenán 24 hodin po transfekci. Nadměrná exprese miR-4647 inhibovala *MUC13* mRNA expresi ve srovnání s negativní kontrolou v HCT-116 ((**Obrázek č. 30. A**), $p=0,05$) a DLD-1 buňkách ((**Obrázek č. 30. B**), $p=0,003$). Umlčení exprese proteinu MUC13 pomocí miR-4647 bylo potvrzeno Western blotem. (**Obrázek č. 30. C**)



Obrázek č. 30. Účinnost transfekce

Účinnost transfekce pomocí miR-4647 napodobuje v (C) DLD1 a (D) HCT116 buňkách. C). Western blot umlčení MUC13 pomocí miR-4647* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test

Aby se určilo, zda analyzovaná miR-4647 ovlivňuje buněčnou homeostázu, byly buňky HCT-116 a DLD-1 transfekovány prekurzorem miR-4647 a enzym adenylátkináza v buněčném médiu byl měřen 48 hodin po transfekci. Pozorovali jsme, že up-regulační exprese miR-4647 neovlivnila buněčnou homeostatickou síť. (Obrázek č. 31 A a B)

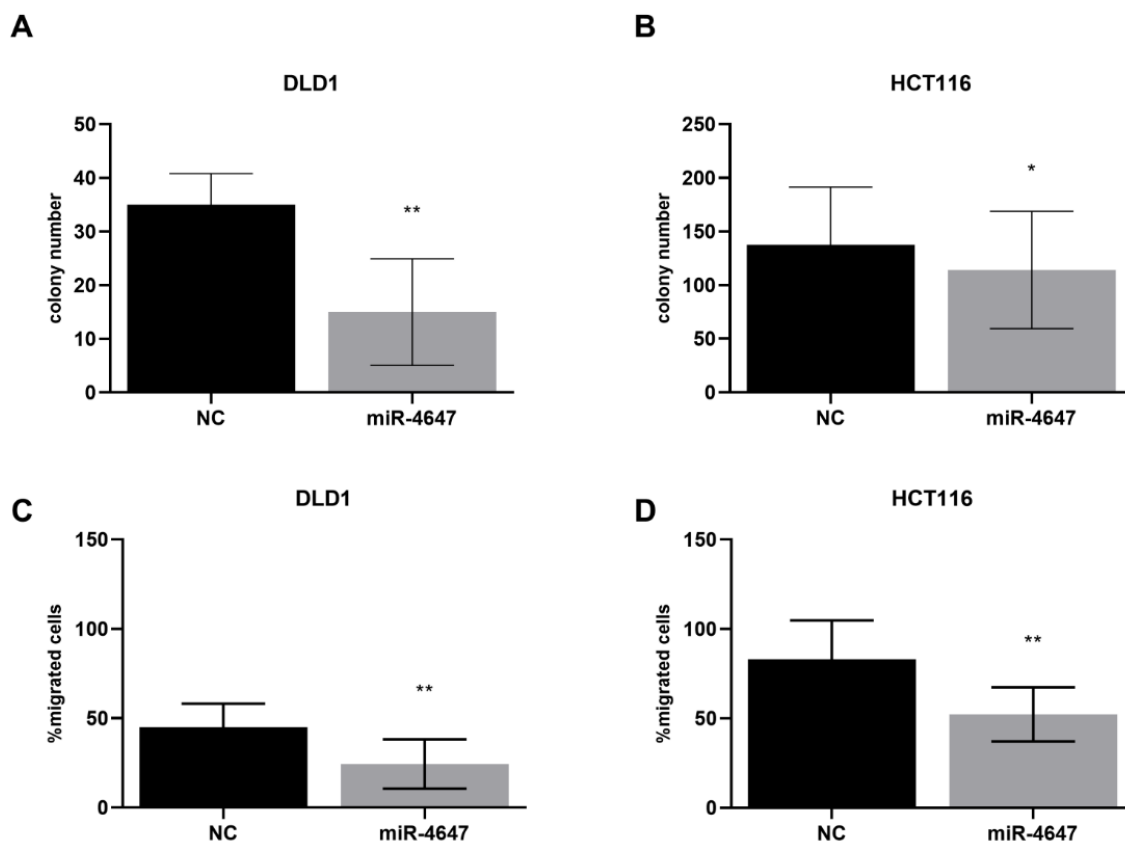


Obrázek č. 31. Hladiny exprese MUC13 po zvýšené expresi miR-4647

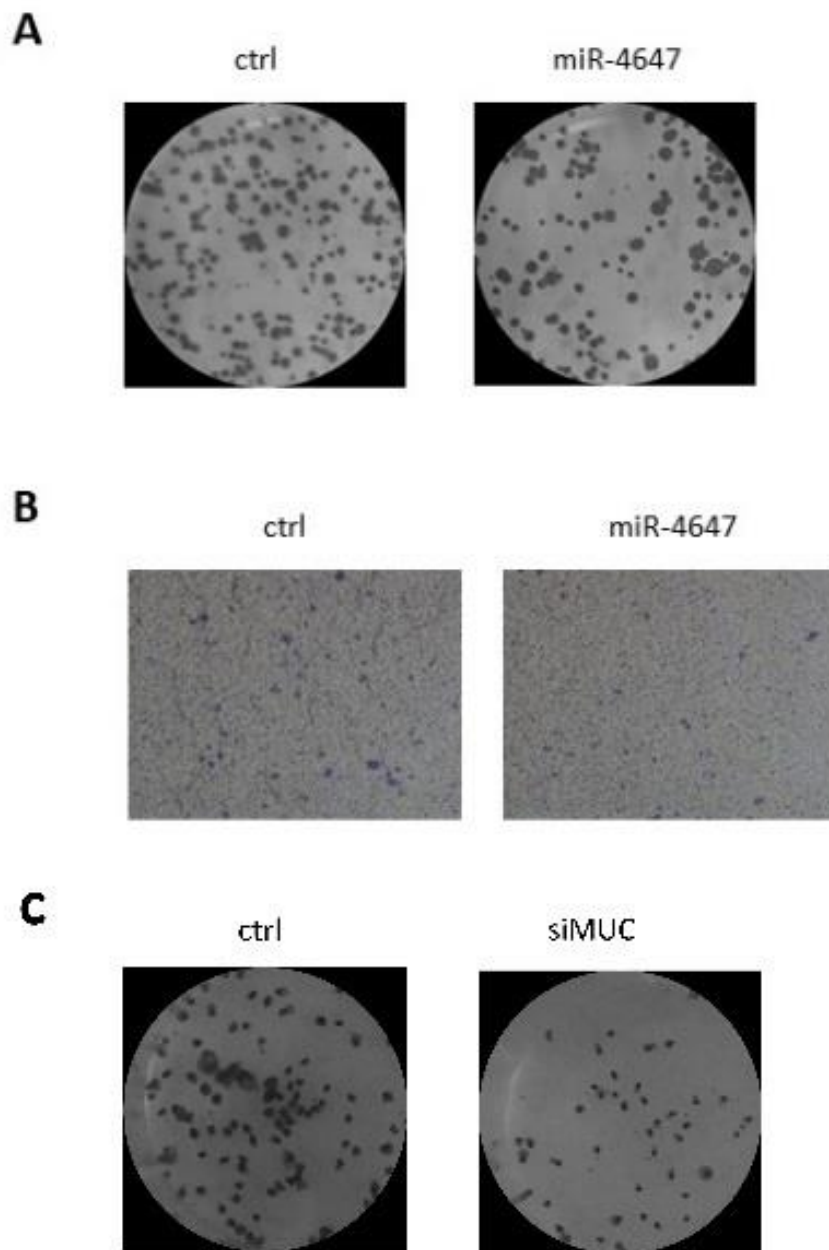
(A). Stupeň adenylát kinazy po miR-4647 zvýšené expresi v DLD1 (B) HCT-116 cells
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NC kontrolní buňky; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.

MiRNAs inhibuje tvorbu kolonií a migraci buněk kolorektálního karcinomu

Pro stanovení efektu účinku miRNA na přežití buněk byla hodnocena závislost růstu pomocí testu tvorby kolonií. Po 12 dnech, buňky HCT-116 a DLD-1 transfekované pomocí testované miR-4647 tvořily významně méně kolonií než buňky transfekované pomocí kontrolních oligonukleotidů (miR-4647: HCT-116 s 20% snížením, $p=0,03$; DLD-1 s 57% poklesem, $p=0,05$, v tomto pořadí; **(Obrázek č. 32. A a B, č. 33.)**). Ke zkoumání účinků miR-4647 na invazivní chování rakovinových buněk byl použit test migrace. Schopnost migrace buněk kolorektálního karcinomu po transfekci pomocí miR-4647 byla redukována u obou buněčných linií (miR-4647: HCT-116 s 37% poklesem, $p=0,002$; DLD-1 s 46% snížením, $p=0,001$, v tomto pořadí; **(Obrázek č. 32. C a D, č. 33.)**).



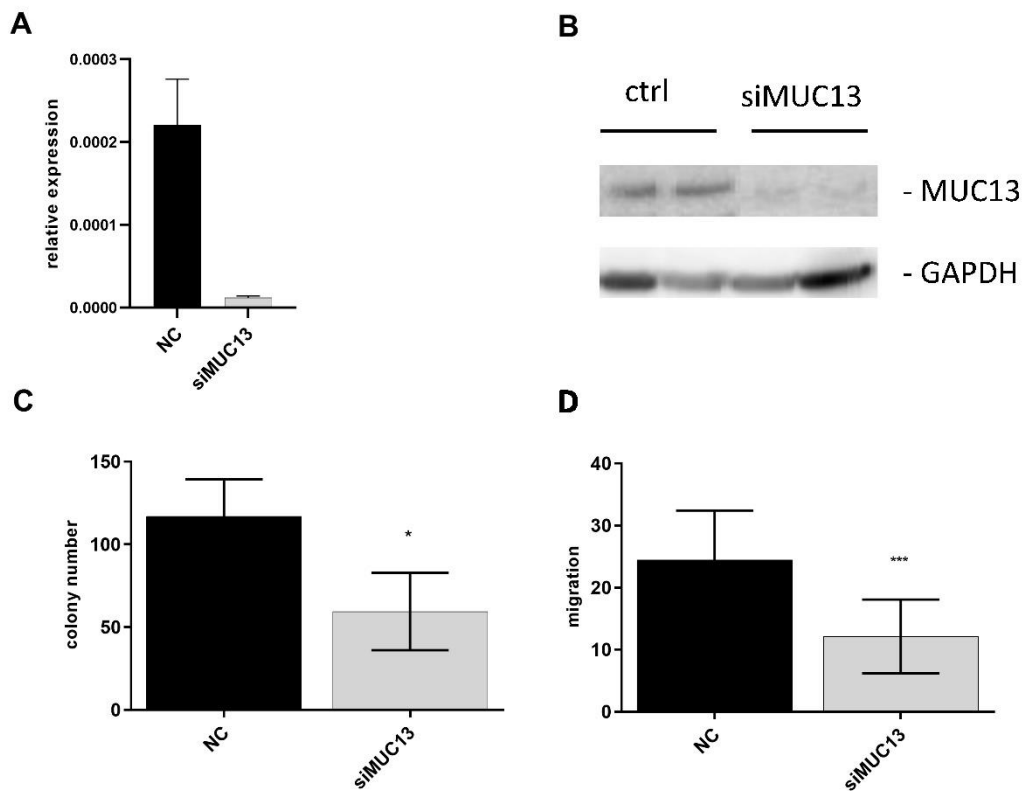
Obrázek č. 32. Vliv nadměrné exprese miR-4647 na růst a invazní chování buněk CRC (A) Vliv nadměrné exprese miR na růst buněk DLD1 a (B) HCT116. (C) Invazní chování nadměrné exprese miR na buňkách DLD1 a (B) HCT116. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NC kontrolní buňky; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.



Obrázek č. 33. Reprezentativní údaje z testů tvorby kolonií a migrace. (A) Reprezentativní obrázky z testu tvorby kolonií s a bez (ctrl) použití napodobenin miRNA, (B) Reprezentativní obrázky z testu migrace s a bez (ctrl) použití napodobenin miRNA, (C) Reprezentativní obrázky z test tvorby kolonií s a bez (ctrl) použití tlumiče MUC13.

Umlčení MUC13 ovlivňuje tvorbu kolonií a migraci buněk kolorektálního karcinomu.

Abychom zjistili, jak snížená hladina *MUC13* ovlivňuje chování buněk kolorektálního karcinomu, umlčeli jsme *MUC13* pomocí siRNA v buňkách HCT-116. Stupeň umlčení *MUC13* mRNA a exprese proteinu v buňkách HTC – 166 jsme potvrdili pomocí RT-qPCR a Western blotu. **(Obrázek č. 34. A, B)** Nižší stupeň exprese *MUC13* jsme potvrdili potlačením tvorby kolonií (33% snížení, $p=0,02$, **(Obrázek č. 34. C)**) a buněčné migrace (64% snížení, $p=0,0003$, **(Obrázek č. 34 D)**). Tento účinek byl také pozorován po umělé nadměrné expresi miR-4647, tato data mohou poukazovat na roli *MUC13* v buňkách kolorektálního karcinomu.



Obrázek č. 34. Účinek umlčeného *MUC13* na růst a migraci buněk HCT116 (A) Kontrolní exprese *MUC13* po umlčení (B) The Western blot umlčení *MUC13*(C) Vliv umlčení *MUC13* na růst buněk CRC. (D) Invazivní chování buněk po umlčení *MUC13*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NC kontrolní buňky; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.

17. Diskuse

Nedávno bylo zjištěno, že homozygotní varianta genotypu AA rs 1532602 ve vazebném místě pro miRNA genu *MUC13* byla spojena s nižším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu. Bylo zjištěno, že mucinózní kolorektální karcinomy jsou spojeny s kratší dobou přežití a vyšším stádiem TNM klasifikace při stanovení diagnózy. Tyto výsledky nás inspirovaly, abychom se na tuto problematiku zaměřili a detailně prostudovali roli miRNA ve vztahu k regulaci *MUC13*. V předkládané disertační práci jsme analyzovali *in silico* predikovanou osu *MUC13* – miR-4647 a poukázali na asociaci jejich rozdílné exprese v přežití pacientů.

Nejprve jsme potvrdili, že exprese *MUC13* poklesla po uměle navozeném navýšení exprese miR-4647 v buňkách pomocí RT-qPCR. Dále jsme pozorovali sníženou expresi miR-4647 v lidské tkáni kolorektálního karcinomu v porovnání s okolní zdravou tkání, zatímco bylo zjištěno, že *MUC13* je zvýšeně exprimován v nádorech kolorektálního karcinomu.

Naším hlavním výsledkem je pozorování vyšší expresní hladiny *MUC13* ve spojení s horším přežíváním pacientů s CRC. Tato zjištění byla také potvrzena na funkčních testech *in vitro*, kde buňky s nižší expresní hladinou *MUC13* měly nižší schopnost tvorby kolonií. Kromě toho buňky kolorektálního karcinomu se zvýšenou expresí miR-4647 tvořily významně méně kolonií a projevovaly nižší schopnost migrace. Předpokládá se, že miR-4647 se váže alelu G na polymorfním sekvenčním místě rs1532602 genu *MUC13*. Tato pozorování zjistila, že horší přežívání buněk s kolorektálním karcinomem může být asociováno s genem *MUC13*, a ne zvýšenou sekrecí miR-4647. Vyšší stupeň exprese miR-4647 v kolorektálním karcinomu byl zároveň spojen s kratším přežíváním u pacientů s homozygotním GG genotypem rs1532602 *MUC13*. Naším nejdůležitějším zjištěním byl vliv vyššího stupně exprese miR-4647 na přežití pacientů, který nebyl doposud analyzován dle dostupné literatury.

Přítomnost SNP by také mohla přispět k rozdílným interakcím miRNAs, které se váží na tuto oblast. Tato skutečnost může mít efekt na posttranskripční regulace zprostředkované jednotlivými SNP. Z toho důvodu nemůžeme v současné době vyloučit, že pozorované klinické fenotypy mohou být výsledkem různých kombinací miRNAs navazující

na některou z předpokládaných SNP. Navíc nedávné výzkumy naznačují, že genové variace v jiných oblastech než 3'UTR mohou také ovlivnit vazbu miRNAs.

Je zajímavé, že jsme pozorovali vyšší hladiny exprese miR-4647 v asociaci s horším přežíváním pacientů s CRC. Tato kontroverzní asociace s našimi údaji by měla být zvažována opatrně. Jednou z hypotéz by mohla být skutečnost, že podle Targetscanu, je dalším cílem miR-4647 tumor nekrotizujícího faktor, receptor superrodiny, člen 13 (*TNFRSF13C*), který hraje důležitou roli v homeostáze B buněk, procesech imunitního systému, adaptivní imunitní odpovědi, a signalizační cestě zprostředkované tumor nekrosis faktorem nádoru a atd. MiRNAs pracují s přesným nastavením translace prostřednictvím specifických vazeb mRNA. Negativní regulace exprese genu *TNFRSF13C* prostřednictvím miR-4647 inhibuje jeho translaci a způsobuje degradaci cílové mRNA. Spojení horšího přežití pacientů s vyšším stupněm exprese miR-4647 by takto mohlo být vysvětleno. Sheng a kol. pozorovali, že MUC13 podporuje tvorbu TNF způsobenou NF- κ B aktivací za pomoci TNFR1 a E3 ligázy, což zvyšuje ubiquitinaci RIPK1 (2013).

Pacienti nesoucí homozygotní genotyp GG pro rs1532602 v *MUC13* spolu s vyššími hladinami miR-4647 však vykazovali horší OS. To by mohlo vysvětlit pozorování vyšších hladin exprese miR-4647 a horšího přežití pacientů.

Ve zdravém tlustém střevě byl MUC13 detekován jako tenká vrstva na apikálním povrchu žláz. V nádorové tkáni byla pozorována vyšší intenzita exprese MUC13 v porovnání s její přilehlou nenádorovou tkání. Pozitivita MUC13 byla detekována i v cytoplazmě nádorových buněk. Na druhou stranu v naší studii mucinózní tumory exprimovaly MUC13 na nižší úrovni na základě nižší intenzity barvení v porovnání s adenokarcinomy (25 % vs. 34 %). Ve výše uvedené studii jsme pozorovali vyšší expresi MUC13 u tumorů v porovnání s přilehlou nenádorovou tkání střeva. Další studie prokáží přesnější vztah mezi expresí MUC13, stadiem tumoru a prognózou maligního procesu.

Deregulace exprese *MUC13* byla pozorována u karcinomů vaječníku, slinivky břišní, žaludku a kolorektálního karcinomu (Gupta, 2012, Chauhan, 2009 a 2012, Shimamura, 2005, Walsh, 2007). Potvrdili jsme, že pacienti s kolorektálním karcinomem s vyšším stupněm exprese *MUC13* v nádorové tkáni mají horší prognózu a kratší přežití v porovnání s pacienty s nižším stupněm exprese.

Tato pozorování souhlasí se studiemi Gupta a kol. (2012, 2014). Naopak, Packer a kol. uvedli, že stupeň mRNA *MUC13* byl nižší u kolorektálního karcinomu, ale jednalo se o malou studii, pouze s 23 vzorky tlustého střeva s karcinomem a 6 vzorky nemaligní tkáně tlustého střeva (2004). *MUC13* mRNA byla také identifikována v krvi pacientů s kolorektálním karcinomem, avšak *MUC13* mRNA byla také detekována v krvi zdravých jedinců (Lauriola, 2010). Sheng a kol. pozorovali, že MUC13 by mohl chránit epiteliální buňky tlustého střeva před apoptózou (2017, Linden, 2008) a to pomocí cílení MUC13 a MUC13 regulované dráhy, které senzibilizují rakovinové buňky k smrti a z toho důvodu by tato signální dráha mohla představovat slibný cíl k léčbě rakoviny (Williams, 2001).

Chauchan a kol. prokázali, že exprese MUC13 zvýšila expresi HER2 u různých typů buněčných linií a že zablokování MUC13 vedlo k snížení exprese HER2 (2012). HER2 patří do rodiny receptorů pro lidský epidermální růstový faktor (EGFR/ErbB) receptorových tyrozinkináz, které se široce podílejí na vzniku rakoviny u lidí (Settleman, 2015) a ovlivňují patogenezi karcinomů (Chaturvedi, 2015). Ačkoliv se ví, že aktivace receptorů závisí na jejich interakci s určitým ligandem, doposud nebyl identifikován žádný rozpustný ligand, který by se vázal na HER2 receptory. Výzkumy však naznačují, že aktivace ErbB receptorů by mohla být potencována proteiny, jako jsou MUC1 a MUC4 (Chaturvedi, 2008). Expese MUC13 na povrchu buněk kolorektálního karcinomu může také ovlivnit růstové charakteristiky tumoru prostřednictvím interakcí s receptory růstového faktoru c-erbB, modulací adheze a interferací pomocí rozpoznávání imunitním systémem. Duan a kol. navrhli, že MUC13 exprimovaný na krevních destičkách potkanů se účastní interakce krevních destiček s endoteliálními buňkami (1998). Pravděpodobně stejným mechanismem MUC13 na nádorových buňkách interaguje s endoteliálními ligandy během metastazování (Williams, 2001). MUC13 uvolňovaný z povrchu nádorových buněk by mohl být důležitým diagnostickým cílem ke zjištění jeho hladin v séru pacientů s gastrointestinálnímu karcinomy.

V praxi existuje významná klinická potřeba identifikovat biomarkery, které by odhalily časně fáze kolorektálního karcinomu. Takovéto markery by mohly hrát přídatnou roli v detekci kolorektálního karcinomu a stanovení správného typu chemoterapie a případně i možnost monitorace odpovědi na léčbu. Současně při výzkumu identifikace biomarkerů je cíl vyvíjet i zajistit nové a přesnější cíle terapie.

MiRNA ovlivňuje nejen různé biologické procesy, ale i se podílí na procesu progresu a metastazování u lidské rakoviny (Detassis, 2017). Deregulace miRNA je asociována s mnoha typy onemocnění včetně rakoviny. Tato zjištění o významu miRNA při vzniku rakoviny vedla k rozvoji výzkumu, který by umožnil léčebný zásah a ovlivnění této regulační cesty, jako nový terapeutický cíl. Nedávno dosáhlo již několik terapeutik ovlivňující miRNA klinického vývoje (Rapaimoole, 2017). V souladu s výše uvedenými poznatky v naší studii miR-4647 potlačoval růst *in vitro*.

U žen byly pozorovány významně vyšší hladiny exprese miR-4647 ve srovnání s muži. Pacienti mužského a ženského pohlaví mají různé endokrinní pozadí. Lze předpokládat, že změny pozorované v hladinách exprese miR-4647 by tedy mohly souviset s pohlavím pacientů, namísto MUC13 nebo CRC.

18. Závěr

Tato studie se zabývala *in silico* predikovanou osou *MUC13* – miR-4647 u kolorektálního karcinomu. Naše data prezentovala zásadní roli *MUC13* na přežívání pacientů a tím pádem se osa *MUC13* – miR-4647 zdá být velice nadějná s ohledem na nové terapeutické přístupy. Potvrdili jsme, že stupeň exprese *MUC13* poklesl po uměle navozené navýšené expresi miR-4647 pomocí RT-qPCR. Dále jsme pozorovali sníženou expresi miR-4647 u lidské tkáně kolorektálního karcinomu v porovnání s okolní zdravou tkání bez tumoru a zvýšení exprese *MUC13* u kolorektálního karcinomu. Naopak při nižší expresi *MUC13* měli pacienti s CRC delší přežívání. Dále jsme dokázali, že buňky kolorektálního karcinomu se zvýšenou expresí miR-4647 tvoří významně méně kolonií a projevují nižší schopnost migrace. Tato pozorování zjistila, že horší přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem může být asociováno s genem *MUC13* a se sníženou expresí miR-4647. Tímto bychom mohli potvrdit naši hypotézu, ale k detailnějšímu pochopení dané problematiky bude potřeba dalšího zkoumání.

MUC13 uvolněný z povrchu nádorových buněk by mohl být důležitým diagnostickým cílem ke zjištění jeho hladin v séru pacientů s gastrointestinálním karcinomem.

Existuje důkaz, že miRNA SNP mohou hrát zásadní roli při předpovídání rizika rakoviny, odpovědi na léčbu a výsledku. Pochopení faktorů přispívajících k riziku rakoviny může představovat silný nástroj do budoucna pro klinické lékaře a genetické poradce, stejně jako pro prohlubování našeho chápání biologie rakoviny. Pokud by byla identifikována jedna riziková alela nebo signatura alel, mohli by kliničtí lékaři doporučit konkrétní skupině pacientů, aby zahájili dřívější, častější a intenzivnější screening nebo ještě přísnější preventivní opatření v naději, že zabrání nemoci nebo ji zachytí dříve v léčitelném stádiu. Také je zajímavé, že jelikož jsou miRNA stimulovány vnějšími podněty, bylo by možné pacienty s takovými SNP poučit o úpravě faktorů životního stylu, aby se udržela homeostáza jejich zděděných rozdílů. Tato cesta aktivního výzkumu se může ukázat jako nejslibnější.

Vzhledem k uvedeným výsledkům se osa *MUC13* – miR-4647 u kolorektálního karcinomu zdá být velice nadějná s ohledem na nové terapeutické přístupy. Předpokládáme, že *MUC13* by mohl představovat signifikantní potenciál pro screening, diagnózu a léčbu rakoviny.

19. Souhrn

Kolorektální karcinom je nádorové onemocnění tlustého střeva s celosvětovým výskytem. Patří mezi nejčastější malignity a představuje závažný zdravotní problém.

V teoretickém úvodu práce jsme se zabývali incidencí CRC v ČR a ve světě. CRC je v ČR dle ÚZIS druhou nejčastější malignitou, celosvětově se jedná o třetí nejčastější malignitu. Nález CRC převažuje u mužů mezi 65-79 rokem. Zabývali jsme se rizikovými faktory rozvoje CRC po prozkoumání dostupné literatury. Na možnosti screeningových vyšetření jsme se podrobně zaměřili a popsali v dané kapitole naší práce. Zabývali jsme se stanginem onemocnění a možnými onkomarkery a biomarkery pro stanovení prognózy a nejlepšího terapeutického přístupu. CRC jsme rozdělili podle jeho etiologie i lokalizace primárního vzniku. Možné teorie vývoje CRC jsme podrobně popsali. V závěru naší teoretické části jsme se zaměřili na možné klinické příznaky a terapeutické možnosti u CRC.

Největší pozornost jsme věnovali nádorům produkující mucin a samotnému mucinu, který je u nádorů, které ho produkují, považován za negativní prediktivní faktor. V experimentální části jsme zkoumali vybraný mucin MUC13 a jeho osu s miRNA-4647. Výsledkem našich klinických testů bylo, že *MUC13* je spojen s horší prognózou onemocnění, přičemž buňky v testech vykazovaly vyšší mitotickou aktivitu a schopnost migrace. Naopak u miRNA byl efekt opačný, nádorové buňky s vyšším stupněm exprese mají nižší schopnost migrace a přežívání.

Zajímavé a nejdůležitější zjištění, byl efekt vyšší exprese miR-4647 na přežití pacienta s CRC, která doposud nebyla analyzována dle dostupné literatury. Vyšší stupeň exprese miR-4647 u kolorektálního karcinomu je spojen s vyšším rizikem smrti u pacientů s homozygotním GG genotypem rs1532602 *MUC13*. Důležitým diagnostickým cílem u pacientů s gastrointestinálními karcinomy by mohlo být stanovení hladiny MUC13 v séru, který je uvolněný z povrchu nádorových buněk. *MUC13* a osa *MUC13* – miRNA-4647 se jeví jako slibná cesta pro screening, stanovení prognózy i možného terapeutického zásahu.

Summary

CRC is a cancer with worldwide occurrence. It is one of the most common malignancies and represents a serious health problem.

In the theoretical part of the study we discussed the incidence of CRC in the Czech Republic and worldwide. According to the Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic, CRC is the second most common malignancy in the Czech Republic and the third most common malignancy worldwide. Higher incidence of colorectal cancer is found in males aged 65-79 years. We addressed the risk factors for the development of CRC after reviewing current available literature. A specific chapter of the study was dedicated to the possibilities of screening and description of the methods used. We addressed the staging of the disease and possible oncomarkers and biomarkers to determine prognosis and the best therapeutic approach. We classified CRC according to its etiology and location of primary origin. The possible theories of CRC development were also described in detail. We concluded the theoretical part of the study by reviewing the possible clinical features and therapeutic options in CRC.

We specifically focused on mucin-producing tumours and mucin itself, which is considered a negative predictive factor in mucin-producing tumours. In the experimental part of the study the selected mucin MUC13 and its axis with miRNA-4647 was investigated. Our clinical assays showed that MUC13 is associated with unfavourable disease prognosis, with the cells in our assays showing higher mitotic activity and migration ability. In contrast, the effect was opposite for miRNAs, with tumor cells with higher expression levels having lower migration ability and survival capacity.

The most important and compelling finding of the study was the effect of higher miR-4647 expression on the CRC patient survival, which has not yet been analysed to the best of our knowledge. Higher expression levels of miR-4647 in CRC are also associated with increased risk of death in patients with homozygous GG rs1532602 *MUC13* genotype. An important diagnostic tool in patients with gastrointestinal carcinomas may be the determination of serum levels of MUC13, which is released from the surface of tumor cells. *MUC13* and the *MUC13* – miRNA-4647 axis may hold a significant potential in screening, prognosis determination, and possible therapeutic intervention.

20. Legenda k obrázkům a tabulkám

Legends to Figures and Tables

Obrázek č. 1. Mapa zobrazující odhadované míry incidence standardizované podle věku (svět) v roce 2020 (poslední aktualizace), kolorektum, obě pohlaví, všechny věkové kategorie, převzato z <http://globocan.iarc.fr/> (GCO, 2021).

Figure 1. Map showing the estimated age-standardised incidence rates (worldwide) in 2020, colorectum, both sexes, all age categories, retrieved from <http://globocan.iarc.fr/> (GCO, 2021).

Obrázek č. 2. Vývoje incidence a mortality v čase v České republice. převzato ze [SVOD](#) (Dušek 2022).

Figure 2. Evolution of incidence and mortality over time in the Czech Republic, retrieved from [SVOD](#) (Dušek 2022).

Obrázek č. 3. Vývoj Indexu mortality/incidence v čase v České republice, převzato ze [SVOD](#) (Dušek 2022).

Figure 3. Evolution of the Mortality/Incidence Index over time in the Czech Republic, retrieved from [SVOD](#) (Dušek 2022).

Obrázek č. 4. Vývoj stádií kolorektální karcinomu v čase v České republice, převzato ze [SVOD](#) (Dušek 2022).

Figure 4. Evolution of colorectal cancer stages over time in the Czech Republic, retrieved from [SVOD](#) (Dušek 2022).

Obrázek č. 5. Incidence CRC v roce 2008 mezi jednotlivými státy, převzato ze [SVOD](#) (Dušek 2022).

Figure 5. Incidence of CRC in 2008 in different countries, retrieved from [SVOD](#) (Dušek 2022).

Obrázek č. 6. Incidence CRC v roce 2020 mezi jednotlivými státy, převzato z [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](#) (GCO, 2021).

Figure 6. Incidence of CRC in 2020 in different countries, retrieved from [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](#) (GCO, 2021).

Obrázek č. 7. Incidence/mortalita CRC v roce 2012 mezi jednotlivými oblastními celky, převzato z [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](#) (GCO, 2014).

Figure 7. Incidence/mortality of CRC in 2012 in different regional units, retrieved from [Global Cancer Observatory \(iarc.fr\)](#) (GCO, 2014).

Obrázek č. 8. Rozložení CRC dle věku – incidence, mortalita, převzato ze [SVOD](#) (Dušek 2022).

Figure 8. Distribution of CRC by age - incidence, mortality, retrieved from [SVOD](#) (Dušek 2022).

Obrázek č. 9. Rozložení CRC v populaci dle pohlaví a vývoje v čase, převzato ze [SVOD](#) (Dušek 2022).

Figure 9. Distribution of CRC in the population by sex and evolution over time, retrieved from [SVOD](#) (Dušek 2022).

Obrázek č. 10. Mapa znázorňující odhadované věkově standardizované míry úmrtnosti (svět) v roce 2020 (poslední aktualizace) na 100 000 CRC, kolorektum, obě pohlaví, všechny věkové kategorie, převzato z <http://globocan.iarc.fr/> (GCO, 2021).

Figure 10. Map showing the estimated age-standardised mortality rates (worldwide) in 2020 per 100,000 CRC, colorectum, both sexes, all age categories, retrieved from <http://globocan.iarc.fr/> (GCO, 2021).

Obrázek č. 11. Endoskopický náleznostenožujícího CRC (archiv autora).

Figure 11. Endoscopic presentation of stenosing CRC (personal archive of the author).

Obrázek č. 12. Stanley Cohen obdržel Nobelovu cenu za medicínu v roce 1986, za objev EGFR, převzato z <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1986/cohen/biographical/> (Nobelprize, 2022).

Figure 12. Stanley Cohen received the Nobel Prize in Medicine in 1986 for the discovery of EGFR, retrieved from <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1986/cohen/biographical/> (Nobelprize, 2022).

Obrázek č. 13. Vogelsteinův model vícečetné kolorektální neoplazie (označované jako adenoma–carcinoma sequence), převzato z Promoter Methylation Precedes Chromosomal Alterations in Colorectal Cancer Development, February 2006, [Cellular oncology: the official journal of the International Society for Cellular Oncology](#) 28(5-6):247-57, DOI:10.1155/2006/846251 (Derks 2016).

Figure 13. Vogelstein model of a step-wise progression colorectal neoplasia (referred to as adenoma-carcinoma sequence), retrieved from Promoter Methylation Precedes Chromosomal Alterations in Colorectal Cancer Development, February 2006, [Cellular oncology: the official journal of the International Society for Cellular Oncology](#) 28(5-6):247-57, DOI:10.1155/2006/846251 (Derks 2016).

Obrázek č. 14. Stenožující CRC sigmatu (archiv autora).

Figure 14. Stenosing CRC of the sigmoid colon (personal archive of the author).

Obrázek č. 15. Stenožující CRC sigmatu na rozstřiženém preparátu (archiv autora).

Figure 15. Stenosing CRC of the sigmoid colon in a sectioned specimen (personal archive of the author).

Obrázek č. 16. CRC na rozstřiženém preparátu po amputaci rekta (archiv autora).

Figure 16. CRC in a sectioned specimen after rectal amputation (personal archive of the author).

Obrázek č. 17. Neanatomická resekce jater pro metastázu CRC (archiv autora).

Figure 17 Non-anatomical liver resection for CRC metastasis (personal archive of the author).

Obrázek č. 18. Resekát metastázy CRC (archiv autora).

Figure 18. CRC metastasis resectate (personal archive of the author).

Obrázek č. 19. Grafické znázornění *in silico* predikované vazby miR-4647 v polymorfni sekvenci *MUC13* rs1532602.

Figure 19. Graphical representation of *in silico* predicted binding miR-4647 in polymorphic sequence of *MUC13* rs1532602.

Obrázek č. 20. Lidské ileum pozitivní na protein MUC13. Pohárkové buňky pozitivní na MUC13 se nachází na spodině střevních krypt ilea.

Figure 20. The positive human ileum for MUC13 protein. The goblet cell MUC13 positivity is present at the base of the intestinal crypts of the ileum.

Obrázek č. 21. Colon pozitivní na MUC13. Odlišná pozitivita MUC13-enterocytech v blízkosti lumen střeva a pohárkových buňkách v kryptách.

Figure 21. The positive human colon for MUC13. The MUC13 positivity is different – in enterocytes close to lumen of the intestine and in goblet cells of crypts.

Obrázek č. 22. Expres *MUC13* a související miRNA-4647 u pacientů s kolorektálním karcinomem (A) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni (B) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni, (celkem N=187), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Figure 22. Expression of *MUC13* and related miRNA-4647 in colorectal cancer patients (A) Expression of *MUC13* in tumor and non-malignant tissue (B) Expression of miR-4647 in tumor and non-malignant tissue, (Total N=187), * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Obrázek č. 23. Vyjádření korelace analyzovaných genů (A) Negativní korelace *MUC13* a miR-4647 v nádorové tkáni, (B) Negativní korelace *MUC13* a miR-4647 v nemaligní tkáni, (Celkem N=187).

Figure 23. Expression correlation of analyzed genes (A) Negative correlation of *MUC13* and miR-4647 in tumor tissue, (B) Negative correlation of *MUC13* and miR-4647 in non-malignant tissue, (Total N=187).

Obrázek č. 24. Rozdíl násobku změny ve vyjádření stupnice \log_2 *MUC13* a miR-4647

(A) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro tlusté střevo a konečník. (B) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro muže a ženy. (C) Expres *MUC13* v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro pacienty, kteří dostávají nebo nedostávají neoadjuvantní terapii. (D) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro tlusté střevo a konečník. (E) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro muže a ženy. (F) Expres miR-4647 v nádorové a nemaligní tkáni stratifikované pro pacienty, kteří dostávají nebo nedostávají neoadjuvantní terapii., (celkem N=187), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Figure 24. The fold change difference in the expression of the \log_2 scale of *MUC13* and miR-4647 (A) Expression of *MUC13* in tumor and non-malignant tissue stratified for colon and rectum. (B) Expression of *MUC13* in tumor and non-malignant tissue stratified for male and female. (C) Expression of *MUC13* in tumor and non-malignant tissue stratified for patients receiving or not receiving neoadjuvant therapy. (D) Expression of miR-4647 in tumor and non-malignant tissue stratified for colon and rectum. (E) Expression of miR-4647 in tumor and non-malignant tissue stratified for male and female. (F) Expression of miR-4647 in tumor and non-malignant tissue stratified for patients receiving or not receiving neoadjuvant therapy., (Total N=187), * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Obrázek č. 25. Kaplan-Meierovy OS křivky stratifikované pro vysokou a nízkou expresi pro (A) *MUC13* ($p=0,05$) (B) miR-4647 ($p=0,03$), (celkem N=187). Analýza přežití byla provedena pomocí log-rank testu a zobrazena do Kaplan-Meierových grafů.

Figure 25. Kaplan-Meier OS curves stratified for high and low expression for (A) *MUC13* ($p=0.05$) (B) miR-4647 ($p=0.03$), (Total N=187). Survival analysis was performed using the log-rank test and Kaplan-Meier plots approach.

Obrázek č. 26. Kaplan-Meierovy OS křivky stratifikované pro rs1532602 v *MUC13* u pacientů s CRC s (A) homozygotní genotyp GG ($p=0,04$), (B) heterozygotní genotyp GA, (C) homozygotní variantní genotyp AA. Analýza přežití byla provedena pomocí log-rank testu a zobrazena do Kaplan-Meierových grafů.

Figure 26. Kaplan-Meier OS curves stratified for rs1532602 in *MUC13* in CRC patients with (A) homozygous GG genotype ($p=0.04$), (B) heterozygous GA genotype, (C) homozygous variant AA genotype. Survival analysis was performed using the log-rank test and Kaplan-Meier plots approach.

Obrázek č. 27. Imunohistochemické barvení MUC13 v (A) nezhoubné ileum, (B) nezhoubné tlusté střevo, (C) nezhoubný konečník, (D) cytoplazma rakovinných buněk a (E) endoteliální rakovinné buňky. Obrázek z Ellipse softwaru rakovinných buněk pomocí metody počítání bodů, kde žluté body znamenají pozitivitu pro mucin 13, zelené body znamenají negativitu.

Figure 27. Immunohistochemical staining of MUC13 in (A) non-malignant ileum, (B) non-malignant colon, (C) non-malignant rectum, (D) cytoplasm of cancer cells and (E) endothelial cancer cells. Image from Ellipse software of cancer cells using the dot counting method, where yellow dots mean positivity for mucin 13, green dots mean negativity.

Obrázek č. 28. (A) Hladiny exprese IHC MUC13 v nádorové tkáni, (B) Hladiny exprese IHC MUC13 v nemalignní tkáni, (C) Kaplan-Meierovy křivky OS stratifikované pro vysoké a nízké hladiny exprese IHC MUC13 (celkem N=44).

Figure 28. (A) IHC expression levels of MUC13 in tumor tissue, (B) IHC expression levels of MUC13 in non-malignant tissue, (C) Kaplan-Meier OS curves stratified for high and low IHC MUC13 expression levels (Total N=44).

Obrázek č. 29. Stanovení transkribovaných alel *MUC13* v buněčné linii CRC HCT-116 a DLD-1, které prokázaly heterozygotní genotyp GA pro *MUC13* rs1532602.

Figure 29. Determination of MUC13 transcribed alleles in CRC cell line HCT-116 and DLD-1 evinced heterozygous GA genotype for MUC13 rs1532602.

Obrázek č. 30. Účinnost transfekce: Účinnost transfekce pomocí miR-4647 napodobuje v (C) DLD1 a (D) HCT116 buňkách. C) Western blot umlčení MUC13 pomocí miR-4647* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.

Figure 30. Transfection efficacy: Transfection efficacy by miR-4647 mimics in (A) DLD1 and (B) HCT-116 cells. (C) The Western blot of silenced MUC13 by miR-4647. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; all presented results are average of 3 independent experiments, Mann-Whitney test.

Obrázek č. 31. (A). Stupeň adenylát kinazy po miR-4647 zvýšené expresi v in DLD1 (B) HCT-116 cells * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NC kontrolní buňky; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.

Figure 31. (A) The adenylate kinase levels after miR-4647 over-expression in DLD1 (B) HCT-116 cells * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NC control cells; all presented results are average of 3 independent experiments, Mann-Whitney test.

Obrázek č. 32. Vliv nadměrné exprese miR-4647 na růst a invazní chování buněk CRC (A) Vliv nadměrné exprese miR na růst buněk DLD1 a (B) HCT116. (C) Invazivní chování nadměrné exprese miR na buňkách DLD1 a (B) HCT116. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NC kontrolní buňky; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.

Figure 32. Effect of over-expression of miR-4647 on growth and invasion behavior of CRC cells (A) The effect of miR over-expression on the DLD1 and (B) HCT116 cells growth. (C) Invasive behavior of miR over-expression on the DLD1 and (B) HCT116 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NC control cells; all presented results are average of 3 independent experiments, Mann-Whitney test.

Obrázek č. 33. Reprezentativní údaje z testů tvorby kolonií a migrace. (A) Reprezentativní obrázky z testu tvorby kolonií s a bez (ctrl) použití napodobenin miRNA, (B) Reprezentativní obrázky z testu migrace s a bez (ctrl) použití napodobenin miRNA, (C) Reprezentativní obrázky z test tvorby kolonií s a bez (ctrl) použití tlumiče MUC13.

Figure 33. Representative figures from colony forming and migration assays.(A) The representative pictures from colony forming assay with and without (ctrl) the use of miRNA mimics, (B) The representative pictures from migration assay with and without (ctrl) the use of miRNA mimics, (C) The representative pictures from colony forming assay with and without (ctrl) the use of MUC13 silencer.

Obrázek č. 34. Účinek umlčeného *MUC13* na růst a migraci buněk HCT116 (A) Kontrolní exprese *MUC13* po ztišení (B) The Western blot ztišení *MUC13*(C) (C) Vliv umlčení *MUC13* na růst buněk CRC. (D) Invazivní chování buněk po umlčení *MUC13*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NC kontrolní buňky; všechny prezentované výsledky jsou průměrem 3 nezávislých experimentů, Mann-Whitney test.

Figure 34. Effect of silenced *MUC13* on HCT116 cell growth and migration (A) The control expression of MUC13 after silencing (B) The Western blot of silenced *MUC13* (C)The effect of *MUC13* silencing on the CRC cells growth. (D) Invasive behavior of cells after *MUC13* silencing. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NC control cells; all presented results are average of 3 independent experiments, Mann-Whitney test.

Tabulka I. TNM klasifikace poslední 8. vydání (převzato z the Union for International Cancer Control; TNM staging (8th edition) classification for colon and rectal cancer) (UICC, 2017).

Table I. TNM classification. the latest 8th edition (Retrieved from UICC the Union for International Cancer Control; TNM staging (8th edition) classification for colon and rectal cancer) (UICC, 2017).

Tabulka II. Klinické charakteristiky pacientů.

Table II. Patient's clinical characteristics.

Tabulka III. Seznam validovaných testů TaqMan, referenčních genů, miRNA mimics a testů siRNA, které mají být použity jako referenční geny pro normalizaci dat.

Table III. List of validated TaqMan assays, reference genes, miRNA mimics and siRNA assays to be used as reference genes for data normalization.

Tabulka IV. Násobná změna v expresi analyzovaných genů.

Table IV. Fold change difference in expression of analyzed genes.

Tabulka V. Vztahy mezi zkoumanými proměnnými a přežitím hodnocené pomocí Spearmanovy korelace pro pacienty s kolorektálním karcinomem nesoucí homozygotní genotyp GG pro rs1532602 v genu *MUC13*.

Table V. The relationships between the examined variables and survival investigated using Spearman's correlation for colorectal cancer patients carrying homozygous GG genotype for rs1532602 in *MUC13* gene.

Tabulka VI. Charakteristika histologických řezů a mikroskopických obrazových polí reprezentujících každý vzorek kolorektálního nádoru použitý pro odhad parametrů.

Table VI. Characteristics of histological sections and microscopic image fields, representing each colorectal tumor sample used for estimating the parameters.

Tabulka VII. Plošná frakce MUC13 AA (plocha na plochu, bezrozměrný poměr; na základě imunohistochemické detekce) ve střevní stěně vzorků kolorektálního karcinomu. Kvantitativní histopatologie byla provedena pomocí stereologických metod a softwaru Ellipse.

Table VII. The area fraction of MUC13 AA (area per area, dimensionless ratio; on the base of immunohistochemical detection) within the intestine wall of colorectal tumor samples. Quantitative histopathology was done using stereological methods and the Ellipse software

21. Literatura

ADAM René, Eduardo BARROSO a kol. Impact of the type and modalities of preoperative chemotherapy on the outcome of liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol*. 2011 May, 29, 3519-3519. DOI:[10.1200/jco.2011.29.15_suppl.3519](https://doi.org/10.1200/jco.2011.29.15_suppl.3519).

AL-SOHAILY Sam, BIANKIN Andrew a kol. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012 Jun., 27(9):1423-31. DOI:[10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x).

ALLISON E. James, Lori C. SAKODA a kol. Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: Update on performance characteristics. *J Natl. Cancer Inst*. 2007 Oct., 99:1462–70. DOI: [10.1093/jnci/djm150](https://doi.org/10.1093/jnci/djm150).

ANDRE Thierry, Philippe COLIN a kol. Semimonthly versus monthly regimen of fluorouracil and leucovorin administered for 24 or 36 weeks as adjuvant therapy in stage II and III colon cancer: results of a randomized trial. *J Clin Oncol*. 2003 Aug., 21: 2896-2903. DOI: [10.1200/JCO.2003.10.065](https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.065).

AUGESTAD M. Knut a BABAKI M. Paul. Metastatic spread pattern after curative colorectal cancer surgery. A retrospective, longitudinal analysis. *Cancer Epidemiol*. 2015 Oct., 39(5):734-44. DOI: [10.1016/j.canep.2015.07.009](https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.07.009).

BABA Yoshifumi, Katsuhiko NOSHO a kol. Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2009 May, 11:418–425. DOI: [10.1593/neo.09154](https://doi.org/10.1593/neo.09154).

BALAGUER Francesc, Alexander LINK a kol. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010 Aug., 70(16): p. 6609-18. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-10-0622](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0622).

BANDRÉS Eva, Elena CUBEDO a kol. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006 Jul., 5: 29. doi: [10.1186/1476-4598-5-29](https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-29).

BASELGA José. Targeting the epidermal growth factor receptor with tyrosine kinase inhibitors: small molecules big hopes. *J Clin Oncol*. 2002 May, 1;20(9):2217-9. DOI: [10.1200/JCO.2002.20.9.2217](https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.9.2217).

BASSETT K. Julie, Gianluca SEVERI a kol. Body size, weight change, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2010 Nov., 19:2978–2986. DOI: [10.1158/1055-9965.EPI-10-0543](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0543).

BATES Beverley, Loma COX a kol. National Diet and Nutrition Survey: Results from Years 5 and 6 (combined) of the Rolling Programme (2012/2013–2013/2014). *Public Health England*. 2016 Sep., London, UK. Dostupné z: <https://assets.publishing.service.gov.uk>

BELHADJ Sami, Mariona TERRADAS a kol. Candidate genes for hereditary colorectal cancer: Mutational screening and systematic review. *Hum Mutat*. 2020 Sep., 41(9):1563-1576. DOI: [10.1002/humu.24057](https://doi.org/10.1002/humu.24057)

BEN Tran, Scott KOPETZ a kol. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011 Oct., 117:4623–4632. DOI: [10.1002/ncr.26086](https://doi.org/10.1002/ncr.26086).

BENEDIX Frank, Rainer KUBE a kol. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010 Jan., 53:57–64. DOI: [10.1007/DCR.0b013e3181c703a4](https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c703a4).

- BENOIST Stéphane, Antonie BROUQUET a kol. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol.* 2006 Aug., 24: 3939–3945. DOI: [10.1200/JCO.2006.05.8727](https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.8727).
- BENSON B Al a Alan P. VENOOK. Clinical Practical Guidelines in Oncology Rectal Cancer; version 01.2022. *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*. NCCN USA: 25.February 2012. 27.October [20.11.2022] Dostupné z: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf
- BERNARD Levin, David A.LIEBERMAN a kol. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* 2008 May-Jun., 58(3):130–60. DOI: [10.3322/CA.2007.0018](https://doi.org/10.3322/CA.2007.0018).
- BIAGI J. James, Michael J. Raphael a kol. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2011 Jun., 305: 2335–2342. DOI: [10.1001/jama.2011.749](https://doi.org/10.1001/jama.2011.749).
- BOGDAN Sven, Christian KLÄMBT. Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr Biol.* 2001 Apr., 11(8):R292-5. DOI: [10.1016/s0960-9822\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00167-1).
- BOSCH JW. Linda, Beatriz CARVALHO a kol. Molecular tests for colorectal cancer screening. *Clin Colorectal Cancer.* 2011 Mar, 10:8–23. DOI: [10.3816/CCC.2011.n.002](https://doi.org/10.3816/CCC.2011.n.002).
- BRAY Freddie, Jacques FERLAY a kol. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov., 68(6) 394–424. DOI: [10.3322/caac.21492](https://doi.org/10.3322/caac.21492).
- BRENNER Hermann, Matthias KLOOR a kol. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014 Apr., 383(9927): p. 490-1502. DOI: [10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).
- BROSENS A. Lodewijk, Danielle LANGEVELD a kol. Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol.* 2011 Nov., 28;17(44):4839-44.
- BROWN Jennifer, Charles ASUMENG Decreased colorectal cancer incidence and mortality in a diverse urban population with increased colonoscopy screening. *BMC Public Health.* 2021 Jun., 30;21(1):1280. doi: 10.1186/s12889-021-11330-6. DOI: [10.3748/wjg.v17.i44.4839](https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i44.4839)
- BUECHER Bruno. Colorectal adenomatous polyposis syndromes: Genetic determinism, clinical presentation and recommendations for care. *Bull Cancer.* 2016 Feb., 103(2):199–209. DOI: [10.1016/j.bulcan.2015.10.019](https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.10.019).
- BUJKO Kryszttof, Marek P. NOWACKI a kol. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg.* 2006 Oct., 93:1215–1223. DOI: [10.1002/bjs.5506](https://doi.org/10.1002/bjs.5506).
- CALVERT M. Paula, MD. Harold FRUCHT, The Genetics of Colorectal Cancer, *Annals of Internal Medicine.* 2002 Oct., Page: 603-612. Dostupné z: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-7-200210010-00012>
- CAYGILL P. Christine a Matthew J. HILL. Fish, n-3 fatty acids and human colorectal and breast cancer mortality. *Eur J Cancer Prev.* 1995 Aug., 4:329–32 DOI: [10.1097/00008469-199508000-00008](https://doi.org/10.1097/00008469-199508000-00008).
- CLINTON K. Steven, Edward L. GIOVANNUCCI a kol. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: Impact and Futura Directions. *J Nutr.* 2020 Apr., 1;150(4):663-671. DOI: [10.1093/jn/nxz268](https://doi.org/10.1093/jn/nxz268).

- COOK D. Alan, Richard SINGLE a kol. Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000. *Annals of Surgical Oncology*. 2005 Aug., 12(8):637-45. DOI: [10.1245/ASO.2005.06.012](https://doi.org/10.1245/ASO.2005.06.012).
- DAHLIN M. Anna, Richard Palmqvist a kol. The role of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. *Clin Cancer Res*. 2010 March, 16:1845–1855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2594>
- DE ROOCK Wendy, Derek J. JONKER a kol. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*. 2010 Oct., 304(16):1812-20. DOI: [10.1001/jama.2010.1535](https://doi.org/10.1001/jama.2010.1535).
- DESCH E. Christopher, Al B. BENSON a kol. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American society of clinical oncology practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Nov., 23(33):8512-9. DOI: [10.1200/JCO.2005.04.0063](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.0063).
- DETASSIS Simone, Margherita GRASSO a kol. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Front Cell Dev Biol*. 2017 Sep., 5: p. 86. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00086>
- DEVITA Vincent, Samuel HELLMAN a kol. *Cancer, Principles and Practice of Oncology (6th edition)*, USA, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001. 1216-1271 1. ISBN-13. 978-0781728072
- DERKS Sahar, Cindy POSTMA. Promoter Methylation Precedes Chromosomal Alterations in Colorectal Cancer Development. *Cellular oncology*. 2006 Feb., 28(5-6):247-57., DOI: [10.1155/2006/846251](https://doi.org/10.1155/2006/846251).
- DICKINSON T. Brandon, John KISIEL a kol. Molecular markers for colorectal cancer screening. *Gut*. 2015 Sep., 64(9):1485–1494. DOI: [10.1136/gutjnl-2014-308075](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308075).
- DIEHL Frank, Kerstin SCHMIDT a kol. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology*. 2008 Aug., 135:489–498. DOI: [10.1053/j.gastro.2008.05.039](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.039).
- DOLL Richard a Richard PETO. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*. 1981 Jun., 66:1191–1308. PMID: 7017215. [\[PubMed\]](#)
- DUAN Youlin, Takuji NARUSE a kol. Expression and functional analysis of hemopoietic progenitor antigen, NJ-1 (114/A10), in the megakaryocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec., 253(2): p. 401-6. DOI: [10.1006/bbrc.1998.9700](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9700).
- DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan a kol. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Verze 7.0, Masarykova univerzita, 2005-2022, [cit. 2022-11-27]. ISSN 1802 – 8861. Dostupné z <http://www.svod.cz>
- DUFFY J. Michael, Rolf LAMERZ a kol. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int J Cancer*. 2014 jun., 134:2513–2522. DOI: [10.1002/ijc.28384](https://doi.org/10.1002/ijc.28384).
- EISSING Marc, Lise RIPKEN a kol. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome and Immune Dysregulation. *Transl Oncol*. 2019 Feb., 12(2):361-367. doi: [10.1016/j.tranon.2018.11.003](https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.003).
- FEARON R. Eric a Bert VOGELSTEIN. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun., 61: 759–767. DOI: [10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i).

- FERLAY Jacques, Hai-Rim SHIN a kol. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010 Jun., 127,12, 2893–2917, Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- FLEMER Burkhardt, Denise B. LANCH a kol. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut*. 2017 Apr., 66(4):633-643. DOI: [10.1136/gutjnl-2015-309595](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309595).
- FOLKESSON Joakim, Helgi BIRGISSON a kol. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *J Clin Oncol*. 2005 Aug., 23:5644–5650. DOI: [10.1200/JCO.2005.08.144](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.144).
- GCO.fr. [online] *Global cancer observatory*. Lyon: Internation Agency for Research on Cancer, 2021, [cit. 2022-11-27]. Dostupné z <https://gco.iarc.fr>
- GLYNE-JONES Rob, Lucjan WYRWICZ a kol. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul., 1;28(4):22-40. DOI: [10.1093/annonc/mdx224](https://doi.org/10.1093/annonc/mdx224)
- GOLD Phil a Samuel O. FREEDMAN. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*. 1965 March., 121:439–462. DOI: [10.1084/jem.121.3.439](https://doi.org/10.1084/jem.121.3.439).
- GONSALVES I. Wilson, Michelle R. MAHONEY a kol. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *Natl Cancer Inst*. 2014 Jul., 106:dju106. DOI: [10.1093/jnci/dju106](https://doi.org/10.1093/jnci/dju106).
- GONZALEZ C. Eduardo, Richard G. ROETZHEIM a kol. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum*. 2001 Feb., 44:251–258. DOI: [10.1007/BF02234301](https://doi.org/10.1007/BF02234301).
- GORHAM D. Edward, Cedric F. GARLAND a kol. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J.Steroid Biochem Mol Biol*. 2005 Oct., 97:179–94. DOI: [10.1016/j.jsbmb.2005.06.018](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.06.018).
- GRANDY M. William, Colin C. PRITCHARD. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol*. 2014 Jan., 42:124–139. DOI: [10.1177/0192623313505155](https://doi.org/10.1177/0192623313505155).
- GUINNEY Justin, Rodrigo DIENSTMANN a kol. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov., 21:1350–1356. DOI: [10.1038/nm.3967](https://doi.org/10.1038/nm.3967).
- GUPTA K. Brij, Diane M. MAHER a kol. Increased expression and aberrant localization of mucin 13 in metastatic colon cancer. *J Histochem Cytochem*. 2012 Nov., 60(11): p. 822-31. DOI: [10.1369/0022155412460678](https://doi.org/10.1369/0022155412460678).
- GUPTA K. Brij, Diane M. MAHER a kol. Functions and regulation of MUC13 mucin in colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 2014 Oct., 49(10): p. 1378-91. DOI: [10.1007/s00535-013-0885-z](https://doi.org/10.1007/s00535-013-0885-z).
- GUPTA Samir, Bijal A. BALASUBRAMANIAN a kol. Polyps with advanced neoplasia are smaller in the right than in the left colon: implications for colorectal cancer screening. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012 Dec., 10:1395–1401, e1392. DOI: [10.1016/j.cgh.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.07.004).
- HAMPEL Heather. Population Screening for Hereditary Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Apr., 27(2):319-325. DOI: [10.1016/j.soc.2017.11.006](https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.006).
- HANSEN O. Iben, Per JESS. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J*. 2012 Jun., 59:A4444. PMID: 22677242 [[PubMed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22677242/)]
- HEALD J. Richard a Nariman D. KARANJIA. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg*. 1992 Sep., 16:848–857. DOI: [10.1007/BF02066981](https://doi.org/10.1007/BF02066981).

HILL J. Micah, Andrew J. TAYLOR a kol. Fecal steroids and urinary volatile phenols in four Scandinavian populations. *Nutr Cancer* 1982 Aug., 4(1):67-73. DOI: [10.1080/01635588209513740](https://doi.org/10.1080/01635588209513740).

HOFHEINZ R. Dieter, Frederik WENZ a kol. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jun., 13: 579-588. DOI: [10.1016/S1470-2045\(12\)70116-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70116-X).

HOLDENRIEDER Stefan, Petra STIEBER a kol. Cytokeratin serum biomarkers in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2012 May., 32:1971–1976. PMID: 22593474 [[PubMed](#)]

HU Xu-Rui, Chunwei XU a kol. Correlation between mismatch-repair protein expression and clinicopathologic features in 658 colorectal cancers. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2018 Nov., 08;47(11):827-833. DOI: [10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.11.003](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.11.003).

HUELS J. David, SANSOM J. Owen. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *British Journal of Cancer.* 2015 Jun., 30;113(1):1-5. DOI: [10.1038/bjc.2015.214](https://doi.org/10.1038/bjc.2015.214)

HUYGHE R. Jeroen, Stephanie A. BIEN a kol. Discovery of common and rare genetic risk variants for colorectal cancer. *Nat Genet.* 2019 Jan., 51(1):76-87. DOI: [10.1038/s41588-018-0286-6](https://doi.org/10.1038/s41588-018-0286-6).

CHANG Li-Chun, WU Ming-Shiang a kol. Metabolic syndrome and smoking may justify earlier colorectal cancer screening in men. *Gastrointest Endosc.* 2014 Jun., 79:961–969. DOI: [10.1016/j.gie.2013.11.035](https://doi.org/10.1016/j.gie.2013.11.035).

CHARIFA Ahmad, Radia T. JAMIL a kol. *Gardner Syndrome*. Treasure Island (FL). StatPearl. Publikováno: Jun 27, 2022 Bookshelf ID: [NBK482342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29493967/). PMID: [29493967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29493967/).

CHATURVEDI Pallavi, Ajay P. SINGH a kol. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Mar., 68(7): p. 2065-70. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-07-6041](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6041).

CHAUHAN C. Subhash, Kelley VANNATTA a kol. Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2009 Feb., 69(3): p. 765-74. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-08-0587](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0587).

CHAUHAN C- Subhash, Mara C. EBELING a kol. MUC13 mucin augments pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jan., 11(1): p. 24-33. DOI: [10.1158/1535-7163.MCT-11-0598](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0598).

CHEN Dong-Liang, De-Shen WANG a kol. Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2013 Apr., 34(4): p. 803-11. DOI: [10.1093/carcin/bgs400](https://doi.org/10.1093/carcin/bgs400).

CHEN – Chih Chen, Yang Shung – HAU a kol. Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res.* 2005 Apr., 124:169–174. DOI: [10.1016/j.jss.2004.08.013](https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.08.013).

CHEN Tao, Shi-Lun CAI a kol. Mecp2-mediated Epigenetic Silencing of miR-137 Contributes to Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence and Tumor Progression via Relieving the Suppression of c-Met. *Sci Rep.* 2017 March, 7: p. 44543. DOI: [10.1038/srep44543](https://doi.org/10.1038/srep44543).

CHOTI A. Michael, James V. SITZMANN a kol. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg.* 2002 Jun., 235: 759-766. DOI: [10.1097/00000658-200206000-00002](https://doi.org/10.1097/00000658-200206000-00002).

CHUNG Philip a James V. FLESHMAN. The Genetics of Sporadic Colon Cancer *Seminars in Colon and Rectal Surgery.* 2004, Sep., 15, 3, 128-135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.scrs.2005.02.001>

IACOPETTA Barry. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer.* 2002 Oct., 101:403–408. DOI: [10.1002/ijc.10635](https://doi.org/10.1002/ijc.10635).

- INOUE Manami, Mitsuhiro NODA a kol. Impact of metabolic factors on subsequent cancer risk: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Eur J Cancer Prev.* 2009 Jun., 18:240–7. DOI: [10.1097/CEJ.0b013e3283240460](https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283240460)
- INOUE Masayoshi, Mitsunori OHTA a kol. Benefits of surgery for patients with pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2004 Jul., 78: 238–244. DOI: [10.1016/j.athoracsur.2004.02.017](https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.02.017).
- JASS R Jeremy. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007 Jan., 50, 1, 113-130. DOI: [10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x).
- JOHNSON H. Caroline, Christine M. DEJEA a kol. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab.* 2015 Jun., 21:891–897. DOI: [10.1016/j.cmet.2015.04.011](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.011)
- JOHNSON H. David, John B. KISIEL a kol. Multitarget stool DNA test: clinical performance and impact on yield and quality of colonoscopy for colorectal cancer screening. *Gastrointestinal Endoscopy.* 2017 March, 85, 3, 657-665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gie.2016.11.012>
- JONCKHEERE Nicolas, Nicolas SKRYPE a kol. Mucins and tumor resistance chemotherapeutic drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug., 1846(1): 142-51. DOI: [10.1016/j.bbcan.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.008).
- KARETENSEN Gásdal John, Johan BURISH a kol. Colorectal Cancer in Individuals With Familial Adenomatous Polyposis, Based on Analysis of the Danish Polyposis Registry. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Oct., 17(11):2294-2300. DOI: [10.1016/j.cgh.2019.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.02.008).
- KARSA von Lawrence, PATNICK Juliette a kol. European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: overview and introduction to the full supplement publication. *Endoscopy.* 2013 Dec., 45(1):51–59. DOI: [10.1055/s-0032-1325997](https://doi.org/10.1055/s-0032-1325997).
- KAWAMOTO Tomoyuki, Denry J. SATO a kol. Growth stimulation of A431 cells by EGF: identification of high affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983 March., 80, 1337-1341 DOI: [10.1073/pnas.80.5.1337](https://doi.org/10.1073/pnas.80.5.1337).
- KHAN Sheema, Mara C. EBELING a kol. MicroRNA-145 targets MUC13 and suppresses growth and invasion of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2014 Sep., 5(17): 7599-609. DOI: [10.18632/oncotarget.2281](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2281).
- KIKUCHI Ryoko, Masashi TAKANO a kol. Management of early invasive colorectal cancer. Risk of recurrence and clinical guidelines. *Dis Colon Rectum.* 1995 Dec., 38: 1286-1295 DOI: [10.1007/BF02049154](https://doi.org/10.1007/BF02049154).
- KIM Tae-Won, Je-Hwan LEE a kol. Randomized trial of postoperative adjuvant therapy in Stage II and III rectal cancer to define the optimal sequence of chemotherapy and radiotherapy: 10-year follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Nov., 81: 1025–1031. DOI: [10.1016/j.ijrobp.2010.07.012](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.07.012)
- KISS Igor a kol. *Modrá kniha České onkologické společnosti*, Aktualizace: 28, Brno: Masarykův onkologický ústav, 1. 3. 2022. ISBN 978-80-86793-53-5. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/>.
- KOGA Yoshikatsu, Masahiro YASUNAGA a kol. Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis. *Cancer Sci.* 2008 Oct., 99:1977–1983. DOI: [10.1111/j.1349-7006.2008.00954.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00954.x).
- KOO Jenn Hian a Rupert WL LEONG. Sex differences in epidemiological, clinical and pathological characteristics of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Jan., 25:33–42. DOI: [10.1111/j.1440-1746.2009.05992.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05992.x).

- KOOK E. James, Charles G. MOERTELa kol. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Mar., 324: 709–715 DOI: [10.1056/NEJM199103143241101](https://doi.org/10.1056/NEJM199103143241101).
- KOSAMI Masami, Gen FUJII a kol. Prevention and intervention trials for colorectal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2013 Jul. 43, 7:685–94. DOI: [10.1093/jjco/hyt053](https://doi.org/10.1093/jjco/hyt053).
- KOSS Konrad, David MAXTON a kol. Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention. *Colorectal Dis*. 2008 March, 10:244–248. DOI: [10.1111/j.1463-1318.2007.01334.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2007.01334.x).
- KŘÍŽKOVÁ Věra, Magdalena DUBOVÁ a kol. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Sep. 78(3): p. 595-603. DOI: [10.1007/s00280-016-3114-7](https://doi.org/10.1007/s00280-016-3114-7).
- KUFE W. Donald. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009 Dec., 9(12): 874–885. DOI: [10.1038/nrc2761](https://doi.org/10.1038/nrc2761).
- KUIPERS J. Ernst a Antina de JONG. Gastrointestinal disorders and Streptococcus bovis bacteremia] gastro-intestinale aandoeningen en Streptococcus bovis-bacteriëmie. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1990 Jul., 134(28):1337–1339. [\[PubMed\]](#)
- LABIANCA Roberto, Bernard NORDLINGER a kol. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May, 21 Suppl 5:v70–77. DOI: [10.1093/annonc/mdq168](https://doi.org/10.1093/annonc/mdq168).
- LANGAN C. Russell, John E. MULLINAX a kol. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *J Cancer*. 2013 March, 4:241–250. DOI: [10.7150/jca.5832](https://doi.org/10.7150/jca.5832).
- LAURIOLA Mattia, Giampaolo UGALINI a kol. Identification by a Digital Gene Expression Displayer (DGED) and test by RT-PCR analysis of new mRNA candidate markers for colorectal cancer in peripheral blood. *Int J Oncol*. 2010 Aug., 37(2): p. 519-25. DOI: [10.3892/ijo.00000701](https://doi.org/10.3892/ijo.00000701).
- LEE Jasmine, Yin-Yi XIAO a kol. Prevalence and characteristics of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome in immigrant Asian colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2017 Dec., 13;17(1):843. DOI: [10.1186/s12885-017-3799-y](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3799-y).
- LECH Gustaw, Robert SIOTWINSKI a kol. The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma*. 2014 Feb., 61:1–8. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24195503/>
- LEPAGE Patricia, Philippe SEKSIK a kol. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 May., 11:473–480. DOI: [10.1097/01.mib.0000159662.62651.06](https://doi.org/10.1097/01.mib.0000159662.62651.06).
- LEVÝ Miroslav, Vladimír VISOKAI a kol. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2008 Feb., 55:138–142. PMID: 18237252 [\[PubMed\]](#)
- LIANG Li, Xianzheng LI a kol. MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2. *Gastroenterology*. 2013 Mar., 144(3): p. 624-635 e4. DOI: [10.1053/j.gastro.2012.11.033](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.11.033).
- LIN S. Jennifer, Margaret A. PIPER a kol. Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2016 Jun., 315(23):2576–2594. DOI: [10.1001/jama.2016.3332](https://doi.org/10.1001/jama.2016.3332)
- LIN S. Jennifer, Leslie A. PERDUE a kol. *Screening for Colorectal Cancer: An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force*. Rockville (MD). Agency for Healthcare Research and Quality US. 2021 May. Report No.: 20-05271-EF-1. Bookshelf ID: [NBK570913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39111113/).

- LINDEN K. Sara, Phillip SUTTON a kol. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 2008 May, 1(3): p. 183-97. DOI: [10.1038/mi.2008.5](https://doi.org/10.1038/mi.2008.5).
- LIVAK J. Kenneth a Thomad D. SCHIMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec., 25(4): p. 402-8. DOI: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
- LOCKER Y. Gershon, Stanley HAMILTON a kol. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Nov., 24:5313-5327. DOI: [10.1200/JCO.2006.08.2644](https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.2644).
- LORENTZEN A. Jon, Krzyszof GRZYB, et al. Oncogene mutations in colorectal polyps identified in the Norwegian colorectal cancer prevention (NORCCAP) screening study. *Clin Med Insights Pathol.* 2016 Sep., 9:19-28. DOI: [10.4137/CPath.s40143](https://doi.org/10.4137/CPath.s40143).
- LYNCH T. Henry, Patrice WATSON a kol. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum.* 1988 Jun., 31:439-444. DOI: [10.1007/BF02552613](https://doi.org/10.1007/BF02552613).
- MARKOWITZ D. Sanford, Monica M. BERTAGNOLLI. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009 Dec., 361:2449-2460. DOI: [10.1056/NEJMra0804588](https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588)
- MCGUCKIN A. Michael, Sara K. Lindén a kol. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Mar., 9(4): p. 265-78. DOI: [10.1038/nrmicro2538](https://doi.org/10.1038/nrmicro2538).
- MEADE Richard. *An Introduction to the History of General Surgery.* Philadelphia. W.B. Saunders. 1968 January, 261-90. ISBN-13: 978-0721662350.
- MEGUID A. Robert, Mark B. SLIDELL a kol. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol.* 2008 Sep., 15:2388-2394. DOI: [10.1245/s10434-008-0015y](https://doi.org/10.1245/s10434-008-0015y).
- MEYERS Mark, Mark W. WAGNER a kol. Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res.* 2001 Jun., 61:5193-5201. PMID: 11431359. [\[PubMed\]](#)
- MISSIAGLIA Edoardo, Bart JACOBS a kol. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Onco.* 2014 Oct., 25:1995-2001. DOI: [10.1093/annonc/mdu275](https://doi.org/10.1093/annonc/mdu275).
- MUZNY M. Donna a BAINBRIDGE N. Matthew. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *The Cancer Genome Atlas Network. Nature.* 2012 Jul., 487:330-337. DOI: [10.1038/nature11252](https://doi.org/10.1038/nature11252)
- NARAYANAN Vilvopathy, Maikel P. PEPPELENBOSH a kol. Human fecal microbiome-based biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014 Nov., 7(11):1108-1111. DOI: [10.1158/1940-6207.CAPR-14-0273](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0273)
- NEUMANN Jens a Evelyn ZEINDL-EBERHART. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2009 Aug., 205(12):858-62. DOI: [10.1016/j.prp.2009.07.010](https://doi.org/10.1016/j.prp.2009.07.010)
- NICOLINI Andrea, Paola FERRARI a kol. Intensive risk-adjusted follow-up with the CEA, TPA, CA19.9, and CA72.4 tumor marker panel and abdominal ultrasonography to diagnose operable colorectal cancer recurrences: effect on survival. *Arch Surg.* 2010, Dec., 145:1177-1183. DOI: [10.1001/archsurg.2010.251](https://doi.org/10.1001/archsurg.2010.251).

- NOBELPRIZE. org. [online] *Stanley Cohen*. Stockholm. The Nobel Foundation. 2022. [cit. 2022-11-27]. Dostupné z <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1986/cohen/biographical/>
- PACKER M. Leisl, Stephanie J. WILLIAMS a kol. Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas. *Int J Oncol*. 2004 Oct., 25(4):1119-26. PMID: 15375564. dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15375564/>
- PANG Xiangyi, Benjie XU a kol. Real-world survival of colon cancer after radical surgery: A single-institutional retrospective analysis. *Front. Oncol*. 2022, Sep., 12:914076. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.914076>.
- PEAKE Mick. Cancer by deprivation in England: Incidence, 1996-2010, Mortality, 1997-2011. *CRUK/NCIN London*. 2014. Dostupné z: <http://www.cancerresearchuk.org>
- PILARSKI Robert. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns*. 2009 Feb., 18(1):13-27. DOI: [10.1007/s10897-008-9187-7](https://doi.org/10.1007/s10897-008-9187-7)
- POPAT Sanjay a Richard HUBNER. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005 Jan., 23:609–618. DOI: [10.1200/JCO.2005.01.086](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.086)
- POPAT Sanjay a Richard S. HOULSTON. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2005 Sep., 41:2060–2070. DOI: [10.1016/j.ejca.2005.04.039](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.039)
- POPAT Sanjay, Dongbing ZHAO a kol. Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: a prospective, blinded analysis of 280 patients. *Anticancer Res*. 2007 Jan-Feb., 27:627–633. PMID: 17348452 [[PubMed](#)]
- PORKKA Noora, Laura LAHTINEN a kol. Epidemiological, clinical and molecular characterization of Lynch-like syndrome: A population-based study. *Int J Cancer*. 2019 Jul., 01;145(1):87-98. DOI: [10.1002/ijc.32085](https://doi.org/10.1002/ijc.32085).
- QUIRKE Phil, Robert STEELE a kol. NCRI Colorectal Cancer Study Group Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet*. 2009 March, 373:821–828. DOI: [10.1016/S0140-6736\(09\)60485-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60485-2)
- RABENECK Linda, Han-Mo CHIU a kol. International Perspective on the Burden of Colorectal Cancer and Public Health Effects. *Commentary*. 2020 Jan., 158,2,P447-452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.10.007>
- ROTH D. Arnaud a Sabine TEJPAR. Stage-specific prognostic value of molecular markers in colon cancer: Results of the translational study on the PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2009 May, 27, 15, 4002. DOI: [10.1200/jco.2009.27.15_suppl.4002](https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.15_suppl.4002).
- ROTH D. Arnaud, Sabine TEJPAR a kol. 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 60-00trial. *J Clin Oncol*. 2010 Jan., 28:466–474. DOI: [10.1200/JCO.2009.23.3452](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.3452).
- ROTHWELL M. Peter, Michelle WILSON a kol. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010 Nov., 376:1741–50. DOI: [10.1016/S0140-6736\(10\)61543-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61543-7).
- RUPAIMOOLE Rajesha a Frank J. SLACK, MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Mar., 16(3): p. 203-222. DOI: [10.1038/nrd.2016.246](https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246).

- SANSOM J. Owen a Inke NÄTHKE. *Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer*. Importance of the Niche: Wnt signaling and stem cell plasticity in intestinal homeostasis and disease. 2013 Jun., pp 107–120. ISBN: 978-1-4614-8412-7 DOI: [10.1007/978-1-4614-8412-7_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8412-7_4).
- SASAKI Osamu, Wendy S. ATKIN a kol. *Histopathology*. Mucinous carcinoma of the rectum. 1987 Mar., 11:259–72. DOI: [10.1111/j.1365-2559.1987.tb02631.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1987.tb02631.x).
- SAUER Rolf, Heinz BECKER a kol. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct., 351: 1731–1740. DOI: [10.1056/NEJMoa040694](https://doi.org/10.1056/NEJMoa040694).
- SEIFERT A. Bruce, Jennifer MCGLAUGHON a kol. Determining the clinical validity of hereditary colorectal cancer and polyposis susceptibility genes using the Clinical Genome Resource Clinical Validity Framework. *Genet Med*. 2019 Jul., 21(7):1507-1516. DOI: [10.1038/s41436-018-0373-1](https://doi.org/10.1038/s41436-018-0373-1).
- SENAPATI Shantibhusan, DAS Srustidhar a kol. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends Biochem Sci*. 2010 Apr., 35(4): p. 236-45. DOI: [10.1016/j.tibs.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.003).
- SENGUPTA Shreya, Sayantan BOSES. Peutz-Jeghers Syndrome. *N Engl J Med*. 2019 Jan., 31;380(5):472. DOI: [10.1056/NEJMicm1806623](https://doi.org/10.1056/NEJMicm1806623).
- SETTLEMAN Jeff. Predicting response to HER2 kinase inhibition. *Oncotarget*. 2015 Jan., 6(2): p. 588-9. DOI: [10.18632/oncotarget.3036](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3036).
- SGOURAKIS George, Sophocles LANITIS a kol. Transanal endoscopic microsurgery for T1 and T2 rectal cancers: a meta-analysis and meta-regression analysis of outcomes. *Am Surg*. 2011 Jun., 77: 761-772 PMID: 21679648. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21679648/>
- SHENG H. Yonghua, Yun-Long HE a kol. MUC13 protects colorectal cancer cells from death by activating the NF-kappaB pathway and is a potential therapeutic target. *Oncogene*. 2017 Feb., 36(5): p. 700-713. DOI: [10.1038/onc.2016.241](https://doi.org/10.1038/onc.2016.241).
- SHENG H. Yonghua, Rohan LOURIE a kol. The MUC13 cell-surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis. *Gut*. 2011 Dec., 60(12): p. 1661-70. DOI: [10.1136/gut.2011.239194](https://doi.org/10.1136/gut.2011.239194).
- SHENG H. Yonghua, S TRIYANA a kol. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal Immunol*. 2013 May, 6(3): p. 557-68. DOI: [10.1038/mi.2012.98](https://doi.org/10.1038/mi.2012.98).
- SHENG H. Yonghua, Choa P. Ng. MUC13 overexpression in renal cell carcinoma plays a central role in tumor progression and drug resistance. *Int J Cancer*. 2017 Feb. 140(10): p. 2351-2363. DOI: [10.1002/ijc.30651](https://doi.org/10.1002/ijc.30651).
- SCHELL J. Michael, Mingli YANG a kol. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nat Commun*. 2016 Jun., 7:11743. DOI: [10.1038/ncomms11743](https://doi.org/10.1038/ncomms11743).
- SCHIERBECK Julliane, Tine VESTERGAARD, et al. Skin Cancer Associated Genodermatoses: A Literature Review. *Acta Derm Venereol*. 2019 Apr., 01;99(4):360-369. DOI: [10.2340/00015555-3123](https://doi.org/10.2340/00015555-3123).
- SHIMAMURA Takahiro, Hirotaka ITO a kol. Overexpression of MUC13 is associated with intestinal-type gastric cancer. *Cancer Sci*. 2005 May, 96(5): p. 265-73. DOI: [10.1111/j.1349-7006.2005.00043.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00043.x)
- SCHMID Daniela a Michael F. LEITZMANN. Association between physical activity and mortality among breast cancer and colorectal cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2014 Jul., 25:1293–311. DOI: [10.1093/annonc/mdu012](https://doi.org/10.1093/annonc/mdu012).

- SCHMOLL H. Joachim, Eric VAN CUSTEM a kol. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012 Oct., 23(10):2479-2516. DOI: [10.1093/annonc/mds236](https://doi.org/10.1093/annonc/mds236)
- SCHOENWOLF C. Gary, Steven B. BLEYL a kol. *Larsen's Human Embryology*, 5th edition. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2015. ISBN-13. 978-1455706846. Dostupné z: <https://evolve.elsevier.com/>
- SCHRANG Deborah, Shicheng WENG a kol. The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2016 May., 15, 34. DOI:[10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3505](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3505).
- SCHÜTZE Madlen, Heiner BOEING a kol. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ.* 2011 Apr., 342:d1584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bmj.d1584>
- SINICROPE A. Frank, Nathan R. FOSTER a kol. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-Fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jun., 103: 863-875. DOI: [10.1093/jnci/djr153](https://doi.org/10.1093/jnci/djr153).
- SMITH R. Amber, Rebecca T. MARQUEZ a kol. Tumor suppressive microRNA-137 negatively regulates Musashi-1 and colorectal cancer progression. *Oncotarget.* 2015 May, 6(14): p. 12558-73. DOI: [10.18632/oncotarget.3726](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3726).
- SNOVER C. Dale. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2011 Jan., 42 (1) pp. 1-10. DOI: [10.1016/j.humpath.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.002).
- SRYSKER J Steven, Bruce G. WOLF a kol. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology.* 1987 Nov., 93:p. 1009–13. DOI: [10.1016/0016-5085\(87\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90563-4).
- STERZING Florian, Thomas B. BRUNNER a kol. Stereotactic body radiotherapy for liver tumors: principles and practical guidelines of the DEGRO Working Group on Stereotactic Radiotherapy. *Strahlenther Onkol.* 2014 Oct., 190:872–881. DOI: [10.1007/s00066-014-0714-1](https://doi.org/10.1007/s00066-014-0714-1).
- STEWART L. Sherri, Jennife M. WIKE a kol. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States 1998-2001. *Cancer.* 2006 Sep., 107: 1128–41. DOI: [10.1002/cncr.22010](https://doi.org/10.1002/cncr.22010).
- SUMA S. Krupa a Vadakkepat MIRMALA. Mucinous component in colorectal carcinoma – prognostic significance: a study in a south Indian population. *J Surg Oncol.* 1992 Sep., 51:60–4. DOI: [10.1002/jso.2930510115](https://doi.org/10.1002/jso.2930510115).
- SUNG Hyuna, Rebecca L SIEGEL a kol. Emerging cancer trends among young adults in the USA: analysis of a population-based cancer registry. *Lancet Public Health.* 2019 March, 4(3):e137-e147. DOI: [10.1016/S2468-2667\(18\)30267-6](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30267-6).
- SUTCLIFFE G Erin, Amanda BARTENBAKER THOMPSON a kol. Multi-gene panel testing confirms phenotypic variability in MUTYH-Associated Polyposis. *Fam Cancer.* 2019 Apr., 18(2):203-209. DOI: [10.1007/s10689-018-00116-2](https://doi.org/10.1007/s10689-018-00116-2).
- TARANCÓN – DIEZ Mariá a Reinhard BÜTTNER. Enhanced Tumoral MLH1-Expression in MLH1-/PMS2-Deficient Colon Cancer Is Indicative of Sporadic Colon Cancer and Not HNPCC. *Pathol Oncol Res.* 2020 Jul., 26(3):1435-1439. DOI: [10.1007/s12253-018-00571-3](https://doi.org/10.1007/s12253-018-00571-3).
- TEJPAR Sabina, Monica BERTAGNOLLI a kol. Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. *Oncologist.* 2010 March, 15:390–404. DOI: [10.1634/theoncologist.2009-0233](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0233).

- THIERY P. Jean. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer*. 2002 Jun., 2:442–454. DOI: [10.1038/nrc822](https://doi.org/10.1038/nrc822).
- THIRUNAVUKARASU Pragatheeshwar, Shyamsunder SUKUMAR, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Apr., 103:689–697. DOI: [10.1093/jnci/djr078](https://doi.org/10.1093/jnci/djr078).
- THOMASSEN Irene, Yvette R. van GESTEL a kol. Incidence, prognosis, and treatment options for patients with synchronous peritoneal carcinomatosis and liver metastases from colorectal origin. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2013 Dec., 56(12):1373-80. DOI: [10.1097/DCR.0b013e3182a62d9d](https://doi.org/10.1097/DCR.0b013e3182a62d9d).
- TORRE A. Lindsey, Freddie BRAY a kol. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 March, 65(2):87–108. DOI: [10.3322/caac.21262](https://doi.org/10.3322/caac.21262).
- TOURNIGAND Christophe, Thierry ANDRÉ a kol. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A Randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan., 15,22(2): 229–237. DOI: [10.1200/JCO.2004.05.113](https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.113).
- UICC.org. [online]. *TNM classification*. TNM staging (8th edition) classification for colon and rectal cancer. Geneva: UIC, Global cancer control, 2017 Jan., [2022-11-27]. Dostupné z: <https://www.uicc.org/>
- UPPARA Mallikarjuna, Franklin ADABA a kol. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of pyruvate kinase M2 isoenzymatic assay in diagnosing colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2015 Feb., 13:48. DOI: [10.1186/s12957-015-0446-4](https://doi.org/10.1186/s12957-015-0446-4).
- ÚZIS.cz [online]. *Novotvary*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistik., 2018, [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>
- VALLE Laura, Eduardo VILARa kol. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol*. 2019 Apr., ;247(5):574-588. DOI: [10.1002/path.5229](https://doi.org/10.1002/path.5229).
- VAN GIJN Willem, Corrie A. M. MARIJNEN a kol. Colorectal Cancer Group Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol*. 2011 Jun., 12:575–582. DOI: [10.1016/S1470-2045\(11\)70097-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70097-3).
- VENTURI Marco, Rebecca J. Hambly a kol. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis*. 1997 Dec., 18:2353–2359. DOI: [10.1093/carcin/18.12.2353](https://doi.org/10.1093/carcin/18.12.2353).
- VERMEER D. Paola, Lisa A. EINWALTER a kol. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature*. 2003 March, 422:322–326. DOI: [10.1038/nature01440](https://doi.org/10.1038/nature01440).
- VODENKOVA Soňa, Tomáš BÜCHLER a kol. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*. 2020 Feb., 206:107447. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2019.107447](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447)
- VYMETÁLKOVÁ Veronika, Barbara PARDINI a kol. Polymorphisms in microRNA binding sites of mucin genes as predictors of clinical outcome in colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*. 2017 Jan., 38(1): p. 28-39. DOI: [10.1093/carcin/bgw114](https://doi.org/10.1093/carcin/bgw114).
- WALSH D. Michael, Joanne P. YOUNG et al., The MUC13 cell surface mucin is highly expressed by human colorectal carcinomas. *Hum Pathol*. 2007 Jun., 38(6): p. 883-92. DOI: [10.1016/j.humpath.2006.11.020](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.11.020).

WANATABE Tadashi, Tony T. WU a kol. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001 Apr., 344:1196–1206. DOI: [10.1056/NEJM200104193441603](https://doi.org/10.1056/NEJM200104193441603).

WEE Ping a Zhixianf WANG. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017 May, 17;9(5):52. DOI: [10.3390/cancers9050052](https://doi.org/10.3390/cancers9050052)

WEISSENBERGER Cchristian, Georg von PLEHN a kol. Adjuvant radiochemotherapy of stage II and III rectal adenocarcinoma: role of CEA and CA 19-9. *Anticancer Res*. 2005 Jun., 25:1787–1793. PMID: 16033101. [[PubMed](#)]

WILLIAMS J. Stephanie, Daniel H. WRESCHER a kol. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem*. 2001 May, 276(21): p. 18327-36. DOI: [10.1074/jbc.M008850200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008850200).

WHITE Alan a kol. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*. 2018 Sep., 20, 18 (1): 906. DOI: [10.1186/s12885-018-4786-7](https://doi.org/10.1186/s12885-018-4786-7).

WIEDUWILT J. Matthew a Mark M. MOASSER. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008 May, 65(10):1566-84. DOI: [10.1007/s00018-008-7440-8](https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8).

WITTER Kirsti, Zbyněk TONAR a kol. Tissue reaction to three different types of tissue glues in an experimental aorta dissection model: a quantitative approach. *Histochem Cell Biol*. 2010 Feb., 133(2): p. 241-59. DOI: [10.1007/s00418-009-0656-3](https://doi.org/10.1007/s00418-009-0656-3).

WU Yu, Xiaoxiong HAO a kol. Genetic polymorphisms in miRNAs and susceptibility to colorectal cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Jan., 71,271,8. DOI: [10.1007/s12013-014-0195-y](https://doi.org/10.1007/s12013-014-0195-y).

YIN Daixin, Cyllene R. MORRIS a kol. Effect of misclassified underlying cause of death on survival estimates of colon and rectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Jun., 103(14) 1130–3. DOI: [10.1093/jnci/djr207](https://doi.org/10.1093/jnci/djr207)

ZEMAN Miroslav a Zdeněk KRŠKA. *Speciální Chirurgie*, Praha, Galén 2014. ISBN 978-80-7492-128-5.

ZHANG Kejin, Jesse CIVAN a kol. Genetic variations in colorectal cancer risk and clinical outcome. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr., 20:4167–77. DOI: [10.3748/wjg.v20.i15.4167](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4167).

22. Seznam zkratek

AKT (PKB)	Protein kinase B
ANOVA	Analysis of variance
APC	Adenomatous polyposis coli
AV ČR	Akademie věd České republiky
BMI	Body mass index
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
CA	Cancer antigen
CAPOX	Capecitabine, oxaliplatin
CEA	Carcinoma embryonic antigen
CIMP	CpG Island Methylated Phenotype
CMS	Consensus molecular subtypes
CRC	Colorectal cancer
CT	Computed tomography
CYFRA	Cytokeratin 19 Fragment
ČR	Česká republika
DCC	Deleted in colon cancer
dMMR	Deficient mismatch repair
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ErbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene
ERBB3	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERUS	Endorectal ultrasound
FAP	Familial adenomatous polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FIT	Fecal immunochemical test for hemoglobin

FOBTs	Fecal occult blood tests
FOLFIRI	5-fluorouracil, irinotekan, leukovorin
FOLFIRINOX	5-fluorouracil, leukovorin, oxaliplatin, irinotekan
FOLFOX	5-fluorouracil, oxaliplatin, leukovorin (infusion)
FU/FA	5-fluorouracil + leukovorin
gFOBT	Guaiac fecal occult blood test
GWAS	Genome-wide association study
Gy	Grey
G13D	Mutation Cys13Asp
Hb	Hemoglobin
HCT, DLD, HT, SW	The colorectal cancer cell lines
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HPCC	Hereditary polyposis colorectal cancer
IHC	Imunohistochemia
JAK	Janus kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LC-CRT	Long-Course radiation therapy
LV	Leukovarin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MiRNA, miRs	Micro RNA
MMP	Microsatellite mutator pheotype
MRI	Magnetic resonance imaging
MSI	Microsatellite instability
MSI-H	Microsatellite instability-high
MSI-L	Microsatellite instability-low
MSS	Microsatellite Stable
MT-sDNA	Multitarget stool DNA
MUC	Mucin
MWA	Microwave ablation
M2-PK	M2 izoform-puryvat kinase
NCCN	National Comprehensive Cancer Networ

NIH	National Institute of Health
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OS	Overall survival
P	p-value or significance
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positron emission tomography
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
R	Residual tumor
RFA	Radiofrequency ablation
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RTr	Reverse transcription
SBRT	Stereotactic body radiation therapy
SC-RT	Short-course radiation therapy
SEA	S13 Erythroblastosis (Avian) Oncogene Homolog
SMAD	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
sRNA (siRNA)	small RNA
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SVOD	Sytém pro Vizualizaci Onkologických Dat
TAAAs	Tumor associated antigens
TEM	Transanal endoscopic microsurgery
TIMP1	Tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1
TME	Total mesorectal excision
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha

TNM	Tumor, Nodes, Metastasized
TPA	Tissue polypeptide antigen
TPS	Tissue polypeptide specific antigen
TP53	Tumor protein p53
UICC	Union for International Cancer Control
UK	United Kingdom
UNG	Uracil N-Glycosylase
USA	United States of America
ÚZIS	Ústav zdravotníckých informáci a statistiky
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGR	Vascular endothelial growth receptor
XELIRI	Kaprecitabin, irinotekan
3'UTRs	Three prime untranslated region
5-FU	5-fluorouracil
ρ	Spearman's rho

23. Publikační činnost a grant

23.1. Publikační činnost

SOJKA Ladislav, Alena OPATTOVÁ, Linda BÁRTU, Josek HORÁK, Vlasta KORENKOVÁ, Věra KŘÍŽKOVÁ, Jan BRUHA Václav LIŠKA, Michaela SCHNEIDEROVÁ, Ondřej KUBEČEK, Ludmila VODIČKOVÁ, Markéta URBANOVÁ, Jaromír ŠIMŠA, Pavel VODIČKA a Ludmila VODIČKOVÁ. The *MUC13*-miRNA-4647 axis in colorectal cancer: prospects to identifications of risk factors and clinical outcomes. *Oncology Letters*. 2022

TOMASOVÁ Kristýna, Michal KROUPA, Alžběta ZINKOVÁ, Marie KORABECNÁ, Veronika VYMETALKOVÁ, Pavel ŠKROBÁNEK, **Ladislav SOJKA**, Miroslav LEVÝ, Kari HEMMINKI, Václav LIŠKA, Petr HOŠEK, Rajiv KUMAR, Ludmila VODIČKOVÁ a Pavel VODIČKA. Monitoring of telomere dynamics in peripheral blood leukocytes in relation to colorectal cancer, patients' outcomes. *Frontiers in Oncology*. 2022 Sep., 12, 962929. DOI: 10.3389/fonc.2022.962929.

LEVÝ Miroslav, Ludmila LIPSKÁ, **Ladislav SOJKA**, Jaromír ŠIMŠA a Vladimír VISOKAI. Impact of Postoperative Septic Complications on Recurrence of Colorectal Cancer. *Surg. Gastroenterol. Oncol.* 2017, Dec., 22(4), 313-317. DOI: 10.21614/sgo-22-4-313.

23.2. Grant

Experimentální část práce byla podpořena grantem Národní vědecké nadace 22-05942S, Rada pro výzkum zdravotnictví MZ ČR NV19-09-00237, v rámci programu Cooperatio, výzkumná oblast „Onkologie a hematologie“; LX22NPO5102 Národní ústav pro výzkum rakoviny a podle programu Cooperatio výzkumná oblast SURG (JB, VL, LV, PV) a oblast výzkumu MED/DIAG (VKr).