

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



**PREDIKTIVNÍ A PROGNOSTICKÉ FAKTORY
NÁDORU ŽALUDKU**

**PREDICTIVE and PROGNOSTIC FACTORS OF
GASTRIC CANCER**

Autoreferát disertační práce

MUDr. David Šmíd

Plzeň 2016

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného postgraduálního studia na Chirurgické klinice Lékařské fakulty v Plzni.

Uchazeč: MUDr. David Šmíd
chirurgická klinika
Lékařská fakulta v Plzni

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Skalický, Ph.D.
Chirurgická klinika FN a LF v Plzni

Oponenti: Doc. MUDr. Jaromír Šimša Ph.D.
chirurgická klinika FTN v Praze
Prof. MUDr. Zdeněk Kala CSc.
chirurgická klinika LF MU a FN Brno Bohunice

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu chirurgie se koná dne:

Místo obhajoby: Chirurgická klinika, FN Plzeň, Aula, Alej svobody 80,
Plzeň 32300

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty v Plzni
Univerzity Karlovy v Praze, Husova 3, Plzeň, 30100.

Prof. MUDr. Vladislav Třeška, Dr.Sc.
předseda komise pro obhajobu disertačních prací v oboru chirurgie
Chirurgická klinika FN a LF UK v Plzni

Obsah:

Obsah

Úvod	4
Cíle projektu	7
Pracovní hypotéza	9
Metodika	13
Soubor nemocných:	13
Tkáňové vzorky:	14
Izolace	15
Kvantifikace exprese protein kódujících genů	15
Kvantifikace exprese mikroRNA	16
Statistické zpracování:	17
Výsledky	19
Zhodnocení prediktivního významu genové exprese	19
Zhodnocení prognostického významu genové exprese	21
Stanovení mikroRNA z tkáňových vzorků	22
Zhodnocení prognostického významu mikroRNA	22
Zhodnocení prediktivního významu mikroRNA	26
Možnosti využití mikroRNA pro časnou detekci	31
kancerogeneze	31
Diskuze	33
Závěr	40
Seznam použitých zkratk	41
Literatura	42
Souhrn	48
Summary	51

Úvod

Karcinom žaludku je maligní onemocnění, které dlouhodobě a celosvětově patří mezi nejčastější nádorová onemocnění postihující člověka. Nejčastější výskyt tohoto onemocnění se dlouhodobě udává v Japonsku, v Číně, v zemích Jižní Ameriky a ve východní Evropě. Naopak dlouhodobý mírný pokles výskytu karcinomu žaludku pozorujeme ve vyspělých zemích, jako jsou Spojené Státy Americké, západní a střední Evropa. Neustále však platí, že tímto onemocněním trpí více muži než ženy a to v poměru 2:1. Četnost výskytu tohoto onemocnění v populaci je závislá na věku, nárůst incidence je přímo úměrný pokročilosti věku nemocného. Ze statistiky vyplývá, že nejvyšší výskyt karcinomu žaludku je u lidí v sedmém decenniu života, naopak vzácný je výskyt u lidí pod 30 let. V roce 2011 byla v české Republice průměrná incidence karcinomu žaludku 14,7 onemocnění na 100 000 obyvatel, ve skupině obyvatel mezi 70. a 84. rokem života je udávaná incidence 68,2 případu na 100 000 obyvatel. Dlouhodobě však platí, že většina onemocnění je diagnostikována ve 4. stádiu nemoci, což významně prognózu nemocných. Prognóza pacientů s karcinomem žaludku je nejvíce ovlivněna pokročilostí onemocnění. U časného karcinomu žaludku se pětileté přežití nemocných pohybuje v rozmezí 60 – 90 %, oproti tomu pětileté přežití nemocných s pokročilým karcinomem žaludku se udává mezi 5 – 20%. [1–6]

Velkým problémem u karcinomu žaludku je dlouhé bezpříznakové období nemoci, což je často příčinou pozdní diagnostiky. V Evropě ani v USA zatím neexistuje účinný screeningový program. Z tohoto důvodu je diagnostika časných stádií nemoci spíše náhodná nebo je výsledkem výborné práce gastroenterologů u rizikových skupin lidí. V současné době probíhají studie, které se zabývají využitím různých tkáňových markerů, které by

mohly sloužit jako indikátor časně kancerogeneze u rizikových nemocných a tím bychom mohli odlišit nemocné s maligním onemocněním od nemocných s benigním onemocněním. [7] Aktuálně je základním a nejdůležitějším nástrojem na poli diagnostiky endoskopické vyšetření horní části zažívacího traktu – esofagogastroduodenoskopie. Samozřejmě součástí endoskopického vyšetření je odběr tkáně pro následné histopatologické vyšetření. [8]

Základním předpokladem úspěšné léčby karcinomu žaludku je provedení radikálního chirurgického zákroku s dosažením R0 resekce, bez kterého je léčba vždy paliativní. V současné době s ohledem na onkologickou radikalitu přichází v úvahu jen tři operační zákroky: totální gastrektomie, subtotální gastrektomie, resekce distálního jícnu a kardie. Součástí všech výkonů je minimálně lymfadenektomie v compartmentu D1. Bohužel díky pozdní diagnostice pokročilého stádia onemocnění je většina nemocných léčena paliativně. U řady nemocných je nádor inoperabilní, což je dáno lokální pokročilostí s prorůstáním do okolních struktur, což může být technicky limitující. Další příčinou neprovedení radikálního zákroku je přítomnost vzdálených metastáz, která se zjistí až v průběhu operace, velmi často se jedná o peritoneální rozsev či přítomnost jaterních metastáz. [1,4,5]

U některých nemocných, v závislosti na celkovém stavu a přítomnosti komorbidit, je indikována paliativní onkologická léčba. Onkologická léčba může být v podobě chemoterapie či konkomitantní chemoradioterapie. Dále je často indikována onkologická léčba u nemocných po chirurgickém zákroku. Benefit nemocného z podání chemoterapie byl prokázán řadou klinických studií. [8–10] Z dlouhodobého pozorování však můžeme říci, že se různí léčebný efekt podané chemoterapie u nemocných, kterým je podána stejná léčba, mají stejný typ nádoru a jsou ve stejném stádiu nemoci. Příčinou tohoto rozdílu může být různá exprese vybraných genů v ponechané nádorové tkáni, které se podílejí

na mechanismu účinku chemoterapeutika. Přestože byla publikována celá řada studií, které se zabývaly touto problematikou u jiných nádorů člověka, není doposud znám jednoznačný vztah mezi genovou expresí vybraných genů a léčebným efektem podané chemoterapie u karcinomu žaludku. [11–17]

Cíle projektu

Projekt se zabývá stanovením prediktivních markerů pro léčebný efekt chemoterapie u nemocných s karcinomem žaludku. Dále zkoumá prognostické faktory karcinomu žaludku.

Projekt má několik cílů:

1. Hlavním cílem projektu je stanovení prediktivního významu genové exprese vybraných genů v nádorové tkáni a předpovědi léčebného efektu chemoterapie u nemocných s karcinomem žaludku. Jedná se o vybrané geny: Thymidylate synthasa (TS), breast cancer type I. (BRCA1), excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) a ERBB2 (původní název erythroblastic leucemia viral oncogene homolog 2, synonymem je také HER2 – human epidermal growth factor receptor 2).
2. Současně zhodnotíme případný prognostický význam exprese námi sledovaných genů u nemocných s karcinomem žaludku.
3. Druhým hlavním cílem projektu je ověřit možnost stanovení mikroRNA (miR) z tkáňových vzorků, které byly použity pro stanovení vlastní histopatologické diagnózy. Jedná se o formalinem fixované a parafínem zalité vzorky tkáně, které byly odebrány při endoskopickém vyšetření nemocného.
4. Pokud se prokáže možnost stanovení mikroRNA z nádorové tkáně, ověříme možnost stanovení mikroRNA v nádorové tkáni jako prognostický faktor u nemocných s karcinomem žaludku.
5. Shodně jako u genové exprese zhodnotíme také možnost využití mikroRNA v nádorové tkáni jako prediktivní faktor léčebné odpovědi chemoterapie u nemocných s karcinomem žaludku.

6. Dalším cílem projektu je zjistit, zda existuje možnost využití stanovení některé miR jako marker pro časný záchyt vzniku karcinomu žaludku.

Pracovní hypotéza

Hlavním cílem projektu je zjistit vzájemný vztah hladiny genové exprese vybraných genů a chemorezistenci nádoru k podané léčbě. Cílem je zhodnotit prediktivní význam exprese vybraného genu k příslušnému cytostatiku. Stanovení genové exprese musí proběhnout přímo z nádorové tkáně a vzorek musí být snadno dostupný, aby nedocházelo k zatížení nemocného. V rámci běžného diagnosticko-terapeutického algoritmu se provádí nemocným s podezřením na karcinom žaludku endoskopické vyšetření horní části zažívacího traktu a zcela rutinně se odebírají vzorky tkáně pro bioptické vyšetření. Vzorky se standardně fixují formalinem a následně jsou zalité parafinem do bločků pro následné histologické zpracování. Poté se z takto připravených bločků krájí mikrotomem tenké řezy, které se fixují želatinou na podložní sklička. Následně se tkáňové vzorky obarví příslušnou metodikou (nejčastěji hematoxilin eosin) pro potřebu patologa, který vzorek tkáně odečte a stanoví definitivní diagnózu. [18]

Aktuálně jsme schopni z formalinem fixovaných a do parafinu zalitých vzorků stanovovat exprese vybraných genů a také je možno stanovovat hladiny jednotlivých mikroRNA. Díky tomu nedochází k další zátěži nemocného, protože tyto vzorky tkáně jsou rutinně odebírány v rámci vyšetřovacího protokolu.

Z literárních údajů je patrné, že u některých nádorů byl prokázán prediktivní význam genové exprese níže uvedených genů k příslušnému cytostatiku: Thymidylate synthasa (TS) – predikce efektu 5 – fluorouracilu a capecitabinu, breast cancer type I. (BRCA1) – predikce efektu epirubicinů, excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) – predikce efektu platinových derivátů, ERBB2 (původní název erythroblastic leucemia viral oncogene homolog 2, synonymem je také HER2 – human epidermal grow

factor receptor 2) – predikce efektu pro antracykliny. [11,12,14–17,19–21] Předpokládáme tedy, že vysoká exprese uvedených genů bude ukazovat na chemorezistenci vůči příslušnému cytostatiku. Důkazem této chemorezistence bude i přes podanou léčbu rychlá progresse nemoci a kratší celkové přežití nemocných s vysokou expresí příslušného genu. Pokud by se tento předpoklad potvrdil, mohli bychom na podkladě stanovení genové exprese odlišit nemocné, kteří budou profitovat z podané chemoterapie. Nemocné, u kterých se na podkladě vyšetření efekt chemoterapie očekávat nedá, nebudeme zatěžovat neúčinnou chemoterapií, která povede jen ke zhoršení kvality života. [22–25] Současně bychom také snížili celkové náklady na drahou, onkologickou léčbu.

Publikované studie a námi provedený experiment jasně dokazují, že buňky primárního karcinomu (např. nemalobuněčného karcinomu plic, prostaty) mají odlišné fenotypové vlastnosti od buněk, které vycestovaly z primárního nádoru a staly se podkladem pro vznik vzdálené metastázy. [19,26–29] Díky této skutečnosti se pacienti rozdělují z praktického pohledu do dvou skupin.

1. Operovaní nemocní: skupina nemocných, u kterých byl primární nádor odstraněn, ať již radikálně či paliativně. U těchto nemocných cílí podaná chemoterapie na reziduální nádorové buňky, které jsou vycestované do cévního nebo lymfatického systému. Je tedy předpoklad, že tyto buňky budou mít jiné fenotypové vlastnosti než buňky primárního nádoru. Genová exprese v buňkách resekátu by mohla být odlišná než je v ponechaných buňkách v těle nemocného a vyšetření by nám nemuselo poskytnout relevantní informace.
2. Neoperovaní nemocní: primární nádor je ponechán v těle nemocného, podaná chemoterapie tedy cílí zejména na primární

nádor. Vyšetření genové exprese probíhá ze vzorku tkáně, který byl odebrán přímo z primárního tumoru a poskytuje tedy relevantní informace, podle kterých bychom mohli určovat indikaci k chemoterapii.

Z tohoto důvodu, jsme náš experiment omezili na paliativně léčené nemocné, prokazujeme tedy prediktivní vliv genové exprese na léčebný efekt paliativně podané chemoterapie u nemocných s karcinomem žaludku.

Ostatní cíle projektu se zabývají možností stanovení mikroRNA z formalinem fixovaných a parafínem zalitých tkáňových vzorků a následného využití mikroRNA. Pokud se ověří možnost jednoduchého stanovení miRNA z běžných histologických vzorků, jako je tomu u stanovení genové exprese, budeme ověřovat možnost využití některých mikroRNA jako prediktorů léčebného efektu chemoterapie. Protože mikroRNA vycestovávají z buněčného jádra do cytoplazmy, kde interagují s molekulami mRNA konkrétních genů a podle stupně komplementarity tuto RNA buď inhibují, nebo degradují a tím snižují výslednou hladinu proteinů, které jsou kódovány příslušným genem. Protože mezi regulovanými geny jsou jak tumor-supresorové geny tak onkogeny, ale i geny podílející se na reparaci DNA, proto se mikroRNA podílí jak na kancerogenezi tak na účinku léčby. Z tohoto důvodu mohou být některé mikroRNA použity jako prediktory léčebného efektu, jiné mohou být použity jako prognostické faktory a některé mohou být použity jako markery záchytu časně kancerogeneze. [30–38] MikroRNA jsou velmi malé molekuly, které snadno pronikají do tělních tekutin, tedy i do periferní krve. Periferní krev je snadno přístupná k odběru a mikroRNA tak mohou být snadno stanovovány u

vybraných nemocných. Z tohoto důvodu se od mikroRNA očekává v budoucnu velký diagnostický potenciál. [39–41]

Metodika

Experiment byl naplánovaný jako retrospektivní studie.

Soubor nemocných:

Od roku 2000 se v naší nemocnici rutinně používá klinický informační systém, který obsahuje všechna data pacientů. Díky uchovávání dat v elektronické podobě je možné kdykoliv dohledat jakákoliv data od pacientů. Na podkladě této skutečnosti jsme zvolili časové období a vyhledali všechny nemocné s karcinomem žaludku, kteří prošli naším komplexním onkologickým centrem od 1. ledna 2000 do 30. června 2013. V uvedeném období prošlo naším pracovištěm necelých 1300 nemocných s karcinomem žaludku. Spádová oblast našeho onkologického centra zahrnuje celý Západočeský kraj a část Karlovarského a Jihočeského kraje, tedy asi 1 milion obyvatel. Pravdou je, že někteří nemocní z Karlovarského kraje jsou léčeni v Praze a někteří nemocní z Jihočeského kraje jsou léčeni v Českých Budějovicích. Vstupní kritéria pro zařazení nemocného do studie byla určena takto:

- 1) pacient s histologicky verifikovaným karcinomem žaludku
- 2) pacient bez resekcčního výkonu pro karcinom žaludku
- 3) pacient, kterému byla podána paliativní chemoterapie
- 4) pacient, u kterého je dostupný tkáňový vzorek (parafinový bloček)
- 5) pacient s dokumentací, která obsahuje všechna potřebná data

Z uvedeného počtu, tedy necelých 1300 nemocných, splnilo vstupní kritéria pouze 54 nemocných, které jsme zařadili do studie (N=54). U všech nemocných bylo dle pravidel TNM klasifikace určeno klinické stádium onemocnění, všichni nemocní byli shodně ve 4. stádiu nemoci. [42] Diagnóza u všech nemocných byla ověřena histopatologickým vyšetřením,

kteře bylo provedeno dle zvyklých standardů. Všichni nemocní byli léčeni a sledováni dle doporučení České onkologické společnosti, která vyplývají z mezinárodních doporučených postupů ESMO. [9,43,44]

Tkáňové vzorky:

V rámci diagnosticko-léčebného procesu u nemocných s podezřením na karcinom žaludku se zcela rutinně odebírají gastrokopicky vzorky tkáně pro následné histologicko-patologické vyšetření, které je základem pro stanovení vlastní diagnózy karcinomu žaludku. Dle běžných standardů se odebrané tkáňové (bioptické) vzorky fixují v roztoku Formalinu (10% roztok formaldehydu). Fixace tkáně formalinem zajistí okamžité zablokování autolytických procesů díky změně konfigurace bílkovin. Protože v případě biopsie žaludeční sliznice se jedná o malé, několika mm vzorky, zpracovávají se tyto tkáňové kousky celé. Dalším krokem zpracování vzorku tkáně je odstranění vody ze tkání, k tomu se používá řízená lázeň ve vzestupné řadě alkoholů. Na konci této řady, po stoprocentním alkoholu, je xylen. Poté je tkáň zalita horkým parafinem, který nahradí xylen a vytvoří tak definitivní parafinový bloček, ve kterém se tkáň uchovává pro následné zpracování. Z takto vyrobených parafinových bločků se poté mikrotomem krájí tenké, 4-5um tlusté řezy, které jsou poté nalepeny želatinou na podložní sklo. Následuje opětovná hydratace tkáně, k tomu slouží řízená lázeň v sestupné řadě alkoholů, což je vlastně opačný proces, který byl použit dříve. Tímto způsobem připravené tkáňové řezy se potom obarví vhodnou metodikou, nejčastěji Hematoxylin-Eozinem. Obarvené řezy je nutné opět odvodit pomocí vzestupné řady alkoholů. Odvodněné řezy se zalijí montovacím médiem (Kanadský balzám, Solakryl) a přikryjí se krycím sklem. Takto připravené histologické preparáty je možné potom pomocí mikroskopu odečítat a hodnotit. Vlastní stanovení histopatologické diagnózy provádí patolog. Takto vyrobené

histologické preparáty na sklíčkách, ale i tkáňové vzorky v parafinových bločcích se uchovávají řadu let v patologických archivech. [18]

Pro potřebu našeho experimentu jsme vyhledali parafinové bločky obsahující tkáň pacientů, které jsme podle vstupních kritérií zařadili do studie.

Izolace

Celková RNA (včetně mikroRNA) byla izolována z 10 um sekcí získaných makrodisekcí na mikrotomu z tkáňe zalité v bločcích (FFPE). Makrodisekcí byla izolována jak nádorová tak nenádorová tkáň a to dle odpovídajících oblastí vyznačených patologem na hematoxylin – eozinových preparátech, které byly na sklíčkách. Z takto získaných vzorků nádorové a nenádorové tkáňe byla pomocí soupravy miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) izolována celková RNA.

Kvantifikace exprese protein kódujících genů

Kvantifikace exprese na úrovni mRNA vybraných genů (BRCA 1, ERCC1, RRM1 a TS) byla provedena pomocí metody real-time RT-PCR a specifických LNA sond z tzv. UPL knihovny, která byla zakoupena od firmy ROCHE (Roche, Mannheim, Německo). Reverzní transkripce byla provedena z 50 ng celkové RNA pomocí reverzní transkriptázy Superscript III (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Jako primery byly použity náhodné hexamery. Nukleotidové sekvence primerů a odpovídajících sond UPL knihovny byly získány pomocí programu ProbeFinder (Roche) a jsou uvedeny v tabulce 1. Primery byly syntetizovány firmou East Port Praha (Praha, Česká republika).

U všech vzorků byla stanovena také exprese referenčních genů glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) a hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferázy (HPRT). Protože exprese HPRT byla velice nízká mimo jiné z důvodu malých výtěžků RNA izolované z bločků (jednalo se o

velice malý kousek tkáně) nebylo možno měřit genovou exprese HPRT ve všech vzorcích. Proto jsme jako referenční gen použili pouze GAPDH.

Kvantifikace exprese mikroRNA

Kvantifikace exprese vybraných mikroRNA byla provedena pomocí RT real-time PCR s použitím metodiky TaqMan MicroRNA. Stanovovali jsme pouze zralé (maturované) miRNA, nikoli jejich prekurzory. Jako referenční gen jsme použili RNU6B (U6snRNA). Seznam stanovovaných mikroRNA ukazuje tabulka č. 8. Zpracování výsledků získaných metodou real-time PCR. Všechny vzorky byly stanoveny v technických replikátech. Pro odstranění možných rozdílů mezi jednotlivými stanoveními na přístroji Stratagene Mx3000P real-time PCR (Agilent Technologies, CA, Spojené státy), byly hodnoty Ct (hodnota fluorescence křižující base-line) zkorigovány pomocí kalibrátorů. V případě neshody technických duplikátů, byl vzorek opakován. Výsledky jsou prezentovány jako normalizovaných hodnot, tzn. jako je poměr počtu kopií stanovovaného genu a referenčního genu. Pro získání dat genové exprese jsme použili postup ddCt ($2^{-\Delta\Delta CT}$ algoritmus).

Tabulka č.1 – seznam stanovovaných mikroRNA

název	miRBase accession number
miR-15b	MIMAT0000417
miR-16	MIMAT0000069
miR-21	MIMAT0000076
miR-27a	MIMAT0000084
miR-34a	MIMAT0000255
miR-99a	MIMAT0004511
miR-101	MIMAT0000099
miR-106a	MIMAT0000103
miR-107	MIMAT0000104

miR-141	MIMAT0000432
miR-143	MIMAT0000435
miR-145	MIMAT0000435
miR-150	MIMAT0000451
miR-181b	MIMAT0000257
miR192	MIMAT0000222
miR-193-3p	MIMAT0000459
miR-202	MIMAT0002811
miR-206	MIMAT0000462
miR-211	MIMAT0000268
miR-218	MIMAT0000275
miR-221	MIMAT0000278
miR-222	MIMAT0000279
miR-224	MIMAT0000281
miR-342-3p	MIMAT0000753
miR-375	MIMAT0000728
miR-509-3p	MIMAT0002881
miR-575	MIMAT0002881
miR-520h	MIMAT0002867
miR-372-3p	MIMAT0000724

Statistické zpracování:

Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí softwaru SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistické výsledky byly vypočteny pomocí Wilcoxonova neparametrického jednovýběrového párového testu. Pro maximální Hazard Ratio (overall survivor, time to progression) byl použit Coxův regresní model proporcionálních rizik. Pro nalezení nejlepšího „cut off“, které je dáno nejlepší hodnotou p-value byl použit log-rank test.

Z výsledků byly pro hodnocení celkového přežití a času do progresu onemocnění na podkladě výsledků log – rank testu vygenerovány Kaplan-Meierovy křivky u nemocných v jednotlivých skupinách i podskupinách. Kompletní statistické zpracování výsledků včetně komentáře hodnotící výstupy pro praxi provedl statistik.

Výsledky

Zhodnocení prediktivního významu genové exprese

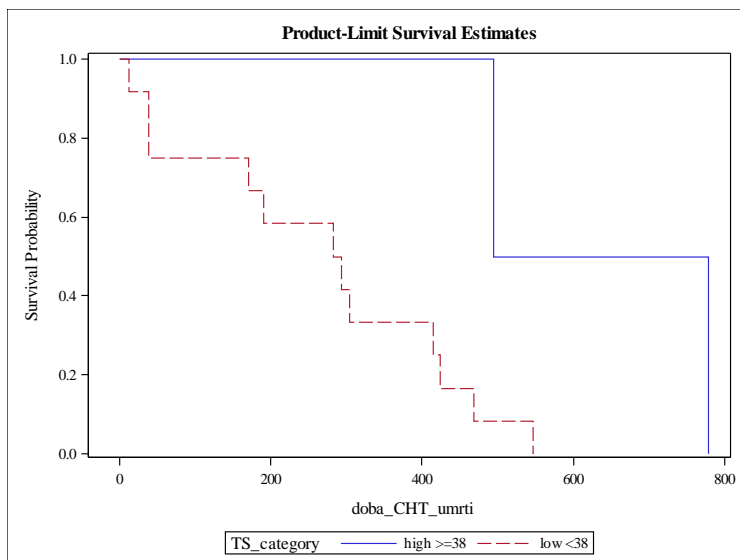
Hlavní cílem projektu bylo stanovit genovou expresi vybraných genů v nádorové tkáni a následně zhodnotit, zda je možné využít toto stanovení jako prediktivní faktor léčebného efektu podané chemoterapie. Dle zvolené metodiky jsme ze všech vzorků tumorózní tkáně kvantifikovali genovou expresi námi sledovaných genů. Kompletní výsledky kvantifikace jednotlivých genů jsou uvedeny v příloze. Pro verifikaci našeho stanovení jsme současně s námi sledovanými geny stanovovali shodně ze všech vzorků také geny kontrolní. Jako referenční geny jsme zvolili HPRT1 (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) a GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Díky omezenému množství tkáně nebylo možné vždy kvantifikovat expresi všech námi sledovaných genů. Také pro omezené množství tkáně v histologickém vzorku nebylo možné stanovit správně všechny sledované geny. Tato skutečnost je dána malým objemem odebírané tkáně při endoskopickém vyšetření.

Získané výsledky jsme dali do vzájemné souvislosti s klinickými daty od pacientů a hledali jsme vzájemný vztah. Hodnotili jsme celkové přežití nemocných (OS – overall survival) a čas do progresse onemocnění (TTP – time to progression).

Nemocné jsme rozdělili do skupin podle složení cyklů podané chemoterapie a podle podaného chemoterapeutika jsme přiřadili vybraný gen, od kterého se dle literárních údajů dá očekávat prediktivní význam. Dle doporučení České onkologické společnosti, která vycházejí z doporučení ESMO se využívají trojkombinace chemoterapeutik v uvedených cyklech chemoterapie. Více o možnostech onkologické léčby v teoretické části práce. [43] V naší skupině nemocných je nejčastěji použitým chemoterapeutikem a

tedy i největší skupinu tvoří nemocní, kterým byl podáván 5-fluorouracil nebo capecitabin (N=51). V této skupině jsme hledali vzájemný vztah 5-fluorouracil (capecitabin) vs gen thymidylate synthasy (TS). Podařilo se nám prokázat prediktivní význam genu thymidylate synthasy pro léčebný efekt 5-fluorouracilu nebo capecitabinu (Hazard ratio <0,001, Coxův univariate model 0,0524, p-value 0,0545). Grafické znázornění ukazuje obrázek č.1. Druhým nejčastěji využívaným chemoterapeutikem je platina, resp. deriváty platiny (N=18). V této skupině jsme hledali prediktivní význam pro gen ERCC1. Prediktivní význam exprese tohoto genu jsme neprokázali. Další méně často využívaná chemoterapeutika jsou rubiciny (N=8) a antracykliny (N=1). Z důvodu nízké četnosti využití je skupina nemocných malá a nelze z tohoto počtu stanovení udělat statisticky významný závěr, na kterém bychom mohli stavět naše tvrzení. Z tohoto důvodu se nemůžeme vyjádřit k vzájemnému prediktivnímu významu genů BRCA1 a ERBB2.

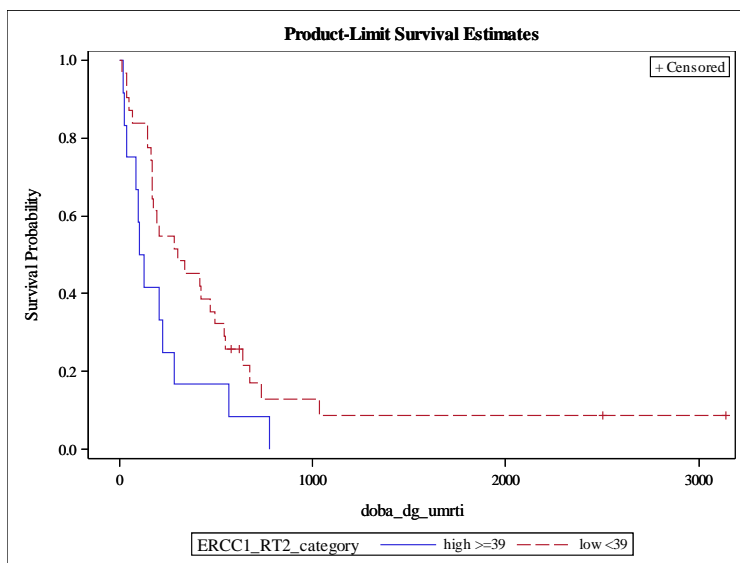
Obrázek č.1 – prediktivní význam léčebného efektu TS pro platinové deriváty



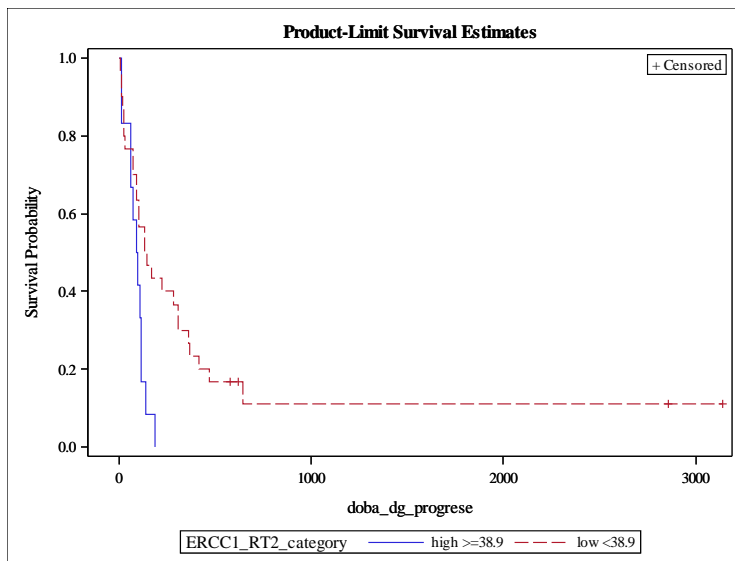
Zhodnocení prognostického významu genové exprese

Zhodnotili jsme skupinu všech nemocných jako celek a pátrali po prognostickém významu některých genů. Z uvedených výsledků jasně vyplývá prognostický význam ERCC1_RT2. Čím nižší, tím delší overall survival (Hazard ration 1,072, Coxův univariate model 0.0305, p-value 0,0588), čím nižší, tím delší time to progression (Hazard ration 1,072, Coxův univariate model 0.0248, p-value 0,0117). Grafické znázornění vztahu ukazují obrázky č. 2 a 3.

Obrázek č.2 – prognostický význam ERCC1 RT2: time to progression



Obrázek č.3 – prognostický význam ERCC1 RT2: overall survival



Stanovení mikroRNA z tkáňových vzorků

Podle plánu studie jsme si úspěšně ověřili možnost stanovení mikroRNA z tkáňových, formalinem fixovaných a parafinem zalitých vzorků. Stanovovali jsme vlastní mikroRNA, nikoliv jejich prekurzory. Přestože se jedná o nově zavedenou metodu na našem pracovišti, stanovení nečinilo žádné potíže. U všech nemocných jsme stanovili celkem 33 různých mikroRNA. Pro kontrolu stanovení jsme shodně u všech vzorků stanovovali také referenční sekvenci, v tomto případě RNU6B (U6snRNA). Výsledky stanovení jsou uvedeny v příloze.

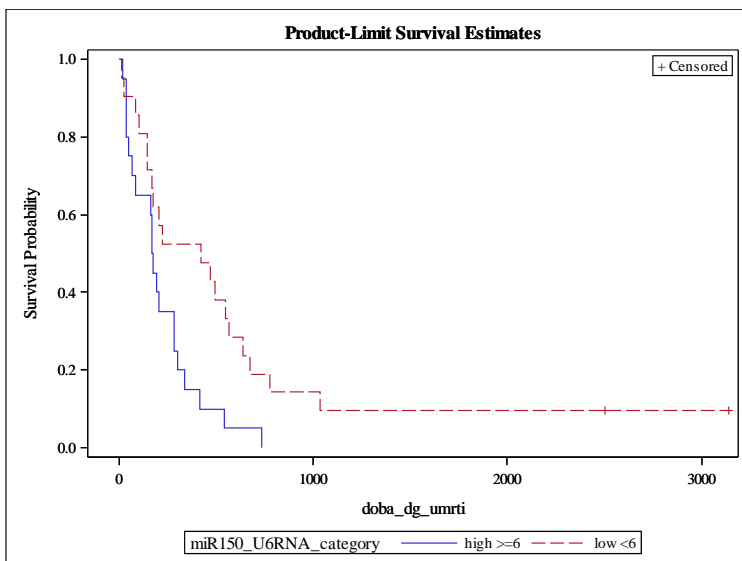
Zhodnocení prognostického významu mikroRNA

Stejně jako v případě stanovení genové exprese, jsme získané výsledky dali do vzájemné souvislosti s klinickými daty od pacientů a hledali jsme vzájemný vztah. Hodnotili jsme celkové přežití nemocných (OS

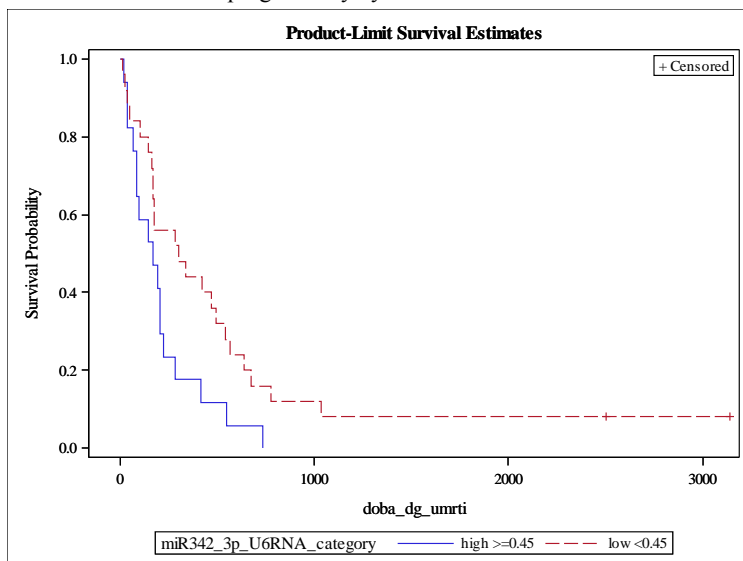
– overall survival) a čas do progrese onemocnění (TTP – time to progression).

Prokázali jsme prognostický význam miR150 U6RNA - čím nižší, tím delší overall survival (hazard ration 1,004, Coxův univariate model 0.0494, p-value 0,0145), stejný význam má miR150 U6RNA pro time to progression (hazard ration 1,006, Coxův univariate model 0.0056, p-value 0,0232). Další významnou mikroRNA je miR342 U6RNA - čím nižší, tím delší overall survival (hazard ration 1,261, Coxův univariate model 0,0286, p-value 0,0319), stejně tak hladina exprese ovlivňuje time to progression (hazard ration 1,383, Coxův univariate model 0,0144, p-value 0,0997). Celkové přežití je také ovlivněno expresí miR224, čím nižší je hladina exprese tím delší je overall survival (hazard ration 7,609, Coxův univariate model 0,0175, p-value 0,0090). Grafické znázornění je na obrázcích č. 4 – 8.

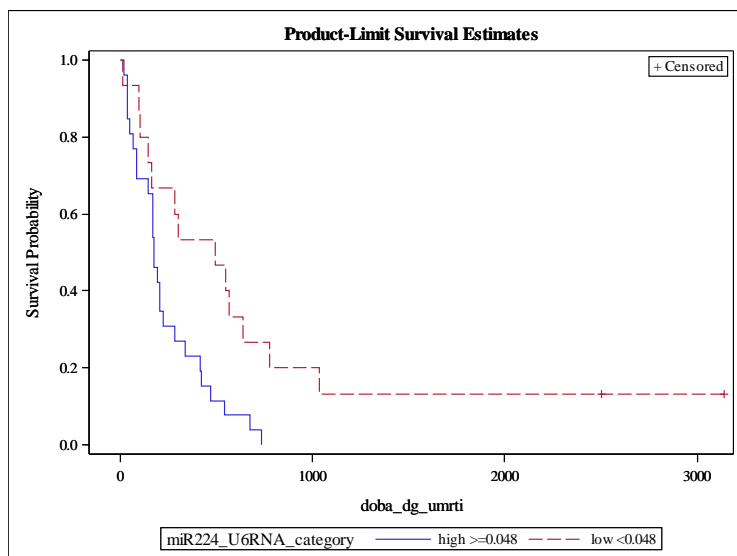
Obrázek č.4 – prognostický význam miR150: overall survival



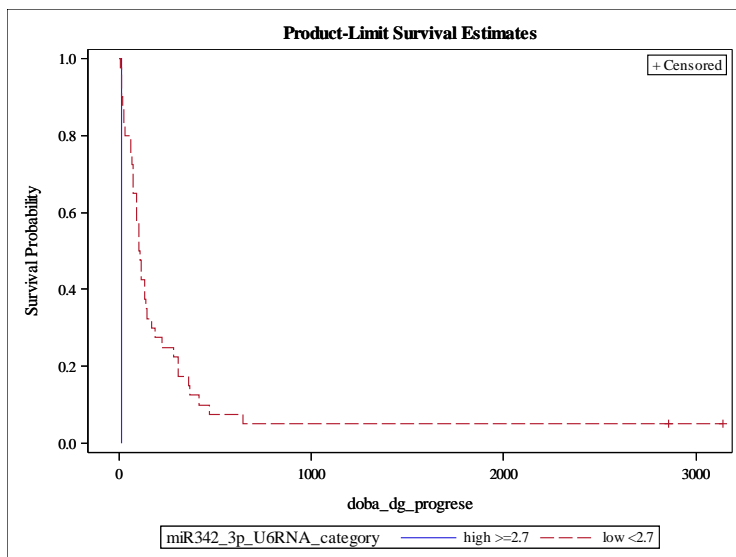
Obrázek č.5 – prognostický význam miR342: overall survival



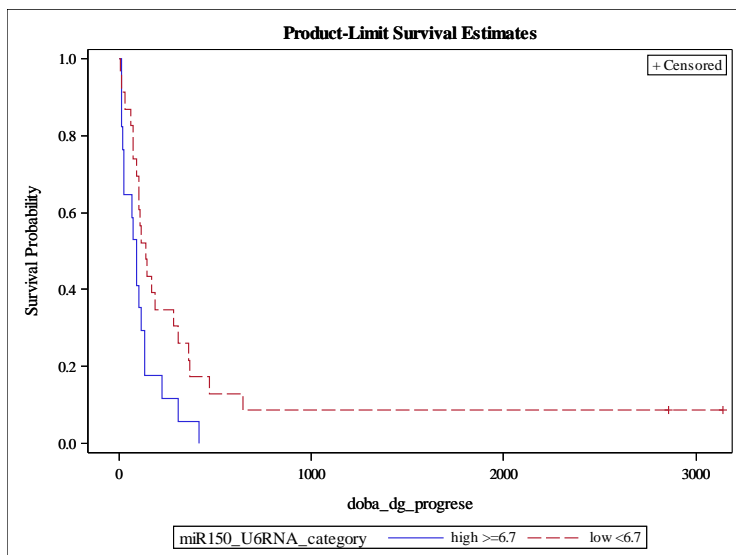
Obrázek č.6 – prognostický význam miR224: overall survival



Obrázek č.7 – prognostický význam miR150: time to progression



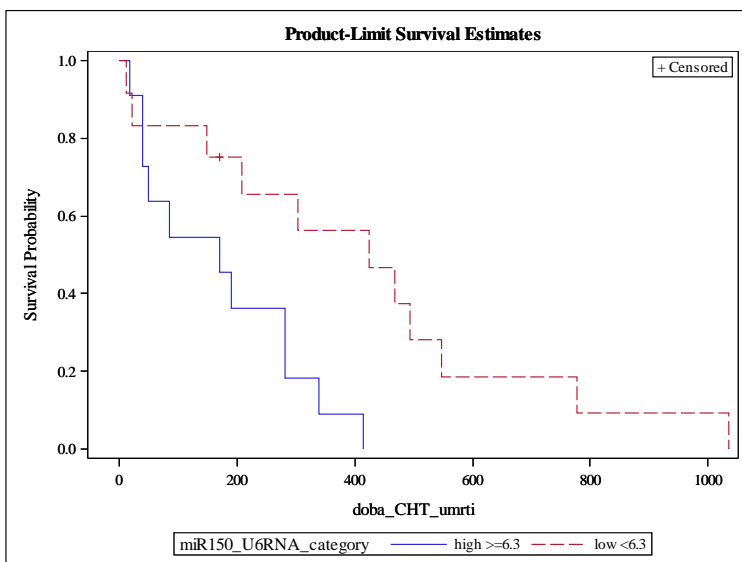
Obrázek č.8 – prognostický význam miR342: time to progression



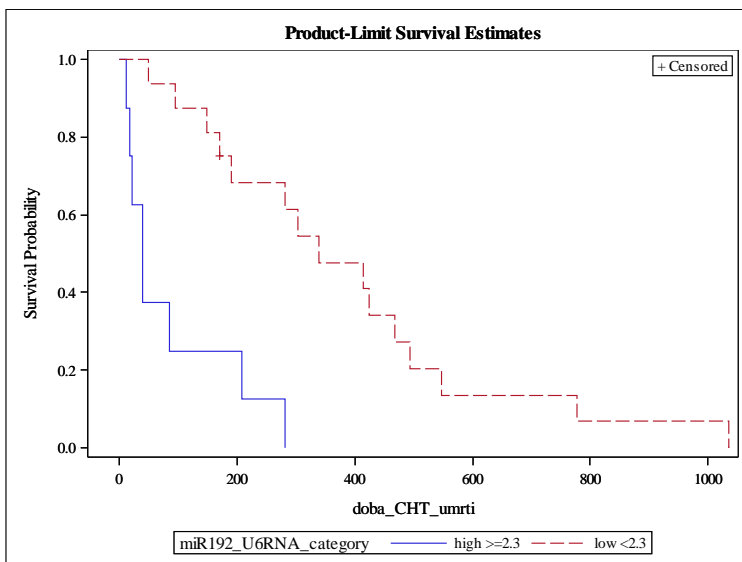
Zhodnocení prediktivního významu mikroRNA

Dalším cílem našeho experimentu bylo zjistit případný prediktivní význam některých mikroRNA. Stejně jako u pátrání po prediktivním významu genové exprese některých genů jsme nemocné rozdělili do skupin podle složení podané chemoterapie. Získané výsledky hladin exprese jednotlivých mikroRNA jsme dali do vzájemné souvislosti s celkovým přežitím a časem do progresu onemocnění u jednotlivých pacientů. Složení jednotlivých skupin bylo stejné jako u stanovení prediktivního významu genové exprese. Podařilo se nám prokázat prediktivní význam miR181b, miR150, miR192 a miR 342 pro 5 fluorouracil a capecitabin. Také se podařilo prokázat prediktivní význam miR221, miR224, miR520 a miR375 pro platinové deriváty. Grafické znázornění je na obrázcích č.9 – 18.

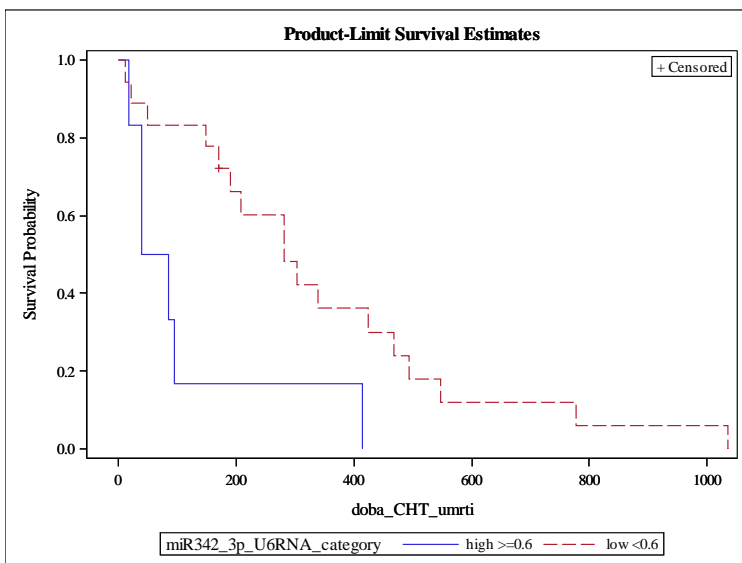
Obrázek č.9 - prediktivní význam miR150: overall survival



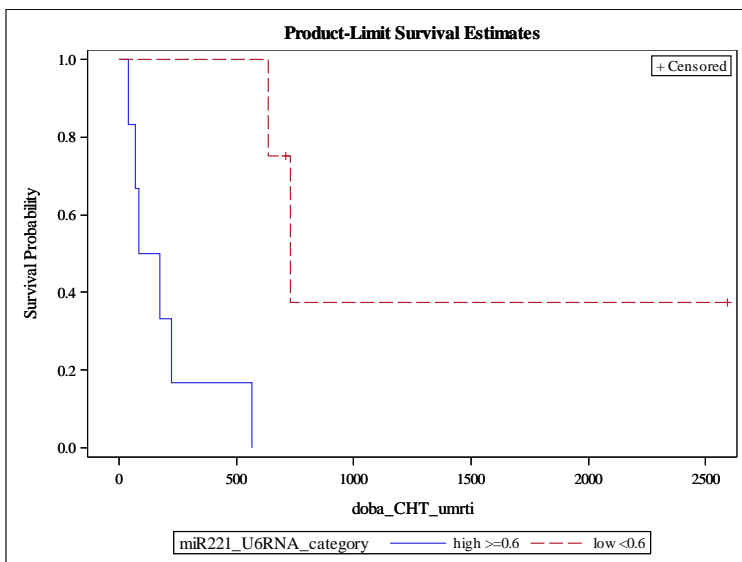
Obrázek č.10 - prediktivní význam miR192: overall survival



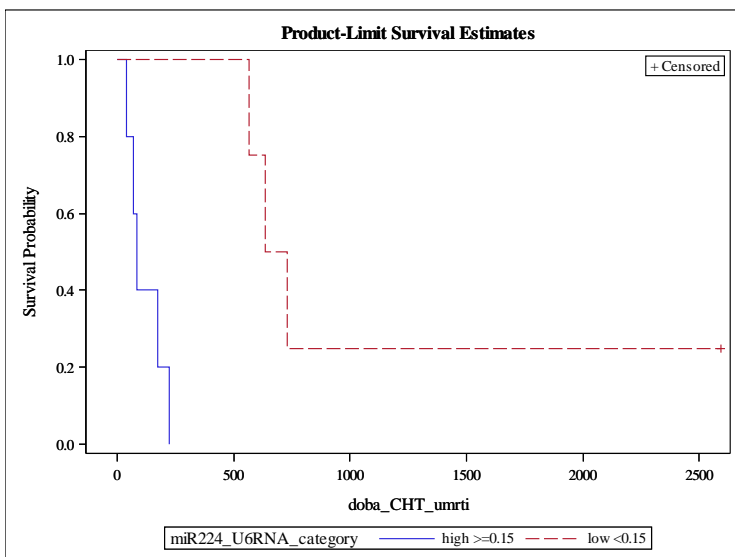
Obrázek č.11 - prediktivní význam miR342: overall survival



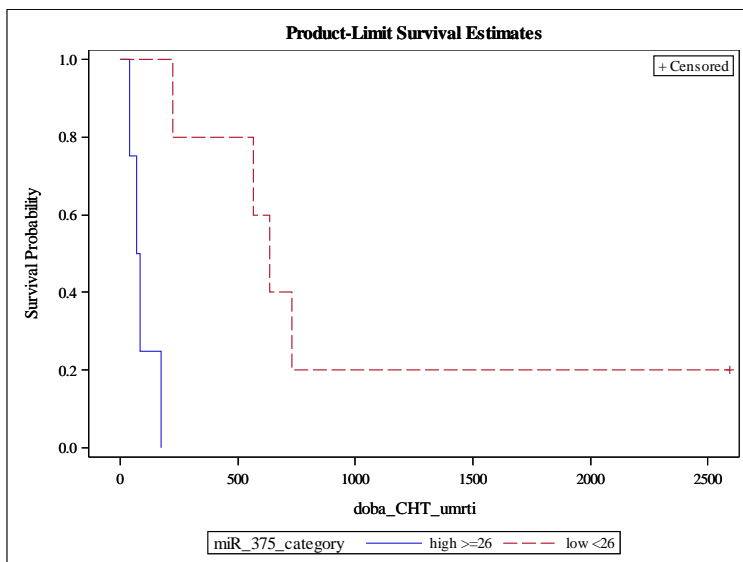
Obrázek č.12 - prediktivní význam miR221: overall survival



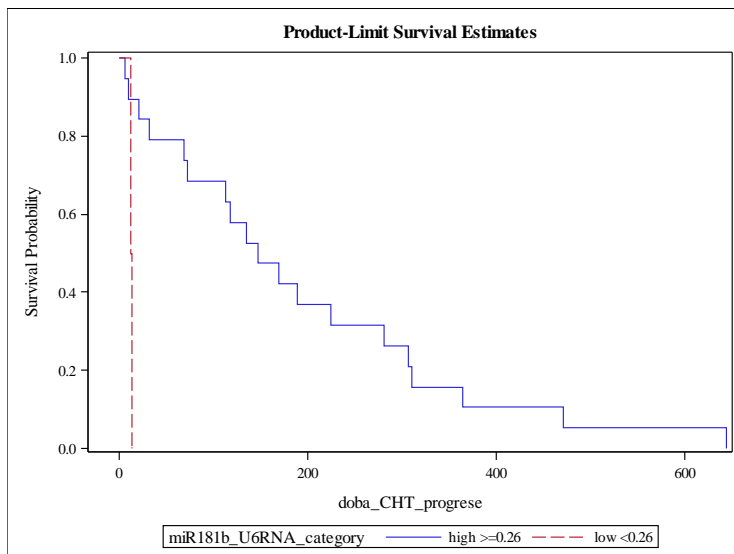
Obrázek č.13 - prediktivní význam miR224: overall survival



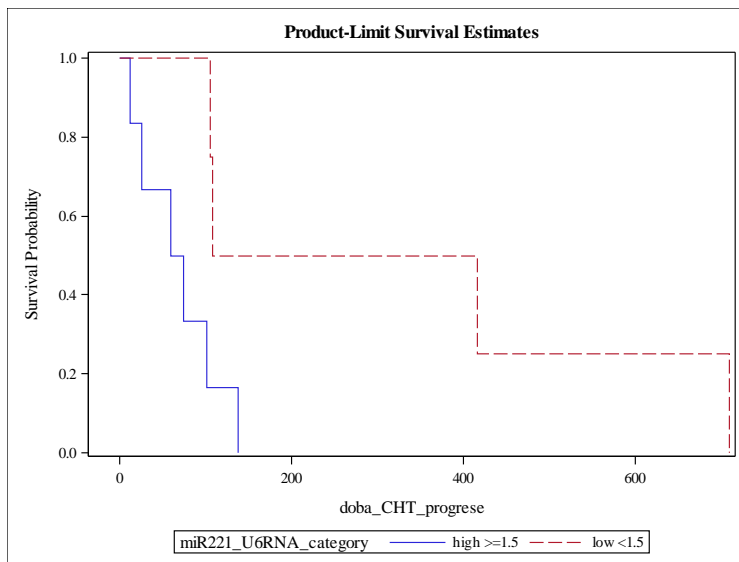
Obrázek č.14 - prediktivní význam miR375: overall survival



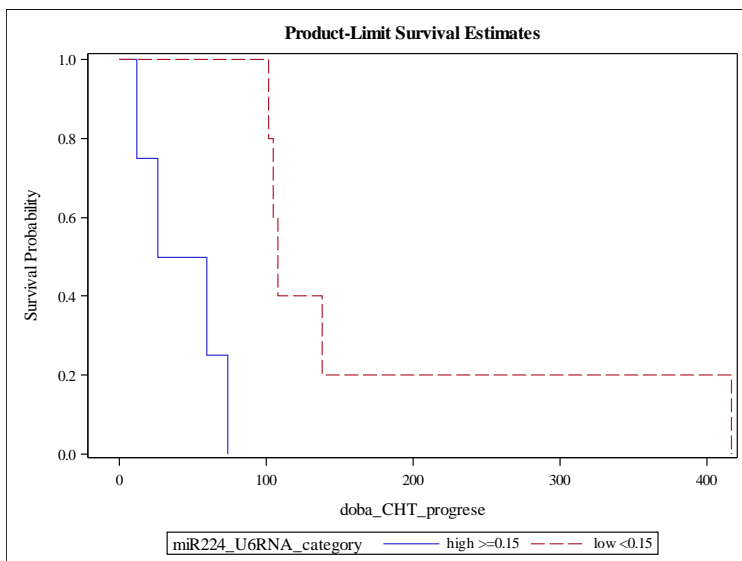
Obrázek č.15 - prediktivní význam miR181: time to progression



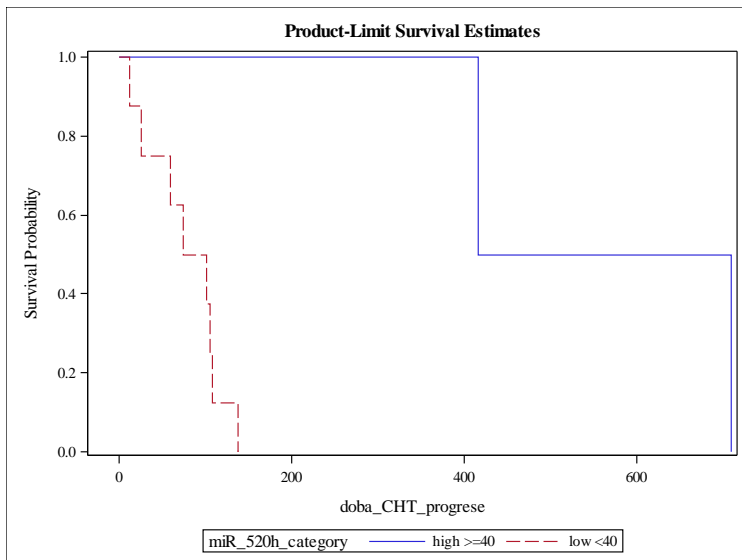
Obrázek č.16 - prediktivní význam miR221: time to progression



Obrázek č.17 - prediktivní význam miR224: time to progression



Obrázek č.18 - prediktivní význam miR520: time to progression



Možnosti využití mikroRNA pro časnou detekci kancerogeneze

MikroRNA je velmi malá molekula, která velmi snadno proniká do tělesných tekutin, tedy i do periferní krve a do budoucna nabízí velký potenciál. Jedním z mnoha cílů našeho experimentu bylo ověřit možnost využití mikroRNA jako biologický marker, který by ukazoval na časnou kancerogenezi. Hledali jsme tedy mikroRNA, která by se nevyskytovala ve zdravé tkáni, ale pouze ve vysoké koncentraci v nádorové tkáni. Její výskyt by potom ukazoval na přítomnost nádorových buněk v těle nemocného. Z námi stanovovaných mikroRNA to však žádná není.

Této skutečnosti se nejvíce blíží miR-221, která se vyskytuje v nízkých hladinách ve zdravé tkáni (průměr 1,947, median 0,536), zatímco v tumorózní je ve vysokých koncentracích (průměr 2,331, median 1,193).

Otázkou však je, zda hladinu exprese této mikroRNA nezvyšují i některé benigní onemocnění žaludeční sliznice či jiné příčiny. Proto nemůžeme s jistotou říci, že je tento marker vhodný pro časnou detekci kancerogeneze.

Diskuze

Karcinom žaludku je maligní onemocnění, v našich krajích s velmi špatnou prognózou. Přežití nemocných se liší, nejvíce je ovlivněno pokročilostí nemoci v době stanovení diagnózy. Bohužel většina nemocných v Evropě, a tedy i v České republice je diagnostikována v pokročilém stádiu nemoci. [2,27,34] Doposud platilo a nadále platí, že základní léčebnou modalitou je chirurgická léčba s dosažením R0 resekce. V indikovaných případech při dodržení zásad bezpečné endoskopické léčby můžeme dosáhnout R0 resekce také endoskopickou cestou – blíže v kapitole léčba. Z důvodu pozdní diagnostiky v pokročilém stádiu nemoci je však většina nemocných léčena paliativně. [1,2,4,27,34] Tuto skutečnost potvrdila i naše studie, která zahrnuje celkem 1258 nemocných s karcinomem žaludku, kteří prošli v průběhu 14 let naším onkologickým centrem. Z celkového počtu všech nemocných podstoupilo resekční zákrok pouze 547 nemocných. Ze zbývajících počtu (neoperovaní nemocní + explorativní výkony) byla paliativní chemoterapie indikována jen u 61 nemocných. Zbytek nemocných byl léčen symptomaticky. V souladu s literárními údaji také v našem souboru nemocných profitují nemocní z podané chemoterapie. Dle očekávání počet podaných cyklů chemoterapie koresponduje s časem do progresu onemocnění a také s celkovým přežitím. Čím více podaných cyklů, tím delší čas do progresu nemoci (Coxův univariate model 0.0075), čím více podaných cyklů, tím delší celkové přežití (Coxův univariate model <0.0001). [1,4,9,10,35,70,78,96] Také jsme zjistili, že v našem souboru ženy přežívají déle než muži (dle Wilcoxonova testu 0.0087) a mají také delší čas do progresu onemocnění (dle Wilcoxonova testu 0.0331). Pro tuto skutečnost však nemáme vysvětlení.

Přesto z dlouhodobého pozorování vyplývá, že se liší přežití nemocných, kteří mají stejný histopatologický typ nádoru, jsou ve stejném

stádiu onemocnění a byla jim podána stejná chemoterapie. Jednou z možných příčin může být různá exprese genů přímo v nádorové tkáni, které se podílejí na mechanismu cytostatika. Tato otázka se stala inspirací k provedení našeho experimentu. Jedním z cílů této práce je ověřit možnost využití hladiny genové exprese vybraných genů přímo v nádorové tkáni jako prediktor léčebného efektu příslušné chemoterapie – blíže v kapitole pracovní hypotéza. Z námi stanovovaných genů se podařilo prokázat prediktivní význam hladiny genové exprese thymidylat synthasy v nádorové tkáni pro předpověď léčebného efektu 5 – fluorouracilu nebo capecitabinu. Nemocní, kterým byla podána chemoterapie obsahující 5 – fluorouracil nebo capecitabin a současně mají vysokou hladinou genové exprese thymidylat synthasy v nádorové tkáni mají horší celkové přežití v porovnání s nemocnými, kteří mají genovou expresi thymidylat synthasy nízkou. Hladina 38 je optimální hranicí pro rozlišení mezi vysokou a nízkou hladinou exprese thymidylat synthasy a tedy hranicí od které se odvíjí, zda můžeme léčebný efekt 5 - fluorouracilu nebo capecitabinu očekávat. Grafické znázornění je na obrázku č. 38.

V našem souboru nemocných byly použity čtyři typy cyklů chemoterapie obsahující 5 – fluorouracil nebo capecitabin (ECX, ECF, FUFA a ELF). Díky tomu je skupina nemocných heterogenní, ale protože capecitabin je prekurzorem, který se v játrech přeměňuje na meziprodukt a v nádorové tkáni se mění v 5 - fluorouracil můžeme očekávat od obou společný princip, do kterého může zasahovat gen thymidylat synthasy. [9,13,14,70,96,132] Je potřeba mít také na mysli, že výsledek může být do jisté míry ovlivněn heterogenitou souboru, resp. synergickým efektem chemoterapeutika, které bylo součástí chemoterapeutického cyklu. I přes tuto skutečnost se domnívám, že lze hladinu thymidylat synthasy využít jako prediktor léčebného efektu capecitabinu či 5 – fluorouracilu.

Druhou otázkou, kterou jsme se zabývali v průběhu naší studie je možnost využití některých mikroRNA jako prediktoru léčebné odpovědi chemoterapie. MikroRNA je malá molekula, která patří mezi tzv. nekódující RNA (ncRNA). Jedná se o jednovláknovou molekulu, která reguluje genovou expresi na posttranskripční úrovni. Tato molekula se vytváří v buněčném jádře ve formě pre mikroRNA (pre miR), pomocí transportního mechanismu ve stěně buněčného jádra (exportin 5) dochází k exportu a přeměně na mikroRNA. Jedna mikroRNA může cílit a tak ovlivňovat jednu, ale také až několik různých mRNA, může se tedy podílet na down či upregulaci různých genů či jejich částí. Současně můžeme říci, že jedna mRNA může být současným cílem mnoha různých mikroRNA. Tento vzájemný vztah není doposud řádně prozkoumán a můžeme tedy očekávat, že stejný histopatologický typ nádoru může mít odlišné molekulárně biologické pozadí, což může být příčinou odlišného chování buněk a důsledkem může být různá reakce na podanou chemoterapii. [104,118,128,130,133] Proto jsme se rozhodli hledat také prediktivní vlastnosti některých mikroRNA – blíže metodika. Prokázali jsme prediktivní význam celkem čtyř mikroRNA pro předpověď léčebného efektu 5 – fluorouracilu nebo capecitabinu. Jedná se o miR181b, miR150, miR192 a miR342. Grafické znázornění je na obrázcích č. 29 – 38, optimální hladiny a bližší statistické údaje jsou v tabulce č. 10. Pro všechny uvedené platí vztah, že čím nižší je hladina příslušné mikroRNA, tím delší je celkové přežití. Přestože se nám nepodařilo prokázat prediktivní význam genové exprese pro předpověď efektu derivátů platiny, podařilo se nám najít některé mikroRNA, které lze k předpovědi efektu platiny použít. V tomto případě se jedná o miR221, miR224, miR520 a miR375. Pro miR224, miR375 a miR520 platí také vztah čím nižší hladina exprese, tím delší celkové přežití. Pro miR221 však platí opačný poměr, čím vyšší hladina exprese, tím delší celkové přežití. Také zde můžeme namítnout, že se jedná o heterogenní skupinu

nemocných. Všem byla podána chemoterapie využívající deriváty platiny, avšak v různých lékových formách (oxaliplatin, cisplatin). Situace je obdobná jako ve skupině s 5 – fluorouracilem a capecitabinem. Stanovení pro jednotlivé formy platiny není možné, pro nízký počet jedinců v podskupinách, rozdělených dle chemické formy platiny. Nemohli bychom vyvodit statisticky významné závěry. Deriváty platiny pracují na stejném principu, proto se domníváme, že uvedené mikroRNA lze využít v klinické praxi, jako prediktory efektu léčby derivátů platiny.

Problémem nadále zůstává množství tkáně, odebraného při endoskopickém vyšetření pomocí biopsických kleští. Množství odebrané tkáně je velmi malé a ne vždy je k dispozici dostatečný vzorek zdravé a nádorové tkáně k naší navrhovanému stanovení. Protože mikroRNA je malá molekula, která snadno proniká do tělesných tekutin, očekáváme, že bude snadno stanovitelná i z periferní krve nemocných, která je jednoduše přístupná k odběru v dostatečném množství. Z tohoto důvodu se nabízí otázka, zda by nebylo možné využít stanovení mikroRNA z periferní krve nemocných jako prediktor léčebného efektu chemoterapie? Abychom mohli zodpovědně odpovědět na tuto otázku, budeme muset provést srovnání hladiny vybraných mikroRNA v nádorové tkáni s hladinou mikroRNA v periferní krvi nemocných s karcinomem žaludku. Pokud bude hladina v obou vzorcích srovnatelná, můžeme využít stanovení sledovaných mikroRNA z periferní, žilní krve nemocných před zahájením chemoterapie.

Bohužel v naší sestavě byla použita chemoterapeutika, pro které doposud neznáme žádné známé prediktory pro předpověď léčebného efektu. Z naší stanovovaných mikroRNA se nepodařilo prokázat prediktivní význam pro příslušná cytostatika. S ohledem na omezený objem vzorku bylo naše stanovení limitováno. Pokud se prokáže možnost stanovení mikroRNA z venózní krve a hladina mikroRNA bude srovnatelná s hladinou v tumorózní tkáni, rozšíříme náš panel mikroRNA a budeme pátrat po

významném prediktoru pro předpověď léčebného efektu etoposidu a leukovorinu, což jsou častá chemoterapeutika využívaná při léčbě karcinomu žaludku. [10,35,70,96]

Další otázka, kterou musíme zodpovědět naším navazujícím výzkumem je, zda bude prediktivní význam námi uvedených faktorů platit také u nemocných, kteří podstoupili resekční výkon. V případě, kdy primární nádor nebyl odstraněn, podaná chemoterapie cílí na primární ponechaný nádor, ze kterého jsme stanovili hladinu příslušného prediktoru. V případě, kdy nemocný podstoupil resekční výkon je primární nádor odstraněn a podaná chemoterapie cílí na reziduální buňky, které vycestovaly z primárního nádoru. Na podkladě publikovaných studií je ale známo, že u některých nádorů, např. karcinom plic, dochází ke změně fenotypových vlastností buněk, které vycestovaly z primárního tumoru a nacházejí se v těle nemocného. V tomto případě by funkce prediktoru mohla být narušena. [41,122,128,130,132,137]

Naše práce se také zabývala studiem prognostických faktorů. Hodnotili prognostický význam genové exprese vybraných genů v nádorové tkáni. Podařilo se nám prokázat prognostický význam genové exprese ERCC1_RT2. Vzájemný vztah hladiny genové exprese a celkového přežití je: čím nižší hladina exprese, tím delší celkové přežití a také tím delší čas do progresu onemocnění. Optimální se jeví hladina exprese 39 pro rozlišení mezi nízkou a vysokou expresí, resp. mezi dobrou a špatnou prognózou. Grafické znázornění vztahu ukazují obrázky č. 22 a 23.

Také jsme pátrali po prognostickém významu některých mikroRNA. Prokázali jsme prognostický význam miR150, miR342 a miR224. Pro všechny uvedené parametry platí vztah, čím nižší hladina, tím delší celkové přežití i čas do progresu onemocnění bez závislosti na podané chemoterapii. Bližší údaje jsou v tabulce č. 9 a grafické znázornění je na obrázcích č. 24 – 28.

Jedním z cílů naší práce bylo najít biologický marker, který by ukazoval časně na probíhající kancerogenezi a umožnil tak časnou diagnostiku onemocnění. Nenalezli jsme žádnou mikroRNA, která by se vyskytovala pouze v nádorové tkáni, a proto nelze říci, že existuje mikroRNA, která by jasně ukazovala na probíhající kancerogenezi a mohla by být tedy využita pro časnou detekci karcinomu žaludku v rámci screeningu. Optimální situaci pro screeningový marker je nejbližší mikroRNA 221 (miR221_U6RNA), u které je prokázán vztah čím nižší je hladina miR221, tím delší je celkové přežití a současně se nachází více v nádorové tkáni, než ve zdravé tkáni. Nyní však bude potřeba ověřit, zda hladinu exprese miR221 neovlivňují také jiné patologické stavy žaludeční sliznice, např. chronická gastritida, infekce *Helicobacter pylori* apod., které by vedly k falešně pozitivním výsledkům. Pokud vyloučíme, že hladina miR221 se zvyšuje také u jiných onemocnění žaludeční sliznice, bude nutné určit optimální hladinu této mikroRNA, která by ukazovala na riziko vzniku karcinomu žaludku a na podkladě této skutečnosti by byla indikována gastrokopie s odběrem tkáně pro bioptické vyšetření. Podobná je situace u miR372, kde je prokázán vztah k času do progresu onemocnění. Čím nižší je hladina miR372, tím delší je čas do progresu onemocnění. Také zde bude potřeba provedení dalšího výzkumu, obdobně jako je tomu u miR221.

Existuje také otázka využití rozdílných hodnot mezi zdravou a nádorovou tkání. Statisticky významný rozdíl je mezi hladinou miR145 ve zdravé a v nádorové tkáni. Čím je rozdíl nižší, tím delší je čas do progresu onemocnění (Coxův univariate model 0.0310). Za předpokladu, že ve zdravé tkáni, tzn. ve skupině zdravých jedinců v populaci je konstantní hladina miR145, pak by mohla stoupající hladina miR145 ukazovat na růst nádoru. Zde počítáme však také se skutečností, že všechny karcinomy žaludku budou mít vysokou hladinu miR145 ve tkáni a díky růstu nádoru se bude

zvyšovat i hladina miR145 v krvi. I tuto otázku se pokusíme v budoucnosti zodpovědět.

Ohledně screeningu a zjištění rizika vzniku karcinomu žaludku se nabízí také otázka možného využití kombinace stanovení mikroRNA a jiných sérových markerů. Nadějně vypadajícím markerem je MMP-7 a PIVKA II. Abychom mohli být konkrétnější, musíme provést další studii, o kterou bychom mohli opřít naše tvrzení.

Závěr

Námi provedená studie odpověděla na všechny námi položené otázky. Současně však na jejím podkladě vznikly nové, doposud nezodpovězené otázky. Musíme tedy konstatovat, že jsme nezískali jednoznačné závěry, které by nás opravňovali k navržení nových klinických postupů v léčbě karcinomu žaludku.

Pokud však zhodnotíme-li situaci v oblasti využití prediktivních faktorů jako celek, musíme říci, že se jedná o velmi slibnou možnost, která by mohla být v blízké budoucnosti změnit pravidla využití chemoterapie u nemocných s karcinomem žaludku. Pokud se nám podaří úspěšně odpovědět na všechny nově položené otázky, jistě posuneme zásady využití chemoterapie do dimenze personalizované onkologické léčby.

Také se domníváme, že kombinace stanovení hladiny mikroRNA a některých sérových markerů nabízí do budoucnosti možnost časně diagnostiky karcinomu žaludku, neboť pouze tato skutečnost může zvrátit nepříznivý osud nemocných s karcinomem žaludku.

Seznam použitých zkratk

TS	thymidylat synthasa
BRCA1	breast cancer type I.
ERCC1	excision repair cross-complementary group 1
ERBB2	erythroblastic leucemia viral oncogene homolog
2	
HER2	human epidermal grow factor receptor 2
event.	eventuelně
DNA	deoxyribonukleová kyselina
miRNA	mikroRNA
ALDH2	aldehyd dehydrogenáza 2
OS	overall survival
TTP	time to progression
vs	versus

Literatura

1. Becker HD. Chirurgická onkologie. Praha: Grada; 2005.
2. Epidemiologie zhoubných nádorů v České Republice [Internet]. Available from: www.svod.cz
3. Kim YG, Kong S-H, Oh S-Y, Lee K-G, Suh Y-S, Yang J-Y, et al. Effects of screening on gastric cancer management: comparative analysis of the results in 2006 and in 2011. *J. Gastric Cancer*. 2014;14:129–34.
4. Krška Z, Hoskovec D, Petruželka L. Chirurgická onkologie. Praha: Grada; 2014.
5. Šimša J. Karcinom žaludku. 2012.
6. Šmíd D. et al. Karcinom žaludku – komplexní pohled na nemocného. *Practicus*. 2014;13:14–7.
7. Yeh Y-C, Sheu B-S, Cheng H-C, Wang Y-L, Yang H-B, Wu J-J. Elevated serum matrix metalloproteinase-3 and -7 in H. pylori-related gastric cancer can be biomarkers correlating with a poor survival. *Dig. Dis. Sci*. 2010;55:1649–57.
8. Min B-H, Kang KJ, Lee JH, Kim ER, Min YW, Rhee P-L, et al. Endoscopic resection for undifferentiated early gastric cancer: focusing on histologic discrepancies between forceps biopsy-based and endoscopic resection specimen-based diagnosis. *Dig. Dis. Sci*. 2014;59:2536–43.
9. NCCN clinical practice guidelines in oncology, gastric cancer, version 1.2014 [Internet]. Available from: www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gastric.pdf
10. Svoboda T., Daum O., Šmíd. Management léčby karcinomu žaludku. *Postgraduální Medicína*. 2014:28–31.
11. Brücher BLD, Keller G, Werner M, Müller U, Lassmann S, Cabras AD, et al. Using Q-RT-PCR to measure cyclin D1, TS, TP, DPD, and Her-2/neu as predictors for response, survival, and recurrence in patients with

- esophageal squamous cell carcinoma following radiochemotherapy. *Int. J. Colorectal Dis.* 2009;24:69–77.
12. Liu Y-P. The effects of ERCC1 expression levels on the chemosensitivity of gastric cancer cells to platinum agents and survival in gastric cancer patients treated with oxaliplatin- based adjuvant chemotherapy. *Oncol. Lett.* [Internet]. 2012 [cited 2015 Jul 8]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.1096>
13. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2004;22:529–36.
14. Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, et al. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* 2014;
15. Shen X-M, Zhou C, Lian L, Li L-Q, Li W, Tao M. Relationship Between the DPD and TS mRNA Expression and the Response to S-1-Based Chemotherapy and Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cell Biochem. Biophys.* 2014;
16. Wang C, Weng Y, Wang H, Shi Y, Ma D. Relationship between the expression of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase and survival in epithelial ovarian cancer. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 2010;30:494–9.
17. Won H, Lee M, Chung E-S, Kim D-G, You Y, Hong T, et al. Comparison of thymidine phosphorylase expression and prognostic factors in gallbladder and bile duct cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:564.
18. Jirkovská M. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky.* Praha: Galén; 2006.

19. Pesta M, Kulda V, Fiala O, Safranek J, Topolcan O, Krakorova G, et al. Prognostic significance of ERCC1, RRM1 and BRCA1 in surgically-treated patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2012;32:5003–10.
20. Yang W, Raufi A, Klempner SJ. Targeted therapy for gastric cancer: molecular pathways and ongoing investigations. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1846:232–7.
21. Zhao X, Bai Z, Wu P, Zhang Z. S100P enhances the chemosensitivity of human gastric cancer cell lines. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers.* 2013;13:1–10.
22. Buetto LS, Zago MMF. Meanings of quality of life held by patients with colorectal cancer in the context of chemotherapy. *Rev. Lat. Am. Enfermagem.* 2015;
23. Gubanski M, Glimelius B, Lind PA. Quality of life in patients with advanced gastric cancer sequentially treated with docetaxel and irinotecan with 5-fluorouracil and folinic acid (leucovin). *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 2014;31:906.
24. Mayrbäurl B, Giesinger JM, Burgstaller S, Piringer G, Holzner B, Thaler J. Quality of life across chemotherapy lines in patients with advanced colorectal cancer: a prospective single-center observational study. *Support. Care Cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer.* 2015;
25. Visacri MB, Ferrari GB, Dias P, Pimentel R, de Souza CM, Costa APL, et al. Quality of Life of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Receiving High-Dose Cisplatin Chemotherapy and Radiotherapy. *South. Med. J.* 2015;108:343–9.
26. Jeffery R, Seedhar P, Poulsom R. Identifying the origin and phenotype of cells in tumor xenografts. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2014;1070:235–45.

27. Pesta M, Kulda V, Topolcan O, Safranek J, Vrzalova J, Cerny R, et al. Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. *Anticancer Res.* 2009;29:4535–9.
28. Ross JB, Huh D, Noble LB, Tavazoie SF. Identification of molecular determinants of primary and metastatic tumour re-initiation in breast cancer. *Nat. Cell Biol.* 2015;17:651–64.
29. Wallwiener M, Hartkopf AD, Riethdorf S, Nees J, Sprick MR, Schönfisch B, et al. The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients. *BMC Cancer.* 2015;15:403.
30. Bosman F, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol. J. Pathol. Off. J. Pol. Soc. Pathol.* 2014;65:257–66.
31. Brenner B, Hoshen MB, Purim O, David MB, Ashkenazi K, Marshak G, et al. MicroRNAs as a potential prognostic factor in gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2011;17:3976–85.
32. Hummel R, Hussey DJ, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990. 2010;46:298–311.
33. Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2015;444:132–6.
34. Li Q, Wang J-X, He Y-Q, Feng C, Zhang X-J, Sheng J-Q, et al. MicroRNA-185 regulates chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer by targeting apoptosis repressor with caspase recruitment domain. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1197.
35. Sousa JF, Nam KT, Petersen CP, Lee H-J, Yang H-K, Kim WH, et al. miR-30-HNF4 γ and miR-194-NR2F2 regulatory networks contribute to the upregulation of metaplasia markers in the stomach. *Gut.* 2015;

36. Wang Q-X, Zhu Y-Q, Zhang H, Xiao J. Altered MiRNA expression in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2015;35:933–44.
37. Wang R, Wen H, Xu Y, Chen Q, Luo Y, Lin Y, et al. Circulating microRNAs as a novel class of diagnostic biomarkers in gastrointestinal tumors detection: a meta-analysis based on 42 articles. *PLoS One.* 2014;9:e113401.
38. Wu J, Zhao X, Lin Z, Shao Z. A system level analysis of gastric cancer across tumor stages with RNA-seq data. *Mol. Biosyst.* 2015;11:1925–32.
39. Li P-F, Chen S-C, Xia T, Jiang X-M, Shao Y-F, Xiao B-X, et al. Non-coding RNAs and gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2014;20:5411–9.
40. Wang H, Wang L, Wu Z, Sun R, Jin H, Ma J, et al. Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 2014;31:298.
41. Xin S-Y, Feng X-S, Zhou L-Q, Sun J-J, Gao X-L, Yao G-L. Reduced expression of circulating microRNA-218 in gastric cancer and correlation with tumor invasion and prognosis. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2014;20:6906–11.
42. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. TNM klasifikace zhoubných nádorů – 7. vydání.
43. Vyzula R. a kol. Modrá kniha České Onkologické společnosti. Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, www.mou.cz; 2014.
44. Waddell T, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D, et al. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 2014;40:584–91.

45. Český statistický úřad – statistiky [Internet]. Available from:
<http://www.czso.cz>
46. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 2009;472:467–77.
47. DeVita VT, editor. *Cancer: principles & practice of oncology*. 5. ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
48. National cancer institute, cancer statistics [Internet]. Available from:
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>
49. Pesta M, Kulda V, Kucera R, Pesek M, Vrzalova J, Liska V, et al. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2011;31:4031–8.

Souhrn

Prediktivní a prognostické faktory nádoru žaludku

Šmíd D.

Chirurgická klinika FN Plzeň a LF UK v Plzni.

Úvod: Karcinom žaludku patří dlouhodobě mezi nádory s nejhorsí prognózou. Bohužel většina nemocných přichází v pokročilém stádiu onemocnění a jsou tedy léčeni paliativně. Nemocní se stejným typem nádoru a ve stejném stádiu onemocnění a podanou stejnou chemoterapií mají různé přežití, což může být zapříčiněno různou expresí vybraných genů, které zasahují do mechanismu účinku cytostatika. Stanovení těchto genů či mikroRNA, které tyto geny regulují, by mohlo být využito jako prediktivní faktor pro předpověď efektu podané chemoterapie.

Stanovení některých mikroRNA, případně v kombinaci s vhodnými plazmatickými faktory by mohlo být využito jako prognostický faktor nemocných s karcinomem žaludku. Také je zde možnost využití této kombinace pro časný záchyt probíhající kancerogeneze.

Cíl: Cílem je ověřit možnost využití genové exprese vybraných genů a některých mikroRNA v nádorové tkáni jako prognostický faktor, a nebo jako prediktor pro léčebný efekt chemoterapie u nemocných s karcinomem žaludku.

Metodika: Retrospektivně jsme zhodnotili soubor 1258 nemocných s karcinomem žaludku, kteří prošli naším pracovištěm během 14 let. Vybrali jsme soubor 54 nemocných, kteří nepodstoupili resekční výkon a byla jim podána chemoterapie (podmínky predikce). U těchto nemocných jsme v parafínem fixovaných tkáňových vzorcích stanovili expresi celkem 33 různých mikroRNA a 4 genů. Získaná data jsme dali do vzájemné souvislosti s typem podané chemoterapie, délkou přežití a časem do progresu

onemocnění.

Výsledky: Podařilo se nám prokázat prediktivní význam miR181b, miR150, miR192 a miR 342 pro 5 - Fluorouracil a Capecitabin. Také se podařilo prokázat prediktivní význam miR221, miR224, miR520 a miR375 pro platinové deriváty. Prokázali jsme prediktivní význam stanovení genu thymidylat synthasy v nádorové tkáni pro léčebný efekt platinových derivátů.

Na podkladě námi získaných výsledků můžeme konstatovat, že stanovení exprese miR150, miR342, miR224 a stanovení genové exprese ERCC1 RT2 lze využít jako prognostický faktor u nemocných s karcinomem žaludku.

Diskuze: Možnost využití prediktivního významu miRNA je nutno ověřit také u resekovaných nemocných, neboť u těchto nemocných cíli podaná chemoterapie na reziduální buňky v těle nemocného. Výsledky publikovaných studií ukazují, že některé fenotypové vlastnosti buněk vycestovaných z primárního nádoru se liší od vlastností buněk mateřského karcinomu. Nově lze také stanovovat miRNA z periferní krve nemocných, což významně zjednoduší stanovení, ale je potřeba ověřit srovnání hladin miRNA v nádorové tkáni s hladinou v periferní krvi. Také se nabízí možnost využití stanovení miRNA s kombinací s jinými sérovými faktory k detekci časně kancerogeneze, ale zde se nabízí celá řada otázek, na které je nutno odpovědět ještě předtím, než budeme moci učinit jasné závěry.

Závěr: Stanovení mikroRNA je jistě velmi slibné a nabízí do budoucna velké možnosti. Využití exprese vybraných mikroRNA přímo v nádorové tkáni může sloužit jako prediktivní i prognostický faktor u nemocných s karcinomem žaludku. Stejně tak lze využít stanovení genové exprese některých genů. Díky předpovědi efektu podané chemoterapie můžeme dopředu odlišit nemocné, kteří budou profitovat z podání chemoterapie. Ostatní nemocné ušetříme zbytečnému podání nefunkční chemoterapie, čím by došlo ke zhoršení kvality života nemocných a současně k navýšení

celkových nákladů na léčbu.

Práce podpořena grantem IGA MZ NT14227

Summary

Predictive and prognostic factors in gastric cancer

Šmíd D.

Surgical clinic of University Hospital in Pilsen and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague.

Introduction: Gastric cancer is one of malignant diseases which have the worst prognosis. Unfortunately, there are most patients with advanced-stage disease who have to be treated in a palliative way. Patients suffered from the same type of tumor, being at the same stage of disease and treated with the same chemotherapy have various rates of survival, which can be caused by diverse expression of selected genes impacting on the mechanism of cytostatic effects. The determination of these genes or microRNAs which regulate these genes could be used as a predictive factor for prediction of effects of administered chemotherapy. The determination of some microRNAs, or in the combination with suitable plasmatic factors, could be used as a prognostic factor for patients with gastric cancer. It is also possible to use this combination for early diagnosis of cancerogenesis

Object: The aim is to verify the possibility to use expression of selected genes and some microRNAs in tumor tissue as a prognostic factor or a predictor for therapeutic effects of chemotherapy in patients with gastric cancer.

Methodology: We retrospectively evaluated the group of 1258 patients with gastric cancer who had been treated in our department in the course of fourteen years. We selected 54

patients who had not undergone resection surgery and had been administered chemotherapy (conditions for prediction). These patients were determined expression of 33 various microRNAs and 4 genes in paraffin-embedded tissue samples in. Afterwards, these obtained data were in connection with the type of chemotherapy, the length of survival and time to progression.

Results: We succeeded in proving predictive significance of miR181b, miR150, miR192 and miR 342 for 5-fluorouracil and capecitabine as well as predictive significance of miR221, miR224, miR520 and miR375 for platin derivatives. We proved predictive significance of the thymidylate synthase gene in tumor tissue for therapeutic effects of platin derivatives. On the basis of results obtained by us, we can state that the determination of expression of miR150, miR342, miR224 and the determination of gene expression of ERCC1 RT2 can be used as a prognostic factor in patients with gastric cancer.

Discussion: It is necessary to verify the possibility to use predictive significance of miRNAs in patients after resection, too because in these patients, this administered chemotherapy is targeted at residual cells in their bodies. Results of published study works show that some phenotypic features of cells which left a primary tumor differ from features of cells of the original tumor. Nowadays, it is also possible to determine miRNAs in the peripheral blood, which can significantly make the determination much easier. However, there is a need to compare miRNA levels in tumor tissue with peripheral blood level. Besides, miRNAs can be determined with the combination with other serum factors to detect early cancerogenesis. Here are numerous questions which have to be replied before determining right conclusions.

Conclusion: The determination of microRNAs is certainly very auspicious and means a great chance for the future. Use of expression of selected microRNAs directly in tumor tissue can serve as a predictive and prognostic factor in patients with gastric cancer. It is possible to use the determination of expression of some genes in the same way, too. Thanks to prediction of effects of given chemotherapy, we can differ the patients who will profit from chemotherapy administered to them. The other patients will avoid useless administration of chemotherapy for whom it is not effective and which could make quality of their lives worse and increase total treatment costs.

Supported by Grant IGA MZ NT14227

