

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Plzni

MUDr. Ondřej Vyčítal

**MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ MECHANISMY
PROGRESE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU
VE VZTAHU K INDIVIDUALIZOVANÉ
ONKOCHIRURGICKÉ LÉČBĚ**

Doktorandská dizertační práce

Chirurgická klinika LF UK v Plzni

2017

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Plzni



MUDr. Ondřej Vyčítal

**MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ MECHANISMY
PROGRESE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU
VE VZTAHU K INDIVIDUALIZOVANÉ
ONKOCHIRURGICKÉ LÉČBĚ**

Doktorandská dizertační práce

Chirurgická klinika LF UK v Plzni

2017

1. Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří umožnili vznik této práce. Předně děkuji svému školiteli doc. MUDr. Václavu Liškovi, Ph.D. za poskytnutí námětu, prostředků a za fundované vedení. Dále děkuji prof. MUDr. Vladislavu Třeškovi, DrSc. za podporu při tvorbě dizertační práce a za odborné zaštitění. Také děkuji MUDr. Magdaléně Dubové a MUDr. Jindřichu Branžovskému, Ph.D. za neocenitelnou pomoc při zpracování histologických vzorků. Též děkuji všem kolegům za pomoc při sběru klinického materiálu v rámci každodenní práce na operačním sále. Nemalou měrou se na sběru klinických dat podílel Richard Pálek, za což mu také děkuji. Za pomoc při statistickém zpracování dat náleží poděkování Ing. Petru Hoškovi, Ph.D. Na závěr bych rád poděkoval za nekonečnou trpělivost své manželce Anně.

Souhlasím se zapůjčením dizertační práce pro vědecké a pedagogické účely.

V Plzni 20. 1. 2017

MUDr. Ondřej Vyčítal

Obsah	
1. Poděkování	1
2. Seznam zkratk	5
3. Úvod	11
4. Kolorektální karcinom	12
4.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice	12
4.2 Etiologie kolorektálního karcinomu	14
4.2.1 Endogenní faktory	14
4.2.2 Exogenní faktory	14
4.3 Karcinogeneze	15
4.3.1 Chromozomální nestabilita	16
4.3.2 Mikrosatelitní nestabilita	17
4.3.3 Fenotyp methylátoru CpG ostrůvků	18
4.4 Morfologie a histologie	18
4.4.1 Histologie adenomů kolorekta	18
4.4.2 Histologie KRCa	19
4.5 Progrese KRCa	20
4.5.1 Metastazování	20
4.5.2 Další způsoby metastazování KRCa	21
4.6 Diagnostika KRCa	21
4.6.1 Klinické projevy a fyzikální vyšetření	21
4.6.2 Endoskopické vyšetřovací metody	22
4.6.3 Konvenční radiodiagnostika	23
4.6.4 Ultrasonografické vyšetření	24
4.6.5 Výpočetní tomografie	24
4.6.6 Virtuální endoskopie	25
4.6.7 Pozitronová emisní tomografie / výpočetní tomografie	25
4.6.8 Endosonografie	25
4.6.9 Magnetická rezonance	26
4.6.10 Nádorové markery	27
4.7 Screening	27
4.7.1 Screening obyvatel bez predispozice ke KRCa	28
4.7.2 Screening vysokorizikových skupin obyvatel	28

4.8 Léčba KRCa	29
4.8.1 Onkologicky radikální chirurgická léčba	29
4.8.2 Paliativní léčebné výkony	36
4.8.3 Onkologická léčba	37
4.8.4 Terapeutická schémata	39
4.8.5 Dispenzarizace	43
5. Imunitní interakce KRCa	44
5.1 Imunobiologie KRCa	44
5.2 Nespecifická munita	49
5.2.1 Přirození zabíječi	49
5.2.2 Makrofágy	54
5.2.3 Granulocyty	56
5.2.4 Dendritické buňky	57
5.2.5 Serinové proteázy cytolytických granul a inhibitory proteáz	59
5.3 Specifická imunitní reakce	60
5.4 Buněčné elementy adaptivní imunity	61
5.4.1 T lymfocyty – jejich klasifikace a vývoj	61
5.4.2 Efektorové a paměťové CD8 ⁺ T lymfocyty	62
5.4.3 Th Lymfocyty	78
5.4.4 Regulační T lymfocyty	71
5.4.5 T lymfocyty s $\gamma\delta$ řetězci	75
5.4.6 Natural Killer T buňky	75
5.5. Humorální specifická imunita	78
5.6 TIL a genetické a morfologické typy KRCa	78
6. Cíle	78
7. Metodika	80
7.1 Inkluzivní a exkluzivní kritéria	80
7.2 Pooperační sledování, sběr tkáňových vzorků a klinických dat	80
7.3 Histologické vyšetření vzorků	80
7.4 Imunohistochemické vyšetření vzorků	81
7.5 Statistická analýza	82
8. Výsledky	83
8.1 Deskripce souboru a doby přežití	83

8.2 Porovnání mezi skupinami UICC II a UICC III	87
8.3 Analýza vlivu onkologické léčby	94
8.4 Prognostické faktory	101
9. Diskuze	104
9.1 Diskuze k charakteristice kohort a k výsledkům pooperačního sledování	104
9.2 Diskuze k výsledkům porovnání TIL mezi skupinami UICC II a UICC III	105
9.3 Diskuze k prognostickým faktorům	106
9.4 Diskuze k výsledkům imunohistochemického barvení na serpin B9	108
10. Závěr	109
11. Použitá literatura	110
12. Souhrn	138
13. Summary	139
14. Přílohy - publikace autora	140

2. Seznam použitých zkratek

Zkratka	anglicky	česky
5-FU	5-fluorouracil	5-fluorouracil
ADCC	antibody dependent celular cytotoxicity	na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita
AIDS	acquired imunodeficiency syndrome	získaný syndrom imunodeficiency
APC	antigen presenting cells	antigen prezentující buňky
ASCO	American Society of Clinical Oncology	
BAX	B cell lymphoma asociated X protein	X protein asociovaný s B lymfomem
BCL 10	onkogen B cell lymphoma 10	onkogen BCL 10
BCR	B-cell receptor	receptor B lymfocytů
BRAF	B-raf murine sarcoma viral oncogene	B raf virový onkogen sarkomu hlodavců
CA	carbohydrate antigen	karbohydrátový antigen
CAM	cell adhesion molecule	buněčná adhezivní molekula
CCL	(C-C motiv ligand)	ligand C-C motivu
CCR	chemokine receptor	receptor chemokinů
CD	cluster of differentiation	diferenciační antigen
CDX2	homeobox transcription factor	homeoboxový transkripční faktor
CEA	carcinoembryonic antigen	karcinoembrionální antigen
c-erb	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	erb-b2 receptor tyrosinázové kinázy
CHT	chemotherapy	chemoterapie
CIMP	CpG island methylator phenotype	fenotyp methylátoru CpG ostrůvků
CIN	chromozomal instability	chromozomální nestabilita
CO ₂	carbon dioxide	oxid uhličitý
CRP	C-reactive protein	C reaktivní protein
CRTH2	prostaglandin D receptor	receptor prostaglandinu D2
CT	computed tomography	výpočetní tomografie

CTL	cytotoxic T lymphocyte	cytotoxické T lymfocyt
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4	antigen 4 cytotoxického T lymfocytu
DC	dendritic cells	dendritické buňky
DCC	deleted in colorectal cancer	Onkogen dráhy kancerogeneze KRCa
DCC/SMAD4	deleted in colorectal cancer / small mother against decapentaplegic 4	onkogeny dráhy kancerogeneze KRCa
DFI	disease free interval	bezpříznakové přežití
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálního růstového faktoru
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer	
ERCC1	excision repair cross - complementation Group 1	Gen DNA opravného proteinu
EUS	endoscopic ultrasonography	endoskopická ultrasonografie
Fas	cell surface death receptor	receptor buněčné smrti
Fas-L	Fas ligand	Fas ligand
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
Foxp3	forkhead box P3	marker T regulačních lymfocytů
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	granulocytární kolonie stimulující faktor
GIT	gastrointestinal tract	gastrointestinální trakt
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	granulocytární a makrofágový kolonie stimulující faktor
GTP	guanosinetriphosphate	guanozintrifosfát
Gy	Gray	Gray (jednotka absorbované dávky záření)
HIPEC	hypertermic intraperitoneal chemotherapy	hypertermická intraperitoneální chemoterapie

HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen (též MHC)
HPF	high power microscopical fields	zorné pole pod největším (400x) zvětšením
hMLH1	human mutated L homolog 1	lidský mutovaný L homolog 1
HNPCC	hereditary nonpolyposis coli carcinoma	hereditární nepolypózní karcinom kolon
HR	hazard ratio	relativní riziko
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase	indoleamin 2,3-dioxygenáza
IFN	interferon	interferon
Ig	immunoglobulin	imunoglobulin
IGF2R	insulin like growth factor 2 receptor	receptor 2 inzulinu podobného růstového faktoru
IL	interleukin	interleukin
IM	invasive margin	invazivní okraj
KIR	killer cell immunoglobulin - like receptor	imunoglobulinu podobný receptor přirozených zabíječů
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Kirstenův onkogen krysího sarkomu
KRCa	colorectal carcinoma	kolorektální karcinom
LARS	low anterior resection syndrom	syndrom nízké resekce rekta
LFA 1	integrin	integrin
LI	lymphatic invasion	lymfatická invaze
LINE	long interspersed nuclear elements	dlouhé prokládané nukleární elementy
MAIT	mucosa associated invariant T cells	invariantní s mukózou asociované T lymfocyty
MAP	mitogen activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCP-1	chemoattractant protein (CCL2)	chemoatraktivující protein (CCL2)

MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex (též HLA)
MICA	MHC class I chain - related A molecules	Antigen rozpoznávaný $\gamma\delta$ T lymfocyty
MIP1- β	macrophage inflammatory protein 1	makrofágový zánětlivý protein
MMR	mis-match repair	DNA opravné proteiny
moAb	monoclonal antibody	monoklonální protilátka
MPR	manose-6-phosphate receptor	receptor manóza-6-fosfátu
MR	magnetic resonance	magnetická rezonance
MSH2, MSH6	MutS protein homolog	
MSI	microsatellite instability	mikrosatelitní nestabilita
MUC1	mucin 1	mucin 1
Myc	myelocytomatosis oncogene	onkogen myelocytomatózy
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NaNO ₂		dusitan sodný
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminic acid	N-glykolylnuraminová kyselina
NF- κ B	nuclear factor- κ B	nukleární faktor - κ B
NK cells	natural killer cells	přirozený zabíječ
NKT	naturall killer T cells	přirozený zabíječ T lymfocyty
NO		oxid dusnatý
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	neuroblastomový onkogen krysího sarkomu
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project	
OS	overall survival	celkové přežití
PD-1 (L)	programmed death 1 (ligand)	gen buněčně řízené smrti (ligand)
PET	positron emmission tomography	pozitronová emisní tomografie
PET/CT	positron emmission tomography / computed tomography	pozitronová emisní tomografie / výpočetní tomografie
PFS	progression free survival	období bez progresse onemocnění
PGE2	prostaglandin E2	prostaglandin E2

PI	perineural invasion	perineurální invaze
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza
PIDD	P53 induced death domain protein1	doména 1 buněčné smrti indukovaná proteinem P53
PMS2	mismatch repair endonuclease	endonukleáza systému DNA opravných proteinů
PTEN	phosphatase and tensin homolog	homolog fosfatázy a tensinu
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors	kritéria hodnocení léčebné odpovědi u solidních nádorů
RFA	radiofrequency ablation	radiofrekvenční ablace
ROR γ	retinoic acid receptor related orphan receptor γ	marker Th17 lymfocytů
RTG	X ray	rentgen
SPEN1, SPEN2, SPEN31	spen family transcriptional repressors	rodina genů transkripčních supresorových faktorů
SAR	survival after recidivy	přežití od recidivy
T reg	regulatory T cells	regulační T lymfocyty
TAA	tumor associated antigens	s tumorem asociované antigeny
TBX21	T-bet X21 transcriptional factor	T-bet transkripční faktor
TC	tumor center	centrum tumoru
TCF4	T cell factor 4	faktor 4 T lymfocytů
TCR	T-cell receptor	imunoglobulinový receptor T lymfocytů
TEM	transanal endoscopic microsurgery	transanální endoskopická mikrochirurgie
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
TGF β RII	transforming growth factor β receptor II	receptor II transformujícího růstového faktoru
Th	T helper lymphocyte	T pomocný lymfocyt
TIL	tumor infiltrating lymphocytes	tumor infiltrující lymfocyty

TIM -3	T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3	receptor T lymfocytů pro hepatitidu A
TK	tymidinkinase	tymidinkináza
TLR	toll like receptor	receptor rozeznávající cizí antigeny
TME	total mesorectal excision	totální mezorektální excize
TNF	tumor necrosis factor	tumor nekrotizující faktor
TPA	tissue polypeptide antigen	tkáňový polypeptidový antigen
TPS	tissue polypeptide specific antigen	specifický tkáňový polypeptidový antigen
TRAIL	tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand	TNF α příbuzný ligand indukující apoptózu
UICC	Union Internationale Contre le Cancer	
USG	ultrasonography	ultrasonografie
VCAM	vascular cell adhesion molecule	vaskulární adhezivní molekula
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A	vaskulární endoteliální růstový faktor-A
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	receptor pro VEGF
VELIPI	vascular, lymphatic and perineural KRCa infiltration	endovaskulární, lymfatická a perineurální invaze mikrometastázami KRCa
VE	vascular infiltration	endovaskulární infiltrace KRCa
WHO	World Health Organization	
XCL	lymphotactin	lymfotaktin

3. Úvod

Kolorektální karcinom (KRCA) je jednou z nejčastějších malignit v ČR a představuje medicínský a společenský problém i pro vysokou mortalitu onemocnění. Populace ČR se také pravidelně umísťuje na předních místech v incidenci KRCA ve světě [1].

Zlepšení prognózy tak závažného onemocnění, jako je KRC, umožňuje prohlubování znalostí o podstatě onemocnění a jeho interakci s organismem pacienta. Tyto znalosti se promítají do všech linií léčby, od prevence a časné diagnostiky přes chirurgický výkon až po onkologickou terapii a dispenzarizaci. Léčba pacientů se řídí stadiem onemocnění dle Union Internationale Contre le Cancer (UICC) [2], která vychází z TNM stagingu a z dalších rizikových faktorů, jako jsou neznámé resekcční okraje, obstrukce, perforace střeva, špatná diferenciacie nádoru, mucinózní složka, nedostatečný počet vyšetřených lymfatických uzlin, lymfatická a/nebo vaskulární a/nebo perineuronální invaze [3].

V klinické praxi se setkáváme s pacienty, kteří i přes příznivou prognózu v rámci současných klinických a histopatologických parametrů recidivují po radikální chirurgické operaci a lze u nich očekávat prospěch z indikace adjuvantní onkologické léčby. Zmíněné klinické a histopatologické parametry, na jejichž základě je rozhodováno o pooperačním přístupu k léčbě ve smyslu indikace adjuvantní chemoterapie a provedení zobrazovacích metod k odhalení recidivy KRCA, dosud nezohledňují imunitní interakci mezi tumorem a organismem pacienta. Tuto interakci odráží tumor infiltruující lymfocyty (TIL) a jejich prostá přítomnost, pozice vůči invazivnímu okraji nádoru [4], ale i jejich typ diferencovatelný podle imunohistochemických markerů [5, 6]. Publikované práce prokázaly přítomnost TIL jako prognostický faktor KRCA [7], dosud však není prostudováno, zdali tumor infiltruující lymfocyty ovlivňují metastazování KRCA do regionálních lymfatických uzlin. Nabízí se proto otázka, jaký je imunohistochemický a morfologický profil TIL u pacientů s KRCA, kteří se liší v metastatickém postižení lymfatických uzlin.

Zahrnutí TIL do algoritmu rozhodování o přístupu k pacientovi po radikálním chirurgickém výkonu by také naplňovalo snahu o individualizaci léčby KRCA.

4. Kolorektální karcinom

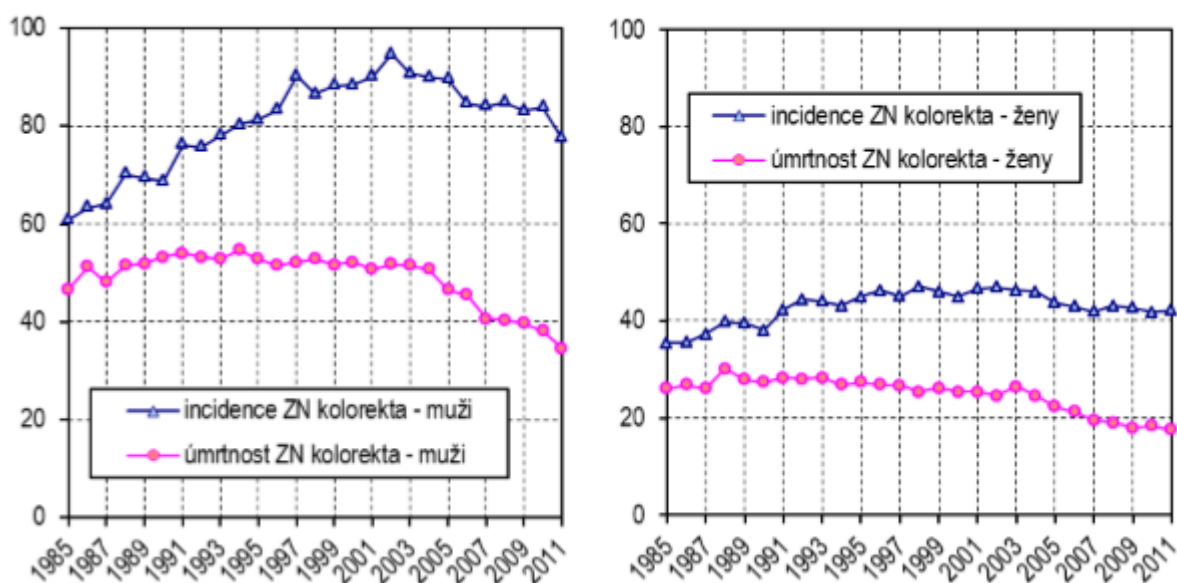
4.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice

KRCa je jednou z nejčastějších diagnostikovaných malignit v České republice. V mezinárodním měřítku se Česko umístilo v incidenci KRCa na šestém místě. Podle výsledků databáze GLOBOCAN z roku 2012 se česká populace mužů umístila v evropském přehledu na třetím místě za Slovenskem a Maďarskem, u žen obsazuje česká populace desátou nejvyšší pozici v Evropě [1].

Celkem bylo za rok 2011 hlášeno 8176 nových případů KRCa, což je mírné snížení počtu oproti minulým letům. Jedná se o 4755 případů u mužů (92,3 pacientů na 100 000 obyvatel) a 3421 u žen (64 pacientek na 100 000 obyvatel). KRCa zaujímá druhé místo v četnosti nově diagnostikovaných malignit v České republice, u mužů je na druhém místě za rakovinou prostaty a u žen na témže místě za rakovinou prsu.

80 % nově diagnostikovaných pacientů je starší než 60 let, průměrný věk v době diagnózy je vyšší u žen než u mužů. Nejvíce nových případů se vyskytuje mezi 65-69letými muži a mezi 80-84letými ženami [8]. J. Gregor uvádí: „*Populační zátěž je skutečně vysoká, ročně je v České republice nově diagnostikováno kolem 8000 pacientů s tímto karcinomem a zhruba 4000 pacientů na něj zemře*“ [9]. Budeme-li sledovat dlouhodobý trend, pak mortalita kolorektálního karcinomu v České republice za rok 2011 mírně klesla oproti předchozím rokům.

V roce 2011 dosáhla prevalence KRCa v České republice hodnoty 51 833 osob, což znamená nárůst ve srovnání s rokem 2001 (32 486 osob). Uvedená data vycházejí z ročenky Národního onkologického registru pro rok 2011 [9]. Aktuální epidemiologická data jsou k dispozici z roku 2013 na www.svod.cz. V uvedeném roce bylo hlášeno celkem 7929 nových případů KRCa pro populaci České republiky (4753 karcinomu kolon, 957 karcinomu rektosigmoideálního spojení a 2239 karcinomů rekta). Celková mortalita činila 3658 pacientů. Současný trend onemocnění je takový, že incidence stoupá a mortalita stagnuje (tab. 1), což přirozeně vede ke zvyšování prevalence v populaci České republiky. Zastoupení klinických stadii v České republice v době diagnózy je 25,6 % pro UICC I, 25,1 % pro UICC II, 27,6 % pro UICC III a 19,4 % pro UICC IV. Relativně vysoké počty stadia III a IV představují výzvu pro screeningový program určený k časnému zachytu onemocnění.



Tab. 1. Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na KRCa u mužů a žen (na 100 000 mužů/žen, evropský standard) za rok 2011

Maximum pacientů je u karcinomu rektu i kolon diagnostikováno v České republice ve věku 70 až 74 let. Zdroj: on-line aplikace www.svod.cz. Pětileté přežití je dle stadia choroby u symptomatických jedinců s KRCa uvedeno níže (tab 2) [10].

Klinické stadium	Pětileté přežití
UICC I	93,2%
UICC II	77,0%
UICC III	47,7%
UICC IV	6,6%
Všechna stadia	50,7%

Tab. 2. Pětileté přežití britských pacientů v letech 2002–2006

Z výše uvedeného vyplývá, že KRCa je onemocnění, které představuje závažný medicínský a sociální problém.

4.2 Etiologie kolorektálního karcinomu

4.2.1 Endogenní faktory

Endogenní faktory se uplatňují hlavně u familiární formy. Familiární formy s vyjádřenou dědičností však tvoří pouze 5 % všech případů kolorektálního karcinomu [11]. Jedná se o pacienty s Lynchovým syndromem (hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem), familiární adenomatózní polypózou, Gardnerovým a Turcotovým syndromem. Dále do této skupiny dědičných polypóz patří Peutzův-Jughersův syndrom a juvenilní polypóza [12 s. 150].

K endokrinním faktorům navyšujícím riziko vzniku KRCa patří diabetes mellitus, což se dá vysvětlit tím, že inzulin je růstovým faktorem pro střevní sliznici. Z hormonálních vlivů se uplatňuje i dlouhodobá androgenní deprivace. Rizikovým činitelem je též obezita [13 s.16].

Dizertační práce se dále bude zabývat výhradně sporadickou formou KRCa. Predispozicí ke vzniku KRCa jsou non-familiární mnohočetná adenomatóza, hyperplastická polypóza a inflamatorní polypóza. Inflamatorní typ polypózy je spjat s chronickým zánětlivým procesem střev např. u ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby a vzácně s amebiázou a schistosomózou [14 s. 48-52].

4.2.2 Exogenní faktory

U sporadické formy jsou jako rizikové faktory vzniku uváděny vysoký příjem živočišných tuků a bílkovin a nedostatečný přísun fermentabilní vlákniny. Nedostatek vápníku je rizikovým faktorem z důvodu snížené schopnosti detoxikace žlučových kyselin. Nedostatek selenu a vitaminů A, C, E se podílí na snížené ochraně před volnými kyslíkovými radikály, čímž přispívá ke zvýšené pravděpodobnosti vzniku KRCa [14 s. 19]. Dále se jedná o nevhodnou tepelnou úpravu stravy, kam patří např. uzení masa, které obsahuje karcinogenní nitrosaminy. Tyto látky mohou vznikat i při výrobě sladu, jejich hladiny jsou proto stanovovány. Dle webového informačního centra ministerstva zemědělství pro bezpečnost potravin stanovuje česká vyhláška 305/2004 o kontaminantech limit pro celkový obsah nitrosaminů v pivu 1,5 µg/kg. Vyhláška 304/2004 o aditivech reguluje vznik nitrosaminů omezením přídatku dusitanů do masných a dalších výrobků a stanovením jejich zbytkového množství (50 až 250 mg/kg jako NaNO₂) [15]. Alkohol patří

těž mezi exogenní faktory kolorektálního karcinomu obecně. Pivo však vychází z provedených studií jako nejrizikovější alkoholický nápoj [16]. Význam konzumace červeného masa v karcinogenezi KRCa je dosud kontroverzní [17]. Zvažovaných mechanismů je více. Železo v hemu, který je obsažen v mase, může indukovat oxidaci lipidů s tvorbou volných radikálů. Ty vedou k cytotoxicitě a kompenzatorní proliferaci enterocytů. Uvedené zjištění bylo prokázáno v experimentu na krysách [18]. Hem může také katalyzovat tvorbu nitrosaminů [19]. Dalším komponentem červeného masa, který může hrát roli v chronickém zánětu střeva a karcinogenezi, je N-glycolylneuraminová kyselina (Neu5Gc), která je inkorporovaná do stěny enterocytu a může vyvolat autoimunní reakci. Již byly nalezeny cirkulující protilátky anti-Neu5Gc [20]. K významným prokázaným rizikovým faktorům pro KRCa patří též kouření cigaret [21 s. 171]. Jako projektivní faktor byla studována probiotika, byl prokázán protektivní vliv lactobacilu ve střevní mikroflóře na růst karcinomu kolon na myším experimentálním modelu. Pravděpodobný mechanismus účinku je změna poměru produkce imunoglobulinu ve prospěch k IgA oproti IgG, neboť IgA nemá schopnost aktivovat komplement a nestimuluje chronický zánět, který přispívá ke karcinogenezi [22].

4.3 Karcinogeneze

Geny, které mají klíčové úlohy v karcinogenezi, se nazývají protoonkogeny a tumorsupresorové geny. Při karcinogenezi KRCa se jedná o akumulaci genetických a epigenetických změn. Za fyziologických okolností tumorsupresorové geny inhibují buněčné dělení. Tato inhibice je porušena po ztrátě funkce obou alel v důsledku mutace či epigenetických změn. Jedná se o hypotézu tzv. dvojitého zásahu [23]. Na druhou stranu protoonkogeny zajišťují buněčnou proliferaci. Karcinogeneze je spojena s mutací, která vede ke zvýšené expresi těchto genů. U KRCa byly dosud nalezeny tři sekvence genetických změn vedoucí ke karcinomu. Jedná se o chromozomální nestabilitu (chromozomální instabilita CIN), mikrosatelitní nestabilitu (microsatellite instability MSI) a fenotyp methylátoru CpG ostrůvků (CpG island methylator phenotype CIMP) [24].

4.3.1 Chromozomální nestabilita

U přibližně poloviny populace se během života vyvine KRCa, přičemž u 3 % se z adenomu vyvine karcinom [25]. Z tohoto zjištění vychází obecně přijímaná sekvence adenom - karcinom [26], která je též označována jako dráha chromozomální nestability, neboť ji charakterizují alelické ztráty na chromozomech 5 gen adenomatous polyposis coli (APC) 7 gen p53 a 18 gen Deleted in colorectal cancer/ small mother against decapentaplegic (DCC/SMAD4). Ve fázi tvorby polypů dochází k mutaci genu APC, během adenomatózy se připojuje mutace genu rat sarcoma oncogene (Ras), při malignizaci polypů se objevuje mutace genu pro protein p53 a delece chromozomu 18q [27].

APC mutace je přítomna v 60 % u karcinomu kolon a u 82 % karcinomu rekta [28]. Gen APC stimuluje destrukci β -cateninů v proteazomech. V případě ztráty funkce APC se β -catenin akumuluje a aktivuje transkripci genů podporující proliferaci genů jako Myc a cyclin D [29].

Dalším známým krokem v karcinogenezi typu chromozomální nestability je mutace tumorsupresorového genu pro protein p53. Jedná se o transkripční faktor indukující transkripci inhibitoru cyklin dependentní kinázy, proapoptotických genů a genů pro signální dráhy buněčné smrti (CD95/Fas, tumor necrosis factor α , TRAIL – Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand, PIDD – P53 induced death domain protein1). Uvedená sekvence je také označována jako chromozomální nestabilita [30 s. 272-280].

Významným krokem v karcinogenezi je mutace protoonkogenů z rodiny RAS. Pro KRCa je významný gen K-RAS (Kirsten - RAS) a N-RAS (Neuroblastoma - RAS) [31]. K-RAS kóduje 21 - kDa GTP-binding protein. Tato GTPáza umožňuje převod extracelulárního signálu k proliferaci. Mutovaný gen K-RAS vede ke stimulaci proliferace a útlumu apoptózy bez ohledu na extracelulární signály, jako je např. přítomnost růstových genů (EGF – epidermal growth factor). Mutace K-RAS je přítomná ve stejném zastoupení v adenomech i karcinomech, ovšem s vyšší frekvencí u velkých adenomů, což naznačuje, že se jedná o pozdní událost v sekvenci adenom - karcinom [32]. Přítomnost mutace K-RAS a N-RAS má zásadní vliv i na predikci biologické terapie zaměřené proti EGFR receptorům, při mutaci RAS genů je tato léčba neúčinná [33].

Mutace genu DCC je přítomna v 60 až 70 % případů KRCa. Dle dostupné literatury není zcela známo, jakým způsobem je funkčně spojen s kancerogenezi. Wild typ DCC

aktivuje pochody vedoucí k apoptóze. Exprese DCC též indukuje zastavení buněčného cyklu ve G2/M fázi buněčného cyklu v některých buněčných liniích [11].

4.3.2 Mikrosatelitní nestabilita

Jako mikrosatelity jsou označovány krátké sekvence repetitivní DNA. Tyto sekvence jsou velmi zranitelné při replikaci a jejich proměnná délka značí ztrátu funkce mismatch repair genů (MMR, opravných genů). Vrozená dědičná porucha MMR genů se vyskytuje u Lynchova syndromu. U sporadické formy, která reprezentuje cca 15 % KRCA, dochází k vyřazení funkce MMR. Obvykle se jedná o metylaci promotorového úseku genu hMLH1 [30 s. 71]. Biomarkerem pro tuto epigenetickou změnu je právě vysoká mikrosatelitní nestabilita (MSI High). Selhání MMR genů vede k mutacím v dalších genech (TGF β RII – transforming growth factor β receptor II, BAX – B cell lymphoma associated X protein, IGF2R – insulin like growth factor 2 receptor, kaspáza 5, TCF4 T cell factor 4, axin, CDX2 homeobox transcription factor a BCL 10 – B cell lymphoma 10). Popsaný sled mutací epigenetických změn je typický pro serrated adenom. Tumory tohoto typu se častěji vyskytují v proximálním tlustém střevě a s vyšší incidencí u žen, mají vyšší grade s mucinózním fenotypem, dobře ohraničený invazivní okraj a vykazují zvýšenou imunitní reakci ve smyslu přítomnosti TIL [34].

Geny, které se užívají v diagnostice Lynchova syndromu též označovaného jako HNPCC (hereditary nonpolyposis coli carcinoma) a MSI-High sporadické formy jsou MLH1 - MutL homolog 1, MSH2 - MutS protein homolog, MSH6 a PMS2 (Mismatch repair endonuclease). Odhalení Lynchova syndromu má význam pro dispenzarizaci příbuzných pacienta. Uvedená vyšetření mají vliv na indikaci chemoterapie, neboť pacienti klinického stadia UICC II s defektem MMR (dMMR, tedy MSI-high) nemají prospěch z adjuvantní chemoterapie na bázi 5 - fluorouracil [3].

4.3.3 Fenotyp methylátoru CpG ostrůvků

U této sekvence karcinogeneze nacházíme silnou DNA metylaci CpG ostrůvků v promotorových oblastech genů, které blokují transkripci tumorsupresorových genů. Jedná se o tzv. CpG island methylator phenotype (CIMP) [35]. Jako markery pro CIMP je ve většině studií užíván panel genů hMLH1, p16, SPEN1, SPEN2 a SPEN31 [24]. CIMP se může vyskytovat u tumorů s mikrosatelitní nestabilitou i stabilitou. Je prokázána pozitivní korelace s lokalizací na pravé straně kolon, mucinózním fenotypem a BRAF mutací nezávisle na statutu mikrosatelitní stability.

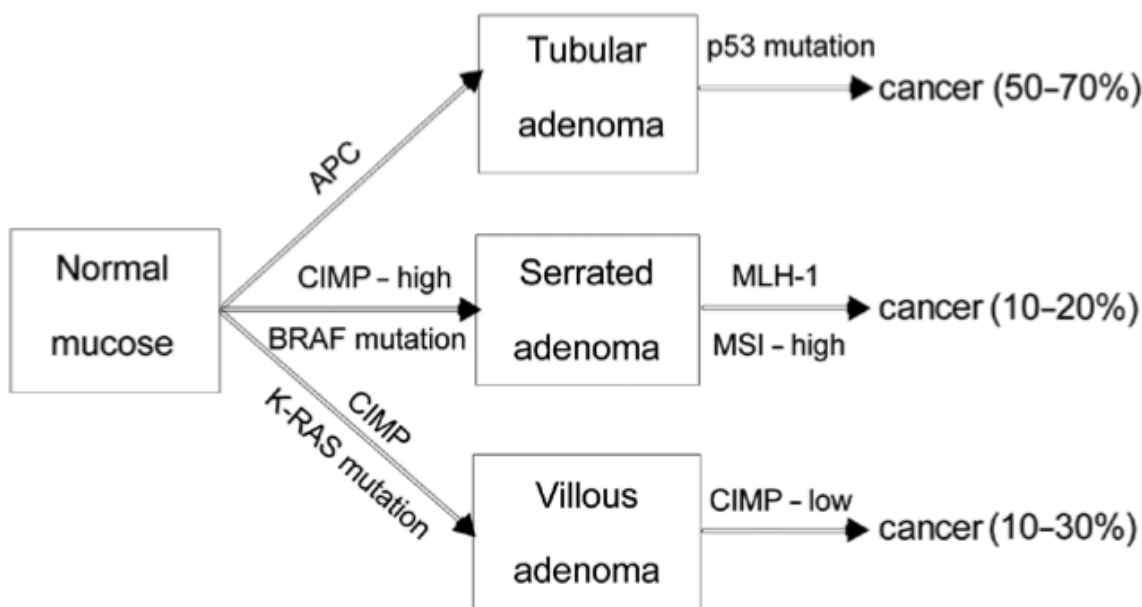
Tumory s CIMP často vykazují mutaci genu BRAF [36]. Protein BRAF je členem rodiny RAF kináz, které fungují jako signální proteinkinázy regulující např. dráhu mitogenem aktivovaný protein kinázy (MAP) se zásadním významem pro proliferaci buňky. Tumory s BRAF mutací produkují více mucinu (žaludeční MUC5AC a intestinální MUC2)[27].

4.4 Morfologie a histologie

4.4.1 Histologie adenomů kolorekta

Adenomy kolorekta se dle morfologie a potenciálu malignizace dělí na hyperplastické polypy s nejnižším rizikem karcinogeneze, "serrated" polypy a adenomy. Adenomy se dále dělí na vilózní, tubulární a tubulovilózní.

Serrated adenomy pojmenované po „zoubkovaném“ uspořádání epitelu krypt lze rozdělit na tři podtypy – tradiční serrated adenom, sessilní serrated adenom a smíšený typ [37]. Pro morfologické typy adenomů lze přiřadit specifickou sérii genetických mutací, které vedou ke vzniku karcinomu. Pro vilózní a serrated adenomy je příznačná karcinogeneze, v níž hraje význam DNA methylace. Pro serrated adenomy je též typická přítomnost mikrosatelitní nestability. Představené změny ve fenotypu a genotypu tumorů tlustého střeva jsou pouze zjednodušené a ukazují korelaci mezi morfologickými nálezy a genetickými a epigenetickými změnami. Pro přehlednost je uvedeno schéma (obr. 1).



Obr. 1. Vztahy mezi morfologickými nálezy a genetickými a epigenetickými změnami [11]

4.4.2 Histologie KRCa

Maligní nádory tlustého střeva a rektu lze rozlišovat podle histogeneze a biologického chování na adenokarcinom, neuroendokrinní karcinom, maligní lymfomy a sarkom. K hraničně maligním neopláziím patří neuroendokrinní neoplázie a gastrointestinální stromální tumor [38]. Dizertační práce se bude dále zabývat pouze adenokarcinomem.

KRCa se makroskopicky dělí na exofytické (polypózní), vyhloubené (exulcerované) a ploché (infiltrující). Mikroskopický nález určuje grade tumoru. Od dobře diferencovaných s gradem 1 až po zcela dediferencované grade 4. WHO klasifikace rozlišuje tyto typy karcinomu: tubulární, medulární, mucinózní, z prstenčitých buněk, skvamózní, adenoskvamózní, dediferencovaný, malobuněčný a ostatní (např. papilární) [14 s. 33].

Tubulární karcinom je tvořen glandulárními strukturami tubulárních a tubulovilózních tvarů. *Mucinózní karcinom* je více než z poloviny tvořen hlenem, který je secernován do lumina žláz. Disekce vrstev střevní stěny mucinem vede k rychlému šíření tumoru. V histologickém preparátu je možné spatřit volné trsy nádorových buněk v hlenových jezírkách. *Karcinom z prstenčitých buněk* je tvořen více než z poloviny

buňkami tvaru pečetního prstenu. Zmíněný tvar je tvořen vakuolou mucinu.

Adenoskvamózní karcinom má zastoupenou i dlaždicovou složku. Častěji se vyskytuje v rektu. *Medulární karcinom* je tvořen solidními ložisky větších buněk s výraznými jádry a prominujícími jádry. Ve stromatu je přítomný lymfoidní infiltrát. I přes značnou dediferenciaci má medulární karcinom relativně dobrou prognózu. Prognosticky nepříznivé jsou karcinomy z prstenčitých buněk, dediferencované a mucinózní karcinomy [39, 12 s. 164].

4.5 Progrese KRCa

4.5.1 Metastazování

Metastatické postižení můžeme rozdělit podle časové konsekvence vzhledem k diagnóze kolorektálního karcinomu na synchronní a metachronní. V době diagnózy kolorektálního karcinomu se vzdálené metastázy podaří prokázat u 20 % [40] pacientů u 25–30 % postižených se metastázy objeví jako metachronní [41]. KRCa má vysoký metastatický potenciál a zakládá dceřiná ložiska v přilehlých lymfatických uzlinách a ve vzdálených orgánech. Nejčastěji KRCa metastazuje do jater a do plic. Do prvních dvou let po radikální operaci jsou nejčastějším místem metastáz játra, po pěti letech převládá postižení plic. Ostatní orgány bývají postiženy výjimečně, většinou se jedná o metastázy na mozku [14 s. 25]. K metastazování dochází hematogenně, lymfogenně a rozsevem po dutinách (v lumen tlustého střeva, ve volné dutině břišní či hrudní). Metastazující buňka musí produkovat cytokiny a růstové faktory, které jí umožní vybudovat stroma a zajistí angiogenezi [14 s. 25].

V první fázi metastazování probíhá invaze do okolí, kdy dojde k prorůstání nádorových buněk přes bazální membránu sliznice. Zásadní roli zde hrají matrix metaloproteinázy, které působí proteolyticky na bazální membránu a okolní mezibuněčné pojivo, čímž se usnadňuje i angiogeneze [42]. V další fázi dochází k transportu nádorových buněk lymfatickou a krevní cestou. K tvorbě metastáz však vede až nidace nádorových buněk a jejich průnik do tkáně vzdálených orgánů. Než dojde k nidaci, je ovšem drtivá většina nádorových buněk zničena imunitním systémem nebo zanikne mechanickým postižením a na základě tzv. kyslíkového efektu v arteriální krvi. K nidaci jsou nutné adhezivní molekuly (CAM – cells adhesion molecules), kdy dojde k adhezi trombů

obsahujících nádorové buňky. Po přesunu buněk z cévního řečiště do tkáně se proliferační aktivita odvíjí od přítomnosti mnoha faktorů. Může se jednat o autokrinní stimulaci faktory jako fibroblast growth factor (FGF), TGF α , epidermal growth factor (EGF). Stěžejní onkogeny v této fázi jsou c-myc, c-erb [43]. Předpokladem pro růst metastázy i primárního tumoru je neoangiogeneze a tvorba stromatu [14 s. 25].

4.5.2 Další způsoby metastazování KRCa

V případě šíření po peritoneální dutině se uplatňuje adheze a implantace v bezprostředním okolí tumoru. Pokud se ale v peritoneální dutině nachází tekutina, dochází k ustálenému vzorci distribuce implantačních metastáz do tzv. peritoneálních kompartmentů, kde se karcinomové buňky nidují v recesech mezi stacionárními povrchy nebo v kolekcích tekutiny vytvořených vlivem gravitace. Tento způsob šíření je typický pro mucinózní karcinom, jehož implantační metastázy se proto objevují nejčastěji v pravém subfreniu, parakolicky vlevo kaudálně a v Douglasově prostoru. Dalšími místy progresu peritoneální metastázy jsou lymfoidní struktury (*milky spots*) na velkém a malém omentu, peritoneu na adnexech a děloze a na mezenterální straně tenkého střeva. Implantační metastázy mají tendenci nidovat na traumatizovaném peritoneu. Nádorové buňky se mohou šířit též intraluminálně spolu se střevním obsahem a implantovat se do místa anastomózy nebo do staplerové linie v průběhu operace [44 s. 374].

4.6 Diagnostika KRCa

4.6.1 Klinické projevy a fyzikální vyšetření

Klinické projevy onemocnění závisí v největší míře na lokalizaci nádoru a jeho pokročilosti. Přibližně 50 % všech nádorů se nachází v rektu, 25 % v sigmatu a zbylých 25 % v ostatních částech kolon [45 s. 307]. Společnými příznaky je anemizace, váhový úbytek a únava. Chronická anemizace se může projevit dušností a kolapsovými stavy. Nádory v pravé polovině tračníku mohou dosáhnout značné velikosti, než se projeví poruchami pasáže vzhledem k relativně většímu průměru střeva a řidší konzistenci stolice. K příznakům tumoru v pravé polovině tračníku může patřit bolest břicha v pravém hypogastriu a mezogastriu s hmatnou rezistencí. U karcinomu kolon descendens, sigmatu

a rekta je příznačný dřívější nástup obtíží s vyprazdňováním, může se objevit obstrukce s rozvojem mechanického ileu či paradoxní průjmy. K tomuto projevu přispívá i fakt, že se v těchto lokalizacích častěji objevuje cirkulární růst po obvodu stěny, který vede časně ke stenóze [12 s. 168]. Karcinom rekta se také může projevit ténezmy a stužkovitou stolicí [45 s. 365].

Anamnéza a pečlivé fyzikální vyšetření jsou podmínkou pro efektivní směřování dalšího vyšetřovacího postupu, který vede k rychlému stanovení správné diagnózy. Vzhledem k tomu, že přibližně 50 % tumorů rekta je hmatných při indagaci, je neopominutelné vyšetření per rectum [46 s. 303].

4.6.2 Endoskopické vyšetřovací metody

Kolonoskopie

Zásadní význam pro diagnostiku kolorektálního karcinomu má kolonoskopie, jedná se o vyšetření konečníku a tlustého střeva flexibilním endoskopem. Ve většině případů je možno provést tzv. totální kolonoskopii, kdy je možno přehlédnout i část terminálního ilea. Výtěžnost vyšetření je limitována dobrou přípravou střeva a průchodností střeva pro endoskop, ať už z důvodu stenózy či ohybů tlustého střeva např. při srůstech. Endoskop neslouží jen jako pomůcka pro vizualizaci lumen tlustého střeva, ale i jako nástroj pro odebrání bioptických vzorků a k provádění polypektomií. Endoskopicky lze provádět i onkochirurgicky radikální výkon rozsahu submukózní excize. Uvedenou terapii je však možno použít pouze do stadia T1, kontrola okrajů excidované tkáně patologem z důvodů nádorové infiltrace je samozřejmostí. Kolonoskopie je též využívána k označení léze tuší. Označení se provádí u malých lézí, které nelze peroperačně palpovat, či pro usnadnění laparoskopické operace. Označení tuší je nutné i v případě, kdy je endoskopicky provedena polypektomie, která se po histologickém vyšetření ukáže jako neradikální, a je proto nutné doplnit resekční chirurgický výkon. Technickým zlepšením, které však přispívá spíše ke snazšímu odhalení malých polypů než k diagnóze kolorektálního karcinomu, je chromodiagnostika s použitím zvětšovací endoskopů. K barvení se používá obvykle methylenová modř a indigokarmín. Nejedná se však o rutinní metodu. Pokud není z technických důvodů možno dokončit totální kolonoskopii, je možno indikovat CT kolografii. Důvodem pro nedokončení vyšetření může být nepropustná stenóza, ostrý

záhyb střeva či nespolupráce pacienta při bolestivosti vyšetření a nedostatečná příprava tračníku [47].

Anoskopie a rektoskopie

Jedná se o vyšetření rigidním rektoskopem do vzdálenosti cca 14 cm, vzácně až do 25 cm od linea dentata. Vyšetření provádíme po přípravě mikroklysmatem. Při zavádění tubusu je možno insuflovat vzduch. Výkon může být diagnostický i terapeutický, jako např. polypektomie či koagulace tumoru. V případě nálezu tumoru je třeba doplnit totální kolonoskopii k vyloučení nádorové duplicity na tlustém střevě.

4.6.3 Konvenční radiodiagnostika

RTG vyšetření

Nativní snímek břicha vestoje patří k základním vyšetřovacím metodám užitým při vyšetřování poruch pasáže. RTG snímek plic je součástí předoperačních vyšetření k vyloučení plicních metastáz.

Irigoskopie

Jedná se o vyšetření metodou dvojího kontrastu (po aplikaci kontrastní látky do konečníku se insuluje vzduch dvojcestnou rourkou). Pacienta vyšetřujeme a polohujeme tak, že nejvýše položená část střeva ukáže tenký film kontrastní látky s plynem a může zobrazit i velmi drobné léze. Snímky vleže na levém a pravém boku na konci vyšetření zobrazí i drobné polypy. Uvedená metoda je dnes však vytlačena ostatními zobrazovacími vyšetřeními a endoskopií [14 s. 79-83].

4.6.4 Ultrasonografické vyšetření

Ultrasonografické (USG) vyšetření má význam hlavně pro diagnostiku metastatického postižení jater. Diagnostika kolorektálního karcinomu je omezená pro plyn ve střevě. Nelze také odlišit nádor od zánětlivého infiltrátu. USG jater má pro svoji dostupnost a absenci radiační zátěže pro pacienta své nezastupitelné místo v dispenzarizaci pacientů po operaci kolorektálního karcinomu. U nejasných nálezů lze doplnit kontrastní USG vyšetření jater [48].

4.6.5 Výpočetní tomografie

Výpočetní tomografie (CT) je vysoce přínosná při diagnostice nádorů v břišní dutině, přináší neocenitelnou informaci o rozsahu a infiltraci okolí tumoru. CT má schopnost zachytit hlavně růst nádoru mimo stěnu střeva a infiltraci přilehlé tukové tkáně. Stěžejní role CT proto spočívá v posouzení postižení uzlin, infiltraci okolních orgánů a přítomnosti vzdálených metastáz. CT může odhalit infiltraci do močového měchýře, vnitřního genitálu a do svalů pánevního dna a přispívá tak ke zhodnocení operability nádoru.

Vyšetřovací protokol CT se liší dle indikace. V případě vyšetřování náhlé příhody břišní, kdy u kolorektálního karcinomu připadá nejčastěji v úvahu ileus, je provedeno vyšetření bez přípravy nemocného s aplikací intravenózní kontrastní látky. U plánovaného vyšetření za účelem zjištění stagingu se provádí vyšetření s podáním kontrastní látky intravenózně a vzduchu nebo CO₂ per rectum. Tumor se na CT vyšetření obvykle projeví jako kratší stenóza se zesílenou stěnou střeva a okraje mohou být naválité. Před zúžením se často vyskytuje prestenotická dilatace střeva. Lymfatické uzliny infiltrované metastatickým procesem jsou obvykle zvětšené, mají obvykle kulovitý tvar a hypodenzní okrsky nekrózy. Karcinózu peritonea lze předpokládat při infiltraci velkého omenta, nodulárním zesílením peritonea a ascitu. Implantační metastázy jsou patrné zejména na povrchu parenchymatózních orgánů, metastázy menší než 5 mm se nemusí prokázat, záleží ovšem na technické úrovni zařízení [49].

4.6.6 Virtuální endoskopie

V případě pacientů, u kterých nelze provést validní kolonoskopii, je možné použít tzv. CT kolonografii neboli virtuální endoskopii. Tato metoda zobrazuje vnitřní povrch kterékoli části trávicí trubice. Vyšetření musí být prováděno u pacienta s vyprázdněným střevem a před výkonem se insufluje konečníkem plyn (většinou 2 l vzduchu či CO₂). Výhodou virtuální kolonoskopie je možnost opakované tvorby rekonstrukcí s pohledem na léze z více stran. Některé drobné léze mohou být skryty například za haustrem nebo v ostrých ohybech střeva, proto musí být proveden tzv. průlet oběma směry. Senzitivita a specifická u polypů nad 5 mm je uváděna kolem 85 %, pro polypy nad 1 cm je senzitivita 93 % a specifická 97 % a u stenozujícího karcinomu je senzitivita a specifická téměř stoprocentní [49]. Mezi hlavní limity patří nemožnost odebrání histologických vzorků a neschopnost zachytit barvu sliznice [50].

4.6.7 Pozitronová emisní tomografie / výpočetní tomografie

Vyšetření pozitronovou emisní tomografií (PET) v kombinaci s CT je indikováno v dispenzarizaci pacientů po léčbě a nenáleží k základním vyšetřením KRCa. Při vyšetření dochází ke sloučení metabolické aktivity s morfoloickým zobrazením. Nejčastěji používaným radionuklidem je ¹⁸F vázaný ve fluorodeoxyglukóze. Pro vyšetření je příznačná vysoká senzitivita, ale nízká specifická. Může být proto obtížně rozlišit např. zánětlivé změny od lokální recidivy malignity. PET/CT vyšetření může odlišit reaktivní lymfadenopatii od metastáz a může též odhalit peritoneální diseminaci karcinomu či vzdálené metastázy [51].

4.6.8 Endosonografie

Tato metoda spadá mezi standardní vyšetřovací metody pro diagnostiku a určení pokročilosti karcinomu rekta. K výhodám vyšetření patří absence radiační zátěže a senzitivita 95 % při specifické 89 %. Endosonografie je též schopna zobrazit uzliny v periproktální oblasti do velikosti 3 mm. V posouzení metastatického postižení uzlin je však shoda s nálezem patologa nízká, cca 70 %. Doplerometrický mód vyšetření ukáže vaskularizaci tumoru. Podmínkou validity vyšetření je zkušenost vyšetřujícího a dobré

vyprázdnění střeva nemocného. Zdravé střevo v oblasti rekta má rozlišitelné dvě hypoechogenní linie (tunica mucosa a lamina muscularis propria) a tři hyperechogenní vrstvy s patrným homogenním zevním svěračem a puborektální kličkou. Orientačními strukturami jsou prostata u mužů a děloha u žen.

V rámci rozlišení jednotlivých stadií je endosonografie citlivější než MR v rozlišení mezi stadii T1 a T2, což má dopad na indikaci transanální mikrochirurgické excize (TME). Problematické může být rozlišení mezi stadiem T0 a T1, v obou případech se jedná o hypoechogenní, hladce ohraničené léze [52]. U hraničních nálezů USG vyšetření spíše nadhodnocuje stadium. T4 stadium však lze s určitostí vyloučit nálezem vrstvy tuku mezi tumorem a přiléhajícími strukturami [14 s. 99].

4.6.9 Magnetická rezonance

Spolu s endosonografickým vyšetřením je magnetická rezonance (MR) pánve užívána pro stanovení rozsahu primárního tumoru rekta. Toto dříve doplňkové vyšetření se v dnešní době stalo dostupnějším a patří mezi standardní vyšetření před plánovanou operací pro karcinom rekta.

Před vyšetřením rekta je pacient připraven vyprázdněním konečníku a podáním spasmopanu k potlačení motility střeva. Polohou k vyšetření na pracovišti naší nemocnice je poloha na břicho, kdy se plyn nahromadí v ampule rekta. Nejprve se vyšetřuje nativně v T1 váženém obraze a poté v T2 váženém obraze. Dále vyšetření pokračuje s gadoliniovým paramagnetickým kontrastem podaným intravenózně. Sekvence s potlačením tuku se užívá k lepšímu zobrazení lymfatických uzlin. K výhodám MR patří absence ionizujícího záření a přínos v pooperační dispenzarizaci k rozlišení jizvy od lokální recidivy, ačkoli i zde může dojít k nejasnostem při zánětlivé reakci. Falešně negativní nález může vzniknout na podkladě desmoplastického růstu tumoru. V těchto případech může pomoci sledování dynamiky nádorových markerů. Omezením této metody je přítomnost feromagnetických materiálů v těle pacienta, délka vyšetření (u rekta cca jedna hod) a klaustrofobie u vyšetřovaného [49].

MR má výbornou senzitivitu k detekci infiltrace mezorektální fascie. Je-li tato vzdálenost menší než 1 mm, je zvýšené riziko inkompletní chirurgické resekce (po neoadjuvanci je možné, že se vzdálenost zvětší) [48, 53]. MR i endosonografie poskytuje informaci o vztahu tumoru ke svěračům, což ovlivňuje rozhodnutí o indikaci výkonu

zachovávajícím svěrače. S výhodou lze použít MR po amputaci rekta, kdy je použití endosonografie vyloučeno. MR se uplatňuje nejen pro zobrazení pánve, ale je využívána jako MR jater v dispenzarizaci k odhalení vzdálených metastáz v případě, že je CT vyšetření kontraindikováno například pro alergii na jodovou kontrastní látku. MR vyšetření může také pomoci v diferenciální diagnostice ložiskového procesu již nalezeného na CT vyšetření, kdy má MR přínos v rozlišení benigních lézí [49].

4.6.10 Nádorové markery

Analýza nádorových markerů není užívána k diagnostice KRCa, ale ke sledování odpovědi na léčbu a k časnému zachytu recidivy. Onkomarkery jsou obecně řečeno látky tvořené buňkami nádoru nebo organismem jako odpověď na tumor. Jedná se proto o doplňkovou diagnostickou metodu, vyhodnocení výsledků je třeba provádět ve spolupráci laboratoře s klinikem. Spíše než absolutní hodnoty je pro interpretaci důležitá dynamika hladiny nádorového markeru.

U KRCa je hlavním stanovovaným onkomarkerem karcinoembryonální antigen (CEA) v kombinaci s CA 19-9 [54, 55]. V souvislosti s kolorektálním karcinomem byly studovány CA 72-4, CA 242 a proliferační markery TPA a TPS [14 s. 66-70].

4.7 Screening

Diagnóza KRCa na základě klinických příznaků bývá často již ve vyšších stádiích onemocnění. Z těchto důvodů a vzhledem k vysoké incidenci onemocnění byl v ČR zřízen v roce 2000 screeningový program pro časnou diagnostiku KRCa. Aktualizace z roku 2013 zahrnuje systém adresného zvaní a možnost primární screeningové kolonoskopie [56]. Screeningový program se liší u pacientů bez predispozic ke vzniku KRCa a u pacientů se zvýšeným rizikem.

4.7.1 Screening obyvatel bez predispozice ke KRCa

Pacienti mezi 50 a 54 lety podstoupí test na okultní krvácení v režii praktického lékaře či gynekologa. Screeningové testy se týkají pouze asymptomatických pacientů. Testy na okultní krvácení vycházejí z faktu, že adenomy a kolorektální karcinomy krvácejí, což je detekovatelné chemickými metodami [14 s. 57]. Vzhledem k nízké specificitě guajakových testů na okultní krvácení se přechází na testy na imunochemickém principu. Při negativním výsledku se test na okultní krvácení opakuje po roce, při pozitivním výsledku je provedena kolonoskopie. Pokud je kolonoskopie negativní, opakuje se test na okultní krvácení za 10 let. U pacientů 55letých a starších lze začít screeningovou kolonoskopií či testem na okultní krvácení. Při negativním nálezu na okultním krvácení se vyšetření opakuje za dva roky. Při negativním kolonoskopickém nálezu se opakuje test na okultní krvácení za 10 let [14 s. 57].

4.7.2 Screening vysokorizikových skupin obyvatel

U pacientů se *střevní polypózou* (Familiární adenomatózní polypóza, Gardenerův syndrom, Turcotův syndrom) je indikován genetický screening a kolonoskopie ve věku 10 až 12 let s flexibilní sigmoideoskopií jednou za 2 až 3 roky.

Pacienti s *Lynchovým syndromem* by měli podstoupit od 20 let totální kolonoskopii každé 2 až 3 roky, doplněnou o každoroční test na okultní krvácení.

Pacienti s *pozitivní rodinnou anamnézou* s incidencí KRCa u příbuzných 1. stupně jsou indikováni ke screeningu od 35 let. U výskytu karcinomu u příbuzného před 55. rokem života nebo při výskytu u dvou příbuzných je doporučena kolonoskopie každých 3 až 5 let. Každoročně je indikován test na okultní krvácení. Při výskytu dvou KRCa v rodině je doporučen u příbuzných 1. stupně test na okultní krvácení každý rok s kolonoskopií jednou za dva roky.

Pacienti s *adenomy* jsou indikováni k profylaktické polypektomii, u příbuzných těchto pacientů je doporučen screening od 35 let věku.

Do části populace s vysokým rizikem patří pacienti s *nespecifickými střevními záněty*. U těchto pacientů se doporučuje zahájit totální kolonoskopie 8 let od počátku pankolitidy a u kolitidy levé části tračnicku. Při nálezu neurčitých dysplastických změn je indikována totální kolonoskopie každý rok. V případě dysplazii nízkého stupně se provádí

každých šest měsíců, při makroskopických změnách a dysplázii vysokého stupně je indikován chirurgický výkon.

Kolonoskopie v rámci dispenzarizace je prováděna po dobu 5–6 let po kurativní operaci. Pokud nebyla před operací provedena totální kolonoskopie, je nutné ji doplnit do půl roku k vyloučení synchronní duplicity.

Pacienti po operaci karcinomu prsu, dělohy, ovárií a po ureteroileostomii podstupují test na okultní krvácení každý rok od operačního výkonu. Test u zmíněných malignit je indikován k vyloučení duplicity, u ureteroileostomie je vyšší riziko vzniku KRCa [14 s. 58].

4.8 Léčba KRCa

Léčbu KRCa můžeme rozdělit dle kurability onemocnění na radikální a paliativní. Šanci na kurativní léčbu poskytuje pouze radikální chirurgický výkon doplněný v indikovaných případech o neoadjuvantní či adjuvantní onkologickou léčbu [58 s. 541].

4.8.1 Onkologicky radikální chirurgická léčba

Obecné principy chirurgické léčby

Rozsah a typ chirurgického výkonu je daný lokalizací a pokročilostí tumoru spolu s jeho lymfatickou drenáží. Pro dosažení R0 resekce, která představuje podmínku pro radikalitu výkonu, je nutné zajistit resekční linii bez makroskopické i mikroskopické nádorové infiltrace. U resekátu se sleduje distální a proximální okraj, do kterého zahrnujeme i cévní stopku resekátu [59 s. 212], v případě karcinomu rekta je též nezbytné sledovat postižení cirkumferenciálního okraje resekátu, což je nezávislý faktor lokální rekurence [60]. R0 resekce je podmíněna vzdáleností nádorové infiltrace do 1 mm od cirkumferenčního okraje. Cirkumferenční radiální okraj je u R0 resekce definován vzdáleností větší než 1 mm. Dalším podstatným parametrem je kompletnost mezorekta, která je hodnocena tzv. Quirkeho protokolem [61].

Cíle kurativního chirurgického zákroku jsou zajištění průchodnosti trávicího traktu a kompletní odstranění nádoru spolu s lymfatickými uzlinami mezokola či mezorekta. Resekce mezokola až k odstupu vyživujících arterií též zvýší šanci na nalezení

dostatečného množství lymfatických uzlin. Podle UICC je třeba vyšetřit alespoň 12 lymfatických uzlin, aby nedošlo k podstážování tumoru. Při nálezů suspektní uzliny mimo resekát bychom ji měli odebrat k histologickému vyšetření, pokud to ovšem dovolují anatomické poměry [59 s. 212].

Onkochirurgie kolon a rekta se řídí následujícími zásadami pro operační techniku. Vždy se snažíme o resekci "en block", tedy v celku. Dalším pravidlem je "no touch" technika, při které operatér manipuluje s nádorem až po podvazu cév. S nádorem manipulujeme co nejméně a netraumatizujeme jej, čímž omezujeme možnost perforace tumoru, rozsevu nádorových buněk po peritoneu a jeho intraluminální šíření pomocí implantace uvolněných nádorových buněk [62]. Jakákoliv anastomóza musí být konstruována s ohledem na zachování perfúze resekčních okrajů. Tuto podmínku můžeme splnit, pouze pokud není anastomóza pod tahem při dostatečné mobilizaci střeva. Pro zachování dostatečného prokrvení anastomózy je též nutné zachování cévního zásobení. Pro techniku konstrukce anastomózy je nutné invertovat okraje k zajištění kontaktu serozy podél celého obvodu anastomózy. U kolon nebyly prokázány rozdíly v množství insufiencí u ručně konstruovaných a staplerových anastomóz [59 s. 213]. Doporučuje se zhotovit anastomózu end to end, neboť side to side anastomóza může vést ke stagnaci stolice ve vzniklých slepých vacích a k následné insufienci anastomózy. Těsnost anastomózy provádíme vzduchovou zkouškou insuflací vzduchu rektálním drenem do tlustého střeva pod hladinou vody. Při prokázané netěsnosti přistupujeme k resuturě anastomózy.

Otázka indikace k založení pojistné ileostomie není dosud jednoznačně vyřešena. U elektivní nekomplikované operace kolon s dobrou přípravou střeva, pacienta bez rizikových faktorů insufiencie anastomózy je doporučena jednodobá operace bez založení pojistné ileostomie [63]. U karcinomu rekta je otázka založení protektivní ileostomie u elektivních výkonů ještě komplikovanější. Na našem pracovišti protektivní ileostomii u elektivní přední nízké resekce rekta zakládáme vzácně v individuálních případech. M. Schaffzin zakládá ileostomii u všech pacientů po neadjuvantní radioterapii a u koloanální anastomózy [59 s. 221]. Dle retrospektivní studie autorů z Fakultní nemocnice v Ostravě nemá pojistná ileostomie u plánované laparoskopické přední nízké resekce rekta celkový benefit ve smyslu snížení množství pooperačních komplikací. Snížení počtu symptomatických insufiencí anastomózy u pacientů s ileostomií bylo převáženo množstvím komplikací ileostomie vyžadující chirurgickou intervenci [64]. Naproti tomu holandská a rakouská studie prokázaly signifikantně nižší počet reoperací po plánované

přední nízké resekci rekta se zavedenou ileostomií [65, 66]. Uvedená rakouská multicentrická prospektivní studie doporučuje u nízké přední resekce rekta provést protektivní ileostomii u všech pacientů s anastomózou níže než 6 cm od anu, zvláště u mužů [66]. Z dosavadních publikací vyplývá, že indikace provedení pojistné ileostomie se řídí u nekomplikovaných plánovaných resekcí rekta zvyklostmi na jednotlivých pracovištích.

Chirurgická léčba karcinomu kolon

Při lokalizaci tumoru v *céku* či vzestupného tračnicku je indikována pravostranná hemikolektomie s ligací a. ileocolica a colica dextra při odstupu od kmene a. mesenterica superior s následnou ileotransversoanastomózou. Při pravostranné hemikolektomii je resekováno terminální ileum, cékum, vzestupný tračník a hepatální flexura a část příčného tračnicku se zachováním kmene a. colica media [45 s. 314-316, 46 s. 289-291].

Při tumoru *hepatální flexury* volíme rozšířenou pravostrannou hemikolektomii, která spočívá v resekcí terminální ilea, céka, vzestupného tračnicku, hepatální flexury a příčného tračnicku s ligací a přerušáním kmene a. colica media. Kontinuitu obnovujeme pomocí ileotransversoanastomózy [45 s. 314-316, 46 s. 289-291].

Při tumoru *příčného tračnicku* resekujeme terminální ileum, cékum, vzestupný tračník, hepatální flexuru a celý příčný tračník s lienální flexurou. Ligujeme u kmene všechny větve pro kolon vycházející z a. mesenterica superior. Kontinuitu obnovujeme pomocí ileodescendentoanastomózy. Při sutuře anastomózy mezi ileem a kolon se musíme vyrovnat s nepoměrem obvodů tenkého a tlustého střeva. Uvedený nepoměr řešíme šikmým řezem ilea, který ustupuje orálně k resekčnímu okraji na antimezenterální straně. Opačně vedený řez by vedl k ischemii resekčního okraje ilea [45 s. 314-316, 46 s. 289-291].

U nádorů *lienální flexury* a *sestupného tračnicku* volíme levostrannou hemikolektomii. Jedná se o resekci tlustého střeva zásobeného krví a. colica sinistra a levou větví a. colica media (část příčného tračnicku a sestupný tračník). Anastomózu konstruujeme mezi příčným tračníkem a sigmatem. Alternativu představuje resekce střeva a sigmatu s anastomózou mezi příčným tračníkem a horním rektum s podvazem a. mesenterica inferior u aorty [59 s. 214].

V případě postižení *sigmatu* resekujeme sigma s podvazem a. sigmoidea či arteria mezenterica inferior u odstupu od aorty a šijeme descendentorektoanastomózu.

U všech výše uvedených výkonů provádíme totální excizi mezokolon ve spádové oblasti lymfatické drenáže bez porušení viscerální fascie [45 s. 314-316, 46 s. 289-291].

KRCa může vést ke stavům, které nutí k akutní operaci, jako je ileus či peritonitida. I tak je možné pokusit se o radikální výkon. K těmto operacím patří totální či subtotální kolektomie při ileu celého kolonu či Hartmannova resekce sigmatu se založením terminální kolostomie [67].

Chirurgická léčba karcinomu rekta

U karcinomu rekta je stěžejní jeho vztah ke svěračům. Při postižení svěračů je nutné provést amputaci rekta s terminální kolostomií, v opačném případě je možné provést nízkou přední resekci rekta. Distální resekční linie by měla být 2 cm od tumoru, což může být problém u nízko uložených, objemných a cirkulárně rostoucích nádorů. Minimální akceptovatelná vzdálenost je 1 cm u ultranízke intersfinkterické resekce [44 s. 308]. Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno šíření tumoru v lymfatických uzlinách mezorekta až na vzdálenost 4 cm distálně u cca 25 %, je doporučený distální okraj u resekce při tumoru horního rekta 5 cm [68]. Distální okraj u resekce i amputace je spíše otázkou lymfatických a krevních cév, samotná délka orální části resekátu nebývá problematická. V tomto případě přetrvává kontroverze ohledně výšky ligace arterie, zda provést ligaci už od odstupu arteria mesenterica inferior od aorty s paraaortální lymfadenektomií, nebo provést podvaz ve výši arteria rectalis superior [69]. Dle prof. Hocha: „*Nebylo prokázáno, že se s rozšířením rozsahu excize mezorekta do výše odstupu dolní mezenterické tepny zvýší radikalita, ale při resekci tento přístup umožní lépe mobilizovat levou polovinu tračniku a založit kolorektální anastomózu*“ [58 s. 554]. V článku Chin-Chiena je vysoká ligatura doporučena u stadií T3 a T4 [70].

Radikalita operace je zajištěna totální mezorektální excizí (TME) bez nádorové infiltrace mezorektální fascie (fascia propria), která by měla zůstat intaktní. Podmínky takto provedené operace jsou přesný staging, který vede k indikaci dostatečně radikálního výkonu, a přesná preparace chirurgem. Přístup k ošetření laterálního šíření karcinomu rekta se liší dle kontinentů. Asijská (japonská) chirurgická škola, na rozdíl od evropské a americké, preferuje lymfadenektomii v laterálních pánevních kompartmentech. Západní

přístup je konzervativní vzhledem k minimálnímu vlivu na lokální recidivu a k vysokému riziku komplikací včetně funkčních poruch [44 s. 313].

Funkčními poruchami po operaci rekta rozumíme poruchy kontinence, sexuálních funkcí a mikce. Soubor symptomů specifických pro funkční poruchy po nízké přední resekcii rekta je označován v anglofonní literatuře LARS (Low anterior resection syndrom). K hodnocení tíže tohoto syndromu se užívá tzv. LARS skóre (0–42 bodů) hodnotící následující příznaky: inkontinenci pro plyny, inkontinenci pro tekutou stolicí, frekvenci stolice, fragmentaci stolice a urgenci. Za obtíže typu LARS lze označit skóre 21 a vyšší. Do 29 bodů je syndrom označován jako minor LARS, vyšší hodnoty jsou označovány jako major LARS [71]. Etiologie syndromu je multifaktoriální. Jedná se o vysoký endoluminální tlak v důsledku snížené kapacity a distenzibility neorekta, snížení klidového tonu svěračového komplexu s vymizením rektoanálního inhibičního reflexu, porucha sensorické funkce, narovnění anorektálního úhlu. Tyto příčiny se umocňují při komplikovaném hojení anastomózy či neoadjuvantní a adjuvantní onkologickou léčbou [72]. Dle provedených studií postihuje LARS 25–80 % pacientů po nízké přední resekcii rekta [71, 73]. U mužů se k sexuálním dysfunkcím, které se objevují po nízké přední resekcii, řadí poruchy erekce a ejakulace, u žen se jedná o dyspareunii a neschopnost lubrikace. Obě pohlaví může postihnout porucha libida a prožívání orgasmu. Z urologických obtíží se nejčastěji projevuje paradoxní a stresová inkontinence [74].

Další metodou určenou pro low grade tumory T1 a T2 je transanální endoskopická mikrochirurgie (TEM). TEM je upotřebitelná u lézí, které nepřesahují 2/3 obvodu a nejsou dále než 18 cm od anu [75]. Praktické zkušenosti na našem pracovišti však tuto hranici snižují na 15 cm a maximální postižení poloviny obvodu rekta.

Radikální chirurgická léčba pokročilých stadií karcinomu rekta

U karcinomu rekta, kde není možná resekce či amputace rekta ani po neoadjuvantní léčbě, přichází v úvahu ještě extenzivnější chirurgické výkony. U pokročilých tumorů v dolní třetině připadá v úvahu cylindrická extralevátorová exstirpace rekta, při které se oproti abdominoperineální amputaci rekta resekuje ještě kostrč a m. levator ani. Ventrálně je hranicí amputace úroveň m. transversus abdominis. Defekt na perineu je kryt kožně svalovým lalokem z m. rectus abdominis nebo lalokem z m. gluteus maximus či

m. gracilis. Alternativou ke svalovým lalokům je syntetický materiál a decelularizovaná fascie [44 s. 351].

U T4 karcinomů rekta s infiltrací okolních orgánů je jediným radikálním a kurativním řešením pelvická exenterace s odstraněním postižených orgánů. Lze tak rozlišit exenteraci totální a kompozitní, u žen ještě rozlišujeme exenteraci přední a zadní. Totální exenterace pánve je en block resekce rekta a močového měchýře, u mužů s prostatektomií a u žen s hysterektomií, adnexektomií a případně i s kolpektomií. V indikovaných případech je prováděna i resekce pánevního dna. Při zadní exenteraci se neprovádí cystektomie a u předních resekcí je součástí hysterektomie, adnexektomie s cystektomií. Kompozitní exenterace jsou spojeny s resekcemi částí pánevního skeletu. Vzhledem k mutilujícímu charakteru těchto extenzivních operací a jejich relativně vysoké pooperační morbiditě je nezbytná uvážená indikace. Ke kontraindikacím patří lokální neresekabilita ve smyslu invaze do laterálních pánevních kostí, angioinvaze do ilických cév a infiltrace nervových kořenů. Další kontraindikací jsou neresekabilní vzdálené metastázy a extrapelvický neresekabilní rozsev karcinomu [58 s. 557-558].

Chirurgická léčba jaterních metastáz

Terapeutický plán metastatické nemoci KRCa je proveden v rámci multidisciplinárního semináře a odvíjí se od resekability tumoru. Kurabilitu můžeme očekávat pouze u R0 resekce všech metastatických ložisek. U synchronních metastáz, ať už plicních či jaterních, je možné trojí načasování chirurgického zákroku. Nejprve odoperovat origo a metastázy odstranit až v druhé době. Dále je možné nejprve operovat játra, jedná se o přístup tzv. liver first surgery. Výkony v jedné době jsou pro vysoké riziko komplikací vzácné. Uspěšný radikální výkon zajistí pětileté přežití v rozsahu 25–45 %. Radikální odstranění metastáz je možné pouze u cca 20 % postižených s metastatickým KRCa [78, 79]. K navýšení počtu pacientů, kteří jsou schopni podstoupit radikální odstranění metastáz, napomáhá např. embolizace portální žíly v rámci víceetapového výkonu, parenchym šetřící výkony, jako je radiofrekvenční ablace, zvýšení citlivosti diagnostických metod a zařazení nových neoadjuvantních režimů [79]. Mezi základní resekční výkony na játrech patří pravostranná a levostranná hemihepatektomie, segmentektomie a metastazektomie [79].

Chirurgická léčba plicních metastáz

U plic je nejčastějším výkonem metastazektomie v rozsahu atypické nebo klínovité resekce s lemem zdravé plicní tkáně. Rozsáhlejší výkony jako lobektomie a pneumonektomie jsou velmi vzácné a provádějí se jen za předpokladu, že velikost nádoru a jeho umístění vzhledem k bronchovaskulárním strukturám nedovolují menší výkon. Na některých pracovištích se provádí i lymfadenektomie. Před operací je nutné spirometrické vyšetření. Je možné též provést laserovou metastazektomii. K lokalizaci metastáz slouží předoperační CT a samotné vyhledání je nejcitlivější pomocí hmatu během operace. Přístup k operaci je možný z thorakotomie, sternotomie či videothorakoskopicky. Miniinvasivní přístup usnadňuje další metastazektomie s odstupem, pokud se objeví nová ložiska [80, 44 s. 387-389].

Chirurgická léčba peritoneální karcinózy

Kombinací chirurgické a onkologické léčby je peritonektomie s hypertermickou intraperitoneální chemoterapií (HIPEC). Prováděná léčba spočívá v radikálním chirurgickém výkonu např. resekci rekta či pravostranné hemikolektomii s následnou omentektomií a peritonektomií. Výkon je završen uzavřenou či otevřenou HIPEC. Po cytoreduktivním výkonu je uzavřená peritoneální dutina proplachována po dobu jedné hodiny zahřátým chemoterapeutikem. Po dimisi pacienti podstupují systémovou chemoterapii. Přínosem léčby je prodloužené přežití, u kolorektálního karcinomu je pětileté přežití po kompletním cytoreduktivním výkonu a HIPEC 30–40 %, což i přes relativně vyšší pooperační morbiditu (34 %) představuje přínos pro prognózu pacientů, kteří by jinak mohli podstoupit pouze paliativní systémovou léčbu [81, 82]. Dosažené výsledky jsou podmíněny resekcibilním nálezem, dobrým celkovým stavem pacienta (Karnovsky Index vyšší než 75 %), žádným nebo minimálním postižením tenkého střeva a absencí mimobřišních metastáz. Peritonektomii a HIPEC je také možné indikovat jako paliativní proceduru k zastavení tvorby ascitu. HIPEC je však metodou, která má nejširší užití u gynekologických malignit a pacienti s KRCa podstoupivší HIPEC tvoří menšinu [83].

4.8.2 Paliativní léčebné výkony

Paliativní výkony pro KRCA provádíme z důvodu poruch pasáže, z důvodu krvácení či perforace střeva, kdy z lokálních či celkových důvodů není možná onkochirurgicky radikální operace. Může se jednat o operace elektivní i akutní. Paliativní operace lze rozdělit na paliativní (malé) resekce, provedení střevního bypassu a na založení derivační stomie. Další možnost, jak zachovat průchodnost GIT při tumoru rekta, je zavedení stentů.

Stomie: Dle lokalizace se dělí na ileostomie, transversostomie a sigmoideostomie. Zakládají se orálně od tumoru jako odlehčovací. Stomie můžeme dále rozdělit dle provedení na terminální a axiální. V paliaci se nejčastěji užívají axiální stomie, kdy nedochází ke vzniku uzavřeného prostoru ve střevě a odvodné raménko funguje jako mukózní píštěl. U ileostomie je dále nutno zajistit, aby její okraj promínoval nad kůži, jen tak je možné zabránit poleptání kůže obsahem ilea. Další možností, byť dnes již neužívanou, je cékostomie [45 s. 317, 46 s. 292].

Střevní bypassy: Jedná se o obejití tumoru vytvořením side to side anastomózy. Při neodstranitelném obturujícím tumoru na pravém tračníku provádíme ileotransversoanastomózu, v případě lokalizace v levém tračníku provádíme transversosigmoideoanastomózu [46].

Zavedení stentu do rekta a rektosigmatu je indikováno jako paliativní výkon při neresekabilním tumoru rekta a rektosigmatu u pacientů, u kterých by bylo založení stomie v celkové anestezii vysoce rizikové. Stent lze s výhodou použít i u pacientů s poruchou pasáže a těch, kteří by profitovali z neoadjuvantní onkologické léčby. Další možností indikace k založení stentu je odmítnutí stomie pacientem nebo technické překážky k jejímu vyvedení a následné péči o ni. Stent lze zavést nejvýše do rektosigmatu a nejnižší nad linea dentata. Při vysoké poloze by došlo k dislokaci stentu a možnému poranění střeva, při nízké poloze pod linea dentata by pacient trpěl bolestmi a inkontinencí. K publikovaným komplikacím patří perforace rekta, dislokace a obstrukce stentu. Alternativou ke stentáži je metoda laserové fotokoagulace, koagulace argonovou plasmou a bipolární koagulace. Nevýhodou těchto metod je jejich krátkodobý účinek [84, 85].

4.8.3 Onkologická léčba

Onkologickou léčbu kolorektálního karcinomu můžeme rozdělit dle načasování a terapeutického cíle na neoadjuvantní, adjuvantní a paliativní.

Neoadjuvantní terapie má za úkol umožnit radikální chirurgický výkon po restagingu nebo umožnit v případě karcinomu rekta sfinkter šetřící výkon (NSABP R03 studie, [86]). U karcinomu rekta byl u neoadjuvantní radioterapie prokázán přínos pro prodloužení doby do lokální recidivy onemocnění (Swedish Rectal Cancer Trial, EORTC), vliv na prodloužení celkového přežití nebyl prokázán ve shodě napříč provedenými studiemi [87].

Adjuvantní terapie je onkologická léčba po radikálním chirurgickém zákroku za účelem snížení rizika recidivy. Předpokládaným efektem léčby je eliminace mikrometastáz.

Paliativní terapie se podává již bez očekávání kurabilního účinku, jejím účelem je zlepšení kvality života a prodloužení celkové doby přežití.

Dle modality terapie lze rozlišit onkologickou léčbu na radioterapii, chemoterapii a biologickou léčbu.

Chemoterapeutika

Nejčastěji používaná chemoterapeutika v léčbě KRCa jsou 5-fluorouracil a jeho perorálně podávaný prekurzor Capecitabin, dále Irinotekan a Oxaliplatin. Tato chemoterapeutika jsou podávána v monoterapii či v kombinaci a v různých režimech, a to v bolusu či kontinuálně.

5-fluorouracil je nejdéle používané chemoterapeutikum, jedná se o analog citidinu. Metabolizuje se v játrech. Vzhledem ke krátkému biologickému poločasu (10–25 min) má vyšší účinnost kontinuální podání. Účinnost léčby lze zvýšit podáním leukovorinu (kyseliny listové). K nežádoucím účinkům 5-fluorouracilu patří zvracení, trombopenie, kardiotoxicita, stomatitida a průjemy [88 s. 550-551].

Capecitabin (Xeloda) je perorální forma fungující jako prekurzor 5-fluorouracilu. Capecitabin je metabolizován v játrech. Výhodou je kromě perorální aplikace i nižší hematologická toxicita [88 s. 550-551].

Irinotecan (Campto) účinkuje inhibicí topoizomerázy I. Je synergický s 5-fluorouracilem a cisplatinou. Tento přípravek nepodléhá mnohočetné rezistenci. Mezi nežádoucí účinky patří průjem a myelotoxicita [88 s. 554].

Oxaliplatin (Eloxatin) je interkalační chemoterapeutikum působící synergicky s 5-fluorouracilem. Nežádoucí účinky jsou průjem a neuropatie [88 s. 554].

Raltitrexed (Tomudex) je inhibitorem thymidilátsyntázy. K nežádoucím účinkům patří febrilní neutropenie. Tento přípravek je v ČR registrován pro léčbu v monoterapii [3].

Biologická léčba

K relativně nové modalitě léčby malignit patří tzv. biologická léčba. Jedná se většinou o monoklonální protilátky proti molekulám, které jsou specifické pro nádorové buňky. Biologická léčba se pro léčbu KRCa užívá v paliaci [3, 88 s. 554]. Kromě regorafenibu v monoterapii jsou monoklonální protilátky aplikovány s chemoterapeutiky. Dalšími zástupci biologické léčby jsou Bevacizumab, Cetuximab, Panitumumab, Ramucirumab a Aflibercept.

Cetuximab (Erbitux) je lékem druhé volby pro léčbu kolorektálního karcinomu, jedná se o monoklonální protilátku, která se kompetitivně váže na receptor epidermálního růstového faktoru. Léčba je neúčinná u pacientů s přítomností mutovaného K-RAS. K negativním prediktivním faktorům patří i mutace PI3K (přítomna v 10–30 % KRCa). K nežádoucím účinkům patří kožní reakce a alergická reakce [13 s. 169].

Bevacizumab (Avastin) je monoklonální protilátka, účinkuje na základě inhibice neoangiogeneze blokováním endoteliálního růstového faktoru. K nežádoucím účinkům patří nejčastěji tromboembolie, hypertenze, proteinurie a krvácení [13 s. 169].

Ramucirumab (Cyramza) je rekombinantní protilátka proti vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), účinnost byla prokázána ve studii RAISE III, kde byly srovnávány kohorty pacientů s metastatickým KRCa. U všech pacientů bylo podáváno FOLFIRI, u experimentální kohorty též Ramucirumab [89]. Mezi nežádoucími účinky jsou neutropenie, hypertenze a trombocytopenie [13 s. 171].

Aflibercept (Zaltrap) je fúzní protein receptoru proti epidermal growth factor receptor (EGFR) a Fc fragment IgG1. Jeho účinnost se prokázala ve III. fázi studie VELOUR [90], kde v aplikaci v druhé linii spolu s FOLFIRI signifikantně prodloužila

celkové přežití u experimentální kohorty. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u Bevacizumabu [13 s. 170].

Ve stádiu klinických studií je protilátka proti PD-1 **Pembrolizumab** s prokázaným účinkem u pacientů s MSI-H KRCa [13 s. 172].

Radioterapie

Terapie ionizačním zářením je součástí komplexní léčby rekta a rektosigmatu. Vyšší etáže nejsou indikovány k ozáření vzhledem k mobilitě a riziku ozáření tenkého střeva. Dalším důvodem pro ozáření rekta a rektosigmatu je snížení rizika výskytu lokální recidivy. V neoadjuvantním režimu má radioterapie za cíl umožnit resekabilitu či zajistit podmínky pro svěrač zachovávající výkon. K nevýhodám předoperačního ozáření patří zpoždění chirurgického kurativního zákroku. Z nevýhod je uváděno pomalejší hojení operační rány. Z tohoto důvodu je operace načasována 4–6 týdnů po ukončení radioterapie. U pooperační radioterapie je nevýhodou vyšší toxicita, svoji roli hraje i vyšší riziko ozáření tenkého střeva, jehož klíčky se i přes peritonealizaci rány mohou dostat do malé pánve. U neoadjuvantního ozáření po dobu 4,5–5 týdnů do dávky 45 Gy. V akcelerovaném režimu je aplikována dávka 25 Gy v 5 dnech s operačním výkonem do 72 hodin. U pooperační terapie se aplikuje pouze standardní frakcionace v celkové dávce 46–50 Gy v průběhu pěti týdnů [91].

4.8.4 Terapeutická schémata

Indikační kritéria pro onkologickou léčbu jsou uvedena pro klinická stadia dle UICC. Tato stadia vycházejí z TNM klasifikace. V roce 2016 je platné 7. vydání TNM klasifikace pro KRC z roku 2009 [2]. Tato klasifikace také může poskytnout údaje o prognóze, napomáhá sledovat a srovnávat výsledky léčby mezi léčebnými centry. Pro KRCa je TNM klasifikace uvedena v tab. 3.

T - primární nádor
TX - primární nádor nelze hodnotit
T0 - bez zn. primárního tumoru
Tis - karcinom in situ
T1 - nádor postihuje submukózu
T2 - nádor postihuje tunica muscularis propria
T3 - nádor postihuje subserózu nebo neperitonealizované perikolické či perirektální tkáň
T4 - nádor prorůstá peritoneum nebo postihuje jiné orgány
T4a - nádor prorůstá na viscerální peritoneum
T4b - nádor přímo postihuje jiné struktury
Poznámka: U vícečetných nádorů se k jakémukoliv T doplňuje označení (m)
N - regionální mízní uzliny
NX - regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0 - regionální mízní uzliny bez metastáz
N1 - metastázy v 1-3 regionálních mízních uzlinách
N1a - postižení 1 uzliny
N1b - postižení 2-3 uzlin
N1c - přítomnost ložiska tzv. satelitu v subserózní nebo neperitonealizované perikolické či perirektální tkáni bez metastázy regionálních uzlin
N2 - metastázy ve více než 3 regionálních mízních uzlinách
N2a - metastázy ve 4-6 regionálních mízních uzlinách
N2b - metastázy v 7 a více regionálních mízních uzlinách
M - vzdálené metastázy
MX - vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0 - bez vzdálených metastáz
M1 - vzdálené metastázy
M1a - metastázy omezené na jeden orgán
M1b - metastázy ve více než jednom orgánu

Tab. 3. TNM klasifikace KRCa [3]

Indikace chemoterapie a radioterapie u karcinomu kolon a rekta se řídí klinickým stadiem a únosností onkologické léčby pro pacienta.

Stadium UICC 0 (Tis, N0, M0) pouze lokální excize nebo polypektomie do zdravé tkáně bez adjuvantní chemoterapie.

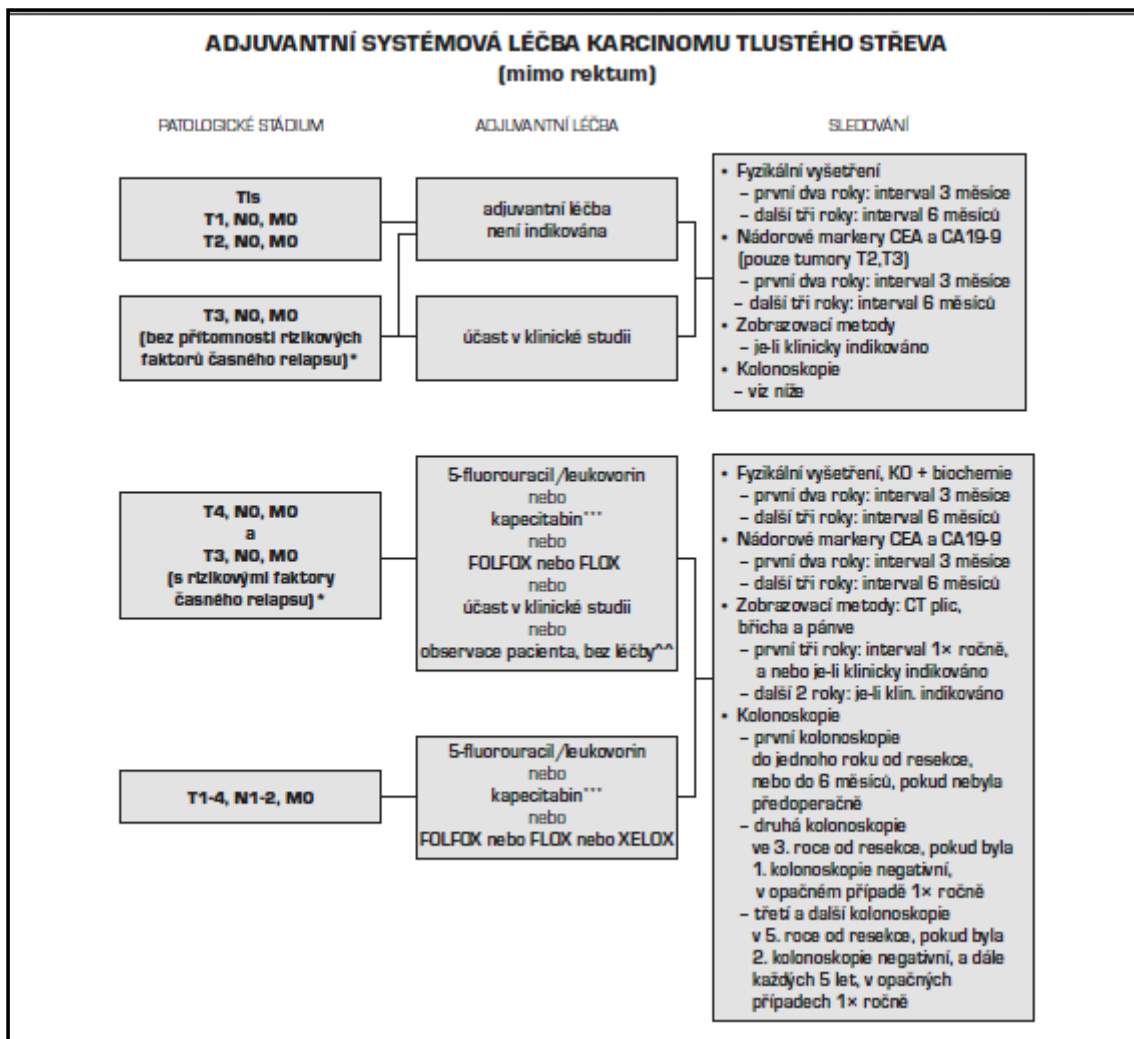
Stadium UICC I (T1-2, N0, M0) radikální chirurgický výkon bez adjuvantní chemoterapie.

Stadium UICC IIa (T3, N0, M0) U karcinomu kolon bez dalších negativních prognostických faktorů pouze radikální operace bez adjuvantní chemoterapie. U karcinomu rekta je na základě endorektální ultrasonografie nebo magnetické rezonance pánve indikována neoadjuvantní chemoterapie s bolusovým nebo kontinuálním podáním 5-fluorouracilu nebo Capecitabinem s konkomitantním ozářením pánve s cílem zvýšení šance na sfinkter šetřící výkon.

Stadium UICC IIb (T3, N0, M0 s negativními prognostickými faktory a T4, N0, M0) po radikálním chirurgickém výkonu následuje adjuvantní chemoterapie a radioterapie. Pokud je zvažována adjuvantní chemoterapie FUFA (5-FU+leukovorin) v UICC II stadiu, je vhodné molekulární vyšetření mikrosatelitní nestability, resp. MMR v nádorové tkáni. Indikace neoadjuvance u karcinomu rekta se řídí stejnými pravidly jako u stadia UICC IIa.

Mezi negativní prognostické faktory definující skupinu high risk pacientů k indikaci adjuvantní chemoterapie patří neznámé resekcí okraje, obstrukce, perforace střeva nádorem, špatná diferenciacie nádoru, mucinózní složka, nedostatečný počet vyšetřených lymfatických uzlin (podmínkou pro přesný patologický staging je vyšetření nejméně 12 lymfatických uzlin). Lymfatická nebo vaskulární nebo perineurální invaze [3].

Stadium UICC III (T1-4, N1-2, M0) Po radikálním chirurgickém výkonu následuje adjuvantní chemoterapie, u rekta doplněná radioterapií. U karcinomu rekta je na základě endorektální ultrasonografie nebo magnetické rezonance pánve indikována neoadjuvantní chemoterapie s bolusovým nebo kontinuálním podáním 5-fluorouracilu nebo Capecitabinem s konkomitantním ozářením pánve s cílem zvýšení šance na sfinkter šetřící výkon. Schéma pooperačního sledování je zobrazeno v tab. 4.



Tab. 4. Tabulka shrnující adjuvantní systémovou léčbu karcinomu kolon [3]

UICC IV (jakékoliv TN a M1) Strategie léčby pacientů se synchronními metastázemi kolorektálního karcinomu se odvíjí od resekovatelnosti vzdálených metastáz a primárního tumoru.

U primárně operabilního nálezu je možné v jedné době operovat origo i metastázy. Nebo nejdříve odoperovat primární tumor a v druhé době metastázy. Je možný též přístup tzv. liver first [92]. Pokud je zvolen dvoudobý výkon, je v mezidobí podávána systémová chemoterapie, přičemž po operaci metastáz následují další série onkologické léčby [48].

U neresakovatelného nálezu ve stadiu UICC IV je indikována systémová paliativní chemoterapie, po které následuje restaging ke zhodnocení resekovatelnosti. Paliativní léčbu, která vede k resekovatelnosti tumoru, označujeme jako konverzní [93].

V paliativní chemoterapii se užívá monoterapie či kombinace chemoterapeutik. Odpověď na léčbu se hodnotí po 2–3 měsících na základě (response evaluation criteria in

solid tumors) RECIST kritérií. RECIST kritéria hodnotí součet průměrů lézí na CT (max. 5 lézí na orgán, celkově max. 10 lézí). O *kompletní remisi* hovoříme, pokud dojde k zániku lézí v průběhu onemocnění. Za parciální regresi je označováno zmenšení sledovaných lézí o 30 % s potvrzením stavu po měsíci. *Progrese* nemoci je definována nárůstem o 20 % nebo vznikem nových metastáz. Stav *stabilní nemoci* se pohybuje mezi parciální regresi a progresí [94]. Pokud onemocnění neprogreduje, je možné pokračovat v první linii léčby.

4.8.4 Dispenzarizace

Pooperační dlouhodobé sledování má za cíl časně odhalit recidivu po radikální operaci, protože až 80 % recidiv je diagnostikováno v prvních dvou letech po ukončení léčby [58 s. 561-562]. První dva roky po operaci je po třech měsících prováděno klinické vyšetření a stanovení nádorových markerů CEA, C 19-9, v dalších třech letech se interval prodlužuje na šest měsíců. CT vyšetření hrudníku, břicha a pánve je prováděno jednou ročně první tři roky. Kolonoskopie je provedena jeden rok po operaci a pak v intervalu tři až pět let [58 s. 561-562].

5. Imunitní interakce KRCa

5.1 Imunobiologie KRCa

První, kdo popsal vztah mezi nádorem a zánětlivou odpovědí, byl v r. 1863 Virchow, který zaznamenal lymforetikulární infiltráty v nádorech a vyslovil hypotézu, že chronický zánět může přispívat k rozvoji nádoru [44 s. 59]. Roli imunity v obraně proti nádorovému onemocnění zmiňuje i Ehrlich [95]. Úlohu zánětu v karcinogenezi prokazují studie, které našly korelaci mezi užíváním nesteroidních antiflogistik a nižší incidencí malignit [96, 97]. Tu část imunitní odpovědi, která vede k potlačení vzniku malignity, popsal Burnet v teorii, v níž tvrdil: „*Fyziologickou funkcí imunitního systému je schopnost rozpoznat a následně zlikvidovat pro organismus nebezpečné buňky, mezi takové patří samozřejmě buňky podílející se na vzniku malignit*“ [98]. Uvedenou teorii potvrzují experimenty na imunodeficientních myších [99] a např. vznik Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS a transplantovaných pacientů s imunosupresivní léčbou [100]. Z uvedeného vyplývá, že role imunitní odpovědi na malignitu a její vznik není jednoznačná. Imunitní odpověď může zcela zničit transformovanou buňku a může také pozastavit růst tumoru. V některých případech ale imunitní reakce také podporuje progresi malignity. Z těchto důvodů byla Burnetova hypotéza doplněna a přeformulována jako imunoeditační teorie.

Progresi nádorového onemocnění z hlediska intervence imunitního systému lze shrnout do tří kroků. Jedná se o *eliminaci, rovnováhu a únik* (Elimination, Equilibrium, Escape) [101]. Ve fázi eliminace, která přibližně odpovídá původní Burnetově hypotéze, je plně funkční imunitní dohled (imun-surveillance) nad nádorovými buňkami. Fáze rovnováhy je obdobím, kdy se nádor vyrovnává s imunitní odpovědí a kdy dochází ke změně imunofenotypu nádorových buňek a imunomodulaci ve smyslu potlačení cytotoxické reakce zprostředované Th1 lymfocyty. Uvedené změny vedou k poslední fázi, k úniku. V tomto stupni dochází k progresi onemocnění [102 s. 3].

Eliminace

Během raných fází maligní transformace dochází k neregulované proliferaci, která vede k uvolňování prozánětlivých cytokinů (interleukin IL-2, IL-12, IL-15, interferon gamma - IFN γ), což vede k aktivaci buněk vrozené imunity. IFN γ a IL-12 aktivují Th1 (T pomocné „helpers“ lymfocyty) imunitní odpověď. Odpověď nespecifické imunity zajišťují přirození zabíječi (NK – natural killers) a makrofágy. Nádorové buňky jsou zabíjeny NK buňkami a fagocytovány makrofágy. Reakce imunity navazuje fagocytózou mrtvých nádorových buněk dendritickými buňkami (Dendritic cells – DC), které po maturaci migrují do lymfatických uzlin. V lymfatických uzlinách DC prezentují nádorové antigeny na major histocompatibility complex (MHC) molekulách I. třídy cytotoxickým lymfocytům a navozují tak specifickou imunitní odpověď.

Aby mohl imunitní systém reagovat na nádor, musí ho nejprve rozpoznat na základě fenotypu buňky, který se mění během tzv. buněčné transformace. Během transformace dochází ke změnám genové exprese a metabolických drah [103]. Mezi důležité změny fenotypu patří snížená tvorba MHC I molekul [104] či tvorba aberantních sacharidů nebo tumor specifických antigenů (tumor specific antigens – TSA) a antigenů spojených s tumorem (tumor associated antigens – TAA). Imunitní odpověď může také vyvolat exprese stresových proteinů (např. CEA, MHC E či MUC1) [44 s. 58].

Rovnováha

Tzv. equilibrium se týká již vytvořeného nádoru, kdy nedochází k progresi a invazi. Jedná se například o stavy po radikální operaci, kdy předpokládáme existenci minimální reziduální nemoci s nádorovými buňkami v tzv. dormantním stavu. V této fázi jsou klíčové IFN γ sensitivní buňky [105]. Rovnovážný stav také nastává v případě, že imunogenicita tumoru a imunitní odpověď je vyrovnávána s proliferační aktivitou nádorových buněk [106, s. 34]. Přibližně 30 % pacientů s KRCa UICC I a II (bez postižení lymfatických uzlin) recidivuje a zůstává otázkou, co je příčinou a jak tyto pacienty identifikovat [107]. Faktorem, který může hrát roli v recidivě, je imunitní odpověď. Galon prokázal, že typ, denzita a lokalizace imunitních buněk vzhledem k tumoru má signifikantní vliv na prognózu pacientů s KRCa [7].

Únik

K časným histologickým známкам úniku nádorových buněk z imunitního dozoru patří mikroembolizace nádorovými buňkami (venous emboli – VE), invaze v lymfatických cévách (lymphatic invasion – LI a perineurální infiltrace – PI). Uvedené histopatologické parametry korelují s kratším bezpříznakovým přežitím (DFI – disease free survival) a dobou celkového přežití (OS – overall survival) [102 s. 4]. Na základě provedených studií lze postulovat, že koordinovaná imunitní reakce zahrnující například cytotoxické lymfocyty zabráňuje úniku metastatických buněk krevními a lymfatickými cévami [102 s. 4].

Expanze nádoru vyvolává tlak na okolní tkáň a účinkuje parakrinně pomocí cytokinů a růstových faktorů na lokální homeostázu [44 s. 58]. V tomto mikroprostředí se vyskytují i imunokompetentní buňky, jejichž modulovaná činnost může paradoxně podpořit progresi nádoru [44 s. 59]. Prostředí chronického zánětu může kromě podpory proliferace nádorových buněk též inhibovat funkci efektorových cytotoxických T lymfocytů. V tomto konkrétním příkladu je to zprostředkováno parakrinním působením IL-23 [108]. Růstové faktory a cytokiny aktivované v solidních tumorech mohou působit jako negativní prognostické faktory. Jedná se o TNF α (tumor necrosis factor alpha), IL-6 a TGF β (transforming growth factor β), IL-17, IL-23, FGF (fibroblast growth factor) [102 s. 25].

Stěžejní trio parakrinních působků pro udržení mikroprostředí chronického zánětu s imunitní reakcí typu Th2 je TNF α , IL-6 a TGF β [102 s. 25]. Popsaný proces, při kterém dojde ke snížené imunogenicitě tumoru a podpoře nádorového růstu imunitní odpovědí, se nazývá imunoediting [7].

5.2 Nespecifická imunita

Nespecifická neboli neadaptivní imunita představuje soubor mechanismů buněčné a humorální imunitní odpovědi, která je založená na rozpoznání společných, nespecifických, chemických struktur cizorodých mikroorganismů. Jedná se o evolučně starší typ imunity, který vyniká vysokou rychlostí odpovědi. Odpověď není ovlivněná předchozím setkáním s patogenem. Nespecifická imunita má složku humorální a buněčnou. Některé buňky nespecifického imunitního systému mají schopnost fagocytovat a prezentovat antigeny lymfocytům. Tvoří tak podmínku funkce adaptivní imunity [109 s 24-25].

Do humorální složky patří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Detailní rozbor humorální složky nespecifické imunity není součástí dizertační práce. Do celulární složky patří buňky s původem v myeloidní řadě hematopoetických buněk kostní dřeně, jedná se o monocyty a granulocyty. Monocyty přecházejí z cirkulace do tkání, kde se z nich stávají makrofágy nebo DC. Granulocyty se dělí do tří linií: *neutrofilů*, *eozinofilů* a *bazofilů*. Formou bazofilních granulocytů v tkáních jsou mastocyty. Buňky z lymfoidní řady zahrnuté do nespecifické imunity jsou přirození zabíječi-NK buňky [109 s. 47, 110].

5.2.1 Přirození zabíječi

Přirození zabíječi mají nezastupitelnou úlohu ve vrozené, ale i ve specifické imunitě [111]. Vynikají schopností rozlišit a zničit infikovanou buňku či buňku maligně transformovanou. NK buňky nepotřebují k lýze postižených buněk předchozí stimulaci [112]. Jejich další úlohou je podpora diferenciací B a T lymfocytů a maturace DC [111]. V lymfatických uzlinách představují 1–5 % mononukleárů a ve slezině tvoří 7–50 % mononukleárů. Fenotyp NK buněk ($CD56^{dim}$, $CD16^+$) ve slezině a v krvi je totožný, což ukazuje na jejich cirkulaci červenou pulpu sleziny. V krvi představují NK buňky do 2 % ze všech lymfocytů [113].

NK buňky vznikají pod vlivem DC a stromálních buněk v sekundárních lymfatických tkáních. Prekurzory NK buněk pocházejí z kostní dřeně [114]. Populací hematopoetických buněk, která dává vznik NK, je $CD34^+ CD45RA^+$ skupina buněk v sekundární lymfatické tkáni [115, 116]. Diferenciaci v kostní dřeni se nepodařilo prokázat

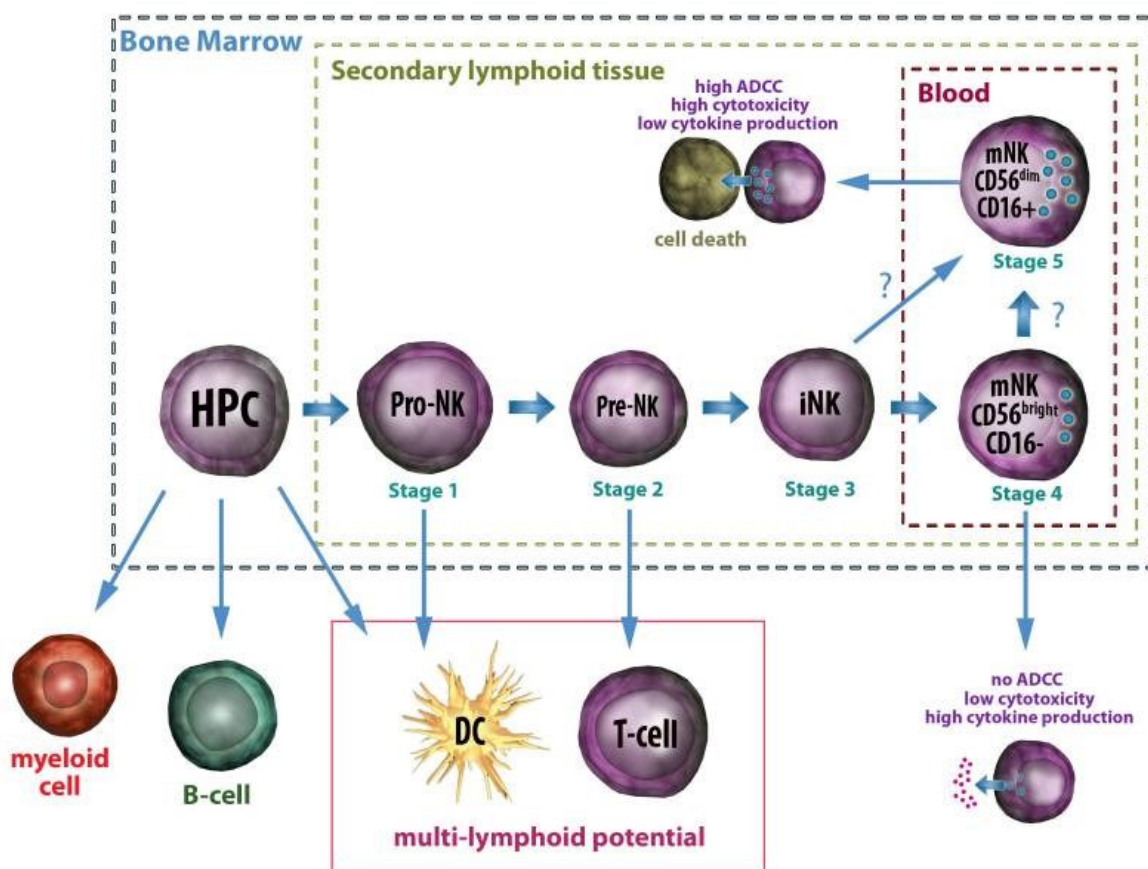
[112]. Nejprve vznikají tzv. pro-NK buňky, které jsou definovány jako $CD34^+ CD45RA^+ CD117^- CD94^- CD122^-$ [117]. Tyto buňky jsou inertní k IL-15. Dalším stadiem vývoje NK buněk je forma s $CD122^+$ (IL2/15R β) a $CD117$ (c-Kit) označovaná jako pre-NK buňky, které již reagují na IL-15. Tento interleukin je pro funkci NK klíčový. Následnou stimulací IL-2 a IL-15 dojde k diferenciaci v tzv. nezralé NK [118]. Zralá NK buňka je charakterizovaná expresí receptoru CD94 (NKG2A) a přítomností CD56 a CD16 a absencí TCR [119]. Dalším markerem, který se vyskytuje na povrchu NK buněk, je CD57. Molekuly CD56 a CD57 jsou součástí metodiky této práce, a proto bude uvedena v následujícím textu jejich charakteristika.

Schéma vývoje NK buněk je představeno v obr. 2. Ačkoli zralé NK buňky jsou v sekundárních lymfocytech ze všech svých vývojových stadií zastoupeny v 90 %, v cirkulaci převládají nezralá stadia a maturované NK jsou ve výrazné menšině (cca 10 %). Předpokládá se, že tyto zralé NK buňky jsou hlavním producentem IFN γ . Zralé buňky jsou schopné usmrtit buňku pomocí perforinů a granzymu B [109 s. 156].

Molekula CD56

CD56 neboli NCAM (Neural cells adhesion molecules) je membránový glykoprotein, který plní funkci adhezivní molekuly. Existuje mnoho izoform v závislosti na alternativním splicingu a posttranslačních modifikacích. CD56 je exprimován kromě zralých NK buněk hlavně na neuronech, astrocytech a oligodendrocytech [120]. Dále je exprimován v četných tkáních během embryonálního vývoje a na buňkách karcinomu rekta [121]. Zralé NK buňky jsou sice pozitivní na CD56, avšak na základě průtokové cytometrie se podle míry positivity dají semikvantitativně rozdělit na subpopulace (bright, mid, dim, negative). V imunologii je na základě imunohistochemického značení CD56 a CD16 (Fc γ RIIIA – receptor pro Fc fragment imunoglobulinu) rozlišeno v periferní krvi 5 skupin NK buněk: $CD56^{bright} CD16^-$, $CD56^{bright} CD16^{dim}$, $CD56^{dim} CD16^-$, $CD56^{dim} CD16^{bright}$, $CD56^- CD16^{bright}$. Míra CD16 positivity odráží schopnost protilátkami zprostředkované imunitní odpovědi. U NK buněk nacházíme na základě semikvantitativního hodnocení CD56 positivity dvě hlavní skupiny – $CD56^{bright}$ a $CD56^{mid}$. Vztah mezi těmito dvěma skupinami NK buněk není přesně znám. Předpokládá se, že $CD56^{bright}$ by mohl být prekurzorem $CD56^{dim}$ [122].

Obě skupiny exprimují jiné spektrum adhezivních molekul a receptorů na chemokiny, což ovlivňuje jejich migrační preference. CD56^{bright} NK buňky cestují do sekundárních lymfatických orgánů, zatímco CD56^{dim} NK buňky migrují do místa akutní zánětlivé odpovědi [123]. CD56^{bright} NK buňky produkují oproti CD56^{dim} větší množství cytokinů. Týká se to hlavně IFN γ , u něhož je tento rozdíl 20–30krát větší [124]. CD56^{dim} NK buňky mají větší cytotoxickou aktivitu, což potvrzuje vyšší obsah cytolytických granulí, granzymu a perforinů [125]. CD56^{dim} NK buňky na rozdíl od CD56^{bright} exprimují CD57 [123]. Schéma vývoje NK buněk je zpracováno na obr. 2. CD56 je exprimován na povrchu buněk karcinomu rekta, je také asociován s vyšším výskytem lokální rekurence a perineurální invazí [121].



Obr 2. Vznik a maturace NK buněk [112]

Molekula CD57

Jedná se o galaktozylgalaktozylxylozylprotein 3 beta glukuronozyltransferázu 1 nazývaný též Human natural killer 1 (HNK1) nebo LEU7. Bylo prokázáno, že CD57 je exprimován u maturovaných NK. Na CD 8⁺ lymfocytech a na buňkách pocházejících z neurální rýhy. Na neuronech má funkci adhezivní molekuly. U T lymfocytů se objevuje po dlouhodobé antigenní stimulaci přechod z fenotypu CD28⁺ CD57⁻ na CD28⁻ CD57⁺. Jedná se o lymfocyty s nízkým proliferačním potenciálem a vysokou cytotoxickou aktivitou. Tyto lymfocyty exprimují inhibiční receptory typické pro NK. Přítomnost CD57 u CD8⁺ T lymfocytů je znakem vysoce diferencované oligoklonální subpopulace v rámci chronické antigenní stimulace [126]. V případě NK buněk se jedná o marker maturace. Jedná se o NK buňky s vysokým cytotoxickým potenciálem, avšak se sníženou citlivostí k cytokinům a redukovanou možností proliferace. CD57⁺ NK vznikají irreverzibilně z CD56^{dim} CD57⁻ buněk. Tato maturace je spojena s fenotypickými změnami. Mají nižší proliferační odpověď na stimulaci IL-2 a IL-15 a produkují také méně IFN γ [127]. Exprese CD57 představuje u NK buňky krok k vyšší cytotoxické aktivitě, větší citlivost ke spuštění protilátkami zprostředkované, ale i nespecifické cytotoxické reakci [128]. Souhrně lze říct, že CD57 pozitivita u buněk imunitního systému je markerem vysokého cytotoxického potenciálu.

Aktivace NK buňky a její funkce v protinádorové imunitě

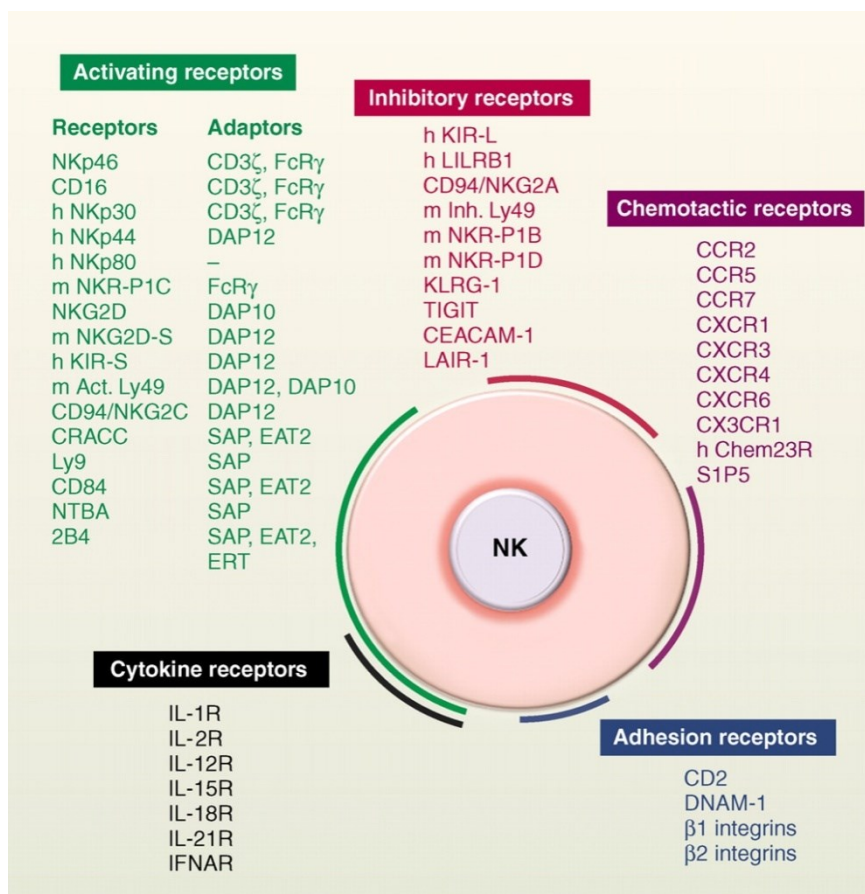
Aktivace NK buněk je zajištěna několika mechanismy. Můžeme je rozdělit na protilátkách závislou (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC) a na nespecifickou, na protilátkách nezávislou cytotoxicitu [109 s. 155-156]. Do nespecifické (vrozené) části imunitní reakce patří aktivace na základě snížení exprese MHC I na povrchu transformovaných buněk. Schopnost rozeznání buněk se sníženou expresí MHC I je dána inhibičními receptory NK buněk, jejichž ligandem je MHC I. Do této skupiny patří killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) a CD94/NKG2A [111, 129]. Další možností aktivace NK buněk bez potřeby protilátek je detekce známek buněčného stresu, což je zajištěno receptorem NKG2D. Do stejné skupiny patří receptor NKp30, který reaguje na zvýšenou expresi ligandu B7-H6. Tato molekula je ve zvýšené míře exprimována při

poškození DNA [129]. NK buňky jsou také schopny bez označení imunoglobulinem rozeznat a napadnout virem infikované buňky [130].

NK buňka dokáže účinkovat cytotoxicky i na základě protilátkami zprostředkované imunitní reakce. ADCC je zajištěna aktivací NK buňky pomocí Fc γ RIIIa (CD16) receptoru při opsonizaci cílové buňky protilátkami IgG typu. Ligandem pro Fc γ RIIIa je Fc fragment imunoglobulinu [131, 132]. Soubor aktivačních receptorů NK buněk u lidí i myší je označen na obr. 3.

NK buňky produkují mnoho prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů, jako IFN γ , TNF α , IL-3, IL-10, a růstových faktorů, jako granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) a granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). NK buňky také produkují mnoho chemokinů včetně CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 (lymfotaktin) a CXCL8 (IL-8) [133]. Uvedené chemokiny přitahují DC do místa probíhajícího zánětu. NK buňky přímo stimulují naivní T lymfocyty v lymfatických uzlinách produkcí IFN γ a nepřímo přes dendritické antigen prezentující buňky [131].

Smrt cílové buňky je zajištěna dvěma cestami. Jedná se o smrt zprostředkovanou aktivací receptorů buněčné smrti a zabití granzymy a perforiny v granulích NK buňky. Receptory, které donutí buňku k apoptóze, jsou Fas a TRAIL receptory [134]. Použití lytických enzymů v granulích je typické pro ničení buněk infikovaných nebo maligně transformovaných [135]. Publikované studie navrhuji roli NK buněk v rozeznávání a usmrcení nádorových kmenových buněk, konkrétně u glioblastomu [136] a melanomu [137]. Nádorové kmenové buňky představují malou populaci buněk v nádorové mase. Tyto buňky jsou zodpovědné za recidivu tumoru po cytoreduktivní terapii [138].



Obr. 3. Přehled aktivačních a inhibičních receptorů spolu s receptory pro cytokiny a chemotaktickými adhezivními receptory na NK buňce [131]

Mechanismy rezistence tumoru k NK buňkám

Nádorové buňky mohou vyvinout různé únikové mechanismy, jak se vyhnout zabití NK buňkami. Důležitou roli má ligandem indukovaná down regulace. Ligand může být vypuštěn z povrchu nádorové buňky či předán trogocytózou [139, 140]. K těmto inhibičním molekulám patří HLA-G na povrchu nádorové buňky. Za fyziologických podmínek je přítomná HLA-G na buňkách imunoprivilegovaných tkání jako je placenta [141]. Metastázy KRCa, jejichž origo má vysokou denzitu HLA-G, jsou paradoxně bez exprese HLA-G [142].

Dalším mechanismem snížení aktivity NK buněk je chronická aktivace receptorů NKG2, která vede k jeho down regulaci. TGF β a prostaglandin E2 (PGE2) tvořené v nádorovém stromatu snižují expresi NKp30, NKp44 a NKG2D u NK buněk, což vede ke snížení cytotoxicity a produkce cytokinů NK buňkou [136, 143]. U melanomu byla prokázána zvýšená exprese genu pro indolamin 2,3 dioxygenázu, která přispívá k navození

imunotolerance NK buňkami [144]. Dalším faktorem snižujícím účinnost funkce NK buněk je hypoxie v tumoru, která významně oslabuje jejich nespecifickou cytotoxicitu. Zachovává však jejich schopnost usmrtit imunoglobuliny označenou buňku v rámci protilátkami zprostředkované cytotoxicity, hypoxie totiž neovlivňuje expresi FcγRIII NK buněk [138]. Na účinnost NK buněk může ukázat i jejich pozice vůči tumoru. NK buňky, které se nacházejí ve stromatu a nejsou v kontaktu s nádorovými buňkami, jsou anergní [145, 146].

Vztah NK buněk ke KRCa

Pozitivní vliv na prognózu pacientů s KRCa byl u NK poprvé prokázán ve španělské studii Cocou [147], kdy množství CD57⁺ buněk v nádorové tkáni pozitivně korelovalo s celkovým přežitím u pacientů po radikální operaci pro karcinom kolon bez adjuvantní terapie. Ve studii Menona byl prokázán pozitivní vliv na bezpříznakové přežití u KRCa s přítomností CD56⁺ a CD57⁺ NK buněk [5]. Italská studie z roku 2015 neprokázala vliv NK (CD57⁺, CD56⁺) na prognózu pacientů s KRCa [148]. Odhalila však jako pozitivní prognostický faktor společnou infiltraci T lymfocytů CD8⁺ a NK buněk. Tato kombinace měla významně největší vliv na celkové přežití oproti tumorům, které byly infiltrovány buď samotnými CD8⁺ lymfocyty, nebo NK buňkami bez CD8⁺ lymfocytů. Marechal studoval počty CD56⁺ buněk v KRCa pacientů ve stadiu IV UICC s postižením lymfatických uzlin. Tito pacienti podstoupili chemoterapii s cetuximabem nebo bez cetuximabu. NK buňky se ukázaly jako pozitivní prognostický faktor celkového přežití. Ze skupiny léčené cetuximabem pozitivně koreloval počet NK buněk v KRCa s časem do progresu onemocnění [149]. V práci Golubové bylo prokázáno, že NK buňky se vyskytují v menších počtech v parenchymu jater postižených metastázami oproti játrům bez metastáz [150]. Fenotypová analýza aktivačních receptorů u NK buněk z periferní krve u pacientů s KRCa ukázala, že exprese těchto receptorů byla snížena oproti zdravým kontrolám. Dalším zjištěním bylo, že snížený podíl NK buněk s přítomným NKG2D a s perforinem je asociován s vysokým gradem tumoru [151]. Gharogozloo prokázal, že pacienti s generalizovaným KRCa mají v periferní krvi významně nižší množství NKG2D⁺ NK buněk, stejně tak byla snížena i exprese NKG2D mRNA v jaderných buňkách periferní krve [152]. Ve studiích Sandela a Halami, do kterých bylo zahrnuto 88 a 122 pacientů, se infiltrace tumoru NK buňkami neukázala jako prognostický faktor KRCa [145, 153].

Existuje však řada studií s opačným vyzněním. Liška publikoval práci, kde byla infiltrace CD57⁺ nezávislým pozitivním prognostickým faktorem pro DFI i OS po radikální chirurgické léčbě KRCa [154]. Obdobně i Chaput prokázal, že infiltrace KRCa CD57⁺ buňkami je pozitivní prognostický faktor pro celkové přežití po radikální operaci KRCa u pacientů ve stadiu UICC II a III [155]. Uvedené výsledky neukazují jednoznačnou roli NK buněk u KRCa. Zcela určitě není jejich vliv determinován pouze jejich přítomností v tumoru, ale i jejich funkčním stavem, pozicí vůči nádorové tkáni a schopností kooperovat s ostatními složkami imunity.

5.2.2 Makrofágy

Charakteristika makrofágů

Makrofágy jsou tkáňovou formou monocytů. Monocyty obíhají v krvi a do infikovaných či poškozených tkání se dostávají poté, co se zachytí na povrchu endoteliálních buněk a projdou diapedézou přes endotel do mezibuněčného prostoru. V tkáni se aktivně pohybují proti koncentračnímu gradientu chemokinů k místu zánětu. Adheze monocytů na endotel je zprostředkována interakcí dvou molekul. Na cévní stěně se jedná o vascular cell adhesion molecule (VCAM) a na monocytech jsou to $\beta 1$ integriny. Chemokiny atrahující monocyty jsou macrophage inflammatory protein 1 a 2 (MIP-1 α , MIP-1 β), CCL2 a CCL5, fragmenty C3a a C5a komplementu, leukotrien B4 (LTB4), platelet activated factor a některé chemotaktické peptidy pocházející z bakteriálních proteinů. Pohyb v mezibuněčném prostoru je zajištěn sekrecí hydrolytických enzymů.

K rozeznání patogenu slouží lektinové receptory, které se vážou na bakteriální glykoproteiny a polysacharidy. Nejdůležitějšími jsou mannozový a galaktózový receptor. K dalším receptorům, které se vážou na evolučně konzervativní struktury patogenů, patří TLR (toll like receptor). Makrofágy jsou schopné rozeznat apoptotickou buňku pomocí scavengerových receptorů, které rozeznávají anionické fosfolipidy. Makrofágy také reagují na částice opsonizované imunoglobuliny za pomoci Fc receptorů. K opsoninům patří kromě imunoglobulinů také lektiny vážající fibronektin, fibrinogen a proteiny ze skupiny tzv. pentraxinu – C-reaktivní protein a sérový amyloid P. Pohlcené částice jsou umístěné ve fagozomech uvnitř makrofágu. Fagozomy splynou s lysozomy obsahujícími defenziny a hydrolytické enzymy, které spolu s nízkým pH destrukují obsah fagozomů. Aktivace

NADPH – oxidázy vede k tvorbě kyslíkových radikálů, které mají destruktivní účinek na biopolymery. Další baktericidní látkou produkovanou makrofágy je oxid dusnatý (NO). Baktericidní látky produkované makrofágy a ostatními fagocyty (neutrofilní a eozinofilní granulocyty, monocyty) se nemusejí selektivně uplatnit pouze na infikovanou buňku či cizí patogen. V takovém případě dojde k poškození okolní tkáně. Imunosupresivní účinek kyslíkových radikálů částečně vysvětluje, proč je chronický zánět včetně Crohnovy choroby či ulcerózní kolitidy prekancerózou. Makrofágy působí také jako antigen prezentující buňky, což určuje jejich vztah ke specifické imunitní odpovědi [109 s. 39-43].

Vztah makrofágů ke KRCa

Studie publikovaná roku 2000 postulovala hypotézu, že produkce zánětlivých cytokinů makrofágy v invazivním okraji KRCa způsobuje vyšší produkci angiogeninu nádorovými buňkami. Angiogenin stimuluje neoangiogenezi a umožňuje progresi nádoru. Pozitivní korelace mezi počty makrofágů a expresí angiogeninu nádorovými buňkami tuto hypotézu podpořila. Expresí angiogeninu pozitivně korelovala s vývojem kapilár, s uzlinovými a jaterními metastázemi a s pokročilostí nádoru [156]. Práce z roku 2002 tyto závěry nepotvrdila, neboť množství makrofágů ve stromatu tumoru či v invazivním okraji nekorelovalo s hustotou kapilár [157]. Práce z roku 2005 prokázala korelaci mezi makrofágy a mastocyty infiltrujícími tumor a delším celkovým přežitím u pacientů s KRCa [158]. Pozitivní vliv makrofágů v invazivním okraji na bezpříznakové přežití po radikální operaci pro KRCa prokázal Imano, zde byl též prokázán negativní vliv osteopontinu v centru tumoru na výskyt metachronních jaterních metastáz [159]. Ve studii zaměřené na pacienty s KRCa po radikální operaci s metastatickým postižením regionálních lymfatických uzlin se prokázal pozitivní efekt makrofágů na prognózu [160]. Rozdělení makrofágů v invazivním okraji dle fenotypu na M1 a M2 neukázalo rozdíl v jejich vlivu na prognózu KRCa. M1 jsou značené na syntázu oxidu dusnatého a M2 makrofágy jsou značené na scavenger receptor CD163. Oba dva typy měly pozitivní vliv na prognózu po radikální léčbě KRCa. Jednalo se o dosti robustní studii se 452 pacienty s definovaným MSI a CIMP statutem. Množství tumor asociovaných makrofágů nekorelovalo s genetickým podkladem onemocnění [161]. V rozporu s uvedenými výsledky byl prokázán negativní vliv M2 makrofágů na prognózu KRCa ve studii Herrery [162]. Použití poměru tumor asociovaných makrofágů dle barvení na CD68 a na CLEVER-1/Stabilin-1 ukázalo, že ve

stadiu KRCA UICC IV vyšší množství regulačních M2 makrofágů peritumorálně a intratumorálně pozitivně korelovalo s delším OS. Vysoký poměr CD68/CLEVER 1 pozitivně koreloval s delším bezpříznakovým přežitím po radikální chirurgické léčbě. CD68 je považovaný za univerzální marker makrofágů, CLEVER-1/Stabilin-1 je markerem regulačních makrofágů [163]. Jako pozitivní prognostický faktor KRCA se CD68⁺ tumor asociované makrofágy potvrdily i v dalších publikacích [155, 164, 165, 166, 167]. V roce 2013 bylo publikováno zjištění, že přítomnost CD169 (sialoadhesin) pozitivních makrofágů v regionálních uzlinách po resekci střeva pro KRCA pozitivně koreluje s prognózou KRCA. Byl též prokázán kontakt makrofágů s CD8 lymfocyty v lymfatických uzlinách [168].

5.2.3 Granulocyty

Typy granulocytů a jejich charakteristika

Granulocyty se svým původem a funkcí řadí k fagocytům a dále se rozlišují na neutrofile, eozinofily, bazofily a mastocyty. Neutrofile se liší od makrofágů a DC tím, že neexprimují MHC II, a nemohou proto fungovat jako antigen prezentující buňky [109 s. 33-47]. Za fyziologických podmínek se většina granulocytů zdržuje v cirkulaci a kostní dřeni a až v průběhu zánětu tyto imuncyty vycestovávají k místu probíhající inflamace. V periferní krvi představují neutrofile 60–70 %.

Funkce *eozinofilů* spočívá v obraně proti mnohobuněčným parazitům. Eozinofily tvoří 1–3 % jaderných buněk v periferní krvi.

Bazofily jsou nejméně početně zastoupenou skupinou, která tvoří méně než 2 % z imuncytů v periferní krvi. Jsou považovány za cirkulující formu mastocytů – žírných buněk. Zůstává však otázkou, jestli jsou jejich prekurzorem. Bazofilní granula obsahují histamin a serotonin a podílejí se na protiparazitární obraně.

Mastocyty patří morfologicky mezi granulocyty. Podílejí se produkcí biogenních aminů (serotonin, histamin) na vypuzení parazitů. V případě systémového účinku mastocyty vyplavených látek se jedná o anafylaxi v rámci alergické reakce. Recentní studie ukázaly, že mastocyty mohou fungovat i jako antigen prezentující buňky a hrají nezastupitelnou roli ve fyziologii sliznic a pojiva [109 s. 45].

Vztah granulocytů ke KRCa

Neutrofilly se objevily ve studii navrhující skórovací prognostický systém u inoperabilního KRCa, kde figurovaly mezi dalšími faktory doby OS. Vysoká hodnota zlomku *neutrofilly/lymfocyty* v periferní krvi byla prokázána jako negativní prognostický faktor [169, 170, 171].

Eozinofily peritumorálně a intratumorálně byly prokázány jako pozitivní prognostický faktor DFI a OS u KRCa [172]. Počet neutrofilů infiltrujících tumor značené na myeloperoxidázu se též ukázaly asociované s nízkými klinickými stadii (UICC I a II) a také jako pozitivní prognostický faktor DFI a OS u KRCa [173]. Mastocyty byly na myším experimentálním modelu odhaleny jako buňky podporující progresi karcinomu kolon [174].

5.2.4 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou nejvýkonnější antigen prezentující buňky a představují most mezi nespecifickou a specifickou imunitou. Recentní imunologické práce zaobírající se DC rozlišují dvě subpopulace; jedná se o myeloidní a plazmacytoidní DC.

Myeloidní DC

V cirkulaci a tkáních nacházíme zralé a nezralé DC, uvedený stav má podstatný vliv na funkci buňky. DC se vyvíjejí z monocytů, které přechází z cirkulace do tkání. Nezralé buňky se v těle typicky nacházejí na rozhraní organismu a vnějšího prostředí. V kůži, respiračním epitelu a mukóze GIT tvoří 1–2 % celkového počtu buněk. Jak už napovídá název buněk, DC mají výběžky. Ve sliznici je též aktivně nastavují do lumen skrze mezibuněčné prostory a vychytávají antigeny z potravy. Cestování nezralých DC do sekundárních lymfatických orgánů je řízeno chemokiny (CCL-19, CCL-21). Zralé DC jsou vybaveny chemokinovým receptorem CCR7. Nematurované DC fagocytují fragmenty odumřelých buněk a molekuly rozpuštěné v extracelulární tekutině cestou do lymfatických uzlin. Části tohoto materiálu vystavují na MHC na svém povrchu, čímž naplňují svoji funkci antigen prezentujících buněk. Pokud se DC nesetká se signály prozrazujícími patogen či nekrózu okolních buněk, přetrvává v nematurovaném stavu. V případě setkání

nezralé DC s antigenně specifickým naivním T lymfocyt se T lymfocyt inaktivuje či diferencuje v regulační T lymfocyt. Maturované DC exprimují zvýšené množství MHC a kostimulačních molekul CD80 a CD86. Tyto zralé buňky také produkují kombinaci interleukinů a faktorů, které stimulují k proliferaci a k diferenciaci efektorové T lymfocyty (jedná se o IL-1, IL-6, IL-12 a TNF α). Bez maturovaných DC nelze aktivovat naivní T lymfocyty. Život maturované DC trvá cca 2 až 3 dny, další přísun DC do místa zánětu je zajištěn z prekurzorů z kostní dřeně [109 s. 43-44].

Plazmocytoidní DC

Plazmocytoidní DC jsou diferencovatelné na základě exprese receptoru pro IL-3 (CD123). Plazmocytoidní DC exprimují TLR 7 a 9, které reagují na přítomnost virových RNA a DNA. Tyto buňky po stimulaci přes TLR produkují IFN γ , aktivují kromě T lymfocytů i NK a NKT (Natural killer T cells) lymfocyty [109 s. 43-44].

Vztah DC ke KRCa

V KRCa jsou maturované DC distribuovány kromě okolní tkáně také v invazivním okraji společně s T lymfocyty. Bylo prokázáno, že absence buněk pozitivních na barvení MHC II je asociována s kratším celkovým přežitím. Je ovšem otázkou, zda se jednalo o zralé DC [175]. Kito potvrdil, že množství CD83⁺ metastázu infiltruujících buněk negativně koreluje s délkou tzv. doubling time u jaterních metastáz KRCa (doubling time – čas, za který se dvakrát zvětší velikost metastázy) [176]. Liškova práce z roku 2012 nepotvrdila význam tumor infiltruujících DC jako prognostického faktoru po radikální operaci KRCa [154]. Kocián prokázal, že mutace kodonu 13 v genu K-RAS je asociována s infiltrací tumoru nezralými DC (CD1a⁺) a skupinou pacientů, kteří po dobu sledování neprodělali recidivu [177]. Práce Golubové ukázala dendritické buňky jako pozitivní prognostický faktor KRCa [178], stejně jako studie Vayrynenova [179].

5.2.5 Serinové proteázy cytolytických granul a inhibitory proteáz

Granzym B a jeho funkce

Granzym je člen serinových proteáz, které jsou uskladněny v cytotoxických granulích. U člověka známe pět typů granzymů, A, B, H, K a M. Nejprostudovanějším je granzym B, který byl objeven v polovině osmdesátých let dvacátého století. Jedná se o serinovou proteázu velikosti 32kDa, která se podobá enzymu chemotripsinu. Granzym lyzuje protein v místě aminokyselinového řetězce připojeného k aspartátu [180].

Původně se předpokládalo, že granzym B je produkován pouze NK buňkami a T lymfocyty. Za určitých podmínek provázejících zánět může být granzym B exprimován u $CD4^+$ lymfocytů, mastocytů, makrofágů, neutronů, bazofilů, DC a regulačních lymfocytů. Z neimunitních buněk mohou produkovat granzym B buňky hladkého svalstva, chondrocyty, keratinocyty, pneumocyty II. typu, Sertoliho buňky, primární spermatocyty, buňky granulózy a syncytiální buňky trofoblastu [181]. Exprese granzymu je regulována na transkripční i translační úrovni mnoha faktory, z nichž mnohé jsou zároveň aktivačními faktory buněk produkujících granzym B. U NKT buněk a T lymfocytů se jedná o prostředí bohaté na určité cytokiny spolu s přítomností $CD4^+$ helperů a regulačních lymfocytů [182]. Ke zvýšení produkce granzymu B dochází i u aktivovaných DC [183]. Posttranskripční regulace granzymu B se skládá z několika mechanismů. Mezi takové patří syntéza granzymu B v Golgiho aparátu jako pro-enzymu, který je aktivován další proteolýzou. Tento produkt je označen receptorem manóza 6 fosfát (MPR) a je transportován do granul. Již uskladněný enzym v granulích je aktivován proteolýzou s odštěpením N terminálního dipeptidu cathepsinem C. Aktivovaný granzym B je umístěn na serglicinu, což je chondroitin sulfátový proteoglykan. Vazba na serglicinu a nízké pH v granulích zajišťuje nízkou aktivitu granzymu [182]. Aktivované granzymy jsou dopravené k cílové buňce pomocí imunologické synapse po rychlé depolarizaci lytických granulí. Synapse slouží jako vývod pro transport lytických granul do cytoplazmy cílové buňky [184]. Pohyb granul je daný cytoskeletem z mikrotubul a probíhá směrem k cílové buňce. K proniknutí granzymu přes cytoplazmatickou membránu cílové buňky slouží perforin [185].

Perforin je enzym strukturou podobný komplementu C9. Recentní modely funkce tohoto proteinu ukazují, že zajišťuje ve vazbě na MPR indukci endocytózy komplexu perforin – MPR - granzym [186]. Perforin také zajišťuje uvolnění granzymu z endosomu

cílové buňky do cytoplasmy, kde proteolytická aktivita granzymu vede ke fragmentaci DNA a k apoptóze. Specifickým inhibítozem granzymu B je serpin B9 [180].

Inhibitor granzymu B serpin B9

Serpin B9 je jediný známý humánní endogenní inhibitor granzymu B. Jeho fyziologická funkce je ochrana proti vylití obsahu lytických granulí. Dosud je prokázána jeho produkce u endoteliálních buněk, buněk hladké svaloviny cév a u hepatocytů. Dále byla zaznamenána zvýšená produkce v imunoprivilegovaných buňkách, jako v trofoblastu, Sertoliho buňkách, v buňkách granulózy a v oční čočce. Zde je jeho předpokládaná funkce obrana proti cytotoxické imunitě [134].

5.3 Specifická imunitní reakce

Hlavní funkcí specifické neboli adaptivní imunity je rozpoznání nejrůznějších antigenních struktur. Tuto schopnost umožňují antigenně specifické TCR (T-cell receptor) a BCR (B-cell receptor) na lymfocytech. T lymfocyty zajišťují cytotoxickou odpověď a B lymfocyty humorální část imunity neboli tvorbu protilátek. Obrovské množství variant (řádově 10^{11}) zmíněných receptorů je dáno rekombinací genových segmentů V, D, J pro variabilní část řetězce imunoglobulinu. Dalším mechanismem diverzity je nepřesné spojení přeskupených genů za účasti terminální transferázy. Rozšířenou variabilitu imunoglobulinů IgM a IgD o IgG, IgA a IgE zajišťuje izotypový přesmyk v konstantní části těžkých řetězců imunoglobulinu. K diverzitě přispívá též indukce somatických mutací pro těžké i lehké řetězce [109 s. 65]. Adaptivní imunitní odpověď je schopná reagovat na nový cizorodý antigen a zapamatovat si ho, přičemž budoucí imunitní odpověď je obvykle mnohem silnější [187].

5.4 Buněčné elementy adaptivní imunity

5.4.1 T lymfocyty – jejich klasifikace a vývoj

T lymfocyty lze rozdělit dle několika kritérií. Podle typu TCR, který je složený z řetězců $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$, a podle exprese CD4 a CD8. Nejpočetnějším typem jsou T lymfocyty s TCR složeným z řetězců $\alpha\beta$. Tyto lymfocyty lze dále rozdělit na hlavní skupiny podle exprese koreceptorů CD4 a CD8. CD4 molekula je koreceptorem MHC II, CD8 je koreceptorem MHC I. Většina $CD8^+$ lymfocytů jsou prekurzory cytotoxických lymfocytů nebo paměťových buněk. U $CD4^+$ buněk se většinou jedná o prekurzory pomocných T lymfocytů (helpers T cells). Pomocné lymfocyty lze rozdělit dle spektra produkovaných cytokinů na dvě hlavní skupiny: *Th1* a *Th2*. *Th1* produkují hlavně $IFN\gamma$ a IL-2 a tím podporují cytotoxickou reakci. *Th2* produkují hlavně IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10, čímž stimulují B lymfocyty. Dalšími skupinami pomocných lymfocytů jsou *Th0*, *Th3* a *Th17*. Toto dělení je však dosti zjednodušené a vychází hlavně ze studia myší adaptivní imunity [109 s. 139-152]. K $CD4^+$ lymfocytům patří tzv. přirozené regulační nebo také supresorové T lymfocyty (T reg), které exprimují též CD25 a Forkhead box P3 (FoxP3). Za fyziologických podmínek potlačují autoimunitní reakci. Kromě T reg se vyskytují v periferních tkáních i tzv. indukované supresorové T lymfocyty. Zvláštním typem jsou intraepiteliální lymfocyty (Mucosa associated invariant T cell), které obsahují $\gamma\delta$ TCR.

T lymfocyty ve svém názvu evokují, že pocházejí z thymu. Jejich prekurzory zvané pro-thymocyty se do thymu dostávají z kostní dřeně. U dalšího vývojového stupně, tzv. časných thymocytů, se objevuje preTCR složený z β řetězce a CD3 komplexu. Buňky v brzlíku, které mají na svém povrchu definitivní TCR složený z CD3 a řetězců α a β , jsou označovány jako thymocyty. Tyto buňky jsou též vybaveny CD4 a CD8 koreceptory. V této fázi je eliminována skupina buněk s reaktivitou k tělu vlastním antigenům (negativní selekce). Dochází též k vyřazení nefunkčních thymocytů, které nedokážou rozeznat MHC (pozitivní selekce). Zralé lymfocyty putují do sekundárních lymfatických orgánů. Některé autoreaktivní thymocyty nepodléhají negativní selekci a jsou směřovány k vývoji v tzv. přirozené regulační T lymfocyty (nTreg) [109 s. 148-150].

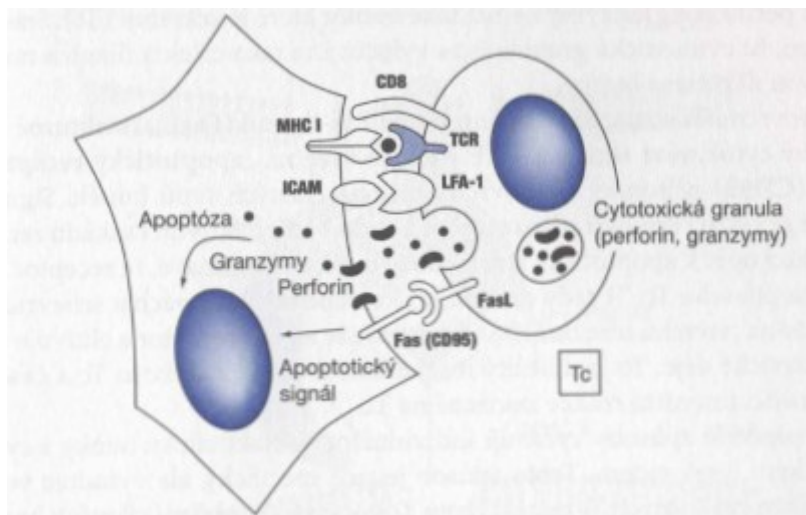
5.4.2 Efektorové a paměťové CD8⁺T lymfocyty

Cytotoxické (efektorové) CD8⁺ T lymfocyty rozeznávají a ničí buňky infikované virem nebo stresem poškozené buňky. Jsou schopny rozeznat a usmrtit i nádorové buňky. Aktivace cytotoxického účinku je závislá na fyzickém mezibuněčném kontaktu TCR lymfocytu se specifickým antigenem na MHC I antigen prezentujících buňkách. Podmínkou je další přítomnost adhezivních a kostimulačních molekul (CD80, CD86, CD28L). Jako antigen prezentující buňky vystupují hlavně DC a makrofágy. Pokud by došlo pouze k vazbě mezi CD8 a MHC se specifickým antigenem bez kostimulace, T lymfocyt by to utlumilo. V opačném případě dochází ke stimulaci proliferace a vzniku klonu zralých efektorových cytotoxických T lymfocytů. K této aktivaci většinou dochází v lymfatických uzlinách [109 s. 136]. Uvedený proces je podporován Th1 lymfocyty, které stimulují proliferaci klonu CD8⁺ lymfocytů pomocí IL-2. Funkce Th1 lymfocytů je zřejmě klíčová, protože se podílejí i na aktivaci DC na plně funkční antigen prezentující buňku, což je kromě produkce cytokinů zajištěno i kontaktem CD40L na Th lymfocytu s CD40 na povrchu DC. Po aktivaci CD40 dochází u DC k expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 a k sekreci IL-1 a IL-12. Uvedené cytokiny stimulují CD8⁺ cytotoxické buňky. Zralé CD8⁺ buňky jsou unášeny z lymfatických uzlin do tkání, kde mohou působit ihned po kontaktu se specifickým antigenem bez nutnosti dalšího kostimulačního signálu [109 s. 136].

Cytotoxické efektorové T lymfocyty využívají k ničení buněk tři mechanismy (obr. 4):

1. Cytotoxická granula obsahující granzymy a perforiny.
2. Stimulace CD95 (Fas receptor) pomocí Fas ligandu na efektorových T lymfocytech. Vazba Fas/Fas ligand vede k apoptóze. Tato interakce ovšem probíhá i opačně, neboť T lymfocyty exprimují Fas a buňky tkání Fas ligand. Tento "sebevražedný" proces je součástí regulace zánětlivé cytotoxické opovědi.
3. Produkce lymfotoxinu TNF β , který působí bez nutnosti přímého buněčného kontaktu a indukuje apoptózu prostřednictvím receptorů buněčné smrti. Působení lymfotoxinu není

ovšem tak cílené a při masivní aktivaci efektorových T lymfocytů může dojít ke škodám na zdravých buňkách okolní tkáně [109 s. 150-153].



Obr. 4. Mechanismy cytotoxického účinku efektorového T lymfocytu [109 s. 152]

Paměťové T lymfocyty jsou částí populace diferencované po setkání s antigenem. Jejich úloha spočívá v sekundární (anamnestické odpovědi), která je mnohem rychlejší a efektivnější než primární imunitní odpověď. Tato imunitní paměť může trvat i mnoho let [109 s. 28]. V několika studiích byl opakovaně prokázán jejich vliv na prodloužené bezpříznakové přežití, což podporuje hypotézu o jejich funkci v potlačení rekurence KRCa po radikálním výkonu. Marker použitý pro paměťové T lymfocyty je CD45RO [7, 107, 188].

Mechanismy rezistence nádorů vůči cytotoxickým T lymfocytům

Mechanismy rezistence tumorů vůči cytotoxické imunitě se dají rozdělit na tři typy:

redukce imunogenicity nádorových buněk,
exprese inhibičních molekul,
imunoprese zprostředkovaná mikroprostředím nádoru [189].

Redukce imunogenicity se odehrává na podkladě snížení exprese MHC I. K tomuto jevu dochází po mutaci genu B2M, který kóduje jednu podjednotku v heterodimeru

molekuly MHC I [190]. Ztráta MHC ovšem vede k aktivaci NK buněk. Některé studie týkající se jiných typů malignit než KRCa (karcinom prsu a melanom) ukázaly, že tumor infiltrující NK buňky mají sníženou cytotoxicitu oproti NK buňkám ve zdravé tkáni v okolí tumoru [144, 191].

K molekulám produkovaným tumorem s inhibičním účinkem na cytotoxické lymfocyty patří Programmed Death 1 (PD-1 ligand), který je produkován nádorovými buňkami. PD-1 je inhibiční receptor produkovaný více typy imunocytů včetně T lymfocytů [192]. K dalším solubilním působkům s imunosupresivním účinkem, které jsou produkovány nádorovými buňkami, patří TGF β , IL-10, Galectin-1, PGE2 a vascular endothelial growth factor – A (VEGF-A) [189]. Dalšími inhibičními molekulami jsou Fas ligand, který se váže na Fas receptor lymfocytů. Vazba Fas ligandu na receptor vede k apoptóze T lymfocytu. Tento způsob vyžaduje přímý mezibuněčný kontakt [193]. Uvedený mechanismus byl prokázán i u KRCa, kde vyšší exprese mRNA Fas ligandu v nádoru korelovala s nižšími počty TIL [194]. KRCa je též schopen produkovat metionin - enkefalin, u kterého byla prokázána imunosupresní funkce na T lymfocytech [195]. K imunosupresorovým látkám patří také B7H3, jedná se o protein produkovaný buňkami KRCa [196].

Do imunosuprese zprostředkované mikroprostředím nádoru lze zahrnout vliv hypoxie, interakci T lymfocytů s dalšími imunocyty, s fibroblasty a s extracelulární matrix.

Imunocyty, které ovlivňují reaktivitu cytotoxických lymfocytů, jsou v první řadě DC a makrofágy jako antigen prezentující buňky a některé subpopulace B lymfocytů [189]. Kontakt s nedospělou DC a T lymfocylem vede k vytvoření imunotolerance k nádorovým buňkám.

Hypoxie je obecně spjata s imunosupresí, přímo inhibuje odpověď T lymfocytů. Bylo prokázáno, že hypoxie inhibuje produkci IL-2 a IFN γ po aktivaci TCR T lymfocytu. Na myším modelu bylo ukázáno, jak exprese VEGF – A indukovaná hypoxií zvyšuje expresi molekul důležitých pro inhibici T lymfocytů (PD-L1, TIM-3, CTLA-4) [197].

K indukci apoptózy TIL během hypoxie je způsobena molekulou Endothelial monocyte activating polypeptide II, jak bylo prokázáno na in vitro modelu buněčné kultury KRCa s lymfocyty [198].

Fibroblasty ovlivňují imunitní odpověď T lymfocytů produkcí extracelulární matrix, která zabraňuje přesunu T lymfocytů z peritumorální oblasti a do centra tumoru [199]. V experimentu s transgenními myšmi bylo prokázáno, že fibroblasty inhibují TNF α .

a IFN γ zprostředkovanou imunitní odpověď [200]. Fibroblasty se podílejí i na inhibici maturace DC a produkují inhibiční ligand PD-L1 [201].

Vztah T lymfocytů ke KRCa

Tumor infiltrující lymfocyty jsou rozeznatelné jako malé kulovité buňky pomocí barvení Hematoxilinem-Eosinem a patolog je schopen je odlišit od ostatních imunocytů jako neutrofilů, eozinofilů makrofágů či mastocytů. Jass prokázal, že infiltrace podél invazivního okraje nádoru je nezávislý prognostický faktor KRCa [202]. Ukázalo se, že kromě počtu TIL je podstatná i jejich lokalizace. Ropponen tento koncept potvrdil zjištěním, že semikvantitativní určení počtu TIL podél invazivního okraje negativně koreluje s klinickým stadiem KRCa a je pozitivní prognostický faktor pro OS a DFI [203]. Tyto výsledky byly doplněny o tzv. Crohn-like reakci, což je přítomnost lymfoidních agregátů naproti invazivnímu okraji. Crohn-like reakce se ukázala jako pozitivní nezávislý prognostický faktor [204]. Na základě pozorování CD8⁺ T lymfocytů u karcinomu žaludku asociovaným s Ebstein-Barrové virem byla provedena imunohistochemická analýza TIL u KRCa [205]. Rozbory lokalizace a množství CD4⁺ a CD8⁺ ukázaly, že TIL v invazivním okraji jsou většinou CD4 a CD8 lymfocyty. Intraepiteliální lymfocyty jsou však hlavně CD8⁺ a představují nejsilnější pozitivní prognostický faktor celkového přežití. Naproti tomu CD8⁺ lymfocyty ve stromatu neprokázaly svoji prognostickou váhu [4, 5, 206, 207]. Měření provedené pomocí průtokové cytometrie, které nezohledňovalo lokalizaci TIL, prokázalo jako pozitivní prognostický faktor vysokou hodnotu poměru CD8/CD4 u TIL [208].

V práci Galona a Pageze z roku 2006 byly u 415 pacientů po radikální operaci KRCa imunohistochemicky značeny cytotoxické T lymfocyty na CD3, CD8 spolu s barvením na granzym B. U tumorů téže skupiny pacientů proběhlo označení T paměťových lymfocytů (CD45 RO). V potaz byly vzaty dvě lokalizace tumor infiltrujících lymfocytů: invazivní okraj a centrum nádoru [7].

Galon prokázal, že v rámci jednoho klinického stadia KRCa je signifikantním pozitivním prognostickým parametrem pro OS a DFI přítomnost tumor infiltrujících T cytotoxických a paměťových T lymfocytů. V kohortě 415 pacientů ve stadiu UICC I, II a III byly prokázány jako nezávislé nejsilnější prognostické faktory s nejvyšším rizikem recidivy T (invazivita nádoru), N (postižení lymfatických uzlin metastázemi KRCa)

a semikvantitativně určené počty buněk $CD3^+$ v tumoru – TC^{hi}/IM^{hi} vs TC^{lo}/IM^{lo} (TC – tumor center, IM – invasive margin). Studie byla doplněna kvantifikací mRNA v 75 tumorech KRCa, v nichž bylo prokázáno, že zvýšená exprese genů Th1 imunitní odpovědi (geny kódující T-box transkripční faktor 21, interferon regulační faktor 1, $IFN\gamma$, CD3, CD8, granulysin a granzym B) pozitivně koreluje s lepší prognózou KRCa. V této studii bylo také prokázáno, že endovaskulární (VE) lymfatická (LI) a perineurální (PI) invaze mikrometastázemi (tzv. VELIPI) KRCa je negativním prognostickým faktorem. Bylo též prokázáno, že počet $CD8^+$ zralých TIL negativně koreluje s VELIPI. Tyto výsledky vedli k zařazení tzv. *immunoscore* do klasifikačních chémat KRCa [7, 13 s. 174].

Kochova studie sledovala status aktivace TIL na základě jejich tří parametrů: CD8/CD4 poměr u TIL, známky cytotoxické aktivity a proliferační aktivitu $CD8^+$ TIL. Imunohistochemické barvení odhalilo vyšší počty $CD4^+$ Th lymfocytů v tumoru oproti zdravé sliznici a snížení poměru CD8/CD4 v tumoru oproti zdravé sliznici. Ve stejné studii bylo použito barvení na CD107a jako marker degranulace lymfocytu a bylo prokázáno, že v nádorové tkáni je pozitivita na barvení na tento marker signifikantně častější. Dále byla měřena proliferační aktivita T lymfocytů pomocí CD69. Navíc se ukázalo, že pacienti, u kterých byly detekovány v periferní krvi a v kostní dřeni T lymfocyty reagující zvýšenou expresí $IFN\gamma$ na aktivaci tumor specifickými antigeny (např. MUC1), mají signifikantně zvýšené alespoň dva ze tří sledovaných parametrů TIL (CD8/CD4, CD107a, CD69). Status aktivace TIL negativně koreloval s UICC stadiem KRCa [209].

Hojó prokázal, že zvýšená exprese chemokinů CXCL 16, který atrahuje TIL, je asociována s lepší prognózou KRCa [210]. V práci obsahující 587 pacientů bylo zjištěno, že absence $CD8^+$ lymfocytů, zvýšená exprese uPA (ureaplasma plasminogen activator) a jeho receptoru v tumoru jsou nezávislými negativními prognostickými znaky KRCa [211]. Byl také prokázán pozitivní vliv přítomnosti TIL na odpověď k chemoterapii založené na 5-FU [212]. Laghi prokázal na vzorcích KRCA 286 pacientů ve stadiu UICC III a IV, že přítomnost $CD3^+$ lymfocytů v invazivním okraji je spojena s menším rizikem recidivy v podobě metachronních metastáz [213]. Ogino prokázal na obsáhlé studii, do níž bylo zařazeno 843 pacientů ve všech stádiích KRCa, že TIL (semikvantitativně hodnoceno) je pozitivní prognostický faktor celkového přežití bez ohledu na následující faktory: mikrosatelitní stabilita, CIMP, LINE-1 hypermethylace, BRAF mutace a mutace P53. Ve studii byla hodnocena lokalizace TIL a pro statistickou analýzu byl vzat v potaz součet semikvantitativních hodnocení jednotlivých lokalizací [214].

Podobné výsledky publikovala Dahlin, v jejíž studii množství TIL pozitivně korelovalo s OS bez ohledu na status mikrosatelitů a CIMP. Zajímavé je, že se neprokázal rozdíl v TIL mezi pacienty s karcinomem rekta s neoadjuvantní radioterapií a bez ní [215]. Suzuki prokázal jako pozitivní prognostický faktor pro DFI i OS u KRCa poměr intratumorálních CD8/FoxP3 lymfocytů [216]. Belgická studie prokázala jako pozitivní prognostický faktor intraepiteliální infiltraci CD3⁺ a CD8⁺ lymfocyty a stromální CD3⁺ lymfocyty pro celkové přežití u pacientů s karcinomem kolon. Většina pacientů byla v klinickém stadiu UICC II a III. Imunohistochemické značení granzymu B se nepotvrdilo jako prognostický faktor OS nebo DFI [217].

Při studiu s tumorem asociovaných lymfoidních nodulů u karcinomu rekta bylo prokázáno, že infiltrace těchto folikulů CD3⁺ lymfocyty je spojena s delším celkovým přežitím bez ohledu na klinické stadium karcinomu [218]. Simpson prokázal na studii zahrnující 462 pacientů, že intratumorální infiltrace T lymfocyty a exprese MHC I a STAT1 tumorem je pozitivní prognostický faktor KRCa [219]. Lee v jihokorejské studii provedl výzkum u pacientů ve stadiu UICC II a prokázal, že množství intraepiteliálních TIL značených na CD3⁺, CD45RO⁺, CD25⁺ a FOXP3⁺ pozitivně korelovalo s DFI. Signifikantním prognostickým faktorem pro OS i DFI byly vysoké hodnoty CD45RO⁺ ve stromatu [188]. Yasuda prokázal, že CD8⁺ TIL jsou pozitivním prediktivním faktorem pro chemoradioterapii karcinomu rekta [220]. Correale prokázal, že u pacientů s UICC IV je infiltrace primárního nádoru CD8⁺ T lymfocyty s vysokou expresí chemokinového receptoru CCR7 pozitivním prognostickým faktorem celkového přežití [221].

Metaanalýza, kterou v roce 2014 provedl Mei, zahrnovala třicet studií zaobírajících se TIL a KRCa. Šest z nich se zabývalo CD8⁺ a shodně prokázalo pozitivní vliv na OS, pokud jsou tyto lymfocyty přítomny ve stromatu KRCa [5, 206, 207, 216, 217, 222]. Tato metaanalýza také ukázala, že sedm prací zabývajících se CD3⁺ se shodně vyjádřilo k pozitivnímu prognostickému vlivu CD3⁺ v invazivním okraji na OS a DFI [6].

V roce 2015 byla publikována práce, v níž autoři skenovali imunofluorescenčně bezprostředně po resekci celé sety povrchových antigenů. Jednalo se o skupiny povrchových markerů KRCa (CD13, CD24, CD26, CD49d, CD138, CD166, CA125, CA19-9, EGFR, Galektin-4 a HLA-DR) a antigenů na povrchu T lymfocytů (CD10, CD11b, CD11c, CD25, CD31, CD95, CD151, CD181, Galektin-4, CA19-9 a trombospodin-1). Pokud se objevilo pozitivní barvení v rizikových kombinacích markerů, bylo možno se 79,2% pravděpodobností očekávat relaps onemocnění po radikální

chirurgické léčbě [223]. Studie z roku 2016 neprokázala korelaci mezi vysokým body mass indexem a množstvím TIL u KRCa [224].

5.4.3 Th Lymfocyty

Jedná se o $CD4^+$ lymfocyty. Dosavadní studie v humánní medicíně zabývající se imunitní protinádorovou odpovědí identifikovaly Th1, Th2 a Th17 pomocné lymfocyty [225]. Za subpopulaci T pomocných lymfocytů lze považovat i T regulační lymfocyty, ty však jsou zpracovány zvlášť. O tom, zda se bude imunitní reakce ubírat směrem k cytotoxické reakci (Th1 zprostředkovaná reakce) nebo k pomoci B lymfocytům (Th2 zprostředkovaná reakce), rozhodují koncentrace určitých interleukinů v okolí naivních prekurzorových $CD4^+$ T lymfocytů. IL-12 produkovaný makrofágy podporuje cytotoxickou rakci a IL-4 produkovaný mastocyty, basofily a infikovanými DC stimuluje proliferaci naivních T lymfocytů a jejich diferenciaci v Th2 lymfocyty. Na stimulaci Th2 podporované reakce ve střevě se může podílet thymic stromal lymphopoetin produkovaný v mukóze, který směřuje DC k stimulaci Th2 reakce [109 s. 140-147]. Příklon k reakci orientované na Th2 lymfocyty byla např. pozorována v transformaci z intraepiteliální neoplázie v invazivní karcinom děložního čípku [226].

Molekula CD4

Molekula CD4 je koreceptor TCR (CD3), který umožňuje vazbu TCR na antigen prezentovaný na MHC II. CD4 přímo interaguje s molekulou MHC II.

CD4 je strukturně glykoprotein a nachází se nejvíce na Th lymfocytech, dále na přirozených (natural) regulačních T lymfocytech nT reg, monocytech, makrofázích a DC. Intracelulární doména CD4 amplifikuje signál vyslaný TCR [227].

Th1 lymfocyty

Pomocné Th1 lymfocyty udržují v chodu imunitní cytotoxickou reakci, která je kromě protinádorové reakce zaměřená hlavně na intracelulární parazity. Proto je základní úloha Th1 lymfocytů interakce s makrofágy a jejich aktivace. Pro aktivaci makrofágů jsou nezbytné cytokiny produkované Th1 lymfocyty. Navíc zde působí pozitivní zpětná vazba, neboť naivní T lymfocyt potřebuje parakrinní stimulaci aktivovanými makrofágy. Makrofág vystavuje na MHC II hydrolyzované fragmenty pohlcené nádorové buňky nebo intracelulárního parazita. Makrofág takto funguje jako APC. Th1 lymfocyt se specificky naváže na MHC II svojí TCR spolu s dalšími adhezivními molekulami. Například molekula ICAM na makrofágu se váže na integrin LFA-1, CD86 na makrofágu se váže na CD28 T lymfocytu (CD28 je též markerem zralosti T lymfocytu). Th1 lymfocyt je také stimulován parakrinně IL-12. Th1 lymfocyt, který rozezná makrofág prezentující specifický antigen, tak přijme soubor signálů k proliferaci a diferenciaci v efektorové Th1 lymfocyty. Tímto způsobem dojde k vytvoření buněčného klonu Th1 lymfocytů, které reagují na stejný antigen. Aktivované Th1 lymfocyty produkují $\text{IFN}\gamma$, který zpětně stimuluje makrofágy k přechodu na aktivovanou formu. Efektorové Th1 lymfocyty také produkují IL-2, který působí jako autokrinní růstový faktor. Obecně lze říci, že Th1 lymfocyty udržují lokální zánět po antigenně specifické aktivaci, a to hlavně produkcí $\text{IFN}\gamma$. Jak je zmíněno v kapitole o cytotoxických T lymfocytech, Th1 lymfocyty stimulují i DC a CD8^+ cytotoxické lymfocyty [109 s. 141-145]. K identifikaci Th1 lymfocytů se používá detekce exprese chemokinových receptorů CXCR3 a CCR5, které se nevyskytují na Th2 a Th17 lymfocytech. Dalším hojně používaným markerem je transkripční faktor TBX21, ten se však může vyskytovat i u Th17. Funkční charakteristikou, která ovšem pro Th1 lymfocyty není zcela specifická, je exprese $\text{IFN}\gamma$ [228, 229, 230].

Th2 lymfocyty

Základní úlohou Th2 buněk je antigenně specifická stimulace B lymfocytů v produkci protilátek. Th2 lymfocyt stimuluje B lymfocyt pomocí produkce IL-4, IL-5, IL-6 a buněčným kontaktem za účasti adhezivních a stimulačních povrchových molekul Th2 lymfocytu (LFA-1, CD40L). Aby se Th2 lymfocyt stal efektorovou buňkou, je třeba, aby její prekurzor byl aktivován kontaktem s antigen prezentující buňkou, která vystavuje

na MHC II specifický antigen za účasti dalších kostimulačních signálů pomocí molekul CD80 a CD86 na povrchu antigen prezentující buňky (tou bývá DC). Takto aktivované prekurzory se klonálně dělí a diferencují v efektní buňky. Imunitní reakce podporovaná interleukiny produkovanými Th2 směřuje hlavně proti extracelulárním parazitům a nepředpokládá se, že by byla účinná v protinádorové imunitě. Změna reakce z cytotoxické na podporu B lymfocytů může být součástí ztráty schopnosti účinně eliminovat nádorové buňky [109 s. 144-147].

Th2 lymfocyty mohou být v periferní krvi identifikovány na základě produkce IL-4, IL-5 a IL-13 po stimulaci. Jako marker povrchových receptorů je také používán CRTH2, CCR3 nebo CCR4. Populace definované expresí interleukinů a povrchových receptorů však nejsou totožné [228, 229, 230].

Th17 lymfocyty

Subpopulace Th17 je známá ve spojitosti s autoimunitními chorobami a má funkci v ochraně proti mykotickým infekcím. K identifikaci Th17 slouží CCR6 a CCR4. Dalším markerem je transkripční faktor ROR γ T a translační produkt ROR γ (related orphan receptor γ T). K identifikaci Th17 lymfocytů lze použít i značení na TCR, IL-17 a CD8 negativitu [228, 229, 230].

Vztah Th lymfocytů ke KRCa

Tosoliny prokázal, že Th1 lymfocyt jako TIL jsou pozitivním prognostickým faktorem, Th17 negativním prognostickým faktorem a Th2 nemají jednoznačnou roli v prognóze KRCa [231]. V japonské studii bylo u 199 pacientů zkoumáno absolutní množství a typ Th (Th1, Th2 a Th 17) a Treg lymfocytů bez ohledu na lokalizaci v KRCa. Do studie byli zařazeni pacienti ve stadiích II a III dle Japanese Classification of Colorectal Carcinoma. (Rozdíl oproti UICC je v podskupinách III. stadia, viz tab. 5.) Dále byl zkoumán poměr jednotlivých typů Th lymfocytů k celkovému počtu TIL. Jediným prognosticky významným parametrem byl vysoký poměr ROR γ / TCR, který byl asociován s kratším celkovým přežitím a metastatickým postižením lymfatických uzlin [225].

Li prokázal, že čím vyšší je klinické stadium KRCa, tím jsou vyšší počty Th17 lymfocytů intratumorálně i peritumorálně. Vyšší stadia KRCa též korelovala s vyššími hladinami IL-6 v krvi [232]. U Th 17 lymfocytů se navíc ukázalo, že jsou atrahovány působky produkovanými KRCa a fibroblasty nádorového stromatu. Oním působkem byl chemokin (C-C motif) ligand 5 monocyte chemoattractant protein-1 [233]. Th lymfocyty byly též zahrnuty v mnoha studiích, kde figurují jako subpopulace CD4⁺ T lymfocytů, tyto studie jsou zmíněny v kapitole cytotoxické T lymfocyty a KRCa [208, 209].

a		N1	N2	N3
T1	IIIa	IIIb		
T2				
T3				
T4a				
T4b				

N1: Metastasis in 1 to 3 pericolic/perirectal or intermediate lymph nodes
N2: Metastasis in 4 to more pericolic/perirectal or intermediate lymph nodes
N3: Metastasis in main or lateral lymph nodes

b		N1a	N1b	N2a	N2b
T1	III A III B III C				
T2					
T3					
T4a					
T4b					

N1a: Metastasis in 1 regional lymph node
N1b: Metastasis in 2-3 regional lymph nodes
N2a: Metastasis in 4-6 regional lymph nodes
N2b: Metastasis in 7 or more regional lymph nodes

Tab. 5. Rozdíly mezi UICC a Japanese classification of Colorectal Carcinoma týkající se III. stadia [234]

5.4.4 Regulační T lymfocyty

Jedná se o skupinu lymfocytů s imunosupresivním účinkem. V periferní krvi nejpočetněji zastoupenými a nejprostudovanějšími jsou tzv. přirozené T regulátorové či supresorové lymfocyty (nTreg).

Uvedené nT reg představují 5–10 % CD4⁺ T lymfocytů v periferní krvi. Za fyziologických okolností udržují imunotoleranci vůči tělu vlastním buňkám. Také se podílejí na inhibici imunitní odpovědi proti komenzálním organismům. Jak již bylo uvedeno výše, existují dva typy Treg rozlišitelné dle svého původu. Dále existují indukované Treg (induced iTreg), které mají původ v Th lymfocytech. Ke změně fenotypu

těchto naivních Th lymfocytů je nezbytný TGFβ. K této indukci může dojít i po kontaktu s nezralými DC [102 s. 115]. Definice nTreg na základě antigenní výbavy T lymfocytů se postupem času měnila. Nejprve byl nTreg popisován jako CD4⁺ CD25⁺ lymfocyt. Tato populace však obsahovala také aktivované T lymfocyty [235]. Ukázalo se ale, že TCR⁺, CD4⁺, Foxp3⁺, CD127^{lo} (IL-7 receptor), CD25⁻ lymfocyty plní též úlohu Treg lymfocytů [236]. Miyara prokázal, že CD4⁺ T lymfocyty se supresorovou funkcí mají dva hlavní fenotypy: CD45RA⁺ Foxp3^{lo} klidové (rasting) rTreg a aktivované (activated) aTreg CD45RA⁻ Foxp3^{high} lymfocyty. rTreg rychle proliferují a mění se v aTreg, které mají velmi krátkou životnost [237]. Aktuální definice Treg v krvi je TCR⁺CD4⁺ Foxp3⁺CD127^{lo} [238]. Mezi další supresorové CD4 lymfocyty, které byly v minulosti objeveny, patří Th3 a Tr1 T lymfocyty. Th3 lymfocyty mají svoji úlohu ve střevní sliznici, kde tlumí imunitní reakci proti cizím antigenům ze stravy. Th3 lymfocyty produkují IL-10 a a TGFβ. Vznik lidských Tr1 lymfocytů byl prokázán in vitro, kdy z naivních CD4 T lymfocytů v přítomnosti CD45 a IL-27vznikly buňky s imunosupresorovou funkcí, jiné protokoly pracují s IL 10. Tr1 buňky neexprimují FoxP3 a dosud pro ně nebyl nalezen společný obecně přijatý marker [238]. Další populace T lymfocytů s imunosupresorovou funkcí nebyla odhalena v periferní krvi, ale v mikroprostředí malignity. Jedná se o CD8⁺ regulační TIL. V práci Filacihio byla imunofluorescenčně prokázána infiltrace různých typů solidních tumorů včetně KRCa buňkami se schopností imunosuprese, které byly definovány jako CD8⁺ CD28⁻ [239, 240]. Frisulo prokázal přítomnost CD8⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ lymfocytů v periferní lidské krvi [241]. Chaput prokázal přítomnost imunosupresivních CD8⁺ FoxP3⁺ TIL u KRCa [242].

Inhibiční účinek Treg byl prokázán in vivo i in vitro na diferencované CD4⁺ a CD 8⁺T lymfocyty, NK buňky, NKT lymfocyty, makrofágy, DC a osteoklasty [243]. Imunosuprese je navozena třemi hlavními mechanismy: *cytokiny a jinými solubilními působky, přímým mezibuněčným kontaktem a cytolýzou* [244].

Mezi imunosupresivní cytokiny a faktory produkované T reg patří TGFβ, IL-10 a IL-35 (člen rodiny IL-12) [245]. Treg lymfocyty produkují také adenosin a cyklický adenosin monofosfát. Adenosin je produkován při degradaci extracelulárního nukleotidu dvěma enzymy na povrchu Treg. Jedná se o CD39 a CD73, které jsou na povrchu 80 % Foxp3⁺ Treg buněk [246]. K imunosupresi přímým buněčným kontaktem Treg využívají povrchové molekuly jako CTLA-4, lymfocyte activation gen 3 (LAG-3) a Nrp-1. Např. LAG-3 je CD4 homolog, který po vazbě na MHC II na DC vede k potlačení její maturace a

omezení její imunostimulační kapacity. Dalším příkladem je interakce mezi již zmíněnou CTLA-4, CD80 a CD86 na povrchu DC, což vede u DC k produkci indoleamin 2,3-dioxygenázy (IDO). IDO reguluje metabolismus tryptofanu na tvorbu proapoptotických metabolitů, které vedou k supresi T efektorových lymfocytů [247]. V experimentu bylo také prokázáno, že Treg lymfocyty snižují expresi kostimulačních molekul CD80 a CD 86 u DC. Dosud není známo, zda tyto mechanismy hrají roli i při navození imunosuprese při nádorovém růstu. Třetí cesta imunomodulačního účinku je cytolýza, tato cesta je studována hlavně na myších [102 s. 68]. U člověka bylo prokázáno, že nTreg exprimují granzym A. Buněčná smrt cílové buňky je zprostředkována granzymem A, perforinem a adhezí CD18 [246].

Molekula CD 25

CD25 je α řetězec receptoru pro IL-2, tento receptor je transmembránový protein, který se vyskytuje na aktivovaných T lymfocytech, na Treg, aktivovaných B lymfocytech a na některých thymocytech a myelodoidních prekurzorech. Na oligodendrocytech se vyskytuje v heterodimeru jako vysokoafinní receptor pro IL-2. Podstatná část paměťových T lymfocytů také exprimuje CD25 [5, 248].

Molekula Forkhead box P3 (Foxp3)

FoxP3 neboli scurfín je člen FOX proteinů. Jedná se o transkripční faktor, který se vyskytuje na přirozených a indukovaných Treg. Lidský FOXP3 gen je lokalizován na X chromozomu. Jeho mutace se u lidí projevuje jako X vázaná autoimunitní deregulace, polyendokrinopatie a enteropatie. Spontánní mutace tohoto genu u myší, která vede ke kožním změnám a u samců k časnému úmrtí, umožnila odhalení funkce tohoto genu. Protein Foxp3 je nezbytný pro funkci a fenotyp Treg. Foxp3 se používá jako marker Treg neboť je 90% shoda mezi přítomností CD4⁺, CD25⁺, CD127^{lo} a expresí FoxP3 [249]. Na Tr1 se FoxP3 nevyskytuje a je přítomný pouze na některých Th3. U CD8⁺ 28⁻ Treg existují obě možnosti s i bez Foxp3 [250].

Vztah Treg k progresi KRCA

Předpokládá se, že zvýšené množství Treg (myšleno FoxP3 pozitivních buněk) znemožňuje efektivní odpověď proti nádorovým buňkám [251]. Samotné nádorové buňky KRCA produkují CCL5 (chemokinin s C-C motivem 5), kterým přitahují Treg pomocí vazby CCL5/CCR5 (CCR5 – receptor chemokininu) [252]. Ukázalo se, že suprese T lymfocyty je založena na specifické aktivaci Treg nádorovými antigeny. Ling prokázal, že u pacientů s KRCA je v periferní krvi a v nádorové tkáni signifikantně vyšší počet FoxP3 T lymfocytů oproti zdravým kontrolám (krev zdravého člověka a zdravá autologní sliznice kolon). Množství FoxP3 lymfocytů bylo vyšší v krvi i v tumoru u pacientů s vyšším stadiem KRCA dle UICC [253]. Terme prokázal, že zvýšené počty peritumorálních FoxP3 pozitivních buněk byly spojeny s vyšším klinickým stadiem KRCA a kratším celkovým přežitím [254]. Dále bylo zjištěno, že u pacientů s KRCA je v periferní krvi vyšší množství FoxP3 lymfocytů oproti zdravým kontrolám. Počty nTreg se po operaci normalizují. Ve stejné studii byla zjišťována reaktivita CD4 lymfocytů na nádor specifické antigeny před operací CEA a BT4. Snížená reaktivita CD4 lymfocytů signifikantně pozitivně korelovala s recidivou do 12 měsíců [255]. Výsledky některých studií jsou však v rozporu a infiltrace nádoru FoxP3 lymfocyty u KRCA je u nich pozitivním prognostickým markerem. V roce 2012 byla provedena metaanalýza zahrnující deset prací, z nichž šest neprokázalo vliv na prognózu, zatímco u zbývajících čtyř prací byl prokázán pozitivní prognostický vliv [256]. Novější práce z roku 2016, v níž studoval poměr FoxP3 pozitivních buněk k CD3⁺ pozitivním TIL, neprokázala vliv na prognózu KRCA a počty FoxP3 pozitivních TIL nekorelovaly s jiným klinickým či histopatologickým faktorem kromě vyššího výskytu tumoru v kolon oproti rektu [225]. Podobné stanovení úrovně imunitní odpovědi bylo zvoleno i ve studii Linga, kde byl prokázán pozitivní vliv na prognózu KRCA u pacientů s vysokým poměrem intratumorálních CD8⁺/FoxP3⁺ [257].

5.4.5 T lymfocyty s $\gamma\delta$ řetězci

Tyto lymfocyty rozeznávají jednoduché organické molekuly, např. aminy. T lymfocyty s $\gamma\delta$ řetězci mají některé společné prvky s NK buňkami, jejich význam je nejspíše v imunitní reakci proti mykobakteriím [109 s. 139]. Subpopulací těchto lymfocytů jsou intraepiteliální lymfocyty MAIT, které disponují omezeným repertoárem TCR zaměřených na evolučně konzervativní, široce rozšířené antigeny. Dosud byla jejich přítomnost popsána v tumorech ledvin, mozku a kolorekta. Ve studii Corvaisera bylo ukázáno, že T lymfocyty s $\gamma\delta$ řetězci TCR (T cell receptor) mají in vitro silnou cytotoxickou aktivitu proti buňkám KRCa [258, 259].

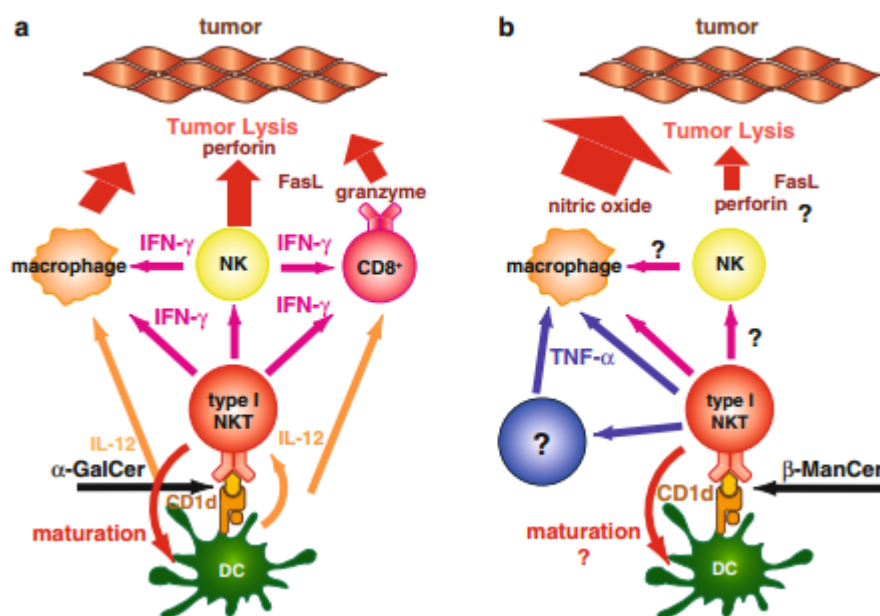
5.4.6 Natural Killer T buňky

Natural Killer T lymfocyty (NKT) jsou jedinečnou populací buněk, která sdílí fenotypové rysy a některé funkce s NK buňkami a T lymfocyty. Představují spojení mezi nespecifickou a specifickou imunitou [260]. NKT buňky tvoří jen 0,01–2 % ze všech mononukleárů z periferní krve. Nejvíce se jich nachází v thymu, játrech a slezině. Minimum jich je však obsaženo v lymfatických uzlinách [261]. Na rozdíl od ostatních T lymfocytů, které rozeznávají antigen prezentovaný na MHC, jsou NKT buňky např. schopny rozeznat glykolipidové, fosfolipidové a nelipidové antigeny prezentované na CD1d (neklasická MHC-like molekula u antigen prezentujících buněk) [262]. NKT buňky po aktivaci časně produkují mnoho cytokinů, jako např. $\text{IFN}\gamma$, IL-4, IL-12, IL-13 a IL-17 [263]. NKT buňky také stimulují produkci cytokinů jinými buňkami, např. produkci IL-12 u DC. V tomto smyslu NKT buňky usměrňují imunitní odpověď cytotoxické reakce. NKT buňky jsou fenotypově i funkčně heterogenní skupina. Některé mají koreceptor CD4, jiné CD8, další nemají ani jeden z nich [109 s. 154]. Můžeme je však dle funkce rozdělit na NKT lymfocyty I. a II. typu [264 s. 15]).

NKT I buňky

NKT I buňky exprimují semivariantní TCR α řetězec -V α 24Ja18. NKT I buňky mají obvykle povrchové markery jako CD44, CD69 a CD161 (NK1.1). Vzhledem k tomu, že se tyto markery nevyskytují na všech NKT I buňkách, slouží k jejich identifikaci

kombinace povrchových markerů CD8 $\alpha\alpha$ a CD8 $\alpha\beta$. K identifikaci je také používáno značení na CD1d tetramer ve vazbě na α -galactosylceramid [265], neboť α -galactosylceramid je typický antigen rozpoznávaný NKT I buňkami. Typ antigenu hraje určující roli také v profilu cytokinové odpovědi NKT I buňky [266] a má vliv i na mechanismus imunitní odpovědi (obr. 5). Například β -mannosylceramid a palmitoyl-aleoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamin má potenciál indukovat protinádorovou cytotoxickou reakci [262]. Lyzované fosfolipidy a neglykosidované lipidy jako threitolceramid mohou aktivovat u NKT I buněk produkci cytokinů vedoucí k maturaci DC, T a B lymfocytů [267]. Maturace DC je také zajištěna přímým kontaktem přes interakci receptor ligand CD40/CD40L [268]. V imunitní odpovědi na mikrobiální infekci hraje roli aktivace NKT I buněk lipidy z Borrelie, Ehrlichie a ze Sřingomonád [269]. Funkce NKT I buněk spočívá ve stimulaci cytotoxické odpovědi zprostředkované CD8 $^{+}$ lymfocyty, NK buňkami a makrofágy pomocí produkce IFN γ a IL-12. Aktivačním signálem je vazba mezi TCR α -V α 24J α 18 NKT I buňky a CD1d s glykosidovaným lipidem na antigen prezentující buňce (obr. 5) [264 s. 71]. Po aktivaci produkují NKT buňky kromě cytokinů i efektorové molekuly jako perforin, FASL a TRAIL [270].



Obr. 5. Funkce NKT I buněk v protinádorové cytotoxické reakci. Rozděleno na reakci indukovanou **a)** α -galactosylceramidem a **b)** β mannosylceramidem [264 s. 58].

NKT II buňky

Funkce NKT II buněk je imunosupresorová. Na rozdíl od NKT I neexprimují semivariantní TCR a nevážou se na α -galactosylceramid. Typickým antigenem, který NKT II buňky rozeznávají, je sulfatid. NKT II buňky jsou méně prostudované než NKT I buňky, ale je známo, že produkují cytokiny směřující k Th2 orientované imunitní reakci [271]. Jejich role u solidních tumorů je v humánní medicíně objasněna pouze u maligního melanomu [272]. Funkce NKT II buněk byla prostudována na myších, u nichž aktivace NKT II buněk vedla k progresi plicních metastáz karcinomu kolon [273]. Interakce mezi NKT I a II buňkami není dosud zcela jasná. Na myším modelu konkavalinem indukované hepatitidy došlo k supresi NKT I buněk navozením jejich anergie k IL-12 a k MIP2. O'Konek prokázala na myším modelu, že NKT II buňky snižují antigenně podmíněnou prolyferaci CD4⁺ T lymfocytů. [262]. NK II buňky také produkují IL-13, který stimuluje MDSC (myeloid derived supressor cells) k produkci protizánětlivého TGF β [274].

Vztah NKT lymfocytů k progresi KRCA

Okada publikoval zjištění, že mezi tumor infiltrujícími lymfocty v KRCA jsou T lymfocyty s pozitivitou na CD57 a CD56 [275]. Tyto buňky měly TCR s $\alpha\beta$ nebo s $\gamma\delta$ řetězci. O'Keefe prokázal, že CD161⁺ T lymfocyty jsou nejčastější buňky s pozitivitou na NK receptor ve střevě a že jejich množství se signifikantně neliší od okolní zdravé tkáně [276]. Tachibana prokázal, že zvýšené množství NKT infiltrujících KRCA je spojeno s lepší prognózou [261]. V této studii byla prokázána infiltrace kolorektálního karcinomu NKT buňkami jako nezávislý pozitivní prognostický faktor. Do studie bylo zařazeno 103 pacientů ve všech stádiích dle UICC. Zabijak publikoval zjištění, že infiltrace nádoru invariantními T lymfocyty (TCR⁺CD26⁺V α 7.2⁺) je spojena se špatnou prognózou KRCA [277].

5.5 Humorální specifická imunita

Prezentovaná práce se humorální imunitní reakcí a B lymfocyty jako TIL nezaobírá. Z provedených studií vyplývá, že humorální imunitní odpověď podporuje progresi KRCA. Bylo prokázáno, že pacienti s KRCA mají oproti zdravé populaci menší počty CD19⁺ B lymfocytů v periferní krvi a větší množství CD21⁺ B lymfocytů, z nichž některé nesly antigeny, které se vyskytují také na nádorových buňkách [278].

5.6 TIL a genetické a morfologické typy KRCA

Lze předpokládat, že genetické pozadí kancerogeneze bude mít vliv na imunogenicitu tumoru. Tento předpoklad se potvrdil v několika studiích. U MSI-H KRCA je typická přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů [279]. Vysvětlení spočívá v chybné funkci mismatch repair proteinů a zvýšené frekvenci mutací, která vede i ke zvýšené expresi nových proteinů. Tyto produkty mutovaných genů jsou na MHC molekulách imunogenní [280]. U MSI-H KRCA byla prokázána vyšší infiltrace FoxP3⁺ CD8⁻ lymfocyty v porovnání s KRCA s mikrosatelitní stabilitou. MSI-H KRCA má též lepší prognózu oproti ostatním typům KRCA [281]. V kontrastu s MSI-H skupinou pacientů vykazuje KRCA vznikuvší cestou CIN nízkou imunogenitu s nižším stupněm infiltrace TIL [106 s. 105]. CIMP KRCA jsou též asociovány s MSI-H, a mají proto větší množství TIL. Vzhledem k tomu, že skupiny pacientů s MSI-H a CIMP se zcela neshodují, vychází i množství TIL a prognóza CIMP v jednotlivých studiích rozporuplně. V celkovém pohledu však mají pacienti se subtypem KRCA CIMP lepší prognózu oproti CIN KRCA [282]. U mucinózního KRCA byla prokázána nižší přítomnost peritumorální lymfatické infiltrace oproti ostatním KRCA [283].

6. Cíle

Dizertační práce je zaměřená na analýzu vztahu současně užívaných klinických a histopatologických faktorů a přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů, NK buněk, granzymu B a serpinu B9. Dalším cílem bylo studium vztahu uvedených faktorů k šíření KRCa do regionálních lymfatických uzlin, a to na základě porovnání výsledků mezi skupinami pacientů v klinických stádiích UICC II a UICC III. Dále se práce zabývá detekcí pacientů s rizikem recidivy KRCa po radikální chirurgické léčbě ve vztahu k tumor infiltrujícím lymfocytům.

7. Metodika

Předmětem výzkumu vlivu klinických, histologických a imunohistochemických faktorů bylo stanovení těch, které mají statisticky prokazatelný vliv na recidivu onemocnění po radikální chirurgické léčbě KRCA. Zkoumané parametry byly hodnoceny v rámci retrospektivní studie.

7.1 Inkluzivní a exkluzivní kritéria

Do dizertační práce bylo zahrnuto 152 pacientů, kteří byli elektivně radikálně operováni pro sporadický KRCA na Chirurgické klinice FN Plzeň od září 2007 do června 2012. Jednalo se o pacienty v klinických stádiích UICC II a UICC III. K exkluzivním kritériím patřila Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, familiární polypóza a nádorová duplicita. Ze studie byli též vyčleněni pacienti, kteří podstoupili chirurgickou léčbu akutně, např. při krvácení z tumoru, obstrukčním ileu, perforaci GIT s peritonitidou nebo při iatrogenní perforaci po kolonoskopickém vyšetření. K důvodům vyřazení ze studie patřil i nízký počet vyšetřovaných lymfatických uzlin z resektátu a riziko podstážování nádorového onemocnění.

7.2 Pooperační sledování, sběr tkáňových vzorků a klinických dat

Pacienti zařazení do studie byli sledováni v rámci standardní dispenzarizace. Stanovované klinické parametry byly: lokalizace tumoru (kolon/rektum), nejvyšší leukocytóza a sérová hladina C-reaktivního proteinu (CRP) v prvním týdnu po operaci, diabetes mellitus, pooperační komplikace dle Clavien-Dindo klasifikace [284], typ recidivy (vzdálená, lokální, implantační), podání onkologické léčby a její režim a modalita.

7.3 Histologické vyšetření vzorků

Histologické a imunohistochemické analýzy byly prováděny v Plzni na Šiklově ústavu patologie Fakultní nemocnice Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Z každého tumoru byly analyzovány řezy ze tří různých míst. Tkáňe byly fixovány ve 4 % formaldehydu a zality do parafinových bločků. Tkáňové bloky byly nařezány na 5µm silné řezy a obarveny hematoxylinem-eosinem. Stadium primárního tumoru, grade

a metastázy lymfatických uzlin byly stanoveny dle pokynů WHO z roku 2000 [2]. Stadium nádorového onemocnění bylo stanoveno v souladu s pokyny UICC 2009 [2].

Z histopatologických parametrů byla hodnocena přítomnost a nepřítomnost nádorové infiltrace endovaskulární (VE), endolymfatické (LI) a perineurální (PI). Hodnocení bylo provedeno dichotomicky na přítomnost infiltrace (1 – ano) a její absenci (0 – žádná). Lymfocytární infiltrace byla hodnocena kvalitativně dle lokalizace a semikvantitativně. Kvalitativní hodnocení rozlišovalo infiltraci intratumorální (ITL), intrastromální (ISL), peritumorální (PTL) a Crohn-like reakce (Crohn-like). Semikvantitativní hodnocení bylo rozděleno do čtyř stupňů na žádnou (0), mírnou (1), střední (2) a závažnou (3) infiltraci. Dále byla stanovena infiltrace KRCa u všech lymfatických uzlin nalezených v resekátu.

7.4 Imunohistochemické vyšetření vzorků

Byla provedena negativní i pozitivní kontrola (tonzila palatina). Hustota infiltrace lymfocytů byla odečtena v pěti zorných polích v high power microscopical fields (HPF). Výsledky byly vyjádřeny jako počet imunopozitivních buněk na HPF a semikvantitativně do čtyř stupňů na žádnou (0), mírnou (1), střední (2) a závažnou (3) infiltraci. Dále bylo použito přečištění pomocí mikrovlnného generátoru. Primární protilátky byly značeny pomocí supersenzitivního streptavidin-biotin peroxidázového komplexu (Biogenex, San Ramon, CA, USA).

Imunofenotyp tumor infiltrujících lymfocytů byl stanoven barvením CD4 (klon SP35, dále neředěno, Ventana, Rocklin, CA, USA) a CD8 (klon C8/144B, 1:50, Dako, Glostrup, Dánsko).

K analýze přítomnosti T reg buněk bylo použito imunohistochemické barvení FoxP3 (klon mAbcam 450, 1:20, Abcam, United Kingdom, Cambridge) a CD25 (klon 4C9, dále neředěno, Ventana, Rocklin, CA, USA). Odečítány byly obarvené lymfocyty. Na NK buňky bylo zaměřeno imunohistochemické barvení CD57 (klon NK-1, dále neředěno, Ventana, Rocklin, CA, USA). U CD57 byly odečítány pozitivní nenádorové buňky. Na aktivitu cytotoxické reakce proti nádorovým buňkám byly odečítány nenádorové buňky s pozitivním barvením granul na Granzym B (klon 11F1, 1:30, Leica Biosystems, USA, Buffalo Grove). Molekula CD 56 asociovaná s vyšším výskytem lokální rekurence a perineurální invazí karcinomu rekta [121] byla imunohistochemicky značena a odečítána u nádorových buněk (klon 11B6, 1:400, Leica Biosystems, USA, Buffalo Grove). Výskyt

inhibitoru proteáz u nádorových buněk byl analyzován na základě barvení SerpinB9 (klon PI9-17, 1:100, Abcam, United Kingdom, Cambridge).

7.5 Statistická analýza

Analýza diferencí sledovaných parametrů mezi skupinami UICC II a III, kolon a rektum, výkon na pravém a levém tračníku a analýza vlivu IHC parametrů na VE, LI, PI byly provedeny pomocí Mannova-Whitneyho U testu. Výsledky tohoto testu byly zobrazeny pomocí krabicových grafů. Závislost mezi typem recidivy a imunohistochemickými parametry byla analyzována Kruskalovou-Wallisovou ANOVOU.

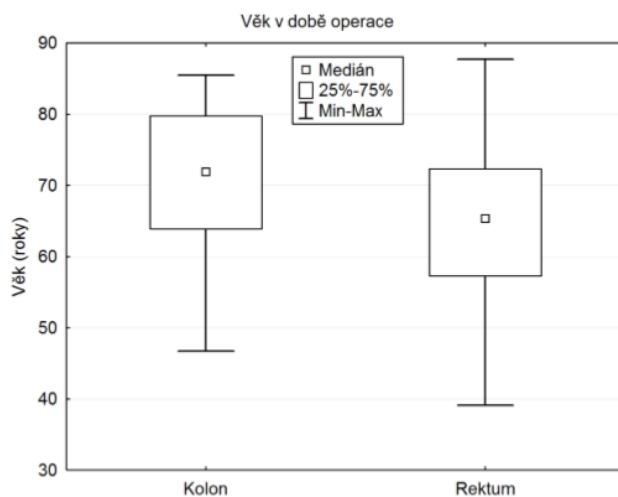
Pozorované funkce přežití DFI a OS byly vyjádřeny Kaplanovou-Meierovou metodou. Pro dvouvýběrové srovnání DFI a OS byl použit Gehanův-Wilcoxonův test, vliv ordinálních a spojitých prognostických faktorů byl analyzován pomocí jednorozměrného Coxova modelu proporcionálních rizik. U ITL, kde hodnoty ordinálního semikvantitativního hodnocení nabývaly pouze hodnot 1 a 0, byl využit Gehanův-Wilcoxonův test. Prognostické faktory, u nichž byla prokázána statisticky významná asociace s DFI a OS, byly (po eventuálním naprahování pozorovaným mediánem v souboru) použity spolu se základními klinickými parametry ve vícerozměrném Coxově modelu proporcionálních rizik s následným srovnáním sil jednotlivých faktorů.

Statistická analýza byla provedena v programu STATISTICA (verze 12 Cz; StatSoft, Inc. 2013, www.statsoft.com).

8 Výsledky

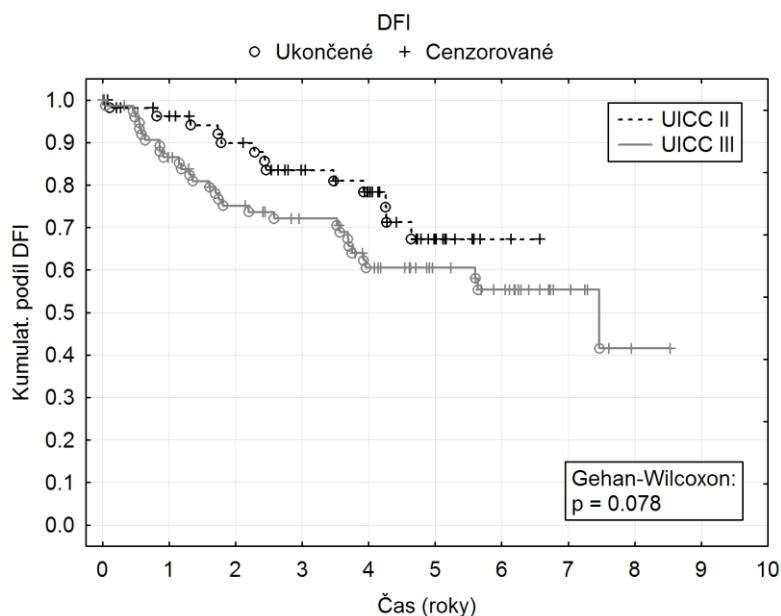
8.1 Deskripce souboru a doby přežití

Statistická analýza souboru pacientů prokázala přiměřenou distribuci základních statistických popisů parametrů. V celém souboru 152 pacientů se nacházelo 94 mužů a 58 žen. Ve skupině UICC II bylo 42 mužů a 21 žen (63 pacientů), ve skupině UICC III pak 52 mužů a 37 žen (89 pacientů). Průměrný věk mužů ve skupině UICC II byl 69,00 roku (medián 70,20, min. 65,00, max. 86,56) a u žen 71,54 roku (medián 72,53, min. 49,59, max. 84,79). Průměrný věk byl ve skupině UICC III u mužů 65,77 roků (medián 65,12, min. 47,48, max. 87,70) a u žen 67,8 let (medián 68,40, min. 39,09, max. 84,45). Průměrný věk všech mužů v obou skupinách byl 67,27 roku (medián 66,26, min. 41,59, max. 87,70) a u žen 69,20 roku (medián 68,79, min. 39,09, max. 84,79). Ve skupině UICC II bylo 27 pacientů s karcinomem rekta a 36 pacientů s karcinomem kolon. Ve skupině UICC III bylo 40 pacientů s karcinomem rekta a 49 pacientů s karcinomem kolon. Pacienti s postižením kolon byli starší než pacienti s karcinomem rekta (obr. 6).

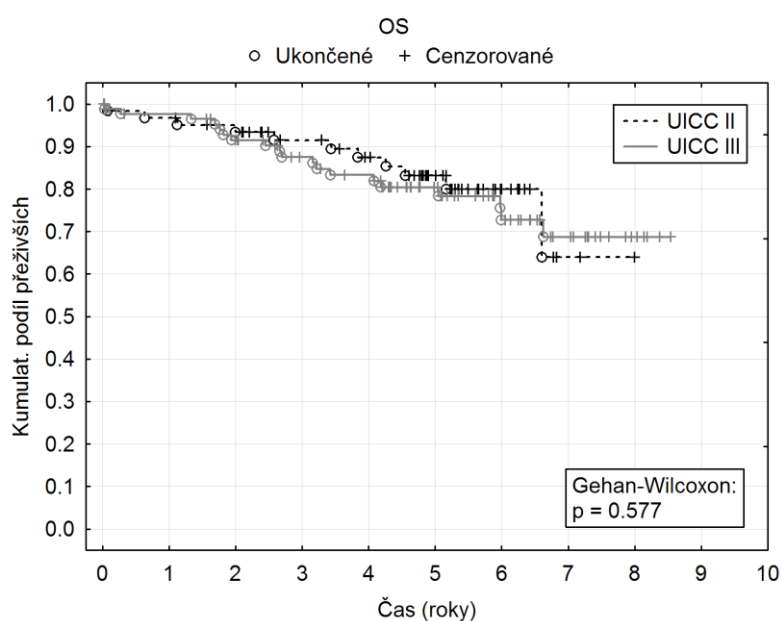


Obr. 6. Pacienti s karcinomem kolon byli starší než pacienti s karcinomem rekta (p value = 0,000369)

Třileté DFI byl pro UICC II 82,14 % a pro UICC III 71,41 % (obr. 7). Pozorované třileté OS bylo 90,51 % pro UICC II a 86,60 % pro UICC III. Pozorované pětileté OS bylo 80,85 % pro UICC II a 78,45 % pro UICC III (obr. 8). Pro validní zhodnocení pětiletého bezpříznakového přežití soubor obsahoval příliš mnoho cenzorů po čtvrtém roce dispenzarizace. Mezi skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v DFI a OS.



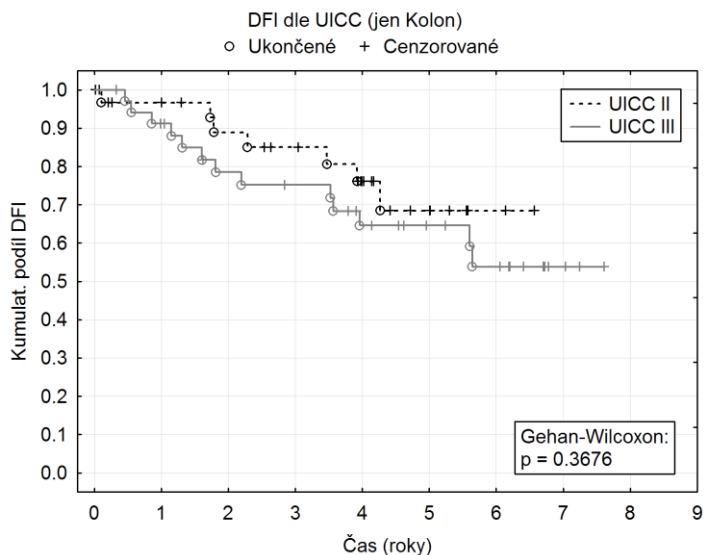
Obr. 7. DFI ve skupinách UICC II a III



Obr. 8. OS ve skupinách UICC II a III

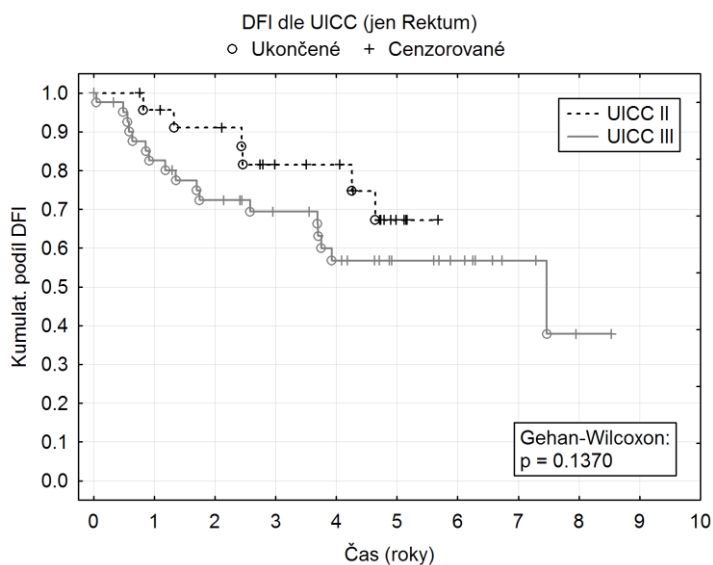
V případě rozdělení pacientů dle lokalizace karcinomu na kolon a rektum nebyl prokázán signifikantní rozdíl v DFI a OS mezi skupinami UICC II a III.

Analýza rozdílů DFI v kohortách UICC II a UICC III u pacientů s postižením kolon neukázala statisticky signifikantní rozdíl (obr. 9).



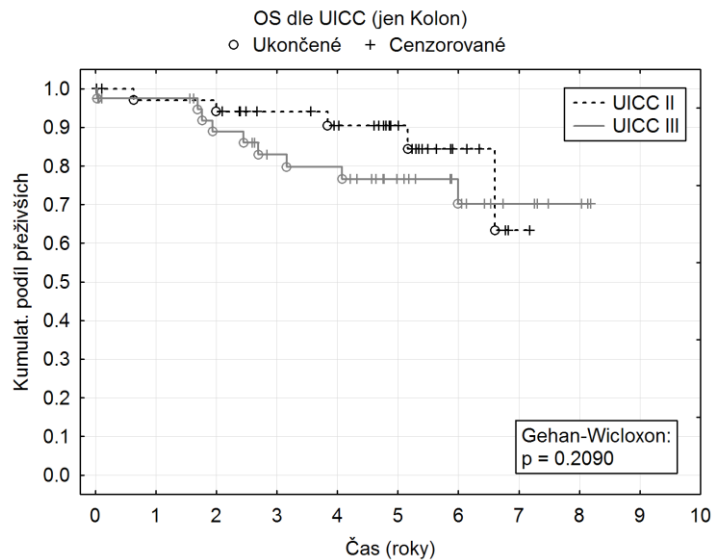
Obr. 9. DFI pacientů s karcinomem kolon u stadií UICC II a III

Obdobně ani rozbor rozdílů DFI v kohortách UICC II a UICC III u pacientů s postižením rekta neukázala statisticky signifikantní rozdíl (obr. 10).



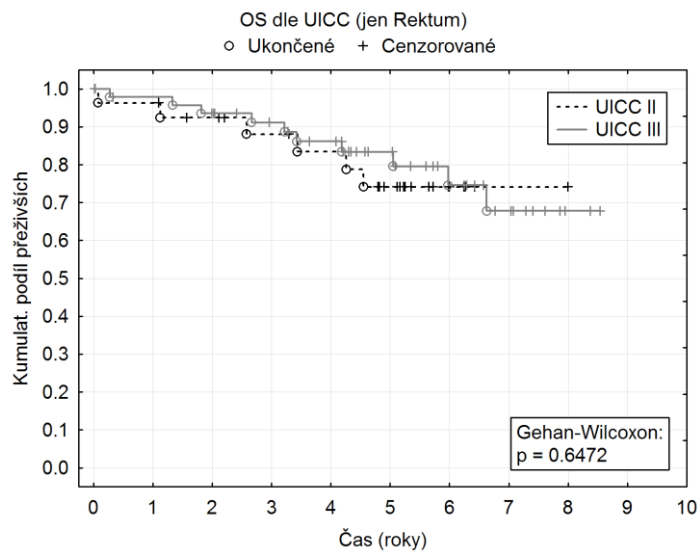
Obr. 10. DFI pacientů s karcinomem rekta u stadií UICC II a III

Analýza rozdílů OS ve skupinách UICC II a UICC III u pacientů s postižením kolon neukázala statisticky signifikantní rozdíl (obr. 11).



Obr. 11. OS pacientů s karcinomem kolon u stadií UICC II a III

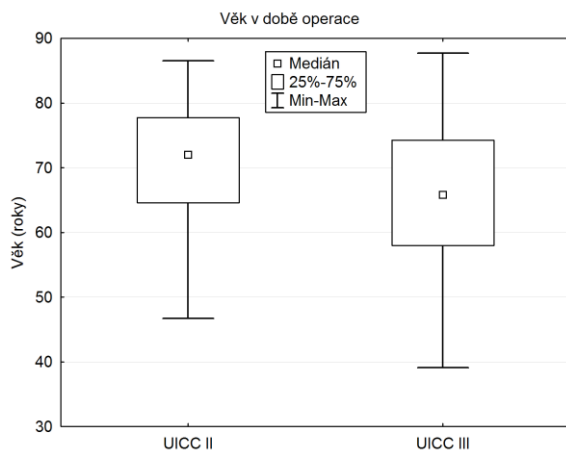
Obdobně ani rozbor rozdílů OS v kohortách UICC II a UICC III u pacientů s postižením rekta neukázala statisticky významný rozdíl (obr. 12).



Obr. 12. OS pacientů s karcinomem rekta u stadií UICC II a III

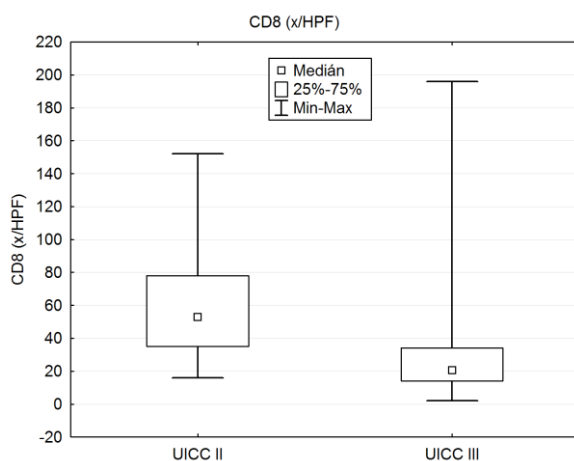
8.2 Porovnání mezi skupinami UICC II a UICC III

Rozdíly mezi skupinami pacientů byly analyzovány pomocí Mann-Whitney U testu. Mezi skupinami UICC II a UICC III byl prokázán signifikantní rozdíl ve věku. Ve skupině UICC II byl výrazně vyšší věk pacientů (p value = 0,016345, obr. 13).



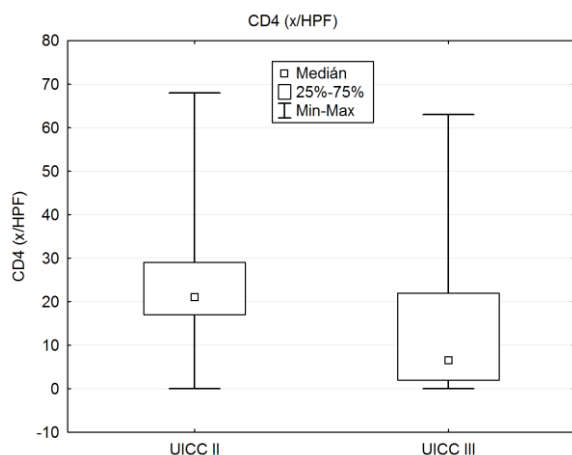
Obr. 13. Věk pacientů v kohortách UICC II a III (p value = 0,016345)

Ve skupině UICC II byl prokázán signifikantně vyšší počet $CD8^+$ TIL v histologických řezech, kvantitativně hodnoceno. Lymfocyty byly v tomto případě odečítány bez ohledu na jejich lokalizaci vůči tumoru (p value < 0,000001, obr. 14).



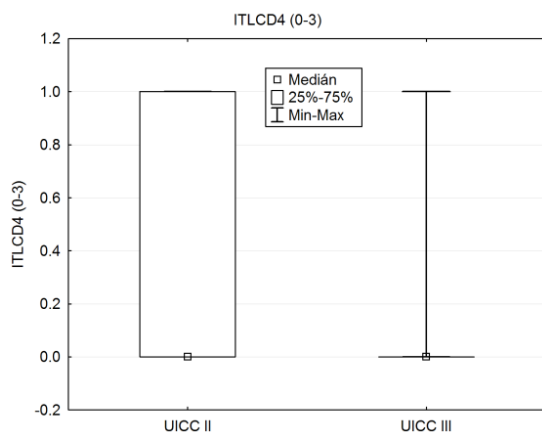
Obr. 14. Density $CD8^+$ TIL u skupin UICC II a III (p value < 0,000001)

Ve skupině UICC II byl signifikantně prokázán vyšší počet CD4⁺ TIL v histologických řezech, počty TIL byly kvantitativně hodnoceny. Lymfocyty byly v tomto případě odečítány bez ohledu na jejich lokalizaci vůči tumoru (p value < 0,000001, obr. 15).



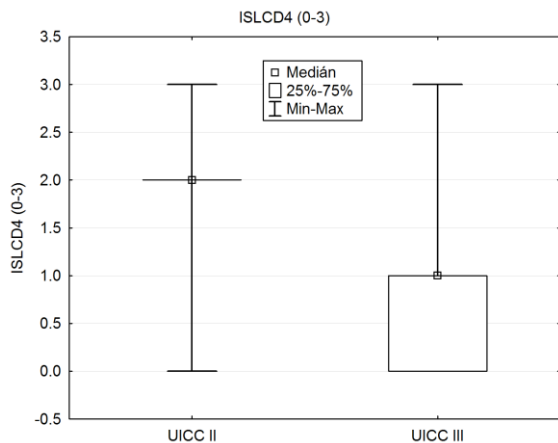
Obr. 15. Hustota CD4⁺ TIL v skupinách UICC II a III, kvantitativně (p value < 0,000001)

Prokázán byl též signifikantní rozdíl mezi skupinami UICC II a III v semikvantitativním hodnocení TIL dle jejich lokalizace. Konkrétně se jednalo o vyšší zastoupení hustoty CD4⁺ ITL u skupiny UICC II (p value = 0,000016, obr. 16).



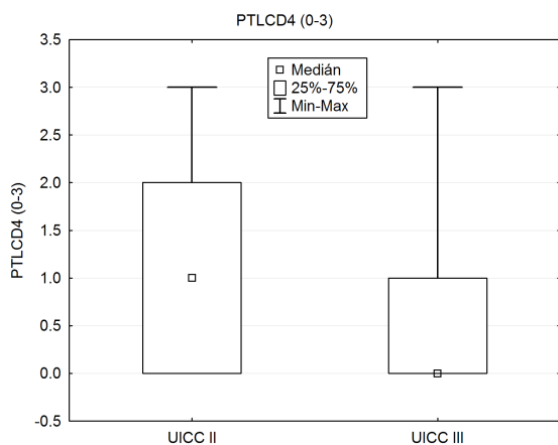
Obr. 16. Semikvantitativní hustota CD4⁺ ITL v skupinách UICC II a III (p value < 0,000001)

Ve skupině UICC II byla potvrzena signifikantně vyšší semikvantitativně hodnocená hustota CD4⁺ ISL (p value < 0,000001, obr. 17).



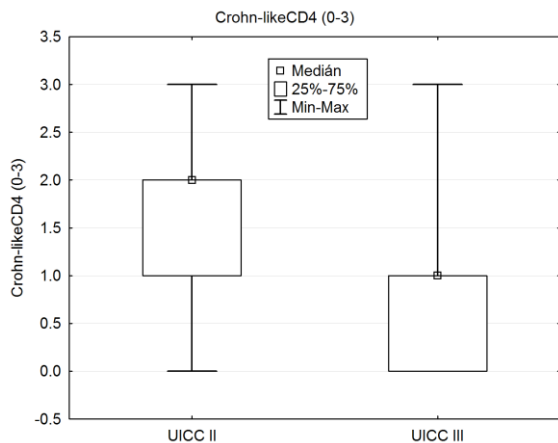
Obr. 17. Semikvantitativně vyjádřená hustota CD4⁺ ISL v skupinách UICC II a III (p value < 0,000001)

Ve skupině UICC II byla potvrzena signifikantně vyšší semikvantitativně hodnocená hustota CD4⁺ PTL oproti skupině UICC III (p value = 0,003518, obr. 18).



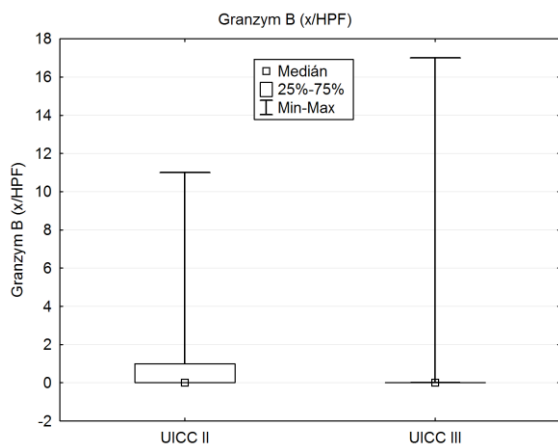
Obr. 18. Semikvantitativní hustota CD4⁺ PTL ve skupinách UICC II a III (p value = 0,003518)

Ve skupině UICC II byla potvrzena signifikantně vyšší semikvantitativně hodnocená hustota CD4⁺ Crohn-like (p value < 0,000001, obr. 19).



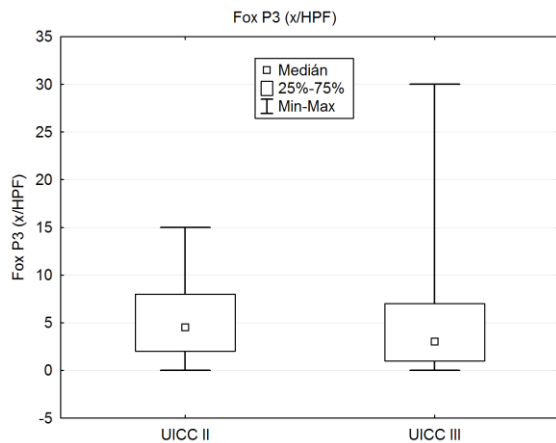
Obr. 19. Semikvantitativní hustota CD⁺ Crohn-like v skupinách UICC II a III (p value < 0,000001)

Ve skupině UICC II se také podařilo prokázat signifikantně vyšší hustotu lymfocytů pozitivních na imunohistochemické značení proti granzymu B, kvantitativně hodnoceno (p value = 0,047917, obr. 20).



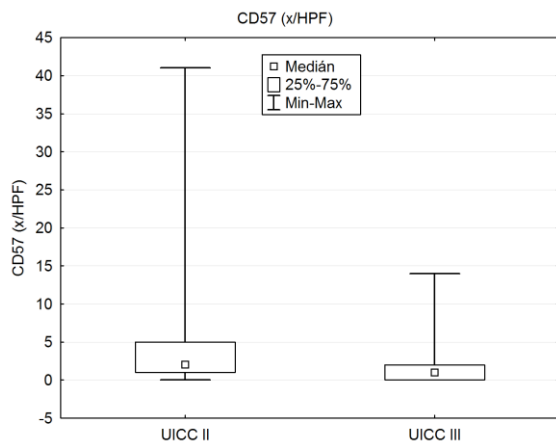
Obr. 20. Hustota lymfocytů pozitivních na značení granzymu B, kvantitativně hodnoceno (p value = 0,047917)

Ve skupině UICC II byly odečteny signifikantně vyšší hustoty Fox P3 lymfocytů, hodnoceno kvantitativně (p value = 0,005763, obr. 21).



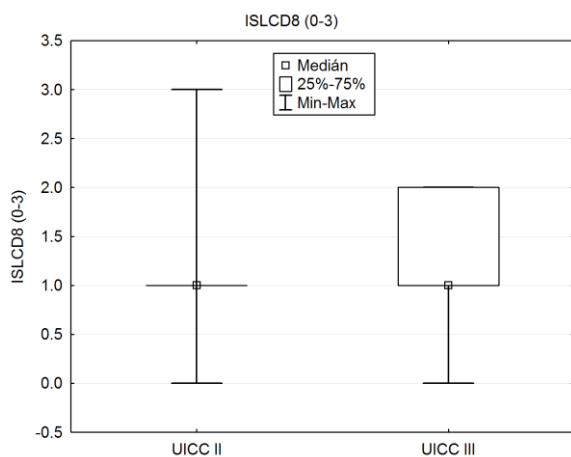
Obr. 21. Hustota FoxP3 v skupinách UICC II a III, kvantitativně hodnoceno (p value = 0,005763)

V případě imunohistochemického barvení proti CD57 byly prokázány signifikantně zvýšené hustoty CD57 pozitivních buněk ve skupině UICC II (p value < 0,000001, obr. 22).



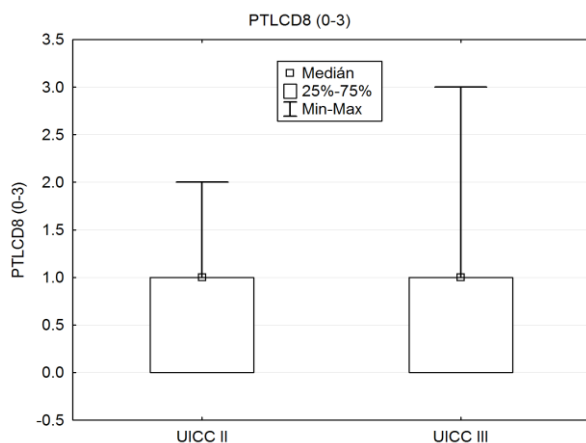
Obr. 22. Hustota CD57 v skupinách UICC II a III, kvantitativně hodnoceno (p value < 0,000001)

Ve skupině UICC III byly signifikantně vyšší semikvantitativně hodnocené hustoty CD8⁺ ISL (p value = 0,006073, obr. 23).



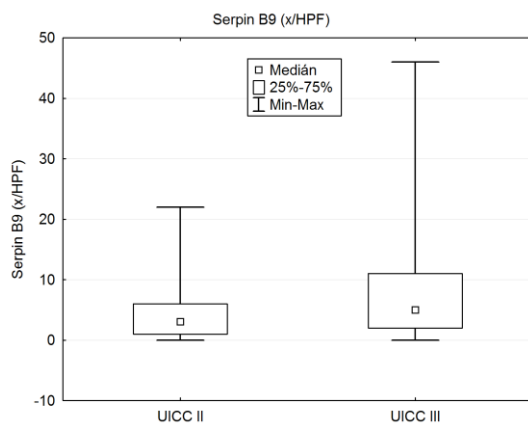
Obr. 23. Semikvantitativní hustota CD8⁺ ISL v skupinách UICC II a III (p value = 0,006073)

Ve skupině UICC III byly prokázány signifikantně vyšší semikvantitativně hodnocené hustoty CD8⁺ PTL (p value = 0,023275, obr. 24).



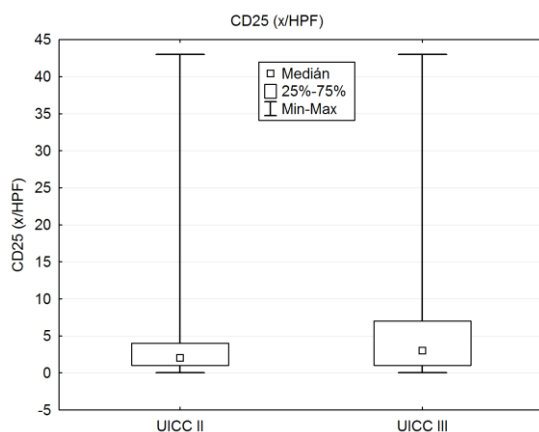
Obr. 24. Semikvantitativní hustota CD8⁺ PTL v skupinách UICC II a III (p value = 0,023275)

Ve skupině UICC III byly prokazatelně vyšší kvantitativně odečtené hodnoty serpin B9 pozitivních nádorových buněk (p value = 0,028638, obr. 25).



Obr. 25. Hustota nádorových buněk pozitivních na serpin B9, hodnoceno kvantitativně (p value = 0,028638)

U skupiny UICC III byl prokázán častější výskyt CD25 pozitivních lymfocytů oproti skupině UICC II (p value = 0,017952, obr. 26).



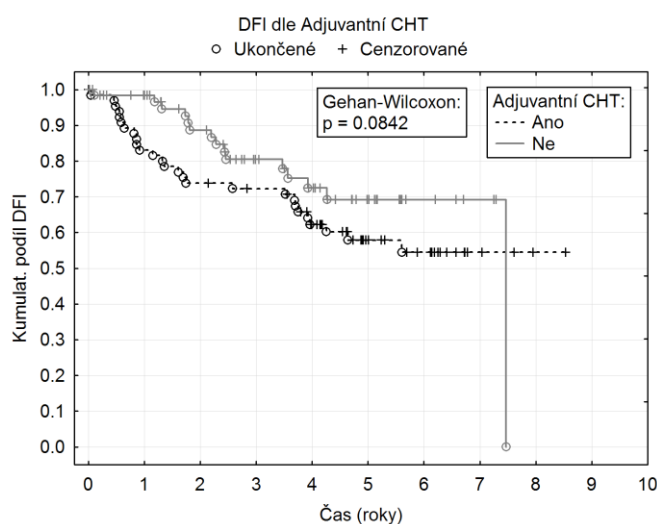
Obr. 26. Hustota CD25⁺TIL v skupinách UICC II a III, kvantitativně hodnoceno (p value 0,017952)

V ostatních evaluovaných parametrech nebyl prokázán rozdíl mezi skupinami UICC II a UICC III. Jednalo se o leukocytózu, sérovou hladinu CRP, CD56 a CD4⁺ ITL a CD8⁺ ITL.

Dále byl proveden rozbor za účelem nalezení rozdílů v imunohistochemických parametrech mezi skupinami pacientů s postižením pravého nebo levého kolon. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v žádném ze studovaných parametrů. Při srovnání imunohistochemických parametrů karcinomů z celého kolon s tumory rekta byly prokázány vyšší denzity ITL CD8 semikvantitativně u kolon (ITL 0-3 vs 4, p value = 0,01706).

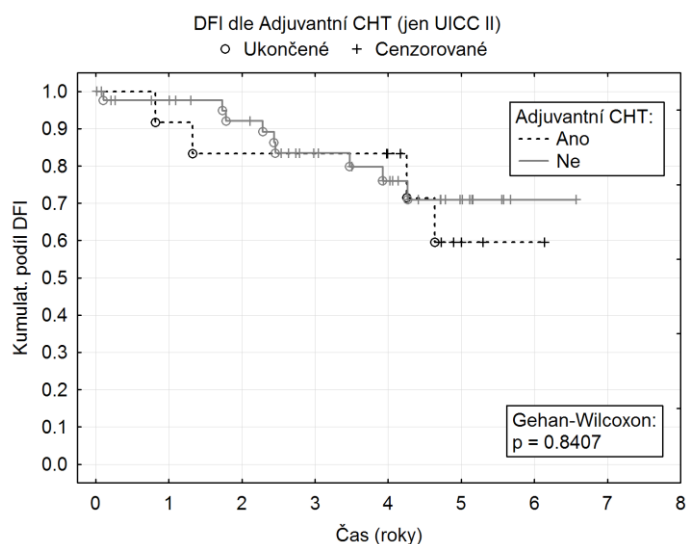
8.3 Analýza vlivu onkologické léčby

Testování vlivu adjuvantní chemoterapie na DFI a OS v celém souboru pacientů (obr. 27) či v kohortách UICC II a III neprokázalo signifikantní rozdíly.



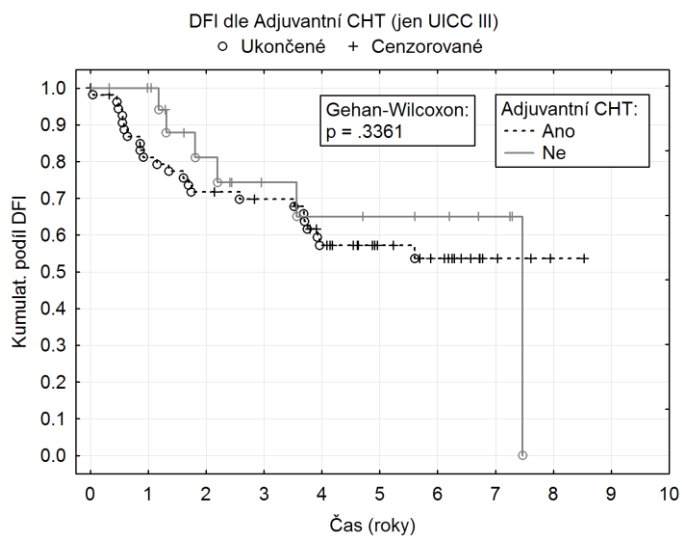
Obr. 27. DFI u všech pacientů rozdělených podle podání adjuvantní chemoterapie

Analýza rozdílů DFI uvnitř skupiny pacientů s klinickým stadiem UICC II neprokázala statisticky signifikantní vliv adjuvantní chemoterapie (obr. 28).



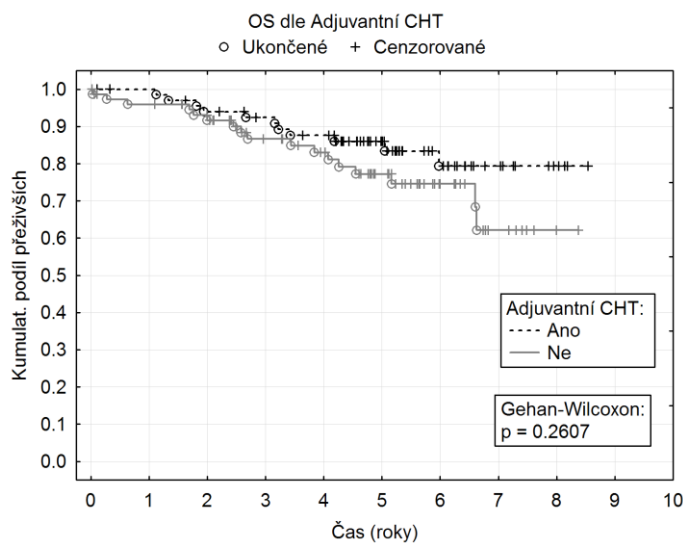
Obr. 28. DFI v skupině UICC II s adjuvantní chemoterapií a bez ní

Stejně tak nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v DFI uvnitř skupiny pacientů s klinickým stadiem UICC III rozdělených do kohort podle podání adjuvantní chemoterapie (obr. 29).



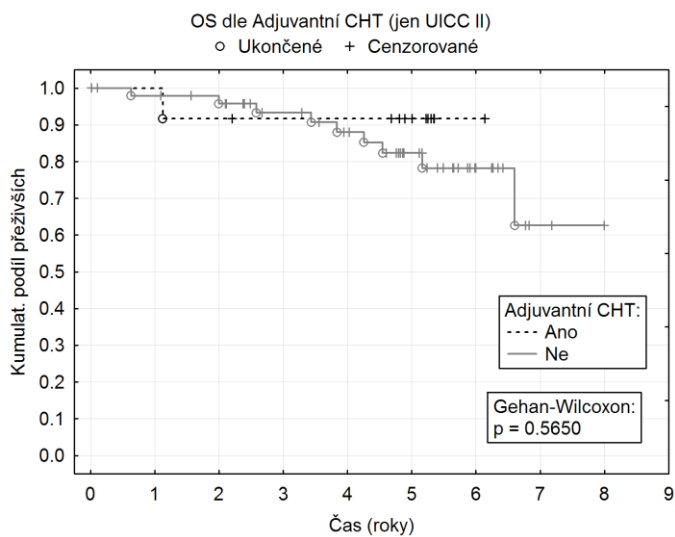
Obr. 29. DFI v skupině UICC III s adjuvantní chemoterapií a bez ní

Ve vztahu k OS nebyl prokázán vliv adjuvantní chemoterapie na OS u všech pacientů ve studii (obr. 30).



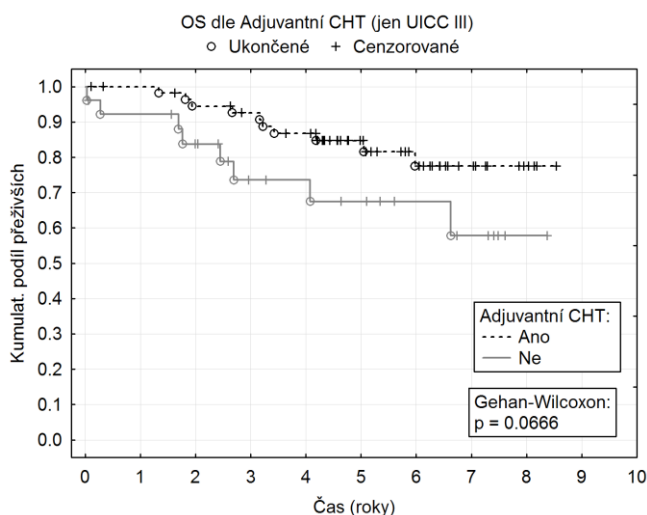
Obr. 30. OS u všech pacientů s adjuvantní chemoterapií a bez ní

Analýza rozdílů OS uvnitř skupiny pacientů s klinickým stadiem UICC II neprokázala statisticky signifikantní vliv adjuvantní chemoterapie (obr. 31).



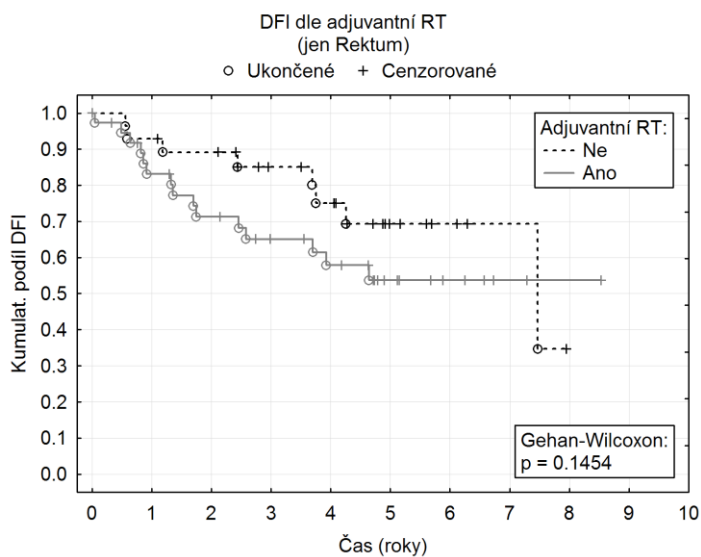
Obr. 31. OS ve skupině UICC II s adjuvantní chemoterapií a bez ní

Nebyl také prokázán statisticky významný rozdíl v OS uvnitř skupiny pacientů s klinickým stadiem UICC III rozdělených do kohort podle podání adjuvantní chemoterapie (obr. 32).



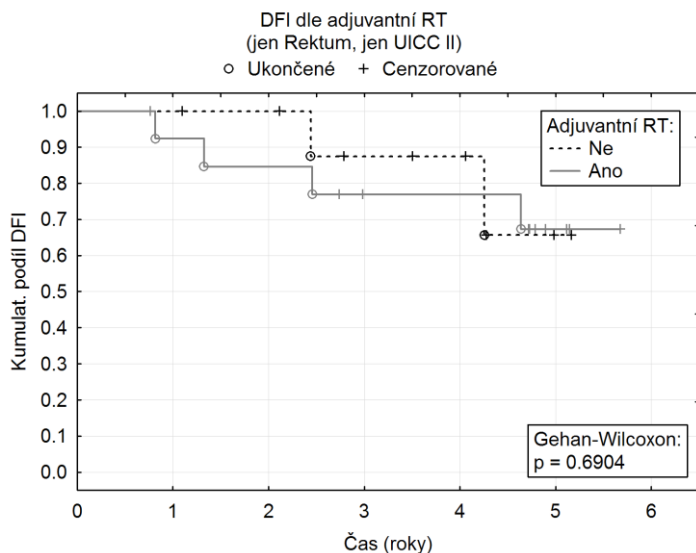
Obr. 32. OS v skupině UICC III s adjuvantní chemoterapií a bez ní

Dále byl testován vliv adjuvantní radioterapie na DFI a OS u pacientů s karcinomem rekta. Tato analýza byla provedena u celého souboru pacientů (obr. 33) i zvlášť po skupinách dle UICC. Nebyl prokázán signifikantní vliv adjuvantní radioterapie na prognózu ani u jedné ze skupin Neoadjuvantní radioterapii jsme nehodnotili, protože ji podstoupil pouze jediný pacient.



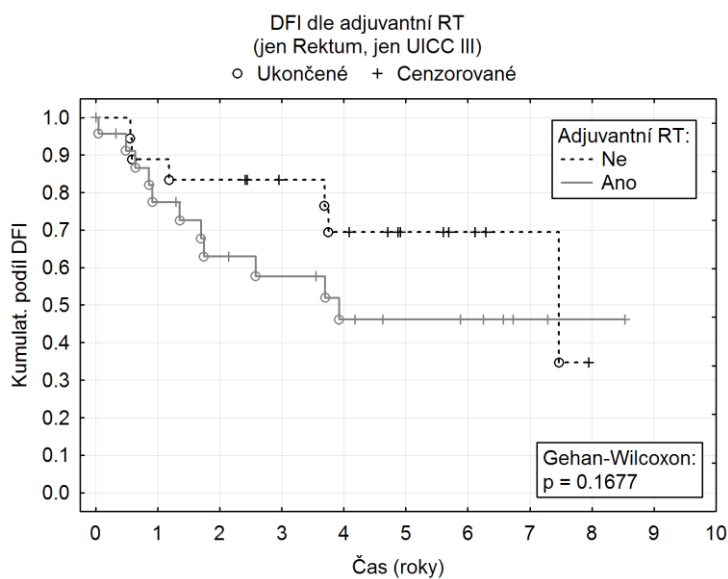
Obr. 33. Vliv adjuvantní radioterapie na DFI u všech pacientů s karcinomem rekta

Analýza rozdílů DFI uvnitř skupiny pacientů s karcinomem rekta s klinickým stadiem UICC II neprokázala statisticky signifikantní vliv adjuvantní radioterapie (obr. 34).



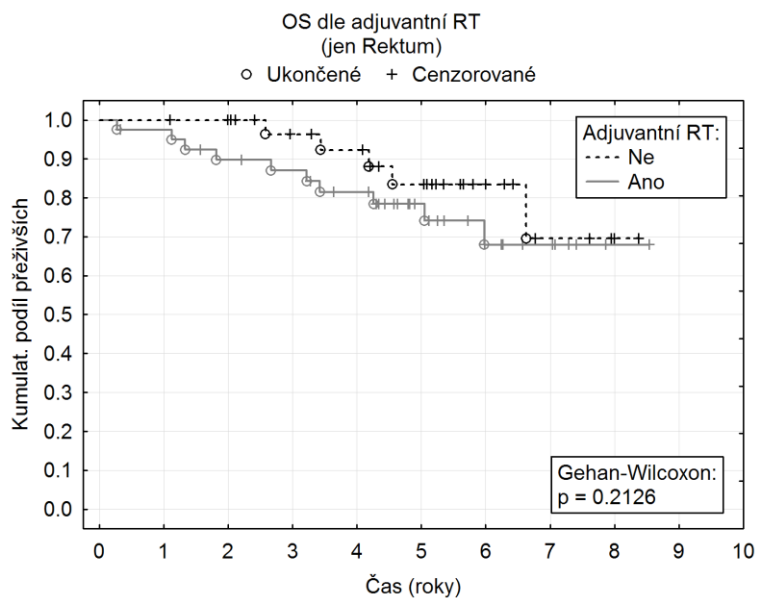
Obr. 34. Vliv adjuvantní radioterapie na DFI ve skupině UICC II s karcinomem rekta

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v DFI uvnitř skupiny pacientů s karcinomem rekta v klinickém stadiu UICC III rozdělených do kohort podle podání adjuvantní radioterapie (obr. 35).



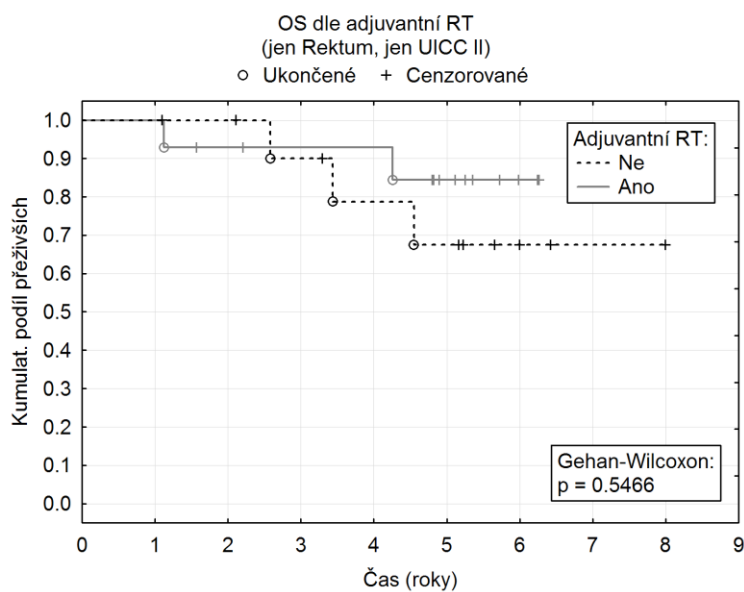
Obr. 35. Vliv adjuvantní radioterapie na DFI ve skupině UICC III s karcinomem rekta

Analýza rozdílů OS u všech pacientů s karcinomem rekta neprokázala statisticky signifikantní vliv adjuvantní radioterapie (obr. 36).



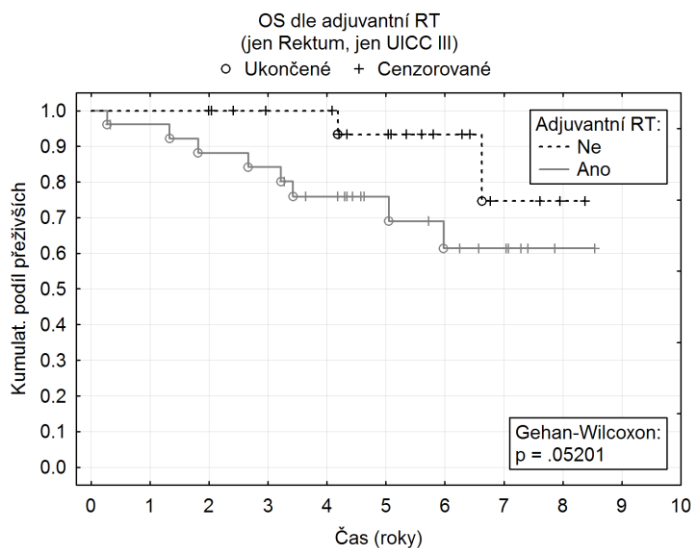
Obr. 36. Vliv adjuvantní radioterapie na OS u všech pacientů s karcinomem rekta

Analýza rozdílů OS uvnitř skupiny pacientů s karcinomem rekta s klinickým stadiem UICC II neprokázala statisticky signifikantní vliv adjuvantní radioterapie (obr. 37).



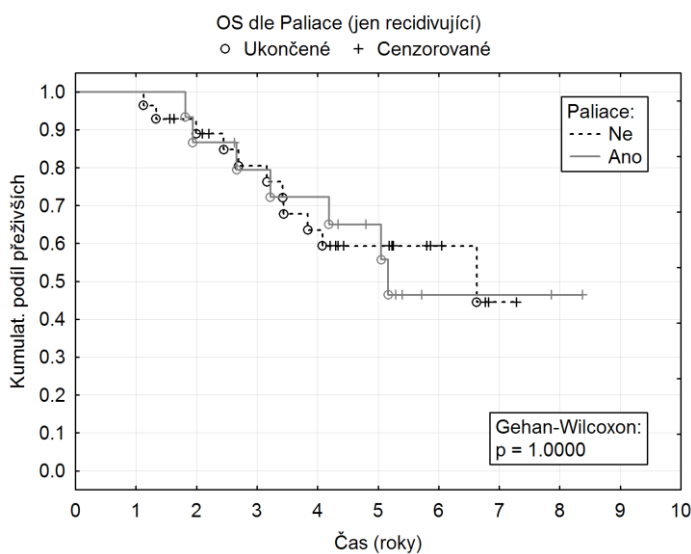
Obr. 37. Vliv adjuvantní radioterapie na OS ve skupině UICC II s karcinomem rekta

Nebyl také prokázán statisticky významný rozdíl v OS ve skupině pacientů s karcinomem rekta v klinickém stadiu UICC III rozdělených do kohort podle podání adjuvantní radioterapie (obr. 38).

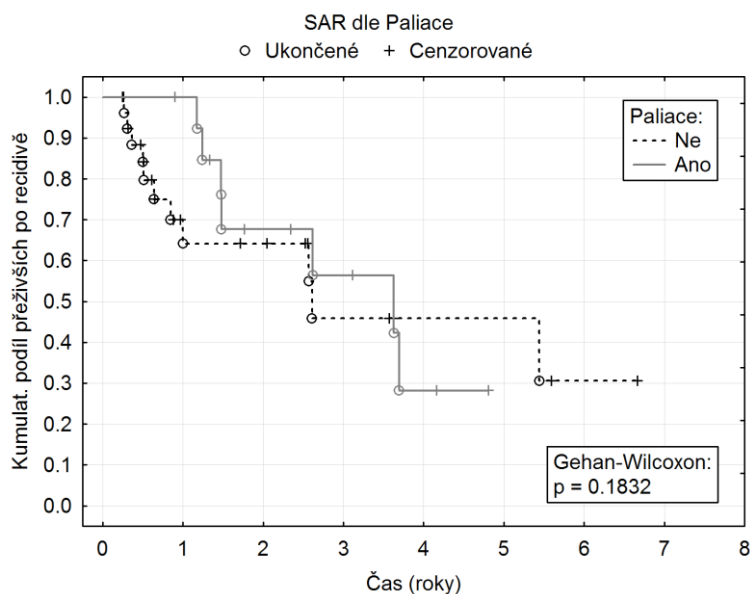


Obr. 38. Vliv adjuvantní radioterapie na OS ve skupině UICC III s karcinomem rekta

Stejně tak jsme neprokázali vliv paliativní chemoterapie či radioterapie (hodnoceno dohromady) na OS. Obr. 39 znázorňuje OS od doby operace, obr. 40 ukazuje OS od doby recidivy.



Obr. 39. Vliv paliativní onkologické léčby na OS od doby operace u všech pacientů



Obr. 40. Vliv paliativní onkologické léčby na OS od recidivy u všech pacientů

8.4 Prognostické faktory

V rámci analýzy vlivu studovaných parametrů byly prokázány jako statisticky významné následující nezávislé prognostické faktory na OS u souboru všech pacientů bez ohledu na UICC a lokalizaci KRCA:

Pozitivní prognostické faktory OS seřazené sestupně podle síly:

CD57 semikvantitativně (p value = 0,000400). Při zvýšení o jednu jednotku klesá riziko úmrtí o 30,62 % (95% interval spolehlivosti 9,31–46,93 %).

Granzym B semikvantitativně (p value = 0,012300). Při zvýšení o jednu jednotku klesá riziko úmrtí o 36,20 % (95% interval spolehlivosti 5,75–61,51 %).

CD8⁺ TIL kvantitativně (p value = 0,004900). Při zvýšení o jednu jednotku klesá riziko úmrtí o 1,97 % (95% interval spolehlivosti 0,34–3,57 %).

Negativní prognostické faktory OS seřazené sestupně podle síly:

Leukocytóza (p value = 0,029600) Při zvýšení o jednu jednotku vzroste riziko úmrtí o 7,95 % (95% interval spolehlivosti 1,71–14,57 %).

CRP kvantitativně (p value = 0,000900). Při zvýšení o 10 jednotek vzroste riziko úmrtí o 6,91 % (95% interval spolehlivosti 3,26–10,70 %).

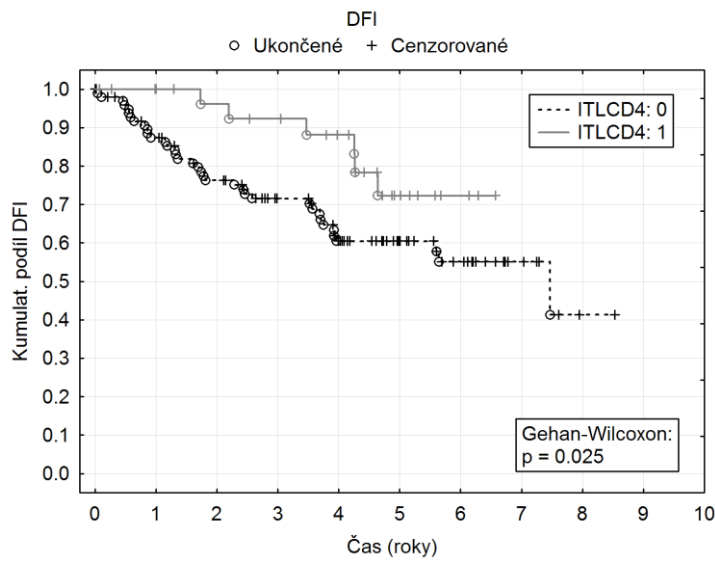
V rámci analýzy vlivu studovaných parametrů byly prokázány jako statisticky významné následující prognostické faktory na DFI u celého souboru všech pacientů bez ohledu na UICC stadium:

Pozitivní prognostické faktory DFI seřazené sestupně podle síly:

CD57 semikvantitativně (p value = 0,021000). Při zvýšení o jednu jednotku klesá riziko recidivy o 13,12 % (95% interval spolehlivosti 0,25–24,71 %).

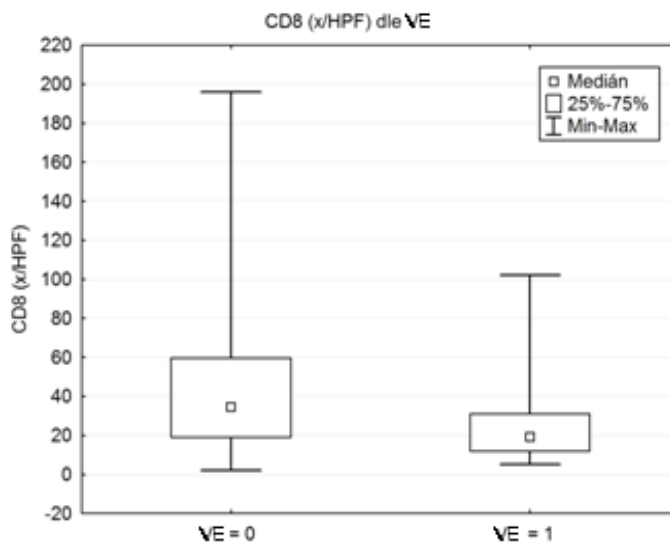
CD4⁺ ITL semikvantitativně (p value = 0,025000, průběh popsán Kaplan Meierovou funkcí (obr. 41). Při absenci ITL CD4 je riziko recidivy 2,16x vyšší (95% interval spolehlivosti 0,1942696–1,097584 %).

U ostatních parametrů nebyl prokázán jejich vliv na OS či DFI. Jednalo se o: staging, status metastatického postižení lymfatických uzlin, grade, stranu výkonu, lokalizaci tumoru v kolon, lokalizaci tumoru v rektu, diabetes mellitus, adjuvantní chemoterapii, adjuvantní radioterapii, CD8⁺ ITL, CD8⁺ ISL, CD8⁺ PTL, CD8⁺ Crohn-like, CD4 kvantitativně bez ohledu na lokalizaci, CD4⁺ ISL, CD4⁺ PTL, CD4⁺ Crohn-like, serpin B9, CD25, Fox P3, CD56, VE, LI a PI.



Obr. 41. CD4⁺ ITL byl prokázán jako pozitivní prognostický faktor DFI (p value = 0,025000)

Analýza vlivu imunohistochemických parametrů na výskyt VE, LI, PI prokázala příznivý vliv zvýšené infiltrace tumoru CD8⁺ lymfocyty. Vyšší hustoty CD8⁺ TIL byly asociovány s nižším výskytem VE (obr. 42). U ostatních imunohistochemických parametrů nebyl neprokázán vliv na výskyt VE, LI ani PI.



Obr. 42. Vyšší hustota CD8⁺ TIL je asociována s absencí VE u KRCa

9. Diskuze

Dosavadní výsledky publikovaných prací zabývající se vlivem imunitní reakce na průběh KRCa nejsou ve výsledcích konzistentní a současně používané histopatologické parametry neumožňují určit dostatečně přesně prognózu u jednotlivých pacientů po radikální chirurgické léčbě. V prezentované studii byly analyzovány dvě kohorty pacientů po radikální operaci pro KRCa, které se lišily v nádorové infiltraci lymfatických uzlin. Motivací k provedené studii byla snaha o selekci pacientů, kteří by za současných indikačních kritérií nebyli indikováni k adjuvantní onkologické léčbě, ale kteří by z ní profitovali. Také nás zajímal kvalitativní a kvantitativní rozdíl v tumor infiltrujících lymfocytech mezi pacienty, kteří se liší v metastatickém postižení regionálních lymfatických uzlin, neboť se jedná o známku pokročilosti malignity.

9.1 Diskuze k charakteristice kohort a k výsledkům pooperačního sledování

Ve studii se nepodařilo signifikantně prokázat postižení lymfatických uzlin jako prognostický faktor, avšak rozdíl v délce DFI ve prospěch kohorty UICC II je patrný (UICC II – bez postižení lymfatických uzlin). Výsledné zjištění, že se neprokázal signifikantní rozdíl v délce OS mezi skupinami UICC II a UICC III, mohlo být zapříčiněno výrazně vyšším věkem pacientů v kohortě UICC II s nižším klinickým stadiem KRCa. Předpokládané delší OS u kohorty UICC II mohlo být tímto způsobem zkráceno. Výsledky OS v absolutních číslech pětiletého přežití u obou skupin jsou srovnatelné s výsledky evropských zemí, jako je Německo či Velká Británie. Pozorované pětileté OS bylo 80,85 % pro UICC II a 78,45 % pro UICC III ve srovnání s analýzou z Velké Británie, kde dosahovalo pětileté OS při stadiu UICC III 47,7 % a 77,0 % pro stadium UICC II [10]. V německé robustní studii (4346 pacientů) bylo pětileté přežití u pacientů s KRCa bez vzdálených metastáz 60,9 % [285].

Vyšší věk pacientů s karcinomem kolon oproti pacientům s postižením rekta je pravděpodobně dán distribucí pacientů do jednotlivých chirurgických pracovišť Plzeňského kraje, neboť v aplikaci www.svod.cz je maximum incidence u karcinomu kolon a rekta ve stejném věku (70–74 let).

9.2 Diskuze k výsledkům porovnání TIL mezi skupinami UICC II a UICC III

U pacientů bez metastatického postižení uzlin byly odečteny signifikantně vyšší hustoty tumor infiltrujících $CD4^+$ i $CD8^+$ lymfocytů, což je ve shodě s dosud publikovanými výsledky, ve kterých vyšší počty tumor infiltrujících lymfocytů představovaly pozitivní prognostický faktor DFI a OS [6]. Zůstává diskutabilní, zda je přítomnost TIL protektivním faktorem proti metastazování do regionálních lymfatických uzlin, nebo jestli jsou TIL průvodním jevem méně invazivního kolorektálního karcinomu. U skupiny UICC II byly při srovnání hustot závislosti na lokalizaci tumor infiltrujících lymfocytů nalezeny větší semikvantitativně hodnocené počty $CD4^+$ intratumorálně, intrastromálně, peritumorálně a i v Crohn-like agregátech, tedy ve všech rozlišovaných lokalitách. Toto rozložení odpovídá celkově zvýšenému počtu $CD4^+$ lymfocytů ve skupině UICC II. Analýza semikvantitativně určených $CD8^+$ lymfocytů v závislosti na jejich lokalizaci působí poněkud rozporně, neboť byly určeny vyšší počty $CD8^+$ lymfocytů v intrastromální a peritumorální pozici u skupiny UICC III, ačkoliv celkové počty $CD8^+$ lymfocytů byly v absolutních číslech vyšší u skupiny UICC II. Tento rozpor může být dán limity semikvantitativního hodnocení.

Ve skupině UICC II se také podařilo prokázat signifikantně vyšší hustotu lymfocytů pozitivních na imunohistochemické značení proti granzymu B, což lze interpretovat jako zvýšenou cytotoxickou aktivitu TIL u pacientů bez metastatického postižení lymfatických uzlin. Tento výsledek není v rozporu se zjištěním, že zvýšená exprese granzymu B u TIL je pozitivním prognostickým faktorem KRCa [7]. Analýza zaměřená na zastoupení Treg ve skupinách UICC II a UICC III, která byla provedena imunohistochemickým barvením na CD25 a FoxP3, nepřinesla jednoznačné výsledky. Ve skupině UICC II bylo prokázáno signifikantně vyšší množství Foxp3⁺ TIL, naproti tomu ve skupině UICC III bylo prokázáno vyšší množství TIL CD25⁺. Důvodem může být fakt, že ne všechny Treg, které jsou recentně imunofenotypicky definovány $CD4^+CD25^+CD127^{lo}$, mají na svém povrchu Foxp3 [249].

Rozbor diferencí v imunohistochemických parametrech pravého a levého kolon neprokázal signifikantní rozdíl, což je poněkud překvapivé u $CD4^+$ a $CD8^+$ TIL, u nichž je v literatuře popisován vyšší výskyt v pravém kolon oproti zbývajícím částem tlustého střeva [286, 287]. K uvedenému rozdílu mohlo dojít odlišnou metodikou. V naší analýze

nebyly zahrnuty karcinomy rekta. Tuto domněnku podporuje zjištěný signifikantně zvýšený výskyt ITL CD8 u karcinomu kolon oproti rektu.

9.3 Diskuze k prognostickým faktorům

V rámci celé studie se podařilo prokázat jako nejsilnější pozitivní prognostický faktor vysokou hustotu CD57⁺ buněk. Do skupiny CD57⁺ spadají hlavně maturované NK buňky a vysoce diferencované oligoklonální subpopulace CD8 T lymfocytů [126]. CD57⁺ pozitivní buňky se ve studii vyskytovaly s vyšší denzitou u pacientů bez metastatického postižení lymfatických uzlin. Také se prokázalo, že jsou pozitivním nezávislým prognostickým faktorem DFI a OS. Prezentované výsledky podporují předchozí zjištění autorů [147, 154, 155], v jejichž rámci byla prokázána infiltrace CD57⁺ buňkami jako nezávislý prognostický faktor po radikální operaci pro KRCa. Nízká denzita CD57⁺ tumor infiltrujících buněk se jeví jako slibný prognostický faktor pro zvážení indikace adjuvantní chemoterapie u pacientů po radikálním chirurgickém výkonu pro KRCa.

K dalším prokázaným pozitivním prognostickým faktorům celkového přežití patří zvýšené denzity nenádorových buněk pozitivních při imunohistochemickém barvení na granzym B. Tato serinová proteáza je využívána NK i T lymfocyty v cytotoxické reakci a prokázaný pozitivní vliv na prognózu je ve shodě s předchozími publikovanými pracemi [7] a i s dalšími výsledky v dizertační práci, neboť CD57⁺ pozitivní buňky i CD8⁺ TIL byly prokázány jako pozitivní prognostický faktor. U CD8⁺ TIL byl prokázán pozitivní vliv na OS ve shodě s předchozími pracemi [205, 208, 288]. V Ohtaniho publikaci se prokázala jako nejsilnější faktor intraepiteliální lokalizace TIL, která je analogem k intratumorální pozici TIL v dizertační práci. Tato závislost mezi intratumorálními TIL a OS nebyla nyní potvrzena. Protektivní vliv CD8 TIL se též projevil ve vlivu na endovaskulární infiltraci KRCa v histologickém vyšetření. Toto zjištění není v rozporu s dosud publikovanými výsledky, v nichž počet CD8⁺ zralých TIL negativně koreloval s VELIPI [7]. Ve vztahu k VELIPI byla pozornost zaměřena také na imunohistochemické barvení nádorových buněk na CD56, zde však nebyl prokázán vliv ani u pacientů s nádorem rekta, ani u pacientů s nádorem kolon. CD56 antigen byl vybrán na základě publikace, v níž byla prokázána asociace s vyšším výskytem lokální rekurence a perineurální invazí karcinomu rekta [121].

Statistickou analýzu mohl ovlivnit i fakt, že k obarvení nádorových buněk došlo pouze sporadicky a to u šesti pacientů.

Ke kontroverzním výsledkům patří průkaz ITL CD4 jako pozitivního prognostického faktoru DFI, což je v rozporu s předchozím výsledkem práce provedené na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice Plzeň [288]. Rozdíl může být dán tím, že výsledky naší studie vycházely ze semikvantitativního hodnocení, kde byly porovnávány skupiny s patrnou infiltrací CD4⁺ a bez ní, zatímco v Novákově práci se jednalo o kvantitativní hodnocení s cut off denzitou 4 CD4⁺ lymfocyty na zorné pole [288]. Nutno dodat, že do souborů obou prací nebyl zařazen žádný společný pacient. Možným zdrojem variability vlivu CD4⁺ TIL je i jejich funkční heterogenita, neboť tato skupina lymfocytů může obsahovat například navzájem antagonistické Th1 lymfocyty i Treg lymfocyty [109 s. 139].

Analýza vlivu adjuvantní chemoterapie neprokázala signifikantní rozdíly v DFI ani OS. Možné důvody pro tyto výsledky se liší podle srovnávaných kohort. V analýze celého souboru pacientů byla většina pacientů s adjuvantní chemoterapií ve skupině UICC III. Ve skupině UICC III podstoupilo adjuvantní chemoterapii 44 pacientů, zatímco ve skupině UICC II pouze 16 pacientů. Již uvedená data ukázala, že mezi skupinami UICC II a UICC III nebyl rozdíl v DFI a OS signifikantní, ačkoliv byl patrný. Další porovnání vlivu adjuvantní chemoterapie proběhlo v rámci skupiny UICC II, kde však soubor pacientů, u kterých chemoterapie nebyla indikována, byl nepočtený, což mohlo ovlivnit reprezentativnost kohorty bez chemoterapie. Ve skupině UICC III též nebyl prokázán vliv adjuvantní chemoterapie, ovšem v tomto stadiu je důvodem nepodání jinak indikované adjuvantní chemoterapie ve velké většině špatný celkový stav pacienta, což může mít vliv na prognózu této skupiny nemocných.

Při srovnání pacientů s karcinomem rekta, kteří podstoupili radioterapii (40 pacientů) a těch, u nichž neproběhla (27 pacientů), se neprojevil vliv adjuvantní aktinoterapie na OS a DFI. Efekt adjuvantní radioterapie se neprojevil ani při analýze v rámci jednotlivých skupin. Dosažené výsledky je dosti obtížné porovnat s publikovanými studiemi, protože ty srovnávají neoadjuvatní radioterapii s adjuvantním režimem a neoadjuvatní aktinoterapie byla provedena ve studovaném souboru pacientů pouze u jediného pacienta [289].

K prognostickým faktorům celkového přežití se zařadily parametry systémové zánětlivé odpovědi, pooperační sérová hladina CRP a leukocytóza. Elevace sérové hladiny

CRP a zvýšená leukocytóza byla prokázána jako negativní prognostický faktor celkového přežití. Interpretace tohoto výsledku je nejednoznačná, neboť nebyla prokázána souvislost s recidivou onemocnění a ani s mírou zaznamenaných pooperačních komplikací. Je možné, že systémová zánětlivá odpověď souvisí s celkovým stavem pacienta, který má na délku OS jistě vliv.

9.4 Diskuze k výsledkům imunohistochemického barvení na serpin B9

Zajímavým výsledkem, který vyplynul z rozboru rozdílů v imunohistochemických parametrech, byla signifikantně vyšší kvantitativně hodnocená denzita nádorových buněk pozitivních na serpin B9 u skupiny pacientů s metastatickým postižením regionálních lymfatických uzlin. Dle provedené rešerše nebyl dosud publikován článek týkající se serpinu B9 a metastázování kolorektálního karcinomu do lymfatických uzlin. Expres serpinu B9 ve vzorcích kolorektálního karcinomu byla prokázána ve studii zabývající se více typy solidních lidských tumorů. Expres byla prokázána u melanomu, karcinomu prsu a děložního čípku [290]. V téže studii byla prokázána expres serpinu B9 u dvou ze tří karcinomů kolon. Byť se jedná o minimální počet vzorků, výsledek uvedené studie poukazuje na heterogenitu v expresi serpinu B9 u tohoto karcinomu. Recentní publikované studie, které se týkají exprese serpinu B9 u malobuněčného karcinomu, referují o asociaci vyšší exprese s vyšším gradem karcinomu [291]. Serpinem B9 se také zabírají další práce ve vztahu k serpin B9 rezistentnímu mutovanému granzymu B [292]. Výsledky prezentované v dizertační práci podporují hypotézu, že serpin B9 produkováný nádorovými buňkami KRCa podporuje metastatické šíření do lymfatických uzlin pomocí inhibice cytotoxické imunitní odpovědi zprostředkované granzymem B. Bylo by do budoucna vhodné podpořit výsledky imunohistochemického vyšetření expresní studií genu pro serpin B9 u KRCa na obdobném souboru pacientů.

10. Závěr

Z výsledků provedené analýzy vyplývá, že se podařilo prokázat roli lokální imunitní odpovědi v kontrole progresu KRCA. Ačkoliv se TIL již používají v klinické praxi, existují rezervy v možnostech imunohistochemického barvení. Jako nejpřínosnější se na základě provedené studie jeví imunohistochemické barvení na CD57. Do skupiny CD57⁺ buněk spadají hlavně maturované NK buňky a vysoce diferencované oligoklonální subpopulace CD8⁺ T lymfocytů. Vzhledem k tomu, že se vysoké denzity CD57 v histologických vzorcích KRCA prokázaly jako nezávislý pozitivní prognostický faktor pro DFI a OS, bylo by stanovování tohoto parametru přínosem pro identifikaci pacientů, kteří by profitovali z adjuvantní onkologické léčby a z intenzivní dispenzarizace. Průkaz pozitivního vlivu granzymu B na celkovou prognózu u pacientů po radikální operaci KRCA též dokazuje účinek cytotoxické imunitní odpovědi na progresi malignity.

Porovnání imunohistochemických parametrů u skupin pacientů s rozdílným postižením regionálních lymfatických uzlin metastázami prokázalo asociaci vyšších hustot nádorových buněk značených na serpin B9 s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách. Jedná se o dosud nepublikovanou souvislost, která může ukázat na mechanismus obrany buněk nádoru proti cytotoxické imunitní reakci.

11. Použitá literatura

1. FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* [online]. 2015, **136**(5), E359-E386 [cit. 2016-11-15]. DOI: 10.1002/ijc.29210. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210>
2. SOBIN, L. H., M. K. GOSPODAROWICZ a Ch. WITTEKIND. *TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-1-4443-3241-4. Dostupné také z: http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/13072015_TNM%20Classification.pdf
3. ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST JANA EVANGELISTY PURKYNĚ. Česká onkologická společnost. *Modrá kniha České onkologické společnosti* [online]. 22. aktualizace. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2016 [cit. 2016-11-16]. ISBN 978-80-86793-40-5. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/modra-kniha/15.pdf>
4. OHTANI, H. et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible antitumor immunity? *Laboratory Investigation*. 1997, **77**(3), 231-241. ISSN 0023-6837.
5. MENON, A. G. et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Laboratory Investigation* [online]. 2004, **84**(4), 493-501 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1038/labinvest.3700055. ISSN 1530-0307. Dostupné z: <http://www.nature.com/labinvest/journal/v84/n4/full/3700055a.html>
6. MEI, Z. et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer* [online]. 2014, **110**(6), 1595-1605 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1038/bjc.2014.46. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <http://www.nature.com/bjc/journal/v110/n6/full/bjc201446a.html>
7. GALON, J. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* [online]. September 2006, **313**(5795), 1960-1964 [cit. 2017-01-20]. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1129139. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=17008531>
8. ČESKO. Ústav zdravotnických informací a statistiky. *Národní onkologický registr* [online databáze]. ÚZIS, [2006-] [cit. 2017-02-08]. Dostupné po přihlášení z: <http://eregpublic.ksrzis.cz/cms/web/NZIS/Stranky/Nor.aspx>
9. GREGOR, J. et al. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. *Kolorektum.cz* [online]. Masarykova univerzita, Institut biostatistiky a analýz, poslední aktualizace: 10. 12. 2015 [cit. 2016-11-15]. ISSN 1804-0888. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>
10. NATIONAL CANCER INTELLIGENCE NETWORK. NCIN Data Briefings. NATIONAL CANCER INTELLIGENCE NETWORK. *National Cancer Registration and Analysis Service* [online]. NCIN, c2010 [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: http://www.ncin.org.uk/publications/data_briefings/

- 11.** SZYLBERG, Łukasz et al. Large Bowel Genetic Background and Inflammatory Processes in Carcinogenesis – Systematic Review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2015, **24**(4), 555-561 [cit. 2016-11-16]. DOI: 10.17219/acem/31239. ISSN 1899-5276. Dostupné z: <http://www.advances.umed.wroc.pl/en/article/2015/24/4/555/>
- 12.** POVÝŠIL, Ctibor et al. *Speciální patologie. 2. dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, ©2007. xix, 430 s. ISBN 978-80-7262-494-2.
- 13.** ZÁVADOVÁ, Eva, ed. *Onkologická imunologie. 1. vyd.* Praha: Mladá fronta, 2015. ISBN 978-80-204-3756-3.
- 14.** HOLUBEC, Luboš a kol. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby. 1. vyd.* Praha: Grada, 2004, s. 39. ISBN 80-247-0636-9.
- 15.** ČESKO. Ministerstvo zemědělství. Nitrosaminy. ČESKO. Ministerstvo zemědělství. *Bezpečnost potravin A-Z* [online]. Ministerstvo zemědělství, [2004] [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76678.aspx>
- 16.** SHARPE, C. R., J. SIEMIATYCKI a B. RACHET. Effects of alcohol consumption on the risk of colorectal cancer among men by anatomical subsite (Canada). *Cancer Causes Control*. 2002, **13**(5), 483-491. ISSN 0957-5243. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146853>
- 17.** OOSTINDJER, Marije et al. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Science* [online]. 2014, **97**(4), 583-596 [cit. 2016-12-28]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.02.011. ISSN 0309-1740. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174014000564>
- 18.** IJSSENNAGGER, N. et al. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis* [online]. 2013, **34**(7), 1628-1635 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1093/carcin/bgt084. ISSN 0143-3334. Dostupné z: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgt084>
- 19.** BASTIDE, N. M., F. H. F. PIERRE a D. E. CORPET. Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and a Review of the Mechanisms Involved. *Cancer Prevention Research* [online]. 2011, **4**(2), 177-184 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113. ISSN 1940-6207. Dostupné z: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113>
- 20.** HEDLUND, M. et al. Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(48), 18936-18941 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1073/pnas.0803943105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0803943105>
- 21.** ANDĚL, Petr, Matěj ŠKROVINA a Vítězslav DUCHÁČ. *Základy praktické proktologie.* Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-892-6.
- 22.** DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of Dairy Science* [online]. 2007, **90**(4), 1920-1928 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.3168/jds.2006-079. ISSN 1525-3198. Dostupné z: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71678-8/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71678-8/abstract)

23. KNUDSON, A. G. et al. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1971, **68**(4), 820-823 [cit. 2017-01-24]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5279523>
24. MOJARAD, Ehsan Nazemalhosseini et al. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* [online]. Summer 2013, **6**(3), 120–128 [cit. 2016-11-18]. ISSN 2008-4234. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017514/>
25. JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2006. *CA: a cancer journal for clinicians* [online]. March-April 2006, **56**(2), 106-30 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.3322/canjclin.56.2.106. ISSN 1542-4863. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/canjclin.56.2.106/full>
26. FEARON, E. R. a B. VOGELSTEIN. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* [online]. 1990, **61**(5), 759-767 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90186-I. ISSN 1097-4172. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
27. PITULE, Pavel et al. Contribution of molecular biology to the diagnosis and therapy of colorectal carcinoma: the present and future. *Rozhledy v chirurgii: měsíčník Československé chirurgické společnosti*. June 2011, **90**(6), 315-323. ISSN 0035-9351.
28. SANDMEIER, Dominique et al. Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Histopathology* [online]. 2009, **55**(2), 206-213 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03356.x. ISSN 0309-0167. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2009.03356.x>
29. STEFANIUS, Karoliina. *Colorectal carcinogenesis via serrated route*. Oulu: University of Oulu, Faculty of Medicine, Institute of Diagnostics, Department of Pathology, 2011. Dizertační práce (PhD). ISBN 978-951-42-9399-3. Dostupné také z: <http://jultika.oulu.fi/Record/isbn978-951-42-9399-3>
30. ALISON, Malcolm (ed.). *The cancer handbook*. 2nd ed. Chichester: Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-01852-1.
31. TOMÁŠEK, Jiří a Jitka BERKOVCOVÁ. Onkogeny RAS – prediktivní molekulární marker u kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie*. 2013, **26**(5), 366-367. ISSN 0862-495x. Dostupné také z: <http://www.prolekare.cz/klinicka-onkologie-clanek/onkogeny-ras-prediktivni-molekularni-marker-u-kolorektalniho-karcinomu-41612>
32. KRASINSKAS, Alyssa M. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International* [online]. 2011, **2011**, 1-6 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.4061/2011/932932. ISSN 2042-003x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/pri/2011/932932/>
33. DEMING, Dustin A. et al. A phase I study of selumetinib (AZD6244/ARRY-142866), a MEK1/2 inhibitor, in combination with cetuximab in refractory solid tumors and KRAS mutant colorectal cancer. *Investigational New Drugs* [online]. 2016, **34**(2), 168-175 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.1007/s10637-015-0314-7. ISSN 0167-6997. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10637-015-0314-7>
34. JASS, J. et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* [online]. May 1998, **42**(5), 673–679 [cit. 2016-11-18]. ISSN 1468-3288. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1727100/pdf/v042p00673.pdf>

35. TOYOTA, M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Washington, D. C.: National Academy of Sciences, 1999, 681-686. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=10411935>
36. KAMBARA, T. et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* [online]. 2004, **53**(8), 1137-1144 [cit. 2016-12-04]. DOI: 10.1136/gut.2003.037671. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2003.037671>
37. CHLUMSKÁ, A., BOUDOVA, L. a M. Zámečník. Sessile Serrated Adenomas of the Large Bowel. Clinicopathologic and Immunohistochemical Study Including Comparison with Common Hyperplastic Polyps and Adenomas. *Česko-slovenská patologie* [online]. 2006, **42**(3), 133-138 [cit. 2016-11-18]. ISSN 1805-4498. Dostupný z: <http://www.cspatologie.cz/docs/273-fulltext.pdf>
38. FLETCHER, Christopher D. M. Tumors of intestine. In: FLETCHER, Christopher D. M. *Diagnostic histopathology of tumors*. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000, 349-410. ISBN 0-443-07992-7. Cit. In: HOLUBEC, Luboš a kol. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, s. 39. ISBN 80-247-0636-9.
39. COMPTON, Carolyn C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Modern Pathology* [online]. 2003, **16**(4), 376-388 [cit. 2016-12-04]. DOI: 10.1097/01.MP.0000062859.46942.93. ISSN 0893-3952. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1097/01.MP.0000062859.46942.93>
40. KUNE, G. A. et al. Survival in patients with large-bowel cancer. A population-based investigation from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Diseases of the Colon and Rectum*. 1990, **33**(11), 938-946. ISSN 0012-3706.
41. COHEN, S. M. a S. D. WEXNER. Laparoscopic colorectal resection for cancer: the Cleveland Clinic Florida experience. *Surgical Oncology*. 1993, **2**(Suppl. 1), 35-42. ISSN 0960-7404.
42. NELSON, A. R. et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2000, **18**(5), 1135-1149. DOI: 10.1200/jco.2000.18.5.1135. ISSN 1527-7755. Dostupné z: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2000.18.5.1135?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed&
43. KRUSZEWSKI, Wiesław. K-RAS point mutation, and amplification of C-MYC and C-ERBB2 in colon adenocarcinoma. *Folia Histochemica et Cytobiologica* [online]. 2004, **42**(3), 173-179 [cit. 2016-11-15]. ISSN 1897-5631. Dostupné z: https://journals.viamedica.pl/fovia_histochemica_cytobiologica/article/view/4644/3899
44. LIPSKÁ, Ludmila et al. *Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 431 s. ISBN 978-80-247-3026-4.
45. ČERNÝ, Ján. *Špeciálna chirurgia. 1, Chirurgia tráviacej rúry*. Martin: Osveta, 1996. 498 s. Dérerova zbierka; Zv. 132. ISBN 80-88824-26-5.
46. ZEMAN, Miroslav. *Špeciálna chirurgia*. 2. vyd. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-260-9.

47. ZÁDOROVÁ, Zdena. Kolonoskopie. Doporučený postup endoskopického vyšetření tlustého střeva. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*. 2005, **59**(1), 26-30. ISSN 1804-7874.
48. KALA, Zdeněk. Kolorektální karcinom. *Onkologická péče*. 2008, **12**(3), 3-10. ISSN 1214-5602. Dostupné také z: <http://www.linkos.cz/casopis-onkologicka-pece/archiv-1/>
49. FERDA, Jiří et al. *CT trávicí trubice*. 1. vyd. Praha: Galén, ©2006. 243 s. ISBN 80-7262-436-9.
50. HALLIGAN, Steve et al. Computed tomographic colonography versus barium enema for diagnosis of colorectal cancer or large polyps in symptomatic patients (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *The Lancet* [online]. 2013, **381**(9873), 1185-1193 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)62124-2. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612621242>
51. VOTRUBOVÁ, Jana a Otakar BĚLOHLÁVEK. PET/CT v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, **7**(6), 303-305 [cit. 2016-11-16]. ISSN1803-5256. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/06/07.pdf>
52. GARCIA-AQUILAR, J. et al. Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Diseases of the Colon and Rectum*. January 2002, **45**(1), 10-15. ISSN 0012-3706.
53. IAFRATE, Franco et al. Preoperative Staging of Rectal Cancer with MR Imaging: Correlation with Surgical and Histopathologic Findings. *RadioGraphics* [online]. 2006, **26**(3), 701-714 [cit. 2016-12-05]. DOI: 10.1148/rg.263055086. ISSN 0271-5333. Dostupné z: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.263055086>
54. GRIESENBERG, D. et al. CEA, TPS, CA 19-9 and CA 72-4 and the fecal occult blood test in the preoperative diagnosis and follow-up after resective surgery of colorectal cancer. *Anticancer Research*. July-August 1999, **19**(4A), 2443-2450. ISSN 0250-7005.
55. DUFFY, Michael J. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Medical Principles and Practice* [online]. 2013, **22**(1), 4-11 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1159/000338393. ISSN 1423-0151. Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000338393>
56. ZAVORAL, Miroslav et al. Národní program screeningu sporadického kolorektálního karcinomu (KR-CA): vývoj, současnost, perspektiva. *Lékařské listy: odborná příloha Zdravotnických novin* [online]. 2013, (1) [cit. 2016-12-05]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/narodni-program-screeningu-sporadickeho-kolorektalniho-karcinomu-kr-ca-vyvoj-soucasnost-perspektiva-468769>
57. RAISKUBOVÁ, Dita. *Screening kolorektálního karcinomu - laboratorní diagnostika*. Olomouc, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových generátorů. Dostupné také z: http://theses.cz/id/ahgodl/Bakalsk_prce_Dita_Raiskubov.pdf
58. KRŠKA, Zdeněk et al. *Chirurgická onkologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2014. xxvi, 872 s. ISBN 978-80-247-4284-7.
59. CAMERON, John L., ed. *Current Surgical Therapy*. 8 ed. St. Louis (Missouri): Mosby, 2004. ISBN 0-323-02519-6.

- 60.** AL-SUKHNI, Eisar et al. Predictors of circumferential resection margin involvement in surgically resected rectal cancer: A retrospective review of 23,464 patients in the US National Cancer Database. *International Journal of Surgery* [online]. April 2016, **28**, 112-117 [cit. 2017-01-13]. DOI: 10.1016/j.ijso.2016.01.098. ISSN 17439191. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743919116001357>
- 61.** QUIRKE, Phil et al. 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. *The Lancet* [online]. 2009, **373**(9666), 821-828 [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60485-2. ISSN 0140-6736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673609604852>
- 62.** JINGLI, C., C. RONG a X. RUBAI. Influence of colorectal laparoscopic surgery on dissemination and seeding of tumor cells. *Surgical Endoscopy* [online]. 2006, **20**(11), 1759-1761 [cit. 2016-12-12]. DOI: 10.1007/s00464-005-0694-4. ISSN 0930-2794. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00464-005-0694-4>
- 63.** PELLINO, Gianluca et al. Role of ileostomy in restorative proctocolectomy. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2012, **18**(15), 1703-1707 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.3748/wjg.v18.i15.1703. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i15/1703.htm>
- 64.** IHNÁT, Peter et al. Diverting ileostomy in laparoscopic rectal cancer surgery: high price of protection. *Surgical Endoscopy* [online]. 2016, **30**(11), 4809-4816 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1007/s00464-016-4811-3. ISSN 0930-2794. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00464-016-4811-3>
- 65.** JONKER, F. H. et al. Comparison of a low Hartmann's procedure with low colorectal anastomosis with and without defunctioning ileostomy after radiotherapy for rectal cancer: results from a national registry. *Colorectal Disease* [online]. 2016, **18**(8), 785-792 [cit. 2017-01-03]. DOI: 10.1111/codi.13281. ISSN 1462-8910. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/codi.13281>
- 66.** MRAK, Karl et al. Diverting ileostomy versus no diversion after low anterior resection for rectal cancer: A prospective, randomized, multicenter trial. *Surgery* [online]. 2016, **159**(4), 1129-1139 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.surg.2015.11.006. ISSN 0039-6060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606015009411>
- 67.** HOCH, Jiří. *Akutní chirurgie tlustého střeva*. Praha: Maxdorf, 1998. ISBN 80-85800-85-3.
- 68.** SCOTT, N. Total mesorectal excision and local recurrence: a study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *The British Journal of Surgery*. August 1995, **82**(8), 1031-1033. ISSN 0007-1323.
- 69.** BUCHMANN, P. Standard technique of oncologic colorectal surgery. *Swiss surgery*. 2003, **9**(3), 104-140. ISSN 1023-9332.
- 70.** CHIN, Chih-Chien et al. The oncologic benefit of high ligation of the inferior mesenteric artery in the surgical treatment of rectal or sigmoid colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 2008, **23**(8), 783-788 [cit. 2016-12-16]. DOI: 10.1007/s00384-008-0465-5. ISSN 0179-1958. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00384-008-0465-5>

- 71.** ZIV, Y. et al. Low anterior resection syndrome (LARS): cause and effect and reconstructive considerations. *Techniques in Coloproctology* [online]. 2013, **17**(2), 151-162 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1007/s10151-012-0909-3. ISSN 1123-6337. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10151-012-0909-3>
- 72.** KOCIÁN, Petr a Jiří HOCH. Funkční poruchy po resekci rekta. *Rozhledy v chirurgii*. 2015, **94**(3), 96-102. ISSN 0035-9351. Dostupné také z: <http://www.prolekare.cz/rozhledy-v-chirurgii-clanek/funkcni-poruchy-po-resekci-rekta-51457>
- 73.** PONTALLIER, Arnaud et al. Potential sexual function improvement by using transanal mesorectal approach for laparoscopic low rectal cancer excision. *Surgical Endoscopy* [online]. 2016, **30**(11), 4924-4933 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.1007/s00464-016-4833-x. ISSN 0930-2794. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00464-016-4833-x>
- 74.** HENDREN, Samantha K. et al. Prevalence of Male and Female Sexual Dysfunction Is High Following Surgery for Rectal Cancer. *Annals of Surgery* [online]. 2005, **242**(2), 212-223 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1097/01.sla.0000171299.43954.ce. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-200508000-00010>
- 75.** BAATRUP, G. et al. Rectal adenocarcinoma and transanal endoscopic microsurgery. Diagnostic challenges, indications and short term results in 142 consecutive patients. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 2007, **22**(11), 1347-1352 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1007/s00384-007-0358-z. ISSN 0179-1958. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00384-007-0358-z>
- 76.** CADY, B. et al. Surgical margin in hepatic resection for colorectal metastasis: a critical and improvable determinant of outcome. *Annals of Surgery* [online]. 1998, **227**(4), 566–571 [cit. 2017-01-20]. ISSN 1528-1140. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1191314/>
- 77.** FONG, Y. a L. H. Blumgart. Useful stapling techniques in liver surgery. *Journal of the American College of Surgeons*. 1997, **185**(1), 93-100. ISSN 1072-7515.
- 78.** TŘEŠKA, Vladislav et al. Portal vein embolisation with application of haematopoietic stem cells in patients with primarily or non-resectable colorectal liver metastases. *Anticancer Research*. 2014, **34**(12), 7279-7285. ISSN 0250-7005. Dostupné také z: <http://ar.iijournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=25503161>
- 79.** SKALICKÝ, Tomáš et al. *Hepato-pankreato-biliární chirurgie*. Praha: Maxdorf, ©2011. 614 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-269-8.
- 80.** VODIČKA, Josef. *Speciální chirurgie*. 2., dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2512-6.
- 81.** PISO, Pompiliu et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer. *World Journal of Surgical Oncology* [online]. 2004, **2**(1), 21- [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1186/1477-7819-2-21. ISSN 14777819. Dostupné z: <http://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7819-2-21>

- 82.** PISO, Pompiliu et al. Multimodality treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: first results of a new German centre for peritoneal surface malignancies. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 2007, **22**(11), 1295-1300 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1007/s00384-007-0313-z. ISSN 0179-1958. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00384-007-0313-z>
- 83.** SUGARBAKER, P. H. a K. VAN DER SPEETEN. Surgical technology and pharmacology of hyperthermic perioperative chemotherapy. *Journal of Gastrointestinal Oncology* [online]. 2016, **7**(1), 29-44 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.105. ISSN 2078-6891. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2015.105>
- 84.** HORÁK, Ladislav. Transrectal stent in palliative therapy of rectal carcinoma and benign strictures of rectum and rectosigmoid. In: *Stenting in gastrointestinal tract*. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2005, s. 129-134. ISBN 80-86703-04-5.
- 85.** FENCL, Pavel. CT colonography measurement of stricture length - an useful method in rectosigmoidal stenting. In: *Stenting in gastrointestinal tract*. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2005, s. 121-127. ISBN 80-86703-04-5.
- 86.** GLYNNE-JONES, R. a M. HARRISON. Locally Advanced Rectal Cancer: What Is the Evidence for Induction Chemoradiation? *The Oncologist* [online]. 2007, **12**(11), 1309-1318 [cit. 2017-01-13]. DOI: 10.1634/theoncologist.12-11-1309. ISSN 1083-7159. Dostupné z: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.12-11-1309>
- 87.** KACHNIC, Lisa A. Adjuvant chemoradiation for localized rectal cancer: current trends and future directions. *Gastrointestinal Cancer Research* [online]. 2007, **1**(4 Suppl 2), S64-S72 [cit. 2017-01-22]. ISSN 1934-7987. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666832/>
- 88.** LINCOVÁ, Dagmar et al. *Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac.* vyd. Praha: Galén, ©2007. xxiv, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- 89.** TABERNERO, Josep et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology* [online]. 2015, **16**(5), 499-508 [cit. 2016-12-28]. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70127-0. ISSN 1470-2045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204515701270>
- 90.** TABERNERO, Josep et al. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *European Journal of Cancer* [online]. 2014, **50**(2), 320-331 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.09.013. ISSN 0959-8049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913008538>
- 91.** MACHÁŇOVÁ, Magda. Radioterapie nádorů konečnicků. *Onkologická péče* [online]. 2008, **12**(3), 11-13 [cit. 2016-12-19]. ISSN 1802-7407. Dostupný z: <http://www.linkos.cz/casopis-onkologicka-pece/hledani-clanku-1/skupina/a/zobrazit/ids/87/>

- 92.** MENTHA, G. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *British Journal of Surgery* [online]. 2006, **93**(7), 872-878 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1002/bjs.5346. ISSN 1365-2168. Dostupný z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bjs.5346/full>
- 93.** AXEL, Grothey. Optimální léčba metastazujícího kolorektálního karcinomu. In: *Zhoubné nádory kolorekta: 2009 Educational Book* [online]. ČOS ČLS JEP, 2009 [cit. 2017-01-24]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/asco/category/zhoubne-nadory-kolorekta/>
- 94.** KIM, Jung Han et al. Comparison of RECIST 1.0 and RECIST 1.1 in Patients with Metastatic Cancer: A Pooled Analysis. *Journal of Cancer* [online]. 2015, **6**(4), 387-393 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.7150/jca.11316. ISSN 1837-9664. Dostupné z: <http://www.jcancer.org/v06p0387.htm>
- 95.** EHRLICH, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*. 1909, **53**(5), 273-290. ISSN 0028-2162. Dostupné také z <https://www.ntvg.nl/sites/default/files/migrated/1909102730002a.pdf>
- 96.** KOEHNE, Claus-Henning a Raymond N DUBOIS. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Seminars in Oncology* [online]. 2004, **31**(Suppl. 7), 12-21 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.03.041. ISSN 0093-7754. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775404001903>
- 97.** COUSSENS, Lisa M. a Zena WERB. Inflammation and cancer. *Nature* [online]. 2002, **420**(6917), 860-867 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1038/nature01322. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01322>
- 98.** BURNET, Macfarlane. Cancer: A Biological Approach. *British Medical Journal*. 13 April 1957, **1**(5023), 841-847. ISSN 0007-1447. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1973618/>
- 99.** SHANKARAN, Vijay et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* [online]. 2001, **410**(6832), 1107-1111 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1038/35074122. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/3507412>
- 100.** SCHREIBER, T. H. a E. R. PODACK. A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. *British Journal of Cancer* [online]. 2009, **101**(3), 381-386 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605198. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720247/>
- 101.** DUNN, Gavin P., Lloyd J. OLD a Robert D. SCHREIBER. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology* [online]. 2004, **22**(1), 329-360 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- 102.** DRANOFF, Glenn. *Cancer immunology and immunotherapy*. New York: Springer-Verlag, c2011. ISBN 978-3-642-14135-5.
- 103.** VAN DER BRUGGEN, P. et al. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunological reviews*. 2002, (188), 51-64. ISSN 0105-2896.
- 104.** SELIGER, Barbara a Ulrike RITZ. Major Histocompatibility Complex Modulation and Loss. *Cancer Immune Therapy* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, s. 57 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1002/3527600795.ch5. ISBN 352730441X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600795.ch5>

- 105.** KOEBEL, Catherine M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* [online]. 2007, **450**(7171), 903-907 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1038/nature06309. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06309>
- 106.** SHREIBER, Robert D., ed. *Tumor immunology*. Advances in immunology, vol. 130. 1st ed. Cambridge: Academic Press, 2016. ISBN 978-0-12-805156-6.
- 107.** PAGÈS, Franck et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **353**(25), 2654-2666 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1056/NEJMoa051424. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051424>
- 108.** LANGOWSKI, John L. et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* [online]. 2006, **442**(7101), 461-465 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1038/nature04808. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04808>
- 109.** HOŘEJŠÍ, Václav et al. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
- 110.** ABBAS, Abul K., Andrew H. LICHTMAN a Shiv. PILLAI. *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, c2007. ISBN 0808923587.
- 111.** MORETTA, Alessandro et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annual Review of Immunology* [online]. 1996, **14**(1), 619-648 [cit. 2017-01-13]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.619. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.14.1.619>.
- 112.** MUJAJ, Sally A. et al. Molecular mechanisms influencing NK cell development: implications for NK cell malignancies. *American Journal of Blood Research* [online]. 2011, **1**(1), 34-45 [cit. 2016-12-28]. ISSN 2160-1992. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3301417/>
- 113.** FERLAZZO, G. et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *The Journal of Immunology* [online]. 2004, **172**(3), 1455-1462 [cit. 2017-01-20]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=14734722>
- 114.** CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. *Blood* [online]. 2008, **112**(3), 461-469 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1182/blood-2007-09-077438. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-09-077438>
- 115.** MILLER, J. S., K. A. ALLEY a P. MCGLAVE. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood*. May 1994, **83**(9), 2594-2601. ISSN 0006-4971. Dostupný také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513206>
- 116.** BOOS, Markus D., Kevin RAMIREZ a Barbara L. KEE. Extrinsic and intrinsic regulation of early natural killer cell development. *Immunologic Research* [online]. 2008, **40**(3), 193-207 [cit. 2017-01-03]. DOI: 10.1007/s12026-007-8006-9. ISSN 0257-277x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-007-8006-9>

- 117.** GALY, Anne et al. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* [online]. October 1995, **3**(4), 459-473 [cit. 2017-01-20]. ISSN 1074-7613. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90175-2. Dostupný také z: [http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90175-2](http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613(95)90175-2)
- 118.** FREUD, Aharon G. et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2006, **203**(4), 1033-1043 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.1084/jem.20052507. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20052507>
- 119.** FREUD, Aharon G. a Michael A. CALIGIURI. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews* [online]. 2006, **214**(1), 56-72 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x. ISSN 0105-2896. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x>
- 120.** PIGOTT, Rod. *The adhesion molecule: FactsBook*. 1. vyd. London: Academic Press, 1993. 190 s. ISBN 0-12-555180-0.
- 121.** KENMOTSU, M. et al. [The expression of neural cell adhesion molecule (NCAM), neural invasion and recurrence patterns in rectal cancer--a study using anti-NACM (neural cell adhesion molecule) antibody]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1994, **95**(2), 66-70. ISSN 0301-4894.
- 122.** ANDRE, P. et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(7), 3400-3405 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1073/pnas.040569797. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.040569797>
- 123.** POLI, Aurélie et al. CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* [online]. 2009, **126**(4), 458-465 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x. ISSN 0019-2805. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x>
- 124.** FEHNIGER, T. A. et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *The Journal of Immunology* [online]. 1999, **162**(8), 4511-4520 [cit. 2016-11-18]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=10201989>
- 125.** JACOBS, R. CD56bright NK cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology* [online]. 2001, **31**(10), 3121-3127 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4. ISSN 1521-4141. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4)
- 126.** VIVIER, E. a N. ANFOSSI. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2004, **4**(3), 190-198 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1038/nri1306. ISSN 1474-1741. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1306>

- 127.** LOPEZ-VERGES, S. et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* [online]. 2010, **116**(19), 3865-3874 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282301. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-04-282301>
- 128.** NIELSEN, Carolyn M. et al. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Frontiers in Immunology* [online]. 2013, **4**, - [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00422. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00422/abstract>
- 129.** MATTA, J. et al. Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor Nkp30, in inflammatory conditions. *Blood* [online]. 2013, **122**(3), 394-404 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1182/blood-2013-01-481705. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-01-481705>
- 130.** LODOEN, M. B. a L. L. LANIER. Viral modulation of NK cell immunity. *Nature reviews. Microbiology* [online]. 2005, **3**(1), 59-69 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1038/nrmicro1066. ISSN 1740-1534. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1066>
- 131.** VIVIER, E. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* [online]. 2011, **331**(6013), 44-49 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1126/science.1198687. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=21212348>
- 132.** TOSI, Michael F. Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2005, **116**(2), 241-249 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.05.036. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674905013643>
- 133.** WALZER, T. et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* [online]. 2005, **106**(7), 2252-2258 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1154. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-03-1154>
- 134.** BLADEGROAN, B. A. et al. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *Journal of Immunology* [online]. 2001, **166**(5), 3218-3225 [cit. 2017-01-22]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/166/5/3218.long>
- 135.** RUSSELL, John H. a Timothy J. LEY. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology* [online]. 2002, **20**(1), 323-370 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730>
- 136.** CASTRICONI, R. et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *The Journal of Immunology: Official Journal of the American Association of Immunologists*. 2009, **182**(6), 3530-3539. ISSN 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.0802845. Dostupný také z: <http://www.jimmunol.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=19265131>
- 137.** PIETRA, Gabriella et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *International Immunology* [online]. 2009, **21**(7), 793-801 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1093/intimm/dxp047. ISSN 1460-2377. Dostupné z: <http://intimm.oxfordjournals.org/content/early/2009/06/02/intimm.dxp047.full>

- 138.** MORETTA, Lorenzo et al. Human Natural Killer Cells: Origin, Receptors, Function, and Clinical Applications. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2014, **164**(4), 253-264 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1159/000365632. ISSN 1423-0097. Dostupné z: <http://www.karger.com?doi=10.1159/000365632>
- 139.** RODA-NAVARRO, P. et al. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(30), 11258-11263 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1073/pnas.0600721103. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600721103>
- 140.** GROH, Veronika et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* [online]. 2002, **419**(6908), 734-738 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1038/nature01112. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01112>
- 141.** ROUSSEV, Roumen G., Siu Chui NG a Carolyn B. COULAM. Natural Killer Cell Functional Activity Suppression By Intravenous Immunoglobulin, Intralipid and Soluble Human Leukocyte Antigen-G. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. 2007, **57**(4), 262-269 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2007.00473.x. ISSN 1046-7408. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2007.00473.x>
- 142.** SWETS, Marloes et al. HLA-G and classical HLA class I expression in primary colorectal cancer and associated liver metastases. *Human Immunology* [online]. 2016, **77**(9), 773-779 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1016/j.humimm.2016.03.001. ISSN 0198-8859. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019888591630009X>
- 143.** BALSAMO, M. et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(49), 20847-20852 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1073/pnas.0906481106. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0906481106>
- 144.** PIETRA, Gabriella et al. Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer Research* [online]. 2012, **72**(6), 1407-1415 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2544. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-2544>
- 145.** HALAMA, N. et al. Natural Killer Cells are Scarce in Colorectal Carcinoma Tissue Despite High Levels of Chemokines and Cytokines. *Clinical Cancer Research* [online]. 2011, **17**(4), 678-689 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2173. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-10-2173>
- 146.** BALSAMO, Mirna et al. Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. *European Journal of Immunology* [online]. 2012, **42**(7), 1833-1842 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1002/eji.201142179. ISSN 00142980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201142179>
- 147.** COCA, S. et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997, **79**(12), 2320-2328. ISSN 0008-543X.

- 148.** COPPOLA, Andrea et al. NK Cell Inflammation in the Clinical Outcome of Colorectal Carcinoma. *Frontiers in Medicine* [online]. 2015, **2**, 33 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.3389/fmed.2015.00033. ISSN 2296-858x. Dostupné z: <http://www.frontiersin.org/Pathology/10.3389/fmed.2015.00033/abstract>
- 149.** MARÉCHAL, Raphaël et al. Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer* [online]. 2010, **10**(1) [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1186/1471-2407-10-340. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-340>
- 150.** GULUBOVA, Maya et al. Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS* [online]. 2009, **117**(12), 870-879 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x. ISSN 0903-4641. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x>
- 151.** PENG, Yun-Peng et al. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2013, **11**(1), 262 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1186/1479-5876-11-262. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-11-262>
- 152.** GHARAGOZLOO, M. et al. The decrease in NKG2D+ Natural Killer cells in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer. *Bratislavské lékařské listy*. 2015, **116**(5), 296-301. ISSN 0006-9248.
- 153.** SANDEL, M. H. et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Molecular Immunology* [online]. 2005, **42**(4), 541-546 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.07.039. ISSN 0161-5890. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589004003141>
- 154.** LIŠKA, Václav et al. Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+ lymphocytes as independent prognostic factors after radical surgical treatment. *Anticancer Research* [online]. 2012, **32**(5), 2129-2132 [cit. 2017-01-22]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iiarjournals.org/content/32/5/2129.long>
- 155.** CHAPUT, N. et al. Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II–III colorectal cancer. *British Journal of Cancer* [online]. 2013, **109**(4), 1013–1022 [cit. 2017-01-25]. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749560/>
- 156.** ETOH, T. et al. Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration. *Clinical Cancer Research*. 2000, **6**(9), 3545-3551. ISSN 1078-0432.
- 157.** NAKAYAMA, Y. et al. Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2002, **22**(6C), 4291-4296. ISSN 0250-7005.
- 158.** TAN, S. Y. et al. Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2005, **11**(8), 1210-1214 [cit. 2017-01-20]. ISSN 2219-2840. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v11/i8/1210.htm>

- 159.** IMANO, M. et al. Osteopontin induced by macrophages contribute to metachronous liver metastases in colorectal cancer. *The American Surgeon* [online]. 2011, **77**(11), 1515-1520 [cit. 2017-01-23]. ISSN 1555-9823. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/contentone/sesc/tas/2011/00000077/00000011/art00043>
- 160.** KINOUCI, M. et al. Infiltration of CD14-positive macrophages at the invasive front indicates a favorable prognosis in colorectal cancer patients with lymph node metastasis. *Hepatogastroenterology*. 2011, **58**(106), 352-358. ISSN 0172-6390.
- 161.** EDIN, S. et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One* [online]. 2012, **7**(10), e47045. DOI: 10.1371/journal.pone.0047045. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047045>
- 162.** HERRERA, Mercedes et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Science* [online]. 2013, **104**(4), 437-444 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1111/cas.12096. ISSN 1347-9032. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.12096>
- 163.** ÅLGARS, Annika et al. Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* [online]. 2012, **131**(4), 864-873 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1002/ijc.26457. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.26457>
- 164.** GULUBOVA, Maya et al. The density of macrophages in colorectal cancer is inversely correlated to TGF- β 1 expression and patients' survival. *Journal of Molecular Histology* [online]. 2013, **44**(6), 679-692 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1007/s10735-013-9520-9. ISSN 1567-2379. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10735-013-9520-9>
- 165.** FORSSELL, J. et al. High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 2007, **13**(5), 1472-1479 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2073. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-2073>
- 166.** KHORANA, Alok A. et al. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma. *Cancer* [online]. 2003, **97**(4), 960-968 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1002/cncr.11152. ISSN 0008-543x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.11152>
- 167.** ZHOU, Qiang et al. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2010, **8**(1), 13- [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.1186/1479-5876-8-13. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-8-13>
- 168.** OHNISHI, Koji et al. CD169-positive macrophages in regional lymph nodes are associated with a favorable prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Science* [online]. 2013, **104**(9), 1237-1244 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1111/cas.12212. ISSN 1347-9032. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.12212>
- 169.** IKEGUCHI M., K. ASHIDA a H. KSAITO. New Prognostic Indicator is Useful for Predicting the Survival of Patients with Unresectable Advanced Colorectal Cancer. *Hepatogastroenterology*. 2015, **62**(140), 859-862. ISSN 0172-6390.

170. KILINCALP, Serta et al. Neutrophil/lymphocyte ratio, platelet/lymphocyte ratio, and mean platelet volume as potential biomarkers for early detection and monitoring of colorectal adenocarcinoma. *European Journal of Cancer Prevention* [online]. 2015, **24**(4), 328-333 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000092. ISSN 0959-8278.

Dostupné z:

<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008469-201507000-00008>

171. GALIZIA, Gennaro et al. Neutrophil to lymphocyte ratio is a strong predictor of tumor recurrence in early colon cancers: A propensity score-matched analysis. *Surgery* [online]. 2015, **158**(1), 112-120 [cit. 2017-01-26]. DOI:

10.1016/j.surg.2015.02.006. ISSN 0039-6060. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606015000914>

172. HARBAUM, L. et al. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Modern Pathology* [online]. 2015, **28**(3), 403-413 [cit. 2017-01-22]. DOI:

10.1038/modpathol.2014.104. ISSN 1530-0285. Dostupné z:

<https://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2014.104>

173. HIRT, Christian et al. Colorectal carcinoma infiltration by myeloperoxidase-expressing neutrophil granulocytes is associated with favorable prognosis. *OncoImmunology* [online]. 2014, **2**(10), e25990 [cit. 2017-02-10]. DOI:

10.4161/onci.25990. ISSN 2162-402x. Dostupné z:

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/onci.25990>

174. RIGONI, A. et al. Mast Cells Infiltrating Inflamed or Transformed Gut Alternatively Sustain Mucosal Healing or Tumor Growth. *Cancer Research* [online]. 2015, **75**(18), 3760-3770 [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3767. ISSN 0008-5472.

Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-14-3767>

175. DADABAYEV, A. R. et al. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online].

2004, **53**(11), 978-986 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1007/s00262-004-0548-2. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-004-0548-2>

176. KITO, Ayako et al. Tumor doubling time and local immune response to hepatic metastases from colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* [online]. 2007, **96**(6), 525-533 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1002/jso.20806. ISSN 0022-4790. Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1002/jso.20806>

177. KOCIÁN, Petr et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: Their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence. *Human Immunology* [online]. 2011, **72**(11), 1022-1028 [cit. 2017-02-11]. DOI:

10.1016/j.humimm.2011.07.312. ISSN 0198-8859. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885911004988>

178. GULUBOVA, Maya V. et al. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease* [online].

2012, **27**(2), 159-169 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1007/s00384-011-1334-1. ISSN 0179-1958. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00384-011-1334-1>

- 179.** VÄYRYNEN, Juha P. et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *International Journal of Cancer* [online]. 2014, **134**(9), 2126-2135 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1002/ijc.28533. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28533>
- 180.** HIEBERT, P. R. Perforin and granzyme B have separate and distinct roles during atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E knockout mice. *PLoS One* [online]. October 2013, **8**(10), e78939 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1371/journal.pone.0078939. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078939>
- 181.** BOIVIN, Wendy Anne et al. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Laboratory Investigation* [online]. 2009, **89**(11), 1195-1220 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1038/labinvest.2009.91. ISSN 0023-6837. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/labinvest.2009.91>
- 182.** CHOWDHURY, Dipanjan a Judy LIEBERMAN. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annual Review of Immunology* [online]. 2008, **26**(1), 389-420 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404>
- 183.** RISSOAN, M. C. et al. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulinlike transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* [online]. **100**(9), 3295-3303 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0638. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-02-0638>
- 184.** HUSE, Morgan, Emily J. QUANN a Mark M. DAVIS. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nature Immunology* [online]. 2008, **9**(10), 1105-1111 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1038/ni.f.215. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.f.215>
- 185.** STINCHCOMBE, J. C. et al. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 2001, **15**(5), 751-761. ISSN 1074-7613.
- 186.** VEUGELERS, K. Granule-mediated Killing by Granzyme B and Perforin Requires a Mannose 6-Phosphate Receptor and Is Augmented by Cell Surface Heparan Sulfate. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2005, **17**(2), 623-633 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1091/mbc.E05-07-0631. ISSN 1059-1524. Dostupné z: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E05-07-0631>
- 187.** ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, c2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- 188.** LEE, Won-Suk et al. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer* [online]. 2010, **116**(22), 5188-5199 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1002/cncr.25293. ISSN 0008-543x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.25293>
- 189.** BECHT, E. et al. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Advances in Immunology* [online]. 2016, **130**, 95-190 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1016/bs.ai.2015.12.002. ISSN 1557-8445. Dostupné z: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065-2776\(15\)30002-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065-2776(15)30002-X)

- 190.** BERNAL, Samuel D. Anticancer immune reactivity and long-term survival after treatment of metastatic ovarian cancer with dendritic cells. *Oncology Letters* [online]. 2012, **3**(1), 66–74 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.3892/ol.2011.424. ISSN 1792-1082. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362454/>
- 191.** MAMESSIER, Emilie et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2011, **121**(9), 3609-3622 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1172/JCI45816. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/45816>
- 192.** BLANK, Christian, Thomas F. GAJEWSKI a Andreas MACKENSEN. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2005, **54**(4), 307-314 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1007/s00262-004-0593-x. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-004-0593-x>
- 193.** IGNEY, Frederik H. a Peter H. KRAMMER. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2005, **54**(11), 1127-1136 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1007/s00262-005-0680-7. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-005-0680-7>
- 194.** TONG, Q., K. LIU a G. WANG. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences*. 2006, **26**(1), 79-81. ISSN 1672-0733.
- 195.** OHMORI, Hitoshi et al. Methionine-enkephalin secreted by human colorectal cancer cells suppresses T lymphocytes. *Cancer Science* [online]. 2009, **100**(3), 497-502 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01073.x. ISSN 1347-9032. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2008.01073.x>
- 196.** SUN, Jing et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2010, **59**(8), 1163-1171 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1007/s00262-010-0841-1. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-010-0841-1>
- 197.** VORON, Thibault et al. Rôle du VEGF dans l'épuisement des lymphocytes T intratumoraux. *Médecine/sciences* [online]. 2015, **31**(5), 473-475 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1051/medsci/20153105004. ISSN 0767-0974. Dostupné z: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20153105004>
- 198.** YOUSSEV, M. M. et al. EMAP-II-dependent lymphocyte killing is associated with hypoxia in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* [online]. 2006, **95**(6), 735-743 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603299. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2360520/>
- 199.** SALMON, Hélène a Emmanuel DONNADIEU. Within tumors, interactions between T cells and tumor cells are impeded by the extracellular matrix. *OncImmunology* [online]. 2014, **1**(6), 992-994 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.4161/onci.20239. ISSN 2162-402x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/onci.20239>
- 200.** KRAMAN, M. et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* [online]. 2010, **330**(6005), 827-30 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1126/science.1195300. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <http://science.sciencemag.org/content/330/6005/827>

- 201.** PINCHUK, Irina V., et al. PD-1 Ligand Expression by Human Colonic Myofibroblasts/Fibroblasts Regulates CD4+ T-Cell Activity. *Gastroenterology* [online]. 2008, **135**(4), 1228-1237.e2 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.07.016. ISSN 0016-5085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508013243>
- 202.** JASS, J. R., S. B. LOVE a J. M. NORTHOVER. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* [online]. 1987, **1**(8545), 1303-1306 [cit. 2016-11-18]. ISSN 1474-547X. Dostupné z: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736\(87\)90552-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736(87)90552-6)
- 203.** ROPPONEN, K. M. et al. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *The Journal of Pathology* [online]. 1997, **182**(3), 318-324 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<318::AID-PATH862>3.0.CO;2-6. ISSN 1096-9896. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349235>
- 204.** HARRISON, J. C. et al. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Human Pathology*. 1995, **26**(1), 31-38. ISSN 1532-8392.
- 205.** OHTANI, H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immunity* [online]. 2007, **7**, 4 [cit. 2017-01-26]. ISSN 1424-9634. Dostupné z: <http://archive.cancerimmunity.org/v7p4/061216.htm>
- 206.** NAITO, Y. et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research* [online]. 1998, **58**(16), 3491-3494. ISSN 1538-7445. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/16/3491.long>
- 207.** CHIBA, T. et al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *British Journal of Cancer* [online]. 2004, **91**(9), 1711-1717 [cit. 2016-12-16]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602201. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2410024/>
- 208.** DIEDERICHSEN, Axel C. P. et al. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2003, **52**(7), 423-428 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1007/s00262-003-0388-5. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-003-0388-5>
- 209.** KOCH, Moritz et al. Tumor Infiltrating T Lymphocytes in Colorectal Cancer. *Annals of Surgery* [online]. 2006, **244**(6), 986-993 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1097/01.sla.0000247058.43243.7b. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-200612000-00019>
- 210.** HOJO, S. et al. High-Level Expression of Chemokine CXCL16 by Tumor Cells Correlates with a Good Prognosis and Increased Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer. *Cancer Research* [online]. 2007, **67**(10), 4725-4731 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3424. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-3424>
- 211.** ZLOBEC, Inti et al. Multimarker phenotype predicts adverse survival in patients with lymph node-negative colorectal cancer. *Cancer* [online]. 2008, **112**(3), 495-502 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1002/cncr.23208. ISSN 0008-543x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.23208>

- 212.** MORRIS, M., C. PLATELL a B. IACOPETTA. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Perforation in Colon Cancer Predict Positive Response to 5-Fluorouracil Chemotherapy. *Clinical Cancer Research* [online]. 2008, **14**(5), 1413-1417 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1994. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-1994>
- 213.** LAGHI, Luigi et al. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3–T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *The Lancet Oncology* [online]. 2009, **10**(9), 877-884 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70186-X. ISSN 1470-2045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147020450970186X>
- 214.** OGINO, S. et al. Lymphocytic Reaction to Colorectal Cancer Is Associated with Longer Survival, Independent of Lymph Node Count, Microsatellite Instability, and CpG Island Methylator Phenotype. *Clinical Cancer Research* [online]. 2009, **15**(20), 6412-6420 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1438. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-09-1438>
- 215.** DAHLIN, A. M. et al. Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Modern Pathology* [online]. 2011, **24**(5), 671-682 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1038/modpathol.2010.234. ISSN 1530-0285. Dostupné z: <http://www.nature.com/modpathol/journal/v24/n5/full/modpathol2010234a.html>
- 216.** SUZUKI, Hiroyuki et al. Intratumoral CD8+ T/FOXP3+ cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2010, **59**(5), 653-661 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1007/s00262-009-0781-9. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-009-0781-9>
- 217.** DESCHOOLMEESTER, Vanessa et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunology* [online]. 2010, **11**(1), 19 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1186/1471-2172-11-19. ISSN 1471-2172. Dostupné z: <http://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2172-11-19>
- 218.** MCMULLEN, T. P. W. et al. Survival in rectal cancer is predicted by T cell infiltration of tumour-associated lymphoid nodules. *Clinical & Experimental Immunology* [online]. 2010, , no-no [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04147.x. ISSN 0009-9104. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2010.04147.x>
- 219.** SIMPSON, J. A. D. et al. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut* [online]. 2010, **59**(7), 926-933 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1136/gut.2009.194472. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2009.194472>
- 220.** YASUDA, Koji et al. Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. *Radiation Oncology* [online]. 2011, **6**(1), 49 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1186/1748-717X-6-49. ISSN 1748-717x. Dostupné z: <http://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1748-717X-6-49>

- 221.** CORREALE, P. et al. Tumor Infiltration by T Lymphocytes Expressing Chemokine Receptor 7 (CCR7) Is Predictive of Favorable Outcome in Patients with Advanced Colorectal Carcinoma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2012, **18**(3), 850-857 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3186. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-10-3186>
- 222.** CHEW, A. et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer. *PLoS One* [online]. 2011, **6**(7), e22047 [cit. 2017-01-25]. DOI 10.1371/journal.pone.0022047. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022047>
- 223.** ZHOU, Jerry, Larissa BELOV, Pierre CHAPUIS, et al. Surface profiles of live colorectal cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes from surgical samples correspond to prognostic categories. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2015, **416**, 59-68 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1016/j.jim.2014.11.001. ISSN 0022-1759. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175914003135>
- 224.** HANYUDA, Akiko et al. Body mass index and risk of colorectal cancer according to tumor lymphocytic infiltrate. *International Journal of Cancer* [online]. 2016, **139**(4), 854-868 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1002/ijc.30122. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.30122>
- 225.** YOSHIDA, Naohiro et al. A High ROR γ T/CD3 Ratio is a Strong Prognostic Factor for Postoperative Survival in Advanced Colorectal Cancer: Analysis of Helper T Cell Lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cells). *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2016, **23**(3), 919-927 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1245/s10434-015-4923-3. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-015-4923-3>
- 226.** BAIS, A. G. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2005, **58**(10), 1096-1100 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1136/jcp.2004.025072. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2004.025072>
- 227.** RYU, Seong-Eon et al. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure* [online]. 1994, **2**(1), 59-74 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)00008-3. ISSN 0969-2126. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212600000083>
- 228.** SALLUSTO, Federica a Antonio LANZAVECCHIA. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *European Journal of Immunology* [online]. 2009, **39**(8), 2076-2082 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1002/eji.200939722. ISSN 0014-2980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200939722>
- 229.** RIVINO, Laura et al. Chemokine Receptor Expression Identifies Pre-T Helper (Th)1, Pre-Th2, and Nonpolarized Cells among Human CD4 + Central Memory T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2004, **200**(6), 725-735 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1084/jem.20040774. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20040774>

- 230.** SINGH, S. P. et al. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *The Journal of Immunology* [online]. 2008, **180**(1), 214-221 [cit. 2017-01-22]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/180/1/214.long>
- 231.** TOSOLINI, M. et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(4), 1263-1271 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2907. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
- 232.** LI, X. et al. Colorectal cancer progression is associated with accumulation of Th17 lymphocytes in tumor tissues and increased serum levels of interleukin-6. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* [online]. 2014, **233**(3), 175-182 [cit. 2017-01-25]. ISSN 1349-3329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24990228>
- 233.** SU, X. et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *Journal of Immunology* [online]. 2010, **184**(3):1630-41 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.4049/jimmunol.0902813. ISSN 0014-2980. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/184/3/1630.long>
- 234.** SUGIMOTO, Kiichi et al. The validity of predicting prognosis by the number of lymph node metastases in node-positive colon cancer. *Open Journal of Gastroenterology* [online]. 2013, **03**(04), 217-222 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.4236/ojgas.2013.34036. ISSN 2163-9450. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ojgas.2013.34036>
- 235.** JONULEIT, Helmut et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *The Journal of Experimental Medicine*. June 2001, **193**(11), 1285-1294. ISSN 0022-1007. Dostupný také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193380/>
- 236.** SEDDIKI, N. et al. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood* [online]. 2006, **107**(7), 2830-2838 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2403. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-06-2403>
- 237.** MIYARA, Makoto et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* [online]. 2009, **30**(6), 899-911 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019. ISSN 1074-7613. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761309002027>
- 238.** POT, Caroline, Lionel APETOH a Vijay K. KUCHROO. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Seminars in Immunology* [online]. 2011, **23**(3), 202-208 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1016/j.smim.2011.07.005. ISSN 1044-5323. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532311000613>
- 239.** FILACI, G. et al. CD8+CD28- T Regulatory Lymphocytes Inhibiting T Cell Proliferative and Cytotoxic Functions Infiltrate Human Cancers. *The Journal of Immunology* [online]. 2007, **179**(7), 4323-4334 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.4049/jimmunol.179.7.4323. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.7.4323>

- 240.** JOOSTEN, S. A. et al. Identification of a human CD8⁺ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(19), 8029-8034 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1073/pnas.0702257104. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702257104>
- 241.** FRISULLO, Giovanni et al. CD8⁺Foxp3⁺ T cells in peripheral blood of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Human Immunology* [online]. 2010, **71**(5), 437-441 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1016/j.humimm.2010.01.024. ISSN 0198-8859. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885910000340>
- 242.** CHAPUT, N. et al. Identification of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* [online]. 2009, **58**(4), 520-529 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1136/gut.2008.158824. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2008.158824>
- 243.** SAKAGUCHI, Shimon et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* [online]. 2008, **133**(5), 775-787 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009. ISSN 0092-8674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408006247>
- 244.** SHEVACH, Ethan M. Mechanisms of Foxp3⁺ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* [online]. 2009, **30**(5), 636-645 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.010. ISSN 1074-7613. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761309001976>
- 245.** COLLISON, Lauren W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* [online]. 2007, **450**(7169), 566-569 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1038/nature06306. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nature06306>
- 246.** DEAGLIO, Silvia et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2007, **204**(6), 1257-1265 [cit. 2016-11-16]. DOI: 10.1084/jem.20062512. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20062512>
- 247.** VIGNALI, Dario A. A., Lauren V. COLLISON a C. J. WORKMAN. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* [online]. 2008, **8**(7), 523-532 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1038/nri2343. ISSN 1474-1741. Dostupné z: <http://www.nature.com/nri/journal/v8/n7/full/nri2343.html>
- 248.** TRIPLETT, Todd A. et al. Defining a functionally distinct subset of human memory CD4⁺ T cells that are CD25^{POS} and FOXP3^{NEG}. *European Journal of Immunology* [online]. 2012, **42**(7), 1893-1905 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1002/eji.201242444. ISSN 0014-2980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201242444>
- 249.** MARSON, Alexander et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* [online]. 2007, **445**(7130), 931-935 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1038/nature05478. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nature05478>

- 250.** STRIOGA, Marius, Vita PASUKONIENE a Dainius CHARACIEJUS. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* [online]. 2011, **134**(1), 17-32 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x. ISSN 0019-2805. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x>
- 251.** MEDINA-ECHEVERZ, J. et al. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *The Journal of Immunology* [online]. 2011, **186**(2), 807-815 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.4049/jimmunol.1001483. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/186/2/807.long>
- 252.** CHANG, L.-Y et al. Tumor-Derived Chemokine CCL5 Enhances TGF- β -Mediated Killing of CD8+ T Cells in Colon Cancer by T-Regulatory Cells. *Cancer Research* [online]. 2012, **72**(5), 1092-1102 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2493. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-2493>
- 253.** LING, K. L. et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immunity* [online]. 2007, **7**, 7 [cit. 2017-01-22]. ISSN 1424-9634. Dostupné z: <http://archive.cancerimmunity.org/v7p7/070206.htm>
- 254.** TERME, M. et al. VEGFA-VEGFR Pathway Blockade Inhibits Tumor-Induced Regulatory T-cell Proliferation in Colorectal Cancer. *Cancer Research* [online]. 2013, **73**(2), 539-549 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2325. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-2325>
- 255.** BETTS, Gareth et al. Suppression of tumour-specific CD4 + T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* [online]. 2012, **61**(8), 1163-1171 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300970. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2011-300970>
- 256.** DELEEUW, R. J. et al. The Prognostic Value of FoxP3+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. *Clinical Cancer Research* [online]. 2012, **18**(11), 3022-3029 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3216. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-3216>
- 257.** LING, A. et al. The intratumoural subsite and relation of CD8(+) and FOXP3(+) T lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues. *British Journal of Cancer* [online]. 2014, **110**(10), 2551-2559 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1038/bjc.2014.161. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.161>
- 258.** CORVAISIER, M. et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *The Journal of Immunology* [online]. 2005, **175**(8), 5481-5488 [cit. 2016-11-16]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/175/8/5481.long>
- 259.** KABELITZ, Dieter. $\Gamma\delta$ T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2011, **68**(14), 2331-2333 [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1007/s00018-011-0696-4. ISSN 1420-682x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-011-0696-4>

- 260.** GODFREY, D. I. et al. NKT cells: what's in a name? *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2004, **4**(3), 231-237 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.1038/nri1309. ISSN 1474-1741. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1309>
- 261.** TACHIBANA, T. Increased Intratumor V 24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas. *Clinical Cancer Research* [online]. 2005, **11**(20), 7322-7327 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0877. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-0877>
- 262.** O'KONEK, Jessica J. et al. Mouse and human iNKT cell agonist β -mannosylceramide reveals a distinct mechanism of tumor immunity. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2011, **121**(2), 683-694 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1172/JCI42314. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/42314>
- 263.** MATSUDA, J. L. et al. Mouse V 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, **100**(14), 8395-8400 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1073/pnas.1332805100. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1332805100>
- 264.** TERABE, Masaki. a Jay A. BERZOFSKY. *Natural killer T cells: balancing the regulation of tumor immunity*. New York: Springer, c2012. ISBN 978-1-4614-0613-6.
- 265.** KARADIMITRIS, A. et al. Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(6), 3294-3298 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1073/pnas.051604498. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051604498>
- 266.** SIDOBRE, S. et al. The V alpha 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. *The Journal of Immunology* [online]. 2002, **169**(3), 1340-1348 [cit. 2016-12-11]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/169/3/1340.long>
- 267.** FOX, Lisa M. et al. Recognition of Lyso-Phospholipids by Human Natural Killer T Lymphocytes. *PLoS Biology* [online]. 2009, **7**(10), e1000228 [cit. 2017-01-06]. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000228. ISSN 1545-7885. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2760207/>
- 268.** FUJII, Shin-ichiro et al. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2004, **199**(12), 1607-1618 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1084/jem.20040317. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20040317>
- 269.** TUPIN, E., Y. KINJO a M. KRONENBERG. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature Reviews. Microbiology* [online]. 2007, **5**(6), 405-417 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1038/nrmicro1657. ISSN 1740-1534. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487145>
- 270.** PERNOT, Simon et al. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(14), 3738- [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3738. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i14/3738.htm>

- 271.** EXLEY, M. A. et al. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *The Journal of Immunology* [online]. 2001, **167**(10), 5531-5534 [cit. 2016-11-18]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/167/10/5531.long>
- 272.** TAKAKU, Shun et al. Blockade of TGF- β enhances tumor vaccine efficacy mediated by CD8 + T cells. *International Journal of Cancer* [online]. 2010, **126**(7), 1666-1674. [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1002/ijc.24961. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24961>
- 273.** AMBROSINO, Elena, Jay A BERZOFSKY a Masaki TERABE. Regulation of tumor immunity: the role of NKT cells. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2008, **8**(6), 725-734 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1517/14712598.8.6.725. ISSN 1471-2598. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.8.6.725>
- 274.** FEIGL-FICHTNER, S. et al. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nature Medicine* [online]. 2006, **12**(1), 99-106 [cit. 2016-11-15]. DOI: 10.1038/nm1332. ISSN 1546-170X. Dostupné z: <http://www.nature.com/nm/journal/v12/n1/full/nm1332.html>
- 275.** OKADA, T. et al. Origin of CD57+ T cells which increase at tumour sites in patients with colorectal cancer. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 1995, **102**(1), 159-66 [cit. 2017-01-20]. ISSN 1365-2249. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1553343/>
- 276.** O'KEEFFE, Joan et al. Diverse populations of T cells with NK cell receptors accumulate in the human intestine in health and in colorectal cancer. *European Journal of Immunology* [online]. 2004, **34**(8), 2110-2119 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1002/eji.200424958. ISSN 0014-2980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200424958>
- 277.** ZABIJAK, Luciane et al. Increased tumor infiltration by mucosal-associated invariant T cells correlates with poor survival in colorectal cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2015, **64**(12), 1601-1608 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1007/s00262-015-1764-7. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-015-1764-7>
- 278.** BARBERA-GUILLEM, E. et al. B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2000, **48**(10), 541-549. ISSN 0340-7004.
- 279.** ROEPMAN, Paul et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer* [online]. 2014, **134**(3), 552-562 [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.1002/ijc.28387. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28387>
- 280.** GUIDOBONI, Massimo, Roberta GAFÀ, Alessandra VIEL, et al. Microsatellite Instability and High Content of Activated Cytotoxic Lymphocytes Identify Colon Cancer Patients with a Favorable Prognosis. *The American Journal of Pathology* [online]. 2001, **159**(1), 297-304 [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61695-1. ISSN 0002-9440. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010616951>

- 281.** MICHEL, S. et al. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *British Journal of Cancer* [online]. 2008, **99**(11), 1867-73 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604756. ISSN 1532-1827. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18985040/>
- 282.** BUDINSKÁ, Eva et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *The Journal of Pathology* [online]. 2013, **231**(1), 63-76 [cit. 2017-01-03]. DOI: 10.1002/path.4212ISSN 1096-9896. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840702/>
- 283.** TOZAWA, Erica et al. Mucin expression, p53 overexpression, and peritumoral lymphocytic infiltration of advanced colorectal carcinoma with mucus component: Is mucinous carcinoma a distinct histological entity? *Pathology - Research and Practice* [online]. 2007, **203**(8), 567-574 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1016/j.prp.2007.04.013. ISSN 0344-0338. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344033807001136>
- 284.** DINDO, D., N. DEMARTINES a P. A. CLAVIEN. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Annals of Surgery* [online]. 2004, **240**(2), 205-213 [cit. 2017-01-23]. ISSN 1528-1140. DOI: 10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1097%2F01.sla.0000133083.54934.ae>
- 285.** HACKL, Christina et al. Treatment of colorectal liver metastases in Germany: a ten-year population-based analysis of 5772 cases of primary colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer* [online]. 2014, **14**(1), 810 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1186/1471-2407-14-810. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-810>
- 286.** GREENSON, J. K. et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *The American Journal of Surgical Pathology* [online]. 2009, **33**(1), 126-133 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31817ec2b1. ISSN 1532-0979. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500028/>
- 287.** ohtaLEE, G. H. et al. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? – A systematic review. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2015, **41**(3), 300-308 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1016/j.ejso.2014.11.001. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798314011998>
- 288.** NOVÁK, Petr. *Tumor infiltrující lymfocyty jako prognostický faktor prognózy kolorektálního karcinomu po radikální chirurgické léčbě*. Plzeň, 2015. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni. Vedoucí práce Josef Vodička. Dostupné také z: <https://is.cuni.cz/webapps/zp/detail/105793>
- 289.** MOLINARI, Chiara a Alessandro PASSARDI. Why is neoadjuvant chemoradiation therapy underused for locally advanced rectal cancer? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* [online]. 2016, **10**(12), 1317-1319 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1080/17474124.2016.1246182. ISSN 1747-4124. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2016.1246182>

290. MEDEMA, J. P. et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(20), 11515-11520 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1073/pnas.201398198. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201398198>

291. ROUŠALOVÁ, Ilona et al. Expression of proteinase inhibitor-9/serpinB9 in non-small cell lung carcinoma cells and tissues. *International Journal of Oncology* [online]. 2010, **36**(1), 275-283 [cit. 2017-01-27]. DOI: 10.3892/ijo_00000498. ISSN 1791-2423. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/36/1/275>

292. AMOURY, Manal et al. Granzyme B-based cytolytic fusion protein targeting EpCAM specifically kills triple negative breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in a subcutaneous mouse tumor model. *Cancer Letters* [online]. 2016, **372**(2), 201-209 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.027. ISSN 03043835. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383516000392>

12. Souhrn

V dizertační práci *Molekulárně biologické mechanismy progresu kolorektálního karcinomu ve vztahu k individualizované onkochirurgické léčbě* řeší autor následující problematiku:

1. V literárním přehledu charakterizuje: epidemiologii, etiologii, karcinogenezi, diagnostiku a léčbu kolorektálního karcinomu (KRCa). Současně uvádí obecné principy protinádorové imunity a charakterizuje imunitní interakci s KRCa se zaměřením na celulární cytotoxickou reakci, která je zprostředkována tumor infiltrujícími lymfocyty (TIL).

2. V metodice jsou prezentovány:

Soubor 152 pacientů, 63 pacientů ve skupině klasifikované do stadia II dle Union Internationale Contre le Cancer (UICC) a 89 pacientů ve skupině UICC III, kteří byli elektivně radikálně operováni pro KRCa.

Metody stanovení lokalizace TIL na peritumorální (PTL), intratumorální (ITL), intrastromální (ISL) a Crohn-like.

Metody imunohistologického stanovení TIL a jejich parametrů (CD4, CD8, CD25, FoxP3), CD57⁺ buněk a granzymu B.

Metody imunohistochemického stanovení nádorových buněk (CD56 a serpin B9)

Metody stanovení nádorové infiltrace endovaskulární (VE), lymfatickou (LI) a perineurální (PI).

3. Ve výsledkové části autor prokázal následující:

Signifikantně vyšší jsou kvantitativně hodnocené denzity CD8⁺ a CD4⁺ TIL ve skupině UICC II. Byly prokázány významně vyšší semikvantitativně hodnocené denzity ve skupině UICC II u CD4⁺ TIL v lokalizaci ITL, ISL, PTL a Crohn-like. V téže skupině jsou vyšší kvantitativně hodnocené denzity CD57⁺ buněk a Fox P3⁺ a granzym B⁺ TIL.

V kohortě UICC III byly pozorovány vyšší denzity v semikvantitativním hodnocení u CD8⁺ v lokalizaci ISL a PTL. Dále byly ve stejné skupině prokázány kvantitativně stanovované vyšší denzity CD25⁺ TIL a denzity nádorových buněk pozitivních na serpin B9.

Při srovnání imunohistochemických parametrů nádorů z celého koln s tumory rekta byly prokázány vyšší denzity ITL CD8 semikvantitativně v kolon. CD8 jsou též asociovány s nižším výskytem VE.

CD57, granzym B a CD8 jsou nezávislé pozitivní prognostické faktory celkového přežití (OS). Pozitivní prognostické faktory bezpříznakového přežití (DFI) byly CD57 a CD4⁺ ITL. Negativním prognostickým faktorem OS je pooperační elevace zánětlivých parametrů (C reaktivní protein a leukocytóza).

4. Závěr: TIL jsou slibným prognostickým faktorem KRCa. Jako nejpřínosnější molekula k detekci pacientů, kteří by profitovali z adjuvantní onkologické léčby, se jeví CD57, jejíž absence signifikantně zvyšuje riziko recidivy a krátké doby přežití. Asociace serpinu B9 v KRCa s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách může ukázat na nový mechanismus rezistence KRCa k cytotoxické imunitní reakci v rámci kontroly nádorové progresu.

5. Součástí práce je **literární seznam** obsahující 292 citací a přehled publikovaných prací autora. Práce vztahované k tématu dizertace jsou doložené v kopiích.

Klíčová slova: Kolorektální karcinom, metastázy lymfatických uzlin, recidiva, tumor infiltrující lymfocyty, natural killers, CD4, CD8, CD57, CD56, serpin B9, FoxP3, CD25.

13. Summary

In this thesis *Molecular biologic principles of progression of colorectal carcinoma and their impact on individualized oncosurgical treatment* deals the author with following issues:

1. In the literature overview: The author characterizes epidemiology, etiology, carcinogenesis, treatment and diagnostics of colorectal carcinoma (CRCa). Contemporary the author introduces to problematics of principles of anticancer immunity and characterises immune interaction with CRCa. The author focuses on cellular cytotoxic reaction represented by tumour infiltrating lymphocytes (TIL).

2. The methodology section characterizes following:

Group of 152 patients, 63 patients in cohort classified in stage II according Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and 89 patients in cohort UICC III (with lymph node metastasis). All of them were electively radically operated due to CRCa.

Methods of evaluating of TIL pattern defined as peritumoral (PTL), intratumoral (ITL), intrastromal (ISL) and Crohn-like.

Methods of immunohistological staining of TIL and evaluating of their parameters (CD4, CD8, CD25, FoxP3), CD57⁺ cells and granzyme B.

Methods of immunohistological staining of cancer cells (CD56 and serpine B9)

Methods of evaluating cancer endovascular (VE), lymphatic (LI) and perineural infiltration (PI).

3. In the final section the author demonstrates following:

There is significantly higher density of CD8⁺ and CD4⁺ TIL in UICC II group, counted quantitatively. There were significantly higher density of CD4⁺ TIL found in pattern ITL, ISL, PTL and Crohn-like in UICC II group. In the same cohort there were higher amount of CD57⁺ cells and lymphocytes stained for Fox P3 and granzyme B.

In cohort UICC III author demonstrates higher density of ISL and PTL CD8⁺ TIL, counted semiquantitatively. In the same cohort were found higher numbers of CD25⁺ TIL and cancer cells stained for serpine B9.

There were higher density of ITL CD8 in colon in comparison with rectum. ITL CD8 were also proved as protective factor of VE.

CD57, granzyme B and CD8 were proved as positive independent prognostic factors of overall survival (OS). There were proved as positive independent prognostic factors of disease free interval (DFI) CD57 and CD4⁺ ITL. Negative independent prognostic factor of OS were higher postoperative leukocytosis and serum level of C reactive protein.

4. Conclusion: TIL are promising prognostic factors of CRCa. CD57 seems to be the most helpful marker to detect patients benefiting from adjuvant treatment and intensive dispensarisation. Because of lack of CD57⁺ cells increases risk of early recurrence of CRCa.

Association of serpine B9 with lymph node metastasis reveals unknown possible principle of tumour resistance to cytotoxic immune reaction.

5. The thesis includes the **overview of relevant literature** with 292 sources and list of authors own publications. The publications with realltion to thesis are attached in copies.

Key words: Colorectal carcinoma, lymph nodes metastasis, recurrency, tumour infiltrating lymphocytes, natural killers, CD4, CD8, CD57, CD56, serpine B9, FoxP3, CD25.

14. Přílohy - publikace autora

Publikace v periodících s impakt faktorem

KŘÍŽOVÁ, V., M. DUBOVÁ, S. SUSOVÁ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, M. SKALA, V. LIŠKA, O. DAUM a P. SOUČEK. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **78**(3), 595-603 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1007/s00280-016-3114-7. ISSN 0344-5704. IF 2,824.

KOŘENKOVÁ, V., J. SLYŠKOVÁ, V. NOVOSADOVÁ, S. PIZZAMIGLIO, L. LANGEROVÁ, J. BJORKMAN, O. VYČÍTAL, V. LIŠKA, M. LEVÝ, K. VEŠKRNA, P. VODIČKA, L. VODIČKOVÁ, M. KUBIŠTA a P. VEDERIO. The focus on sample quality: Influence of colon tissue collection on reliability of qPCR data. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**, 29023 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1038/srep29023. ISSN 2045-2322. IF 5,228.

EBERLOVÁ, L., V. LIŠKA, H. MÍRKA, T. GREGOR, Z. TONAR, R. PÁLEK, M. SKÁLA, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, K. KALUSOVÁ, S. HAVIAR, M. KRÁLÍČKOVÁ a A. LAMETSCHWANDTNER. Porcine liver vascular bed in biodur E20 corrosion casts. *Folia Morphologica*, 2016, **75**(2), 154-161. ISSN 0015-5659. IF 0,3.

KUNICKÁ, T., P. PROCHÁZKA, I. KRUS, P. BENDO VÁ, M. PROTIVOVÁ, S. ŠŮSOVÁ, V. HLAVÁČ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, M. SCHNEIDEROVÁ., P. PITULE, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, P. VODIČKA a P. SOUČEK. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*[online]. 2016, **16**(1) [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1186/s12885-016-2826-8. ISSN 1471-2407. IF 3,362.

BRŮHA, J., O. VYČÍTAL, Z. TONAR, H. MÍRKA, L. HAIDINGEROVÁ, J. BENEŠ, R. PÁLEK, M. SKÁLA, V. TŘEŠKA a V. LIŠKA. Monoclonal Antibody Against Transforming Growth Factor Beta 1 Does Not Influence Liver Regeneration After Resection in Large Animal Experiments. *In Vivo*. 2015, **29**(3), 327-340. ISSN 0258-851X. IF 1,148.

SVOBODA, M., J. SLYŠKOVÁ, M. SCHNEIDEROVÁ, P. MAKOVICKÝ, L. BIELIK, M. LEVÝ, L. LIPSKÁ, B. HEMMELOVÁ, Z. KALA, M. PROTIVANKOVÁ, O. VYČÍTAL, V. LIŠKA, L. SCHWARZOVÁ, L. VODIČKOVÁ a P. VODIČKA. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis* [online]. 2014, **35**(7), 1510-1515 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1093/carcin/bgu055. ISSN 0143-3334. IF 5,635.

PITULE, P., M. ČEDÍKOVÁ, O. DAUM, J. VOJTÍŠEK, O. VYČÍTAL., P. HOŠEK, V. TŘEŠKA, O. HES, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. LIŠKA. Immunohistochemical Detection of Cancer Stem Cell Related Markers CD44 and CD133 in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1-7 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1155/2014/432139. ISSN 2314-6133. IF 2,88.

PITULE, P., O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. NOVÁK, P. HOŠEK, V. TŘEŠKA, I. HLAVATÁ, P. SOUČEK, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. LIŠKA. Differential expression and prognostic role of selected genes in colorectal cancer patients. *Anticancer Research* 2013, **33**(11), 4855-4865. ISSN 0250-7005. IF 1,725.

HLAVATÁ, I., B. MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, R. VÁCLAVÍKOVÁ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, L. HOLUBEC, V. TŘEŠKA, P. VODIČKA a P. SOUČEK. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187-196 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1093/mutage/ger075. ISSN 0267-8357. IF 3,983.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, J. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK, J. BENEŠ, L. HOLUBEC. Inhibition of Transforming Growth Factor Beta-1 Augments Liver Regeneration after Partial Portal Vein Ligation in a Porcine Experimental Model. *Hepatogastroenterology*. 2012, **59**(113), 235-240. ISSN 0172-6390. IF 0,9.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, J. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BRŮHA, O. FIALA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, A. CHLUMSKÁ, L. HOLUBEC, S. KORMUNDA, L. TREFIL, J. RACEK J. a M. MATĚJOVIČ. Tumour Necrosis Factor-Alpha Stimulates Liver Regeneration in Porcine Model of Partial Portal Vein Ligation. *Hepatogastroenterology*, 2012, **59**(114), 496-500. ISSN 0172-6390. IF 0,9.

LIŠKA, V., O. VYČÍTAL, O. DAUM, P. NOVÁK, V. TŘEŠKA, J. BRŮHA, P. PITULE a L. HOLUBEC. Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+ lymphocytes as independent prognostic factor after radical surgical treatment. *Anticancer Research*, 2012, **32**(5), 2129-2132. ISSN 0250-7005. IF 1,414.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. BENEŠ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK, L. TREFIL, J. FÍNEK a L. HOLUBEC. Immediately Preoperative use of Biological Therapy Does not Influence Liver Regeneration after Large Resection - Porcine Experimental Model with Monoclonal Antibody against Epidermal Growth Factor. *In Vivo*. 2012, **26**(4), 683-691. ISSN 0258-851X. IF 1,159.

LIŠKA, V., L. HOLUBEC, V. TŘEŠKA, J. VRZALOVÁ, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, S. KORMUNDA, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, J. FÍNEK, M. PEŠTA, L. PECEN a O. TOPOLČAN. Evaluation of tumor markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer. *Anticancer Research*, 2011, **31**(4), 1447-1451. ISSN 0250-7005. IF 1,43.

PEŠTA, M., V. KULDA, R. KUČERA, M. PEŠEK, J. VRZALOVÁ, V. LIŠKA, L. PECEN, V. TŘEŠKA, J. ŠAFRÁNEK, M. PRAŽÁKOVÁ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, L. HOLUBEC a O. TOPOLČAN. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 2011, **31**(11), 4031-4038. ISSN 0250-7005. IF 1,43.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, R. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BRŮHA, O. FIALA, O. VYČÍTAL, A. CHLUMSKA, L. HOLUBEC a M. MATĚJOVIČ. Interleukin-6 Augments Activation of Liver Regeneration in Porcine Model of Partial Portal Vein Ligation. *Anticancer Research*. 2009, **29**(6), 2371-2377. ISSN 0250-7005. IF 1,604.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, T. SKALICKÝ, H. MÍRKA, J. KOBR, R. SÝKORA, A. SUTNAR, J. BRŮHA, O. FIALA, O. VYČÍTAL, A. CHLUMSKÁ, L. HOLUBEC L. a M. MATĚJOVIČ. Cytokines and liver regeneration after partial portal vein ligation in porcine experimental model. *Bratislavské lekárske listy*. 2009, **110**(8), 447-453. ISSN 0006-9248. IF 0,047.

Publikace v ostatních periodických

VYČÍTAL, O., V. LIŠKA, J. GEIGER a V. TŘEŠKA. Diagnostika a léčba biliárního ileu. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, **95**(2), 83-86. ISSN 0035-9351.

NOVÁK, P., V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, J. KOPALOVÁ, O. VYČÍTAL a J. BRŮHA. Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě. *Rozhledy v chirurgii*. 2012, **91**(4), 219-222. ISSN 0035-9351.

LIŠKA, V., M. EMINGR, M. SKÁLA, R. PÁLEK, O. TROUP, P. NOVÁK, O. VYČÍTAL, T. SKALICKÝ a V. TŘEŠKA. Jaterní metastázy karcinomů kolon a rekta z pohledu rozdílů v klinických parametrech. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, **95**(2), 69-77. ISSN 0035-9351.

TŘEŠKA, V., P. DURAS, H. MÍRKA, T. SKALICKÝ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, V. OPATRNÝ, V. LIŠKA a A. SUTNAR. Transarteriální chemoembolizace pomocí „drug eluting beads“ (TACE DEB) u nemocných s radikálně neodstranitelným hepatocelulárním karcinomem (HCC). *Rozhledy v chirurgii*. 2014, **93**(2), 63-69. ISSN 0035-9351.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BENEŠ, J. KOBR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK J. a J. TREFIL. Liver parenchyma regeneration in connection with extended surgical procedure – experiment on large animal. *ScienceMed*. 2011, **2**(5), 461-467. ISSN 2039-4632.

VYČÍTAL, O., J. BRŮHA, V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, J. KOBR, R. SÝKORA, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK, L. TREFIL L. a J. BENEŠ. Novel use of biological therapy in acceleration of liver regeneration after partial portal vein ligation in a porcine experimental model. *Plzeňský lékařský sborník*. 2009, (75), 17-27. ISSN 0551-1038.

Knihy – kapitoly v knihách

LIŠKA, V., P. NOVÁK, O. DAUM, V. TŘEŠKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA a P. PITULE. Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis of colorectal cancer after radical surgical treatment. In: ETTARH, R., ed. *Colorectal Cancer Biology: From Genes to Tumor*. Rijeka: Intech, 2012, 413-428. ISBN 978-953-307-707-9.

LIŠKA, V., V. TŘEŠKA, H. MÍRKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, J. KOPALOVÁ, T. SKALICKÝ, A. SUTNAR, J. BENEŠ, J. KOBR, A. CHLUMSKÁ, J. RACEK a L. TREFIL. Liver parenchyma regeneration in connection with extended surgical procedure: experiment on large animal. In: BAPTISTA, P., ed. *Liver Regeneration*. Rijeka: Intech, 2012, 151-174. ISBN 979-953-307-163-2.

LIŠKA, V., D. GLANC, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. PITULE, J. KOPALOVÁ, R. PÁLEK a V. TŘEŠKA. Interleukin-6 inhibitors as novel generation of treatment strategies. In: D'AQUINO, J. et al. *Interleukin-6: Genetics, Clinical Applications and Role in Disease*. New York: Nova, 2013, 1-60. ISBN 978-1-62417-592-3.

LIŠKA, V., ed. *Experimental surgery*. 1st edition. Plzeň: Nava, 2016. 541 stran. ISBN 978-80-7211-490-0. Kapitoly 1, 2, 4, 5.

HOCH, J., F. ANTOŠ, *Koloproktologie. Vybrané kapitoly*. Mladá fronta a.s. 2017. 239 stran. ISBN 9788020441799, spoluautor kapitoly 11

Knihy - kapitoly ve skriptech

LIŠKA, V., a J. ROSENBERG, eds. *Experimentální chirurgie - nové technologie v medicíně. I. díl, Experimentální chirurgie*. Plzeň: Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni, 2013. 188 s. ISBN 978-80-260-4795-7. Kapitoly 1.2, 3.1, 3.5, 3.6.

Přednášky

VYČÍTAL, O., B. ČERTÍK., J. MOLÁČEK, V. TŘEŠKA, Přímá embolektomie větvení karotid-kazuistika. XII. dny mladých chirurgů Prof. MUDr. Stanislava Čárskeho Seč u Chrudimi, 7.6.-8.6. 2012

VYČÍTAL, O., O. DAUM, V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis of colorectal cancer after radical surgical treatment. The 10th International Medical Postgraduate Conference in Hradec Králové, 21.11.-22.11. 2013

VYČÍTAL, O., V. LIŠKA, R. ŠULC , V. TŘEŠKA, De Garengotova kýla – kazuistika, XIII. dny mladých chirurgů prof. MUDr. Stanislava Čárskeho, DrSc., Slnečné jazerá–sever, Senec, 7.6.– 8. 6 2013

VYČÍTAL, O., P. SOUČEK, I. HLAVATÁ, V. TŘEŠKA, P. NOVÁK, V. LIŠKA, Farmakogenomika jako účinný nástroj individualizace onkologické léčby. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 4.2.-6.2. 2014

VYČÍTAL, O., P. SOUČEK, I. HLAVATÁ, V. TŘEŠKA, P. NOVÁK, V. LIŠKA, J. BRANDŽOVSKÝ. Farmakogenomika jako účinný nástroj individualizace onkologické léčby. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 5.6.-6.6. 2014

VYČÍTAL, O., J. GEIGER, V. LIŠKA, V. TŘEŠKA. Diagnostika a léčba biliárního ileu. Večer chirurgické kliniky Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy, a Fakultní nemocnice Plzeň. 13.5.2015

VYČÍTAL, O., M. BLAŽEK, B. ČERTÍK, V. LIŠKA, V. TŘEŠKA. Unilaterální porucha vizu jako příznak útlaku arteria carotis interna elongovaným processus styloideus – kazuistika. V. XVI. dny mladých chirurgů Prof. MUDr. Stanislava Čárskeho, Seč u Chrudimi 9. 6. - 10. 6. 2016

Kopie publikací se vztahem k tématu dizertační práce

KŘÍŽOVÁ, V., M. DUBOVÁ, S. SUSOVÁ, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA, M. SKALA, V. LIŠKA, O. DAUM a P. SOUČEK. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **78**(3), 595-603 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1007/s00280-016-3114-7. ISSN 0344-5704. IF 2,824.

Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients

V. Krizkova¹ · M. Dubova² · S. Susova³ · O. Vycital^{3,4} · J. Bruha^{3,4} · M. Skala^{3,4} · V. Liska^{3,4} · O. Daum² · P. Soucek³

Received: 31 March 2016 / Accepted: 22 July 2016 / Published online: 28 July 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Purpose This study investigated the prognostic importance of protein expression of ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCC10 and ABCC11 in colorectal cancer.

Methods Protein content of ABCC10 and ABCC11 was assessed in tumor tissue blocks of 140 colorectal cancer patients and associated with survival of patients with regard to 5-fluorouracil-based therapy.

Results Low ABCC10 protein content in tumors increased hazard ratio of patient's death more than three times in comparison with high ABCC10-expressing tumors ($P = 0.004$). In contrast, the low ABCC11 content increased the hazard ratio of cancer recurrence in patients almost four times ($P = 0.016$). Analysis of patients treated with regimens based on 5-fluorouracil revealed that patients with low ABCC11 content in their tumors had shorter disease-free interval than those with higher content ($P = 0.024$).

Conclusions The present study shows for the first time that the protein expression of ABCC10 significantly associates with overall survival and the expression of ABCC11 with disease-free interval of colorectal cancer patients and provides strong impulse for further validation of their prognostic value in colorectal cancer.

Keywords Colorectal cancer · Immunohistochemistry · Protein · Prognosis

Introduction

Colorectal cancer (C18-21, OMIM: 114500) is the third most often diagnosed malignancy and the fourth leading cause of death in the adult population globally, with one of the highest incidence recorded in Central Europe [1].

There are many obstacles to the treatment of this serious disease. One of the most important causes is the resistance of tumor cells to chemotherapy modulated, among other reasons, also by overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters [2].

The family of human ABC transporters comprises 48 proteins divided into seven subfamilies (ABCA to G) and transports a variety of physiological substrates and xenobiotics including anticancer drugs [3]. ABCB1/p-glycoprotein (OMIM: 171050) [4], ABCC1/multidrug resistance protein 1 (OMIM: 158343) [5], and ABCG2 (OMIM: 603756) [6] are the most studied mediators of resistance to anticancer drugs from this family. These transporters perform efflux of anticancer drugs from cancer cells across the membrane into the extracellular space, and thus they reduce the cytotoxic effect and confer drug resistance [3].

Current knowledge suggests that other ABC transporters are important for cancer biology (colorectal cancer [7];

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00280-016-3114-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ P. Soucek
pavel.soucek@lfp.cuni.cz

¹ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

² Department of Pathology, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

³ Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic

⁴ Department of Surgery, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

pancreatic cancer [8]; breast cancer [9]). Except drug transport, physiological roles, e.g., transport of cholesterol, fatty acids, and hormones, contribute to the mechanism of action of these transporters in cancer development and progression. Currently, the role of such transporters in tumorigenesis and tumor cell response to anticancer treatment needs precise elucidation with potential implication for the design of effective targeted therapies.

In the previous small-scale pilot study, we have found that intratumoral transcript levels of ABCC11 (OMIM: 607040) significantly associated with the response of colorectal cancer patients to palliative chemotherapy and with a disease-free interval (DFI) of patients treated by adjuvant chemotherapy [7]. Moreover, ABCC10 (OMIM: 612509) expression also associated with the grade of colorectal tumors.

The main goal of the present study was to validate on the protein level the previously suggested putative prognostic role of both ABC transporters for colorectal cancer patients. Thus, we determined the protein content of these markers in a larger cohort of colorectal cancer patients and compared it with the patient's DFI and overall survival (OS). The observed associations suggest the need for further functional studies on revealing the mechanism of action of these new targets.

Materials and methods

Patients

In total, archival formalin-fixed, paraffin-embedded samples from 140 patients with histologically confirmed diagnosis of colorectal carcinoma were retrospectively included in the study and clinical follow-up. All patients underwent surgery and oncological treatment at the Department of Surgery and Oncology, Faculty Hospital in Pilsen, between the years 2008 and 2011.

The following data on patients were retrieved from medical records: age, sex, date of diagnosis, date of surgery, tumor size, lymph node metastasis, clinical stage, histological type and grade, treatment regimen, and survival. Clinical characteristics of patients are described in Table 1. In patients treated with adjuvant therapy after radical surgical resection R0, the DFI served as a measure of the treatment outcome. Therefore, for the DFI analysis, just patients without distant metastases, i.e., those with complete tumor removal during surgery entered the analysis. The DFI was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection and disease recurrence or death. The OS was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection or start of palliative therapy and death from any cause.

Table 1 Clinical data of CRC patients included in this study

Characteristics	N = 140
Age (median ± SD)	67 ± 10
Gender	
Female	42
Male	98
UICC stage	
Stage 2	82
Stage 3	32
Stage 4	26
Tumor size	
pT2	6
pT3	116
pT4	18
Lymph node metastasis	
pN0	86
pN1	33
pN2	19
Not available	2
Distant metastasis	
cM0	114
cM1	26
Grade	
G1	21
G2	101
G3	16
Not available	2
Localization	
Colon	74
Rectosigmoideum	25
Rectum	41
Chemotherapy based on 5-fluorouracil	
Yes	76
No	64

The study protocol was approved by the Ethical Commission of the Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Pilsen, Czech Republic.

Immunohistochemical staining

Tissue for light microscopy was fixed in 4 % formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five-micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin. The immunohistochemical study was performed using Ventana Benchmark XT automated staining system (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ) with the following primary antibodies: ABCC10 (M7I-3, 1:10, Abcam, Cambridge, UK) and ABCC11 (M8I-74, 1:10, Abcam, Cambridge,

UK). Heat-induced epitope retrieval was performed, and buffer Dako Target Retrieval Solution pH 9.0 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) was used. Appropriate positive and negative control slides were employed. Quantitative estimates were done using stereological methods and the Ellipse software (ViDiTo, Košice, Slovakia) as previously established and described [10]. The detailed description of sampling of histological sections and microscopic image fields for the estimation of quantitative parameters (ABCC10 and ABCC11) of each tumor specimen ($n = 140$) in comparison with matched adjacent non-tumor tissues in subset of patients ($n = 30$) is presented in Supplementary Table S1.

Data analysis

All statistical analyses were performed using SPSS version 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences in protein content between groups of patients stratified by clinical data were assessed by the ANOVA and the Pearson tests. Receiver operator curve (ROC) analysis was performed for evaluation of the power of ABCC10 and

ABCC11 to discriminate the patients with different clinical features. For DFI analysis, protein content was divided by median and by the cutoff calculated using ROC analysis by the help of Cutoff Finder version 2.1 [11]. DFI was evaluated by the Kaplan–Meier method with the log-rank test used for comparison of subgroups of patients. Stage- and chemotherapy-adjusted analysis was performed by the Cox regression. All P values were calculated from two-sided tests. P values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Protein content (resp. area per area, dimensionless ratio) of ABCC10 and ABCC11 was assessed in formalin-fixed paraffin-embedded sections of 140 colorectal cancer patients (clinical data in Table 1). The representative results of the protein content assessment of both proteins in the analyzed samples are on Fig. 1.

The percentage of protein content in tumor components was $35.5 \pm 10.6 \%$ for ABCC10 and $36.7 \pm 11.4 \%$ for

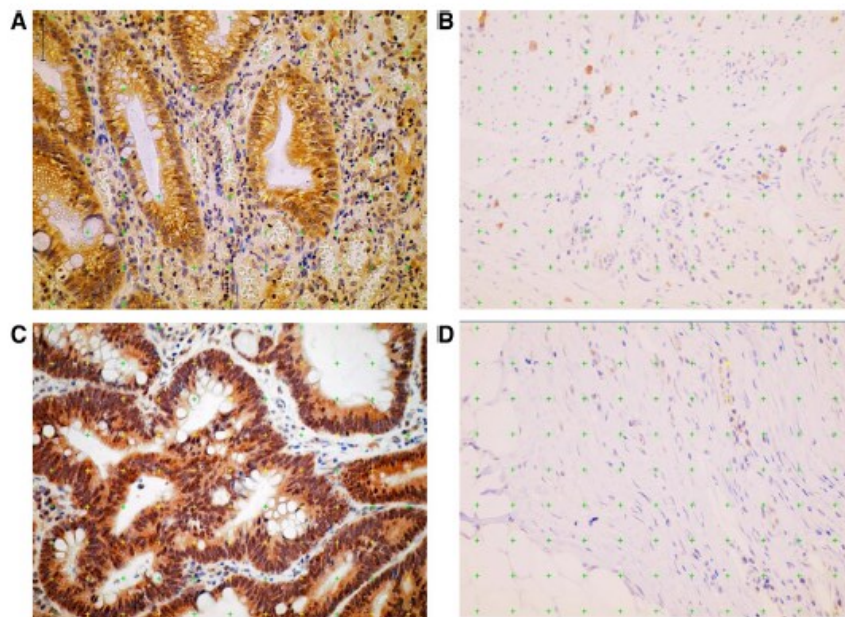


Fig. 1 Quantitative histopathology—immunohistochemistry of the ABCC transporters. The area fraction A_A of the ABCC10 and ABCC11 (separately) detected components was estimated by the method based on counting intersections of ABCC10 and ABCC11. Positive structures with stereological grids randomly superposed on the micrographs, counting points hitting the *highlighted* profiles are demonstrated as *yellow* crosses (non-hitting points green crosses). Points hitting the mentioned positive profiles (*yellow*) were counted. Their sum was then

multiplied by the area corresponding to each point. The reference area (total area sampled in each specimen) was determined in the same way. The relation between the area of ABCC positive structures and reference area was calculated. The figure demonstrates counting intersection of ABCC10 positive structures with stereological grid within the intestinal wall in colorectal cancer and its stroma (**a**) and in adjacent non-tumor tissues (**b**) and the same for ABCC11 (**c**—colorectal cancer and its stroma and **d**—adjacent non-tumor tissues). Scale bar 50 μ m

ABCC11 (mean \pm S.D., see Supplementary Figure S1 for value distribution). The percentage of protein content in a subset of matched adjacent non-tumor tissues was 6.4 ± 2.6 for ABCC10 and 6.2 ± 2.9 for ABCC11 ($n = 30$). Associations between clinical data and ABCC10 and ABCC11 content have been evaluated: no significant associations of ABCC10 or ABCC11 protein content with gender and age of the patients, tumor size (pT), presence of local (pN) and distant (cM) metastasis, tumor grade, and stage have been observed ($P > 0.05$). Suggestive association between the ABCC11 content and localization of the tumor ($P = 0.042$, higher content

in colon or sigma compared with rectum) was found. Such association was not observed for ABCC10 ($P = 0.229$).

For each clinical feature ROC curve analysis was also performed. The area under the curve (AUC) for prediction of poor prognosis factors (pT4, pN1, cM1, grade 3 or rectal tumor localization) together with ROC curves are in Supplementary Figure S2.

We then divided the patients into two groups according to the median of ABCC10 and ABCC11 content in sections for the survival analysis. Six patients lost to follow-up were excluded from the OS analysis. The analysis of the

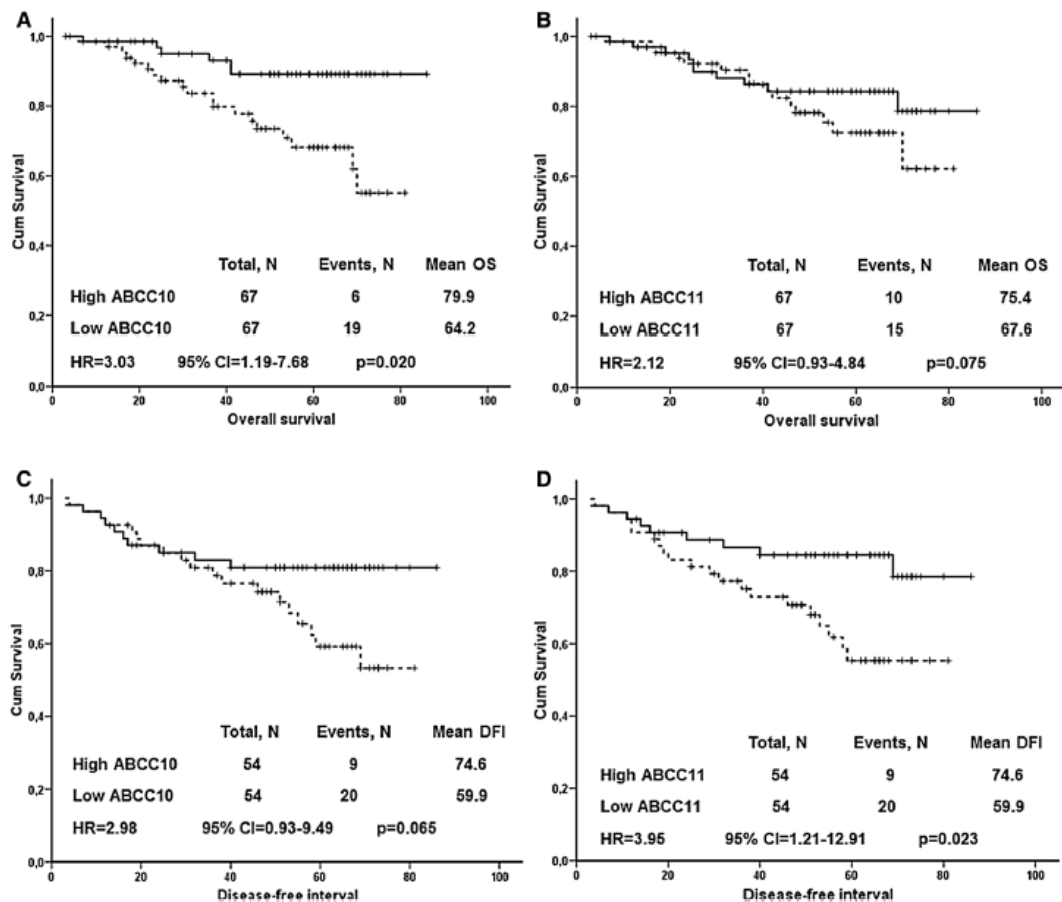


Fig. 2 Associations between ABCC10 and ABCC11 protein content and the survival of colorectal cancer patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the OS ($n = 134$) or the DFI ($n = 108$) of patients divided into two groups by the median of the intratumoral protein content of ABCC10 or ABCC11. Dashed line represents the group with lower protein content, solid line the group with higher protein content than the median. **a** Shows the results of analysis of

ABCC10 versus the OS and plot **b** that for ABCC11. **c** Shows the results of analysis of ABCC10 versus the DFI and plot **d** that for ABCC11. Differences between groups were compared using the log-rank test. HR hazard ratio and 95 % CI 95 % confidence intervals were calculated using the Cox regression adjusted for stage and chemotherapy

whole set ($n = 134$) has shown a significant association of the ABCC10 content with the OS of the patients ($P = 0.004$, Fig. 2a). On the other hand, the ABCC11 content did not associate with the OS ($P = 0.251$, Fig. 2b). Stage- and chemotherapy-adjusted analysis has confirmed these results (hazard ratios, 95 % confidence intervals, and P values are presented in the respective figures). Patients with lower than the median protein content of ABCC10 in their tumors had more than three times increased hazard ratio of death compared with high ABCC10-expressing ones ($P = 0.020$). The association of ABCC11 with the OS was suggestive, but nonsignificant ($P = 0.075$). The ABCC10 content did not associate

with the DFI ($n = 108$, $P = 0.075$, Fig. 2c). In contrast, the ABCC11 content significantly associated with the DFI of the patients ($P = 0.016$, Fig. 2d). The stage- and chemotherapy-adjusted DFI analysis confirmed this trend ($P = 0.065$ for ABCC10 and $P = 0.023$ for ABCC11). Patients with lower than the median protein content of ABCC11 in their tumors had almost four times increased hazard ratio of recurrence compared with high ABCC11-expressing ones.

Additionally to the median cutoff method, we applied ROC curve analysis to set optimal cutoff values considering the best sensitivity and specificity of both markers to discriminate prognosis of the patients based on their

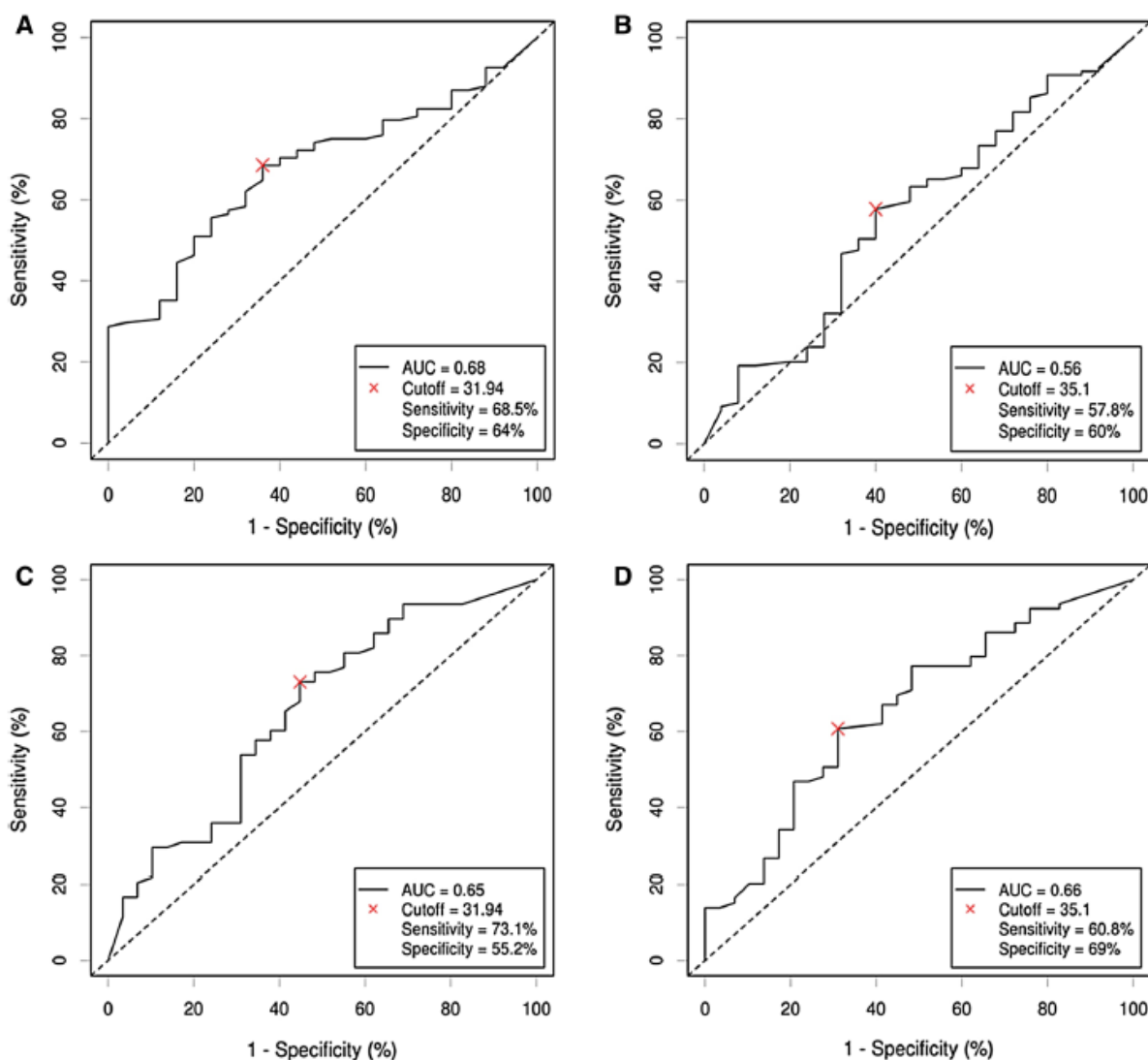


Fig. 3 ROC curves plotted for survival of patients using immunohistochemical protein expression of ABCC10 and ABCC11. ROC curves are plotted for the OS, according to ABCC10 (a) or ABCC11 (b)

expression and for the DFI according to ABCC10 (c) or ABCC11 (d) expression. *AUC* area under the curve. Crosses indicate the optimal cutoff point used for survival analysis

survival (Fig. 3). The analysis of the whole set has shown a significant association of the ABCC10 content with the OS of the patients (ABCC10, $P = 0.003$, Fig. 4a), but a lack of significance for ABCC11 ($P = 0.072$, Fig. 4b). In DFI analyses ($n = 108$), both the ABCC10 and ABCC11 content significantly associated with the DFI ($P = 0.012$, Fig. 4c for ABCC10 and $P = 0.005$, Fig. 4d for ABCC11). The stage- and chemotherapy-adjusted survival analysis confirmed these trends except association of ABCC11 expression with the OS ($P = 0.022$, Fig. 4b).

Stratified analyses of patients treated with regimens based on 5-fluorouracil have not revealed significant

associations of ABCC10 or ABCC11 content with the OS ($n = 78$, $P = 0.106$ and $P = 0.059$, respectively) and ABCC10 with the DFI ($n = 50$, $P = 0.143$). However, the association of ABCC11 content with the DFI was significant ($P = 0.024$). Patients with low ABCC11 content had poorer DFI than those with higher content. The ROC analysis (Supplementary Figure S3) suggested, that ABCC10 ($P = 0.021$, Fig. 5a), but not ABCC11 expression significantly associate with the OS ($P = 0.059$, Fig. 5b). On the other hand, both ABCC10 and ABCC11 content significantly associated with the DFI of 5-fluorouracil-treated patients ($P = 0.010$ and $P = 0.005$, respectively, Fig. 5c, d).

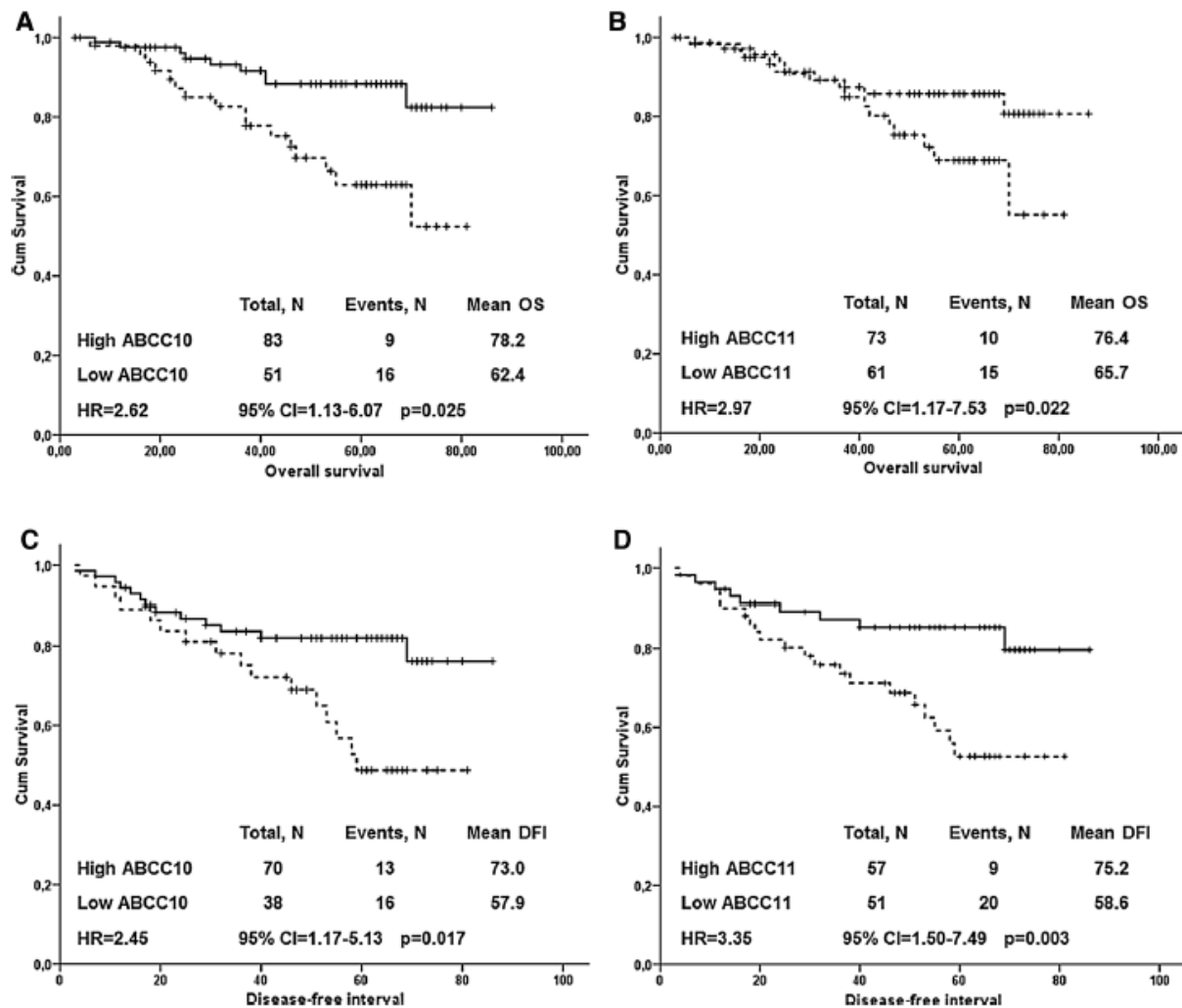


Fig. 4 Associations between ABCC10 and ABCC11 protein content and the survival of colorectal cancer patients based on ROC analysis. Kaplan–Meier survival curves were plotted for patients divided into two groups by the cutoff showed in Fig. 3. *Dashed line* represents the group with lower protein content, *solid line* the group with higher protein content than the cutoff. OS analysis is presented for ABCC10

(a) and ABCC11 (b). DFI analysis is presented for ABCC10 (c) and ABCC11 (d). Differences between groups were compared using the log-rank test. *HR* hazard ratio and *95 % CI* 95 % confidence intervals were calculated using the Cox regression adjusted for stage and chemotherapy

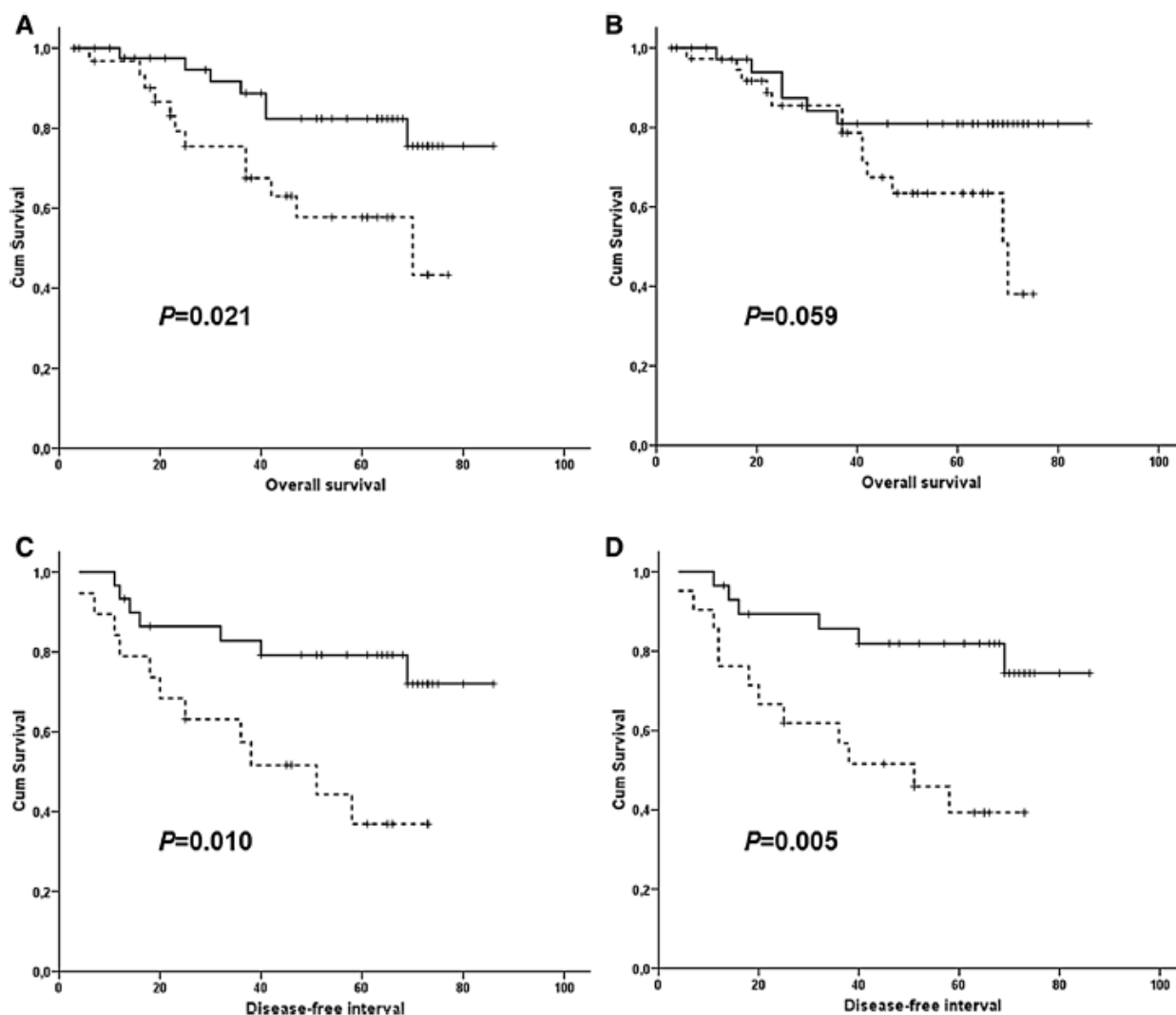


Fig. 5 Associations between ABCC10 and ABCC11 protein content and the survival of 5-fluorouracil-treated subgroups of colorectal cancer patients based on ROC analysis. Kaplan–Meier survival curves were plotted for the OS ($n = 76$) or DFI ($n = 50$) of patients divided into two groups by the cutoff (ROC analysis in Supplementary Figure S3). *Dashed line* represents the

group with lower protein content, *solid line* the group with higher protein content than the cutoff. OS analysis is presented for ABCC10 (**a**) and ABCC11 (**b**). DFI analysis is presented for ABCC10 (**c**) and ABCC11 (**d**). Differences between groups were compared using the log-rank test. Adjusted analysis was not performed due to the low numbers of patients in the compared groups

Discussion

Based on the previously observed associations of transcript levels of two less often studied ABC transporters with clinical factors of colorectal cancer [7], we analyzed the prognostic significance of their protein content in a larger study. Our data clearly show that protein expression of ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients.

The association of low ABCC10 protein content with shorter OS of colorectal cancer patients observed in the present study suggests that the low ABCC10 expression

presents a poor prognosis factor. ABCC10 discovered 15 years ago [12] is upregulated in pancreatic adenocarcinoma and its transcript level is significantly lower in tumors with angiogenesis (i.e., with worse prognosis) compared to those without it [8]. Prognostic power of ABCC10 transcript expression (together with that of ABCB6 and ABCC3) for prostatic cancer progression was recently demonstrated [13]. ABCC10 protein modulates tumor resistance to taxanes, e.g., docetaxel [14], and nucleoside analogs such as gemcitabine [15]. The present study brings discrepant data about the role of 5-fluorouracil-based treatment in the prognostic meaning of ABCC10. ABCC10 protein level

significantly associated with both OS and DFI when evaluated using the cutoff set by ROC analysis, but remained insignificant in analyses by the median expression levels. This controversy could be due to the sample size effect.

ABCC11 expression did not associate with the OS, but with the DFI in analysis based on both ROC cutoff and median levels. ABCC11 (first reported by Bera et al. [16]) is able to efflux nucleoside analogs [17] and confers resistance to 5-fluorouracil in vitro [18]. Immunohistochemically detected protein overexpression of ABCC11 demonstrated in the most aggressive HER2+ and triple-negative tumor subtypes of breast cancer was significantly associated with worse disease-free survival of patients [19]. A novel functional *ABCC11* allele (c.1637C > T; T546M), previously associated with 5-fluorouracil toxicity [20] was recently identified in silico and confirmed in vitro. This alteration is frequent among European and American populations with major allele frequency exceeding 10 % [21]. The present association between ABCC11 protein expression and the DFI of colorectal cancer patients thus brings another interesting evidence for the putative prognostic role of this transporter.

Despite both transporters are known to perform outward transport of nucleoside analogs used for the treatment of colorectal cancer, their associations with survival observed in the present study were not affected by the adjustment to stage and chemotherapy. The DFI of 5-fluorouracil-treated patients was significantly modified by the ABCC11 (and by ABCC10 only in ROC analysis) protein expression. However, the direction of the association had opposite trend, i.e., low expression and presumably lower efflux was found in patients with poor DFI suggesting that this interaction is likely not functional in terms of 5-fluorouracil treatment. The present study is the first one addressing this point in colorectal cancer patients. Although protein expression of both transporters was not predictive for 5-fluorouracil-based treatment here, follow-up studies in larger patient cohorts shall decisively answer this question.

We are aware of some limitations of our study. First, the sample size may be seen as one of the study limitations. Second, we cannot offer precise mechanistic explanation for the observed complex prognostic role of both transporters in colorectal cancer tissue. Third, our quantification used two-dimensional sections only. It is necessary to conduct next studies to confirm present results.

Taken together, our results present the first indication about the prognostic role of ABCC10 and ABCC11 transporters in colorectal cancer that needs further validation and functional analysis.

Acknowledgments This work was supported by projects of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, No.: NT14329-3 (to V.L.), the Czech Science Foundation No.: P303/12/G163 (to

P.S.), the National Sustainability Program I (NPU I) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic, no.: LO1503 (to V.L. and P.S.).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108
2. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR Jr et al (2015) The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat* 18:1–17
3. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ et al (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 10:147–156
4. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152–162
5. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH et al (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650–1654
6. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV et al (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15665–15670
7. Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R et al (2012) The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 27:187–196
8. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Oliverius M et al (2013) Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and non-neoplastic tissues. *Pancreas* 42:707–716
9. Hlavac V, Brynychova V, Vaclavikova R et al (2013) The expression profile of ABC transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14:515–529
10. Tonar Z, Witter K, Krizkova V et al (2010) Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. In: Méndez-Vilas A, Díaz J (eds) *Microscopy: science, technology, applications and education. applications in biology and medicine*. Formatex Research Centre, Badajoz, 926–935
11. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV et al (2012) Cutoff finder: a comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS ONE* 7:e51862
12. Hopper E, Belinsky MG, Zeng H et al (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* 162:181–191
13. Karatas OF, Guzel E, Duz MB et al (2016) The role of ATP-binding cassette transporter genes in the progression of prostate cancer. *Prostate* 76:434–444
14. Chen Z-S, Hopper-Borge E, Belinsky MG et al (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 63:351–358
15. Hopper-Borge E, Xu X, Shen T et al (2009) Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res* 69:178–184
16. Bera TK, Lee S, Salvatore G et al (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med* 7:509–516

17. Turriziani O, Schuetz JD, Focher F et al (2002) Impaired 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine accumulation in T-lymphoblastoid cells as a mechanism of acquired resistance independent of multidrug resistant protein 4 with a possible role for ATP-binding cassette C11. *Biochem J* 368:325–332
18. Oguri T, Bessho Y, Achiwa H et al (2007) MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol Cancer Ther* 6:122–127
19. Yamada A, Ishikawa T, Ota I et al (2013) High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 137:773–782
20. Magdy T, Arlanov R, Winter S et al (2013) ABCC11/MRP8 polymorphisms affect 5-fluorouracil-induced severe toxicity and hepatic expression. *Pharmacogenomics* 14:1433–1448
21. Arlanov R, Lang T, Jedlitschky G et al (2016) Functional characterization of common protein variants in the efflux transporter ABCC11 and identification of T546 M as functionally damaging variant. *Pharmacogenomics J* 16:193–201

KOŘENKOVÁ, V., J. SLYŠKOVÁ, V. NOVOSADOVÁ, S. PIZZAMIGLIO, L. LANGEROVÁ, J. BJORKMAN, O. VYČÍTAL, V. LIŠKA, M. LEVÝ, K. VEŠKRNA, P. VODIČKA, L. VODIČKOVÁ, M. KUBIŠTA a P. VEDERIO. The focus on sample quality: Influence of colon tissue collection on reliability of qPCR data. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6, 29023 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1038/srep29023. ISSN 2045-2322. IF 5,228.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The focus on sample quality: Influence of colon tissue collection on reliability of qPCR data

Received: 27 January 2016
Accepted: 14 June 2016
Published: 07 July 2016

Vlasta Korenkova¹, Jana Slyskova², Vendula Novosadova¹, Sara Pizzamiglio³, Lucie Langerova¹, Jens Bjorkman⁴, Ondrej Vycital^{5,6}, Vaclav Liska^{5,6}, Miroslav Levy⁷, Karel Veskrna⁷, Pavel Vodicka^{2,6,8}, Ludmila Vodickova^{2,6,8}, Mikael Kubista^{1,4} & Paolo Verderio³

Successful molecular analyses of human solid tissues require intact biological material with well-preserved nucleic acids, proteins, and other cell structures. Pre-analytical handling, comprising of the collection of material at the operating theatre, is among the first critical steps that influence sample quality. The aim of this study was to compare the experimental outcomes obtained from samples collected and stored by the conventional means of snap freezing and by PAXgene Tissue System (Qiagen). These approaches were evaluated by measuring rRNA and mRNA integrity of the samples (RNA Quality Indicator and Differential Amplification Method) and by gene expression profiling. The collection procedures of the biological material were implemented in two hospitals during colon cancer surgery in order to identify the impact of the collection method on the experimental outcome. Our study shows that the pre-analytical sample handling has a significant effect on the quality of RNA and on the variability of qPCR data. PAXgene collection mode proved to be more easily implemented in the operating room and moreover the quality of RNA obtained from human colon tissues by this method is superior to the one obtained by snap freezing.

Significant effort and funding¹ are used for the discovery of novel biomarkers and biomarker profiles that play important roles in detecting or predicting specific diseases as well as increasing our understanding of disease mechanisms. Validated biomarkers can reveal a disease from its earliest manifestation and reflect its propagation to the terminal stage in individual patients. This could be most valuable for personalized therapy^{2,3}. Recent advances in genomics, transcriptomics, proteomics, and other -omics allowed us to generate many more candidate biomarkers than ever before. However, it was shown that published biomarker candidates often show poor reproducibility if tested by different laboratories on patients samples from different clinics⁴⁻⁶ or if they are tested in large scales by pharmaceutical companies. This has triggered efforts for the proper standardization and control of the entire experimental process to minimize the effects of variables that introduce bias and confounding variation⁷.

Experimental measurements based on quantitative analyses, such as gene expression analyses, inevitably require accurate preservation of analysed samples to be able to obtain high quality data. A technical variability in the gene expression measurements can be introduced during different phases of the experimental process. The phases are classified as pre-analytical, analytical, and post-analytical⁸. The pre-analytical phase is defined as "steps starting in chronological order, from the clinician's request including the examination requisition, a preparation of the patient, a collection of the primary sample, the transportation to and within the laboratory, which ends when the analytical examination procedure begins", according to ISO 15189:2012. The analytical phase comprises steps of workflow starting in the laboratory and producing measured results. Post-analytical phase is the analysis of obtained results. In recent years, quality assurance tools for improvement of the mainly analytical phase of

¹Institute of Biotechnology, BIOCEV Centre, Czech Academy of Sciences, Průmyslová 595, 252 42, Vestec u Prahy, Czech Republic. ²Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic. ³Unit of Medical Statistics, Biometry and Bioinformatics, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy. ⁴TATAA Biocenter AB, Göteborg, Sweden. ⁵Department of Surgery, Teaching Hospital and Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic. ⁶Biomedical Centre, Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic. ⁷Surgical Department, Thomayer Hospital, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ⁸Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.K. (email: Vlasta.korenkova@ibt.cas.cz)

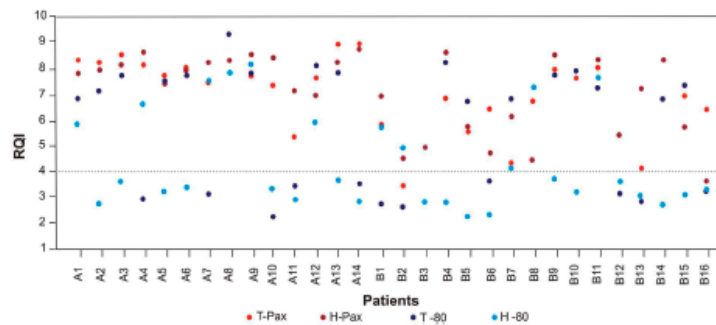


Figure 1. Scatter plot of RQI values measured for each patient, each type of sample and each type of collection method. T-PAX: tumour tissue collected in the PAXgene Tissue System, H-PAX: healthy adjacent tissue collected in the PAXgene Tissue System, T –80: tumour tissue that was frozen, H –80: healthy adjacent tissue that was frozen.

qPCR experiments have been developed and are described very well in detail in the MIQE guidelines⁹. Because of this, the quality and transparency of the laboratory results have been improved considerably⁷.

Most of the errors are introduced during the pre-analytical phase^{10,11}. Despite the long-known influence of the pre-analytical phase on the quality of results, it is rarely stringently controlled. One reason is that it occurs outside of the laboratory, usually beyond the control of laboratory personnel. The quality of the sample is already influenced at the operating theatre during the warm and cold ischemia. The warm ischemia is the time between surgical incision and tumour specimen removal¹², which can trigger the cellular stress response^{13,14}. Time between tissue removal and its storage, called cold ischemia, should also be minimized because tumour specimen manipulation and storage can both affect the quality of RNA¹⁵ and can distort the gene expression pattern that is associated with a disease condition within minutes^{16,17}. For this reason, it is recommended to keep the cold ischemic time short, about 30 minutes maximally¹⁸. Apart from warm and cold ischemia, there are other sources of possible variability outside the operation theatre, which have been described previously. Among them: the transport of the samples to the laboratory¹⁹, long-term storage^{20,21} or thawing and refreezing of the samples²².

Here, we focus on the first part of pre-analytical phase: tissue collection and fixation. A common way to protect the sample is by snap-freezing in liquid nitrogen. Snap-frozen tissue specimens are considered high quality material for molecular analyses and are also preferred for conserving tissue morphology. However, snap-freezing during surgery is complicated since it requires access to liquid nitrogen at the operational theatre. This might not be allowed in some places. An alternative is using a fixative that can be used at room temperature. One option is the PAXgene Tissue System, which is based on usage of the solution that rapidly penetrates and fixes tissue. This technology is compatible with molecular studies in a single sample together with histopathological analyses²³. The quality of RNA in such preserved tissues is comparable with fresh-frozen tissue and the histology is similar to the one obtained by formalin-fixed paraffin-embedded fixation²⁴.

Here, we evaluated the experimental outcomes obtained from samples collected by the conventional snap-freezing and by the new PAXgene Tissue System in two different hospitals.

Results

Influence of tissue collection on RNA quality. *Evaluation of RNA integrity by RNA Quality Indicator (RQI).* The quality of the extracted RNA from all patient samples (see description of samples in the Methods) was determined by RNA Quality Indicator (RQI), which is the method providing integrity measurements of rRNA (28S and 18S region) scaled from 1 to 10²⁵ (Supplementary Figures 1–11). It has been described that samples with RNA integrity score higher than 4 reach the quality required for qRT-PCR analysis, while those with RNA integrity score lower than 4 can be applied for amplification of short regions only²⁰. Based on this, RQI of 4 was artificially set as a quality borderline value.

Figure 1 shows a scatter plot of RQI values for each patient, each type of sample (tumour or adjacent healthy tissue) and each type of collection (PAXgene Tissue System fixation or freezing). Seven patients had all 4 samples (tumour PAXgene, tumour freezing, healthy tissue PAXgene, healthy tissue freezing) with a RQI value > 4: 4 from hospital A and 3 from hospital B. All samples (tumour and normal tissue) received from all 14 patients (100%) from hospital A and fixed with PAXgene Tissue System had RQI > 4, while only 4 patients out of 14 (29%) had both paired samples with RQI > 4 when snap-frozen. In hospital B, 12 out of 16 patients (75%) reached RQI > 4 for both tissues when fixed with PAXgene system, and only for 3 patients out of 16 (19%) the quality of frozen paired samples was above the borderline value.

Descriptive statistics of RQI values according to the hospital, the tissue type and the type of collection are listed in Table 1. Box plots (Fig. 2) represent visualizations of distribution among different collection methods for each tissue type in two hospitals. The highest RQI values (means and medians) were obtained from hospital A using PAXgene Tissue System. According to the non-parametric Wilcoxon Signed Rank Test, no significant difference in RQI values was observed between colon cancer tissues and matched adjacent healthy tissues, no matter what preservation mode was used: PAXgene Tissue System in hospital A p-value = 0.47 (n = 14 pairs), PAXgene Tissue System in hospital B p-value = 0.33 (n = 16 pairs), snap-freezing in hospital A p-value = 0.12

Hospital	Collection mode	Status of tissue	Num. of samples	Mean RQI	STD	maximum	median	minimum	IQR
A	PAXgene Tissue System	healthy	14	8.0	0.6	8.7	8.2	6.9	0.6
		tumour	14	7.8	0.9	8.9	7.9	5.3	0.7
	Snap-freezing	healthy	14	4.8	2.0	8.1	3.6	2.7	3.4
		tumour	14	6.1	2.4	9.3	7.3	2.2	4.4
B	PAXgene Tissue System	healthy	16	6.3	1.7	8.6	5.9	3.6	3.3
		tumour	16	6.0	1.8	8.3	6.4	2.9	3.1
	Freezing	healthy	16	3.9	1.6	7.6	3.3	2.2	1.6
		tumour	16	5.4	2.3	8.2	6.8	2.6	4.3

Table 1. Descriptive statistics for RQI values according to the hospital, the tissue type and the mean of collection. STD: standard deviation, IQR: interquartile range.

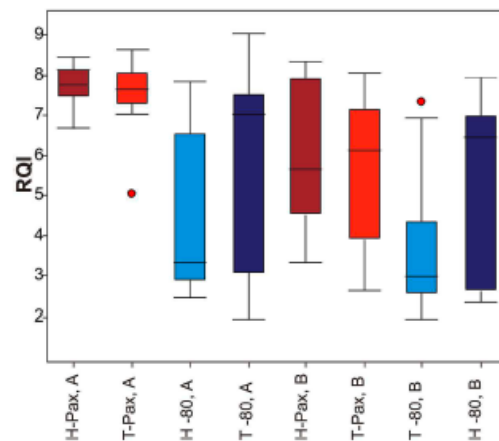


Figure 2. Box plots for the distribution of RQI values divided according to the hospital, the tissue type and the collection method. Box plots represent median and interquartile range. Bars represent the highest and the lowest value excluding outliers, depicted by the dots.

($n = 14$ pairs), immediate freezing in hospital B p -value = 0.11 ($n = 16$ pairs). However, in both hospitals the median and mean of RQI values are higher in tumour samples compared to healthy tissue if samples were frozen (Table 1, Fig. 2).

Within each hospital, RQI values of samples which were frozen versus RQI values of samples collected in PAXgene Tissue System were compared by considering both tumor and adjacent healthy tissues (Fig. 2). According to the non-parametric Wilcoxon Signed Rank Test, a statistical significant p -value in both hospitals was obtained (hospital A p -value: < 0.0001 and hospital B p -value: 0.0007), indicating difference in RQI values between collection methods. In hospital A, the median values increased from RQI = 5.85 of frozen samples (IQR = 4.45, $n = 28$) to RQI = 8.05 of samples fixed in PAXgene Tissue System (IQR = 0.7, $n = 28$). In hospital B, the median values increased from RQI = 3.6 of frozen samples (IQR = 4.15, $n = 32$) to RQI = 6.25 of samples fixed in PAXgene Tissue System (IQR = 3.15, $n = 32$). The yield, purity and quality of each sample using each stabilization method are given in Supplementary Table 1.

Evaluation of mRNA integrity using Differential Amplicon Assays. Integrity of mRNA was measured by Differential Amplicon Assay (Δ AMP) approach, which is an independent measure of mRNA quality²⁶. The method is based on using paired qPCR assays that produce amplicons of different length (long and short) from the same target. If mRNA is intact, both Cq values should be very similar, if mRNA is degraded then Δ AMP > 0 . Acceptable quality of our samples were set to be Δ AMP ≤ 1.0 .

Nineteen patients had all 4 samples (tumour PAXgene, tumour freezing, healthy tissue PAXgene, healthy tissue freezing) with Δ AMP ≤ 1.0 : 11 from hospital A and 8 from hospital B, irrespectively on tissue type and collection method. All patients (14/14) from hospital A had both paired samples (tumour and adjacent healthy tissue) collected in PAXgene Tissue System with a Δ AMP ≤ 1.0 , while 10 patients out of 14 (71%) had both paired samples that were snap-frozen with a Δ AMP ≤ 1.0 (Fig. 3a). Eighty one percent of patients (13/16) from hospital B had both paired samples collected in PAXgene Tissue System with a Δ AMP ≤ 1.0 while 10 patients out of 16 (63%) had both paired samples that were immediately frozen with a Δ AMP ≤ 1.0 (Fig. 3b). Interestingly, several samples with low RQI values (< 4) that would be doomed for any regular downstream analysis had Δ AMP ≤ 1.0 (10/28 = 36% collected by snap-freezing, hospital A); 9 samples out of 32 (28%) that were immediately frozen

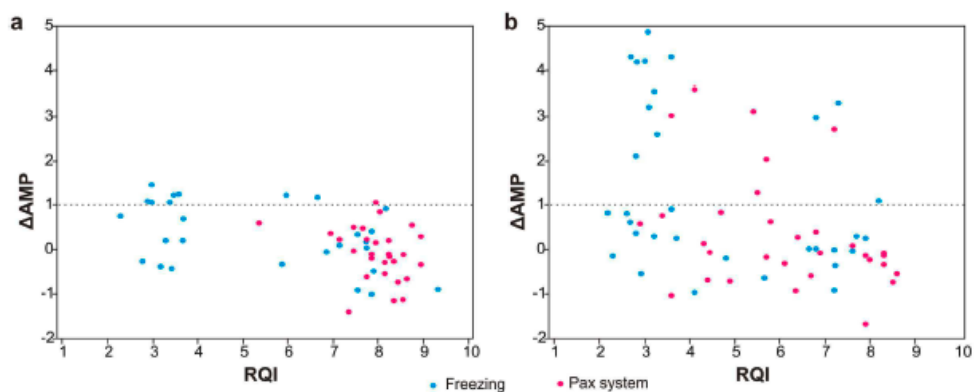


Figure 3. The quality of mRNA determined by Δ AMP assays. Acceptable quality is below Δ Cq= 1. (a) Samples collected in hospital A. (b) Samples collected in hospital B.

from hospital B and 3 samples out of 32 (9%) collected in PAXgene Tissue System in hospital B. On the contrary, a few samples that would pass quality control with $RQI > 4$ had Δ AMP > 1.0 : 2 samples out of 28 (7%) collected by snap-freezing in hospital A, 2 samples out of 32 (6%) that were immediately frozen in hospital B and 5 samples out of 32 (16%) collected in PAXgene System in hospital B. The scatter plots showing the integrity of RNA of the tissue samples determined by both quality indexes are plotted in Fig. 3a,b. Spearman's correlation coefficient between the two quality indexes (RQI and Δ AMP) was low, -0.46 (95% CI: -0.64 ; -0.22) in Hospital A and -0.43 (95% CI: -0.61 ; 0.20) in Hospital B. However, using the arbitrary classification according to the cut-off values (≥ 4 for RQI and ≤ 1 for Δ AMP), all samples collected in hospital A using PAXgene Tissue System passed a good quality criteria with both indexes.

In agreement with RQI evaluation, no significant difference in mRNA integrity measured by Δ AMP values was observed between colon cancer tissues and matched adjacent healthy tissues, no matter what preservation mode was used according to the non-parametric Wilcoxon Signed Rank Test: PAXgene Tissue System in hospital A p-value = 0.39 (n = 14 pairs), PAXgene Tissue System in hospital B p-value = 0.25 (n = 16 pairs), snap-freezing in hospital A p-value = 0.80 (n = 14 pairs), immediate freezing in B p-value = 0.32 (n = 16 pairs). The influence of the collection method on RNA quality was significant in both hospitals by considering both tumour and normal samples (Wilcoxon Signed Rank Test p-value = 0.03 in hospital A and p-value = 0.005 in hospital B). The median Δ AMP indicated an improvement in mRNA quality in samples collected in PAXgene Tissue system (median Δ AMP = -0.13 in hospital A and -0.15 in hospital B) with respect to the samples that were frozen (median Δ AMP = 0.14 hospital A and 0.41 in hospital B).

Influence of tissue collection on stability of gene expression patterns. *Evaluation of gene expression by single gene analysis.* All tested samples of tumours and adjacent healthy tissue from 30 patients (16 from hospital B and 14 from hospital A) were subjected to gene expression profiling using the high-throughput qPCR instrument BioMark (Fluidigm) with 13 already pre-selected assays measuring levels of DNA repair gene expression in the tissue of interest that were normalized with 2 reference genes *TOP1* and *18S* to obtain Δ Cq values. The selected transcripts are able to form expression profiles that can distinguish tumour tissue from healthy tissue²⁷.

To evaluate impact of tissue collection method on expression profile of 13 individual normalized genes to distinguish tumour tissue from healthy tissue, the computation of the percentile bootstrap simultaneous confidence interval (SCI) for the Δ Cq value of each gene (Δ Cq tumour $-$ Δ Cq healthy tissue) was performed²⁸. If the intervals contain zero the expression of the specific gene is not different between tumour and normal tissue sample. The results are depicted in Fig. 4a–d.

We observed that in hospital A, there were 2 genes (*NEIL1* and *XPA*) with differential expressions (tumour versus healthy adjacent tissue) collected in PAXgene Tissue System. In the same hospital, significantly different expressions between matched tumour and healthy adjacent tissues were observed for 6 genes (*APEX1*, *DDB1*, *ERCC1*, *NEIL1*, *PARP1*, *RPA2*) after snap freezing collection. In hospital B, gene expression profile differed slightly from expression profiles from hospital A because of the different set of patients. Seven genes out of 13 (*CCNH*, *ERCC2*, *ERCC6*, *NEIL1*, *OGG1*, *RPA1*, *XPA*) had a significantly different expression in tumour versus normal tissue stored in PAXgene Tissue System. Whereas in the matched samples that were immediately frozen, no significantly different expression was measured, probably because of not optimal treatment of the specimens. In addition, by considering the width of the 95% SCI reported in Fig. 4a–d, a higher variability of gene expression for frozen samples (median width of the 95% SCI for hospital A = 0.88 and for hospital B = 1.36) emerges with respect to those collected in PAXgene Tissue System (median width of the 95% SCI for hospital A = 0.49 and for hospital B = 0.37) especially for hospital B. The gene expression pattern is similar for both collection methods in either hospital, respectively (Fig. 5).

Evaluation of gene expression using multigene expression patterns. All normalized gene expression data (Δ Cq) were subjected to discriminant analysis to find out if the gene expression profiles from different hospitals with samples collected under different conditions are able to discriminate tumour tissue from healthy tissue. The

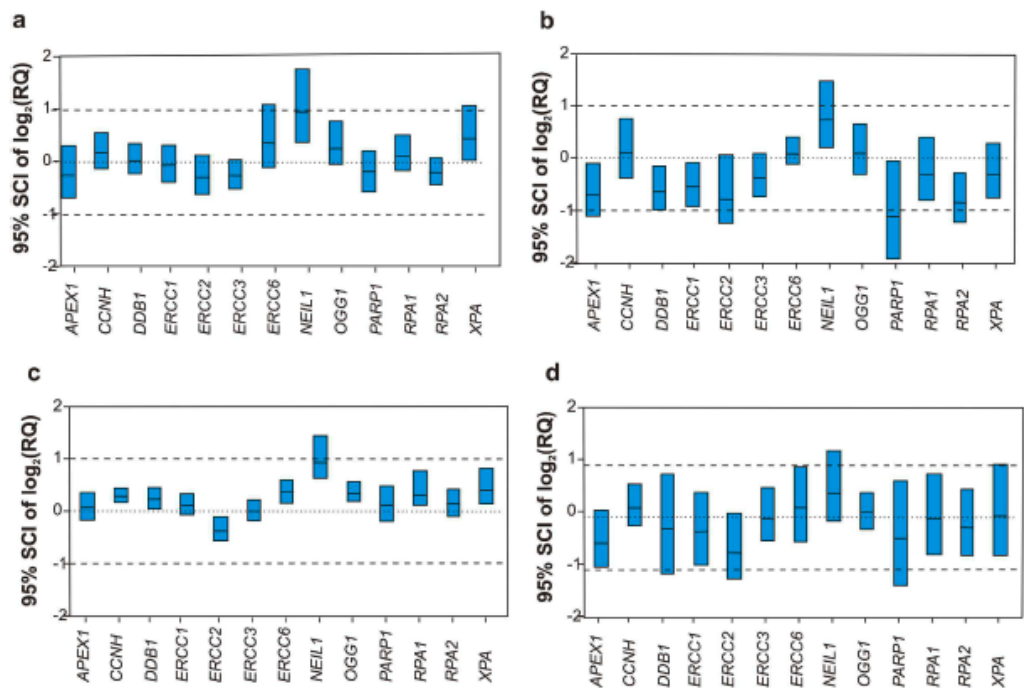


Figure 4. The Simultaneous Confidence Interval (SCI) of the differential expression ($\Delta\Delta Cq$) of each gene in tumour tissue with respect to healthy tissue. (a) PAXgene Tissue System, hospital A, (b). Snap-freezing, hospital A, (c). PAXgene Tissue System, hospital B, (d). Immediate freezing, hospital B.

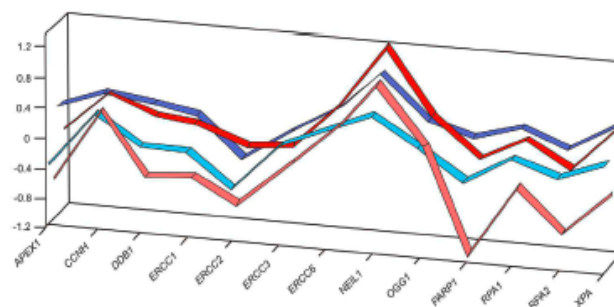


Figure 5. Mean gene expression ($\Delta\Delta Cq$) of differential profiles obtained from both hospitals and both collection methods, respectively, with all tissue samples. Dark red: collection to PAXgene Tissue System in hospital A, light red: snap-freezing in hospital A, dark blue: collection to PAXgene Tissue System in hospital B, light blue: immediate freezing in hospital B.

analysis showed clear and significant discrimination for samples collected into PAXgene Tissue System in both hospitals A and B (p-value = 0.0021, n = 28 and p-value = 0.0017, n = 32) and for snap-freezing method in hospital A (p-value = 0.0016, n = 28). The immediate freezing in hospital B was not appropriate method to maintain stable gene expression profile that would discriminate tumour tissue from healthy tissue (p-value = 0.19, n = 32) (Fig. 6a–d).

The Squared Mahalanobis Distance (SMD)²⁹ was used to assess if removing the samples of lower quality ($\Delta\Delta MP > 1.0$ or RQI < 4) will influence the discrimination ability of tumour tissue samples versus healthy tissue samples. The higher is the value of the SMD, more higher is the discriminatory capability. As worse quality samples were observed mainly with snap-frozen method and with this method specimens were correctly collected only in hospital A, we selected for this evaluation only snap-frozen samples from hospital A. As expected, after removal of $\Delta\Delta MP > 1.0$ or RQI < 4 data, the SMD increased. More specifically, SMD between tumor and healthy tissues with all samples was 18.9 (n = 28), after removing samples with of $\Delta\Delta MP > 1.0$ it increased to 24.2 (n = 24) and when only samples with RQI < 4 were removed the SMD increased to 49.5 (n = 15). It means that the best discrimination was observed when the worse quality samples were excluded according to RQI. On the other hand, if $\Delta\Delta MP$ method was performed to identify worse quality samples, less samples had been removed out of multivariate gene expression analysis in order to improve overall discrimination between tumour and healthy tissues.

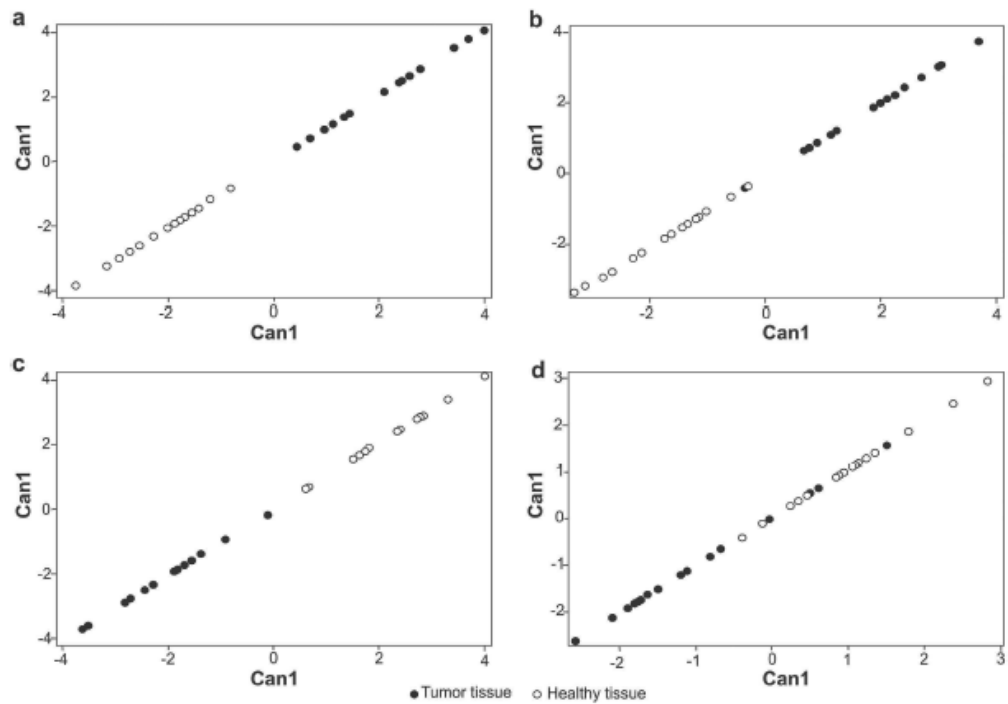


Figure 6. Discriminant analysis of the tumour (black) and the adjacent healthy tissue samples (white). (a) Samples collected in hospital A in the PAXgene Tissue System. (b) Samples collected in hospital B in the PAXgene Tissue System. (c) Samples collected by snap-freezing in hospital A. (d) Samples collected by immediate freezing in hospital B. Can1: the first canonical variable – the linear combination of all genes that provides the greatest difference between class means.

Discussion

In this study we evaluated the effect of tissue preservation methods using PAXgene Tissue System and snap-freezing in clinical settings. Our aim was to compare the quality of RNA and gene expression patterns obtained from paired tumour tissue and adjacent healthy colon human tissue from one hospital A and compare our findings with the data from the second hospital B where conditions of collection were not optimal (collection protocols were not exactly followed).

First, the quality of obtained specimens was determined by measurements of RNA integrity using two methods: RNA Quality Index (RQI)²⁵ and Differential Amplification (Δ AMP)²⁶. RQI or equivalent indexes as RIN (RNA Integrity Number)³⁰ reflect the integrity of the dominant ribosomal RNA, which makes up about 85% of the total RNA amount. rRNAs are chemically and structurally different from mRNA and thus differently respond to different degrading agents and consequently to different treatments³¹. Moreover, degraded samples show larger variation and substantial uncertainty below integrity number 5²⁶.

In order to complete the whole picture, the integrity of mRNA using Δ AMP was measured²⁶. The principle of Δ AMP is based on the evaluation of the ratio of paired amplicons of different length amplified from the same target. If mRNA is intact, Cqs of both assays are the same, while for degraded RNA, Cq of the longer amplicon is higher due to the lower yield³¹. This method should reflect changes caused by mRNA degradation more sensitively than RQI evaluation. All samples collected by hospital staff into PAXgene Tissue System in the hospital A, exactly according to the protocol, displayed a good integrity of RNA, it means Δ AMP \leq 1.0, RQI $>$ 4, and the highest RQI values: median RQI = 8.2 in healthy tissue samples and median RQI = 7.9 in tumour tissue samples. In the hospital B, where the PAXgene collection protocol was partially modified, about a quarter of paired samples did not pass quality criteria and the mean RQI values were lower than in hospital A: median RQI = 5.9 in healthy tissue samples and mean RQI = 6.4 in tumour tissue samples. The RQI of our samples collected in PAXgene Tissue System are comparable to the values published in literature for a snap-frozen tissue. For example, mean RQI for snap-frozen human colon tissues was about 7.7 or mean RIN (RNA integrity number) about 7.2³². In another example, the mean RIN value of 7.5 was recorded in human colon samples that were snap frozen within 10 minutes after extraction, 30 minutes after extraction mean RIN was 6.7, and 90 minutes after extraction mean RIN dropped to 4.2¹⁵. If we compared our PAXgene results with published integrity numbers for snap-frozen tissues, then we would comply with the conclusions of the comparative study of Viertler *et al.*²³, who determined that PAXgene-fixed rat liver and kidney tissues provided RNA quantity and quality similar to that from snap-frozen tissue in the laboratory conditions. However, the quality of our RNA isolated from the human colon tissues that were immediately frozen after extraction, was significantly worse than the quality of our matched samples collected in PAXgene Tissue System. Tissue samples collected by snap-freezing in hospital A, exactly according to the protocol, had median RQI = 3.6 in healthy tissue samples and median RQI = 7.3 in

tumour tissue samples. Quality criteria were not fulfilled for almost 3/4 of paired samples (at least one sample from the pair was under the quality criteria). The RNA with the worst quality was isolated from the frozen samples from hospital B. The deviation of protocol was the most substantial. Samples were not snap-frozen, instead they were immediately inserted in -80°C freezer. This kind of immediate freezing is actually a slow freezing process. During this process, the core of the larger sample freeze later compared to outer surfaces, which may lead to variation in RNA quality in different parts of the sample^{19,33}. Healthy tissue samples, collected by this mean in the hospital B, had mean RQI = 3.3 and tumour tissue samples exhibited mean RQI = 6.8. More than 3/4 quarters of paired samples did not pass RQI or ΔAMP quality criteria.

We further observed that there was no significant difference between integrity (RQI and ΔAMP) of RNA isolated from tumour tissues and adjacent healthy tissues using either collection method. Specifically, when samples were snap-frozen or immediately frozen, RNA integrity of adjacent healthy tissues was lower than in tumour tissues, which is in partial agreement with previous finding of Bao²⁰, who described these differences as significant because of the different composition of tumour and healthy tissue. If PAXgene Tissue System was applied, the median integrity values for both tissues were almost identical. This indicates the rapid and efficient biomolecule preservation with the PAXgene fixative solution. The similar observation was made previously using another type of fixative RNA Later RNA Stabilization Reagent during collection of resected colorectal tissues: no significant differences in mean RIN scores between the normal and tumour samples were observed¹⁷.

The link between the lower quality of the samples and their higher gene expression variability has already been established^{25,34}. It has also been evidenced that RNA quality has a noticeable influence on the significance of differential expression of individual marker genes between two divergent risk groups of cancer patients³⁵, which could be summed in the well-known sentence: Rubbish in, rubbish out. Our results comply with these conclusions. We have observed that even though mean differential gene expression patterns obtained for matched samples by 2 different collection means within the same hospital are similar, significance of differential expression of individual genes differs as well as quality of RNA. Only *NEIL1* gene was able to significantly distinguish tumour tissue from healthy tissue by both collection methods. Significance of differential expression of individual marker genes as well as variability could be influenced by the collection mode, quality of RNA, different sets of patients in two hospitals and relatively small number of patients. Thus, univariate analysis of expression changes between tumour tissue and healthy tissue with small number of patients and small fold changes of differential gene expression (less than 2) will not provide us with definitive outcomes and it should be combined with results of multivariate analysis. Nevertheless, what we can observe from our univariate analysis is the width of simultaneous confidence intervals obtained for each collection method that can be linked to various quality of RNA.

The widest SCIs were obtained for tissue samples collected by immediate freezing in the hospital B where there was no difference in expression of any analyzed gene between normal and tumour tissue observed. A higher variability in individual gene expression values could cause wiping out any significant differences between tumour and healthy tissues. The lowest median RNA integrity values were measured in these specimens, 63% of all samples did not pass quality criteria RQI or ΔAMP . Also, multivariate discriminatory analysis using 13 gene classifier, was not able to discriminate tumour tissue samples from adjacent healthy samples. On the basis of our results and previous publications^{19,33}, we do not recommend this kind of freezing for samples that are aimed for gene expression analysis.

On the other hand, tissue specimens that were collected by conventional snap-freezing into the liquid nitrogen and then replaced to -80°C freezer, were suitable to discriminate the tumour and healthy samples with multivariate discriminate analysis in spite of the lower quality of RNA (54% of all samples did not pass the quality criteria RQI or ΔAMP). The widths of the SCI of individual genes were comparable to SCI of specimens collected into PAXgene Tissue System in the same hospital A. The snap-frozen samples were also used to assess whether the exclusion of samples with worse RNA quality improved the discriminatory ability of the multipanel gene expression. SMD showed that discrimination of healthy tissue samples from tumour tissue samples by gene expression profiling improved after exclusion of 14% samples ($\Delta\text{AMP} > 1.0$). Improvement was higher if 46% of samples were removed according to $\text{RQI} < 4$. Even though exclusion of the precious patient samples from analysis is a painful step for researcher to do, it is known that the quality of biological samples ultimately determines the quality of any analysis performed with these samples^{19,35}. The exclusion of lower quality RNA samples is necessary for accurate diagnosis, prediction of outcome, for selection of appropriate therapy or the molecular characterization of human diseases.

All presented evidence proves that PAXgene-fixed colon tissues provided RNA quality significantly better than that obtained from snap-frozen tissues collected in clinical setting in both hospitals. Using multigene classifier, it was possible to significantly discriminate tumour tissue from adjacent healthy tissue when fixed with PAXgene Tissue System. Low variability of gene expression was observed, thus this approach enables us to reliably detect smaller fold changes of gene expression. PAXgene collection mode proves to be a good option for the operating theatres where use of liquid nitrogen is restricted.

Methods

Human tissue samples. Two hospitals in the Czech Republic participated in the study, collecting tissue specimens from patients having surgery of colon carcinoma. Two samples were collected from each patient; tumour tissue and adjacent healthy colon tissue (5–10 cm distant from the tumour). Collection of human samples was approved by ethical committees of participated hospitals and the methods were carried out in accordance with the approved guidelines (Ethics committee at the Institute of Clinical and Experimental medicine and Thomayer Hospital, approved on April 13th 2011, and Ethics committee at the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen, approved on July 11th 2012) and all study participants have signed informed consent. In total 120 patient samples were collected and included in the study. Paired tumour and adjacent healthy tissues were collected by different means from 14 and 16 patients from hospital A and B, respectively. The same tissue specimen

(tumour or adjacent healthy tissue) was divided in two pieces, one was collected in PAXgene Tissue System (Qiagen), and the second piece was fresh-frozen and further stored at -80°C . The protocol using PAXgene Tissue System was as follows: tissue was placed into the PAXgene Tissue Container and preserved in the PAXgene Tissue FIX solution for up to 24 hours at room temperature, which was then replaced by the PAXgene Tissue Stabilizer Concentrate and stored at -80°C . All specimens were kept at -80°C until isolation. Warm ischemic time during surgery varied between 5–20 minutes, while the cold ischemic time took no longer than 5 minutes in all cases. The maximal size of the tissue was recommended to be $\leq 2\text{cm}^3$.

Despite the fact that the detailed protocol was distributed to the hospitals, some deviations in collection and processing of the tissue samples between the two hospitals were discovered after collection: 1. rinsing of the specimen to get rid of stool with warm tap water in hospital B only. 2. in hospital B, liquid nitrogen was not available at the place of surgery, instead, the sample was inserted in a cryo tube and within 5 minutes stored in a -80°C freezer present in the same room. In hospital A, the sample was inserted in a cryo tube and snap-frozen in liquid nitrogen within 5 minutes. 3. in hospital B, the specimen was inserted into the PAXgene Tissue FIX container according to the manufacturer's protocol. Within 5 minutes, the sample was stored at -80°C in the fixative instead of removing the PAXgene Tissue FIX after 24 hours and replacing it by PAXgene Tissue Stabilizer. Despite the protocol deviation, we decided to investigate the quality of these specimens because PAXgene Tissue FIX solution is designed to quickly fix the tissue and stabilize the RNA, thus gene expression profile could be retained.

Isolation of RNA. Tissue samples were homogenized in the MagNA Lyser (Hoffmann-La Roche). All Prep DNA/RNA mini kit (Qiagen) was used to isolate nucleic acids from the samples. RNA from tissues collected in PAXgene containers was extracted using the PAXgene Tissue RNA Kit (PreAnalytiX) according to the manufacturer's instructions.

Quantity and quality control of RNA. RNA quantity and purity was measured with Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific) and RNA integrity was measured with Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad) with Experion RNA StdSense Analysis Kit (Bio-Rad). Information on the samples is included in Supplementary Table S1.

qPCR assay design and validation. Primer/probe assays with PerfectProbe were purchased from Primer Design. Specificity and efficiency of all assays were tested. Information on all primers and their validation is included in Supplementary Table S2. The transcripts are functionally divided: transcripts from base excision repair pathway: *OGG1*, *APEX1*, *NEL1*, *PARP1*, transcripts from nucleotide excision pathway: *XPA*, *RPA1*, *RPA2*, *ERCC3 (XPB)*, *ERCC2 (XPD)*, *ERCC1*, *ERCC6 (CSB)*, *DDB1*, *CCNH*. For normalization, 2 reference genes were used (*TOP1*, *18S*), which had been tested previously using the same type of tissue material²⁷ and evaluated with Normfinder (GenEx, MultiD Analyses).

Reverse transcription. cDNA was synthesized from 50 ng of RNA in 10 μl reaction using a RevertAidTM First strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas) using random hexamers and following manufacturer's instructions. cDNA samples were stored at -20°C and diluted just before use 1:1 with RNase-free water.

Testing integrity of mRNA by Differential Amplicons (ΔAMP) Method. Possible degradation of mRNA was evaluated by applying a new method for evaluation of integrity. The ΔAMP method²⁶ uses three assay sets (Assay set 1–3) for integrity analysis of RNA. Each set has 3 assay variants with various amplicon size (74–342 bp) named short (S), medium (M) and long (L) assays. Assays in each set have one primer in common within the set (forward or reverse). The length of ΔAMP assays was selected to be of similar length as assays used for expression profiling. Long (L) and Short (S) assays of assay set 3 were selected for calculating ΔAMP value for each sample: $\Delta\text{AMP} = C_{qL} - C_{qS}$. The quality cut off value was set to +1.0. The 10 μl qPCR reaction contained 5 μl of TATAA SYBR GrandMaster Mix (TATAA Biocenter), 2 μl of cDNA, 0.2 μl of mixed reverse and forward primers with a final concentration of 200 nM and 2.8 μl of water. Temperature profile was 95°C for 30 s for polymerase activation and 40 cycles of 95°C for 10 s, 58°C for 10 s and 72°C for 35 s. Melting curve analysis followed. The qPCR reactions were run in CFX384 qPCR cycler (Bio-Rad).

High-throughput qPCR. Each sample was pre-amplified 18 cycles with a mix of 15 primer pairs (without *18S*). The reaction contained 10 μl of iQ Supermix (Bio-Rad), 4 μl of cDNA, 2 μl of pooled primers with a final concentration of each primer of 25 nM and 4 μl of water. Temperature profile was 95°C for 15 s and 60°C for 4 min. As a control, NTC was included in the pre-amplification reaction, one extra sample was included as IPC. The pre-amplified cDNA was immediately used or placed in freezer at -20°C . The pre-amplified cDNA was diluted 10x with water prior to the use. qPCR was performed using the high-throughput platform BioMark™ HD System (Fluidigm) and two 48.48 GE Dynamic Arrays. Five μl of sample pre-mix contained 1 μl of 10x diluted pre-amplified cDNA, 2.5 μl of Taqman universal master mix II without UNG (Applied Biosystems), 0.25 μl of 20x GE sample loading reagent (Fluidigm) and 1.25 μl of water. Five μl of assay pre-mix contained 1.25 μl of 12 μM primer/probe assays with PerfectProbe™ (Primer Design) with final concentration of 300 nM in reaction, 2.5 μl of 2x assay loading reagent (Fluidigm). Thermal conditions for qPCR were: 95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s.

Data pre-processing. Gene expression data were collected from two GE Dynamic Arrays 48×48 . IPC was used to recalculate the background fluorescence from two arrays at the same level. C_q cut off was set up to 25 and values higher than 25 were replaced by the value of 25 ($C_q = 25$ in BioMark correspond approximately to $C_q = 35$ in a conventional qPCR cycler)³⁶. Data were normalized to reference genes (*18S* and *TOP1*) to obtain ΔC_q values: $\Delta C_q = (C_q \text{ gene} - \text{mean } C_q \text{ of the two reference genes})$. All data were pre-processed in GenEx Enterprise (MultiD Analyses).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using SAS software v. 9.2. (SAS Institute Inc.), GeneEx Enterprise (MultiD Analyses) and SigmaPlot 13.0.

Comparison of sample integrity in PAXgene Tissue System versus freezing. Difference between RQI or Δ AMP values obtained in colon cancer tissue and matched normal tissue within each hospital were evaluated by resorting to non-parametric approach (Wilcoxon Signed Rank Test). The same approach was used to assess the difference between RQI or Δ AMP values obtained in tissues collected in PAXgene Tissue System versus those collected by snap-freezing. The correlation between the two integrity indexes was assessed by the Spearman Correlation Coefficient and its 95% confidence interval (CI) obtained using the Fisher's transformation.

Effect of tissue collection method on stability of gene expression patterns. Simultaneous Confidence Interval (SCI): For each considered gene the relevance of the expression changes between tumour tissue and adjacent healthy tissue were evaluated by computing the 95% SCI for the $\Delta\Delta$ Cq value of each gene (Δ Cq tumour – Δ Cq healthy tissue) within each collection method and hospital. If the intervals contain zero the expression of the specific gene is not significantly different between tumour and normal tissue sample. This approach³⁷ takes into consideration the simultaneous determination of all the markers on the same set of subjects.

Linear Discriminant Analysis (LDA): In order to jointly consider the expression change of all the gene between tumour and normal tissue within each collection method and hospital, LDA was resorted. This technique provides a linear combination (i.e. canonical correlation) of the gene expression that maximize the separation between normal and tumour tissue³⁸ by assuming a multivariate normal distribution within each group, with a common covariance matrix. Inference was made by testing the null hypothesis that the first canonical correlation is equal to zero.

The Squared Mahalanobis Distance (SMD)²⁹ was used in order to describe how removing of samples with quality indexes Δ AMP > 1.0 or RQI < 4 influences the discrimination of tumour tissue samples from healthy adjacent tissue samples. The SMD was computed by using a pooled covariance matrix.

References

1. Markets and Markets. *Cancer/Tumor Profiling Market worth \$35.03 Billion by 2018*. Available at: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/cancer-tumor-profiling.asp> (Accessed: 19th January 2016) (2016).
2. Moorcraft, S. Y., Smyth, E. C. & Cunningham, D. The role of personalized medicine in metastatic colorectal cancer: an evolving landscape. *Therapeutic advances in gastroenterology* **6**, 381–395 (2013).
3. Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B. & Soucek, P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World journal of gastroenterology* **20**, 10316–10330 (2014).
4. Dougherty, E. R. Biomarker development: prudence, risk, and reproducibility. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**, 277–279 (2012).
5. McShane, L. M. & Polley, M. Y. Development of omics-based clinical tests for prognosis and therapy selection: the challenge of achieving statistical robustness and clinical utility. *Clinical trials* **10**, 653–665 (2013).
6. Hayes, D. F. *et al.* Breaking a vicious cycle. *Science translational medicine* **5**, 196CM6 (2013).
7. Johnson, G., Nour, A. A., Nolan, T., Huggett, J. & Bustin, S. Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments. *Methods in molecular biology* **1160**, 5–17, (2014).
8. Verderio, P. Assessing the clinical relevance of oncogenic pathways in neoadjuvant breast cancer. *Journal of clinical oncology* **30**, 1912–1915 (2012).
9. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 611–622 (2009).
10. Carraro, P. & Plebani, M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clinical chemistry* **53**, 1338–1342 (2007).
11. Kristensen, G. B., Aakre, K. M., Kristoffersen, A. H. & Sandberg, S. How to conduct External Quality Assessment Schemes for the pre-analytical phase? *Biochimica medica* **24**, 114–122 (2014).
12. Ma, Y., Dai, H. & Kong, X. Impact of warm ischemia on gene expression analysis in surgically removed biosamples. *Analytical biochemistry* **423**, 229–235 (2012).
13. Lin, D. W. *et al.* Influence of surgical manipulation on prostate gene expression: implications for molecular correlates of treatment effects and disease prognosis. *Journal of clinical oncology* **24**, 3763–3770 (2006).
14. Musella, V. *et al.* Effects of warm ischemic time on gene expression profiling in colorectal cancer tissues and normal mucosa. *PLoS one* **8**, e53406 (2013).
15. Hong, S. H. *et al.* Effects of delay in the snap freezing of colorectal cancer tissues on the quality of DNA and RNA. *Journal of the Korean Society of Coloproctology* **26**, 316–323 (2010).
16. Spruessel, A. *et al.* Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *BioTechniques* **36**, 1030–1037 (2004).
17. Yamagishi, A. *et al.* Gene profiling and bioinformatics analyses reveal time course differential gene expression in surgically resected colorectal tissues. *Oncology reports* **31**, 1531–1538 (2014).
18. Viana, C. R. *et al.* The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. *Cell and tissue banking* **14**, 167–173 (2013).
19. Kap, M. *et al.* The influence of tissue procurement procedures on RNA integrity, gene expression, and morphology in porcine and human liver tissue. *Biopreservation and biobanking* **13**, 200–206 (2015).
20. Bao, W. G. *et al.* Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue *ex-vivo* ischemia times and storage periods on RNA quality. *Annals of surgical oncology* **20**, 1737–1744 (2013).
21. Kap, M., Oomen, M., Arshad, S., de Jong, B. & Riegman, P. Fit for purpose frozen tissue collections by RNA integrity number-based quality control assurance at the Erasmus MC tissue bank. *Biopreservation and biobanking* **12**, 81–90 (2014).
22. Ma, Y., Dai, H., Kong, X. & Wang, L. Impact of thawing on reference gene expression stability in renal cell carcinoma samples. *Diagnostic molecular pathology* **21**, 157–163 (2012).
23. Viertler, C. *et al.* A new technology for stabilization of biomolecules in tissues for combined histological and molecular analyses. *The Journal of molecular diagnostics* **14**, 458–466 (2012).
24. Groelz, D. *et al.* Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: a comparison of histology and RNA quality. *Experimental and molecular pathology* **94**, 188–194 (2013).
25. Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine* **27**, 126–139 (2006).

26. Björkman, J., Švec, D., Lott, E., Kubista, M. & Sjöback, R. Differential amplicons (Δ Amp)—a new molecular method to assess RNA integrity. *Biomolecular Detection and Quantification* **6**, 4–12 (2016).
27. Slyskova, J. *et al.* Functional, Genetic, and Epigenetic Aspects of Base and Nucleotide Excision Repair in Colorectal Carcinomas. *Clin Cancer Res.* **18**, 5878–5887 (2012).
28. Mandel, M. & Betensky, R. A. Simultaneous Confidence Intervals Based on the Percentile Bootstrap Approach. *Computational statistics & data analysis* **52**, 2158–2165 (2008).
29. McLachlan, G. J. Mahalanobis distance. *Resonance* **4**, 20–26 (1999).
30. Schroeder, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* **7**, 3 (2006).
31. Kubista, M., Björkman, J., Švec, D. & Sjöback, R. RNA quality matters. *European Pharmaceutical Review* **17**, 63–67 (2012).
32. Denisov, V., Strong, W., Gingrich, J. & Wintz, H. Development and Validation of RQI: An RNA Quality Indicator for the Experion™ Automated Electrophoresis System. Electrophoresis tech note 5761. Available at: <http://www.gene-quantification.com/Bio-Rad-bulletin-5761.pdf> (Accessed: 19th January 2016) (2008).
33. Scouten, C. W. Frozen Section Technique in the Animal Research Setting in *A Practical Guide to Frozen Section Technique* (ed Peters, S. R.) 171–191 (Springer, 2010).
34. Die, J. V. & Roman, B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *Journal of experimental botany* **63**, 6069–6077 (2012).
35. Vermeulen, J. *et al.* Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic acids research* **39**, e63 (2011).
36. Korenkova, V. *et al.* Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment. *BMC molecular biology* **16**, 5 (2015).
37. Pizzamiglio, S. *et al.* Simultaneous confidence intervals to compare gene expression profiles using ABC transporter TaqMan microfluidic cards. *Oncology reports* **23**, 853–860 (2010).
38. Gutierrez-Osuna, R. *L10: Linear discriminants analysis*. Available at: http://research.cs.tamu.edu/prism/lectures/pr/pr_l10.pdf (Accessed: 19th January 2016) (2016).

Acknowledgements

The authors are thankful to volunteers who participated in the study. This project was funded by GACR: P304/12/1585, GACR:GA15-08239S, AZV 15-27580A and NT13424. The SPIDIA RNA study has been supported by European Union (FP7, Title “SPIDIA: Standardization and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for *in vitro* diagnostic”). The collection of the human samples at the Department of Surgery, Teaching Hospital and Medical School Pilsen was supported by the National Sustainability Program I (NPU I) No. LO1503 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic (MEYS). This work was also supported by LQ1604 NPU II provided by MEYS and CZ.1.05/1.1.00/02.0109 BIOCEV provided by ERDF and MEYS.

Author Contributions

All authors have seen and approved the manuscript. The authors are aware of the responsibilities connected to authorship. V.K. and J.S. wrote the manuscript and designed the experiments, V.K., S.P. and V.N. participated in statistical analyses and prepared plots and figures, L.L. performed most of experiments, J.B. analysed Δ AMP experiments, O.N., V.L., M.L. and K.V. were responsible for collection of patient samples, P.V., L.V. and M.K. supervised experiments and had a critical comments to the manuscript, P.V. supervised statistical analyses.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Korenkova, V. *et al.* The focus on sample quality: Influence of colon tissue collection on reliability of qPCR data. *Sci. Rep.* **6**, 29023; doi:10.1038/srep29023 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

KUNICKÁ, T., P. PROCHÁZKA, I. KRUS, P. BENDO VÁ, M. PROTIVOVÁ, S. ŠŮSOVÁ, V. HLAVÁČ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, M. SCHNEIDEROVÁ., P. PITULE, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, P. VODIČKA a P. SOUČEK. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*[online]. 2016, **16**(1) [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1186/s12885-016-2826-8. ISSN 1471-2407. IF 3,362.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma



T. Kunicka^{1,2,3}, P. Prochazka⁴, I. Krus¹, P. Bendova^{3,4}, M. Protivova¹, S. Susova^{1,3}, V. Hlavac^{1,2,3}, V. Liska^{3,5}, P. Novak⁵, M. Schneiderova⁶, P. Pitule³, J. Bruha^{3,5}, O. Vycital^{3,5}, P. Vodicka^{3,4*} and P. Soucek^{1,3,7*}

Abstract

Background: This study addresses involvement of major 5-fluorouracil (5-FU) pathway genes in the prognosis of colorectal carcinoma patients.

Methods: Testing set and two validation sets comprising paired tumor and adjacent mucosa tissue samples from 151 patients were used for transcript profiling of 15 5-FU pathway genes by quantitative real-time PCR and DNA methylation profiling by high resolution melting analysis. Intratumoral molecular profiles were correlated with clinical data of patients. Protein levels of two most relevant candidate markers were assessed by immunoblotting.

Results: Downregulation of DPYD and upregulation of PPAT, UMPS, RRM2, and SLC29A1 transcripts were found in tumors compared to adjacent mucosa in testing and validation sets of patients. Low RRM2 transcript level significantly associated with poor response to the first-line palliative 5-FU-based chemotherapy in the testing set and with poor disease-free interval of patients in the validation set irrespective of 5-FU treatment. *UPP2* was strongly methylated while its transcript absent in both tumors and adjacent mucosa. *DPYS* methylation level was significantly higher in tumor tissues compared to adjacent mucosa samples. Low intratumoral level of *UPB1* methylation was prognostic for poor disease-free interval of the patients ($P = 0.0002$). The rest of the studied 5-FU genes were not methylated in tumors or adjacent mucosa.

Conclusions: The observed overexpression of several 5-FU activating genes and DPYD downregulation deduce that chemotherapy naïve colorectal tumors share favorable gene expression profile for 5-FU therapy. Low RRM2 transcript and *UPB1* methylation levels present separate poor prognosis factors for colorectal carcinoma patients and should be further investigated.

Keywords: Colorectal carcinoma, 5-fluorouracil, Methylation, Expression, Prognosis

Background

Colorectal carcinoma (OMIM: 114500) is the third most common malignancy and the fourth cause of cancer-related deaths in the adult population worldwide, with the highest incidence recorded in Central Europe [1, 2].

Colorectal cancer treatment consists of surgical removal of the tumor and, based on disease characteristics, of chemo- and or radiotherapy. 5-Fluorouracil (5-FU) is widely used drug in the first-line therapy of colorectal cancer [3]. Over 80 % of administered 5-FU dose is

rapidly degraded [4] and only 1–3 % is converted into its active metabolite fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP [5]). FdUMP then inhibits thymidylate synthase (TYMS, OMIM: 188350) and blocks deoxythymidine triphosphate (dTTP) synthesis. Subsequent dTTP depletion triggers “thymineless” death [6]. TYMS is considered as a potential prognostic marker for colorectal cancer. Recent studies have shown that overexpression of TYMS transcript predicts poor outcome in colorectal cancer patients [7, 8]. However, another contemporary study has not confirmed these observations as intratumoral TYMS transcript level was not predictive in patients with colorectal cancer of stage II and III [9].

Several studies have indicated potential prognostic or predictive role of 5-FU metabolizing enzymes expression

* Correspondence: pvodicka@biomed.cas.cz; pavel.soucek@szu.cz

³Biomedical Centre, Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

¹Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

for resistance to the treatment of colorectal cancer. Colorectal cancer patients with low protein expression of 5-FU inactivating enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD, OMIM: 612778) exhibited a longer survival after 5-FU-treatment than those with high levels [10]. Likewise, high DPYD transcript level was associated with poor outcome of stage IV colorectal cancer patients [11]. High thymidine phosphorylase (TYMP, OMIM: 131222, 5-FU activating enzyme) transcript level was associated with significantly better disease-free survival (DFS) following oral administration of 5-FU in stage III colorectal cancer patients [12].

The resistance of the tumor cells towards 5-FU is substantially modulated by the transport mechanisms. Especially solute carrier transporter 29A1 (SLC29A1, OMIM: 602193) plays a crucial role in cellular uptake of nucleoside drugs such as cytarabine, gemcitabine, or 5-FU [13]. Results of a recent small scale functional study suggested that high SLC29A1 mRNA levels in colorectal cancer tumor tissue correlate with poor clinical response to 5-FU [14].

In this study we aimed to address importance of gene expression and methylation profile of 15 5-FU genes in tumor and adjacent bowel mucosa tissues of colorectal cancer patients for the patient's prognosis and the response to 5-FU. Genes were selected from literature and PharmGKB database based on functional evidence from 5-FU pharmacokinetics data (<https://www.pharmgkb.org/>). Protein expression of two most relevant candidate markers was assessed as another chain underlying 5-FU mode of action.

Methods

Studied patients and collection of biological specimen

Tumor tissue and adjacent non-neoplastic mucosa samples were obtained from total of 151 patients with sporadic colorectal cancer (C18-21 according to ICD-10) diagnosed at the Department of Surgery and Oncology, Teaching Hospital and Medical School in Pilsen, and General Teaching Hospital in Prague between January 2008 and November 2011. From 151 patients, 146 paired tissue samples (tumor and control mucosa), four tumors, and one mucosa sample were taken for analyses (for study flow chart, see Fig. 1). Native tissue samples were collected as described elsewhere [15, 16].

Patients represented three groups – testing set (stage II-IV, $n = 52$) for gene and protein expression and methylation analysis, validation set I (stage II, $n = 67$) for gene expression analysis, and validation set II (stage II and III, $n = 32$) for gene expression and methylation analysis. The lack of tissue aliquots for simultaneous isolation of RNA and DNA necessitated the use of two different validation sets. All patients in the testing set underwent adjuvant ($n = 26$) or palliative ($n = 26$)

chemotherapy regimens based on 5-FU (with added leucovorin and/or oxaliplatin). In the validation sets I and II, 24 and 17 patients were treated by such chemotherapy regimens, respectively (Table 1 and Fig. 1).

Response to the palliative treatment was evaluated by RECIST criteria [17] based on routine imaging techniques for assessment of tumor mass (computerized tomography with or without positron emission, magnetic resonance or ultrasonography). Increase in tumor mass or the appearance of new lesions in patients with palliative treatment indicated progression and thus poor response to the treatment (PD). Good response to the treatment was defined as a decrease of the number or volume of metastases, i.e., complete or partial response (CR or PR) or stabilization of the disease or (SD). In patients treated by adjuvant therapy after radical surgical resection R0 disease-free interval (DFI) served as a measure of the treatment outcome. DFI was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection and disease recurrence.

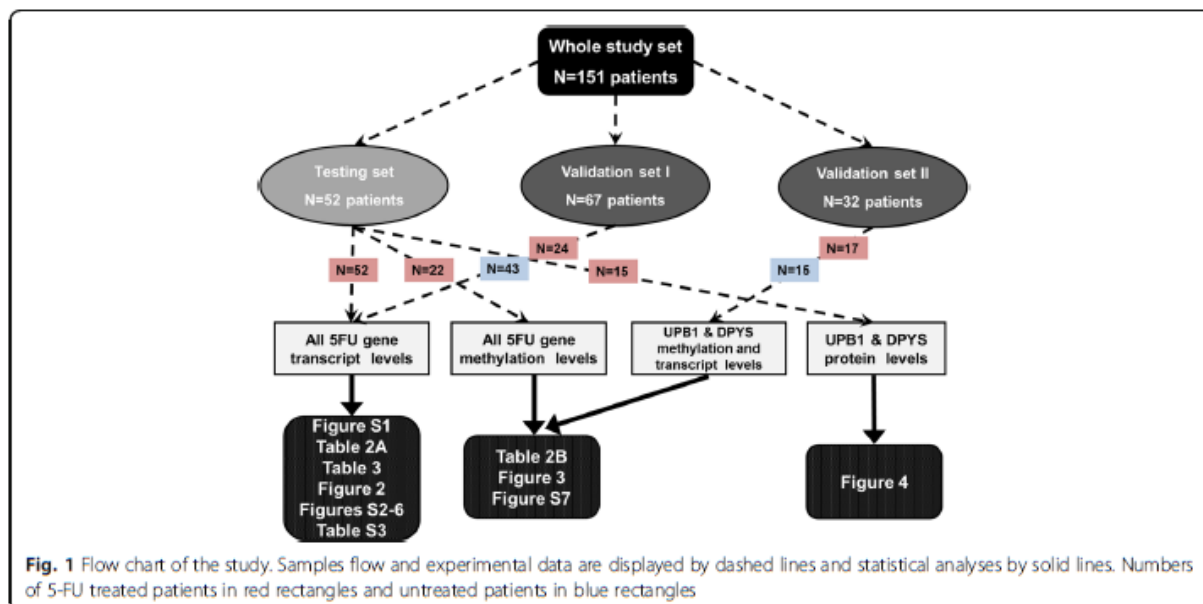
Methylation analyses were conducted on 22 tissue pairs from the testing set and on the whole independent validation set II from the General Teaching Hospital, Prague.

Isolation of total RNA and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from frozen tissues using Trizol[®] reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), stored, and characterized for the quantity and quality [18]. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 0.5 μ g of total RNA and random hexamer primers with help of RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Quality of cDNA in terms of DNA contamination was confirmed by PCR amplification of *ubiquitin C* [19].

Gene expression profiling

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using ViiA7 Real-Time PCR System, TaqMan[®] Gene Expression Assays and TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Life Technologies). Reference genes – *POLR2A* (DNA-directed RNA polymerase II subunit A, OMIM: 180660), *MRPL19* (mitochondrial ribosomal protein L19, OMIM: 611832), *EIF2B1* (eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1, OMIM: 606686), and *PSMC4* (proteasome 26S subunit, ATPase, 4, OMIM: 602707) – were selected by us earlier [15]. Gene Expression Assays with their characteristics are listed in Additional file 1: Table S1. While samples from the testing set were preamplified using TaqMan PreAmp Master Mix (Life Technologies), cDNA from the validation sets was used for quantification directly without preamplification procedure [20]. For calculating the qPCR efficiency of each assay, a calibration curve from one non-neoplastic sample was



prepared (six points, 5-times dilution). The non-template control contained water instead of cDNA.

The qPCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments [21]).

Gene expression and clinical data of all samples were submitted to Gene Expression Omnibus (GEO) repository under accession number GSE67111.

Promoter CpG methylation profiling

To convert unmethylated cytosines to uracils whole genomic DNA was treated with sodium bisulfite using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. Promoter region of every gene of interest was determined using Genomatix MatInspector and Genes & Genomes software (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany). CpG islands or simple CpG sites were identified by Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The same software was used for design of primers specific for sodium bisulfite converted DNA bases. Number of CpGs in the PCR amplicon and equal primer melting temperature (T_m) were taken into consideration in the primer design. Real-time PCR followed by high resolution melting (HRM) was carried out in high-performance Eco Real-Time PCR system (Illumina, San Diego, CA), essentially as described in [16]. PCR was initiated by incubation at 95 °C for 5 min, followed by 50 cycles at 95 °C for 10 s, annealing temperature of specific primers (T_a) for 20 s, and 72 °C for 10 s. Primer sequences, T_m , T_a , length, and numbers of CpGs for each amplicon are listed in Additional file 1: Table S2. HRM thermal profile was set up according to the

manufacturer's recommendations (Qiagen). Fluorescence data were converted into melting peaks by the Eco Software (Illumina, Ver. 3.0.16.0). For each assay, a standard dilution series of EpiTect Control DNAs (Qiagen) was run to assess the quantitative properties and sensitivity of the assay. Fluorescence of each sample was normalized against 100 % methylated DNA control. Methylation data of individual samples were subtracted from calibration curve with positive controls of 100, 75, 50, 25, and 0 % methylated DNA.

Immunoblotting in human colorectal cancer tissues

Tissue sample pairs from 15 patients and unpaired tumors from two patients were selected based on tissue availability from the testing set and used for immunoblotting. Samples, stored at -80 °C prior to the protein isolation, were grinded by a mortar and pestle, subsequently protein and total RNA were isolated using 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 % Triton X-100 buffer. Protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL). Immunoblotting was performed as described in [20, 22]. Briefly, 10 µg of protein was used for separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (10 %) and transferred onto 0.2 µm Protran nitrocellulose membrane (Whatman, Kent, UK). Primary antibodies against dihydropyrimidinase (DPYS, OMIM: 613326) (dilution 1:4000), beta-ureidopropionase (UPB1 OMIM: 606673) (dilution 1:500) (both from Aviva System Biology, San Diego, CA), β -actin (dilution 1:2000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and the corresponding horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (dilution 1:10000; Sigma-Aldrich) were employed. Protein

Table 1 Clinical-pathological characteristics of studied groups of patients

Characteristics	Testing set (n = 52)	Validation set I (n = 67)	Validation set II (n = 32)
Gender (male/female)	36/16	45/22	19/13
Age at diagnosis ^a	63.9 ± 9.2 years	70.2 ± 9.5 years	70.8 ± 11.2 years
Tumor size (pT)			
pT2	3	-	4
pT3	40	62	24
pT4	9	5	4
Presence of lymph node metastasis (pN)			
pN0	15	67	18
pN1-2	37	-	14
Presence of distant metastasis (pM)			
pM0	26	67	32
pM1	26	-	-
Stage			
UICC II	8	67	18
UICC III	18	-	14
UICC IV	26	-	-
Histological grade (G) ^b			
GI	6	9	6
GII	39	47	19
GIII	7	8	3
Gx	-	3	4
Primary localization			
Colon	26	44	28
Rectosigmoideum	12	9	1
Rectum	14	14	3
Chemotherapy			
5-FU-based	52	24 ^c	17
None	-	33 ^c	15

Footnotes:^aMedian ± standard deviation^bGI well differentiated, GII moderately differentiated, GIII poorly differentiated, Gx cannot be assessed^cNumbers may not add up to 67 of available subjects because of missing data (n = 10)

bands were visualized with an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce Biotechnology) by Fc Odyssey (Licor Biotechnology, Lincoln, NE) and quantified by densitometry (Image Studio software, Licor Biotechnology).

Statistical analyses

Expression levels of genes were analyzed by ViiA7 System Software (Life Technologies) and statistical analysis was performed using SPSS v16.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL). Fold changes were calculated

using raw cycle threshold (Ct) data by the REST2009 program (Qiagen), which is routinely used for the determination of differences between different types of sample and control groups and considers both normalization to numerous reference genes and reaction efficiencies [23]. Then ratios of Ct values of genes of interest and mean value of reference genes were calculated and used for further statistical analyses. Differences in gene expression or methylation levels between tumor and control tissues were assessed by the nonparametric Mann-Whitney U-test. To evaluate associations of transcript levels with clinical data and other variables (Table 1), nonparametric tests (the Kruskal-Wallis, the Mann-Whitney, and the Spearman's tests) were used.

DFI was evaluated by the Kaplan-Meier method and the Log Rank test was used for evaluation of the compared subgroups and combined groups of patients. Stage-adjusted analysis was performed by the Cox regression. All P-values were calculated from two-sided tests. P-values lower than 0.05 were considered statistically significant. The correction for multiple testing was applied according to Bonferroni.

Results**Patients' characteristics**

Summary of patient's characteristics and clinical data from testing and validation sets are presented in Table 1 and the study flow diagram in Fig. 1. Testing set comprised colorectal cancer patients with stages UICC II-IV treated by first-line adjuvant (n = 26, UICC II and III) and palliative chemotherapy based on 5-FU (n = 26, UICC IV). Testing set served as a hypothesis generating screen and for assessment of protein levels. Validation set I used for validation of gene expression study included patients with UICC II stage (n = 67). Part of them was treated by 5-FU-based chemotherapy (n = 24). Validation set II used for methylation study consisted of patients with UICC II and III stage (n = 32) with 17 patients treated by 5-FU-based chemotherapy. The validation set II served for validation of correlations between DPYS and UPB1 methylation and expression levels and clinical data, mainly DFI. Median DFI of the validation set I was 46 ± 6 months and that of the validation set II was 39 ± 3 months.

Transcript levels in tumors and non-neoplastic control tissues

Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (PPAT, OMIM: 172450), uridine monophosphate synthetase (UMPS OMIM: 613891), ribonucleotide reductase M2 (RRM2, OMIM: 180390), and SLC29A1 transcripts were consistently overexpressed in tumors compared to adjacent mucosa in both testing and validation I sets (except UMPS, all passed the correction for multiple testing,

Table 2a, Additional file 1: Table S1). On the contrary, DPYD was downregulated in tumors compared to adjacent mucosa ($P < 0.001$, both sets).

Associations of transcript levels with clinical data of patients

We first tested associations between gene expression levels and therapy response of stage IV patients. Patients from the testing set with poor response to the first-line palliative treatment with 5-FU-based regimens had significantly lower expression of UMPS, ribonucleotide reductase M1 (RRM1, OMIM: 180410), and RRM2 in adjacent mucosa ($n = 26$; $P = 0.024$, $P = 0.014$, and $P = 0.038$,

respectively; none passed the correction for multiple testing) than good responders (Table 3). Stage IV patients were excluded from subsequent survival analyses due to the metastatic character of their disease, which strongly modifies their prognosis.

For DFI analyses, transcript levels were first divided by their median separately in testing and validation set I and for the combined analysis these data were put together to eliminate raw data differences between sets. Significance of RRM2 gene expression for prognosis of colorectal cancer patients was further corroborated in the validation set I, where patients with intratumoral RRM2 transcript level higher than

Table 2 Differences in transcript (A) and methylation (B) levels between tumor and adjacent mucosa tissues of colorectal cancer patients

A. Transcript levels						
Gene	Testing set (n=52)		Validation set I (n=67)			
	Fold change ^b	P-value ^a	Fold change ^b	P-value ^a		
	Tumor vs mucosa		Tumor vs mucosa			
DPYD	0.45 ^c	<0.001	0.47 ^c	<0.001		
DPYS	0.21	0.014	ND	ND		
PPAT	2.21 ^c	<0.001	1.95 ^c	<0.001		
RRM1	1.10	0.378	1.04	0.769		
RRM2	1.68 ^c	<0.001	1.98 ^c	<0.001		
SLC29A1	2.50 ^c	<0.001	2.51 ^c	<0.001		
TK1	1.64	0.008	1.27	0.051		
TYMP	1.36	0.211	1.57 ^c	0.002		
TYMS	1.20	0.579	1.29	0.390		
UCK1	0.86	0.126	0.75 ^c	<0.001		
UCK2	1.17	0.355	1.01	0.680		
UMPS	1.26	0.024	1.18	0.010		
UPB1	0.71	0.074	0.65	0.012		
UPP1	0.86	0.107	0.71 ^c	<0.001		
UPP2	ND	ND	ND	ND		

B. Methylation levels						
Gene	Testing set (n=22) ^d		P-value	Validation set II (n=32) ^d		P-value
	Tumor	Mucosa		Tumor	Mucosa	
DPYS	0.19 ± 0.14	0.08 ± 0.04	<0.001 ^c	0.28 ± 0.16	0.20 ± 0.13	0.010 ^c
UPB1	0.55 ± 0.14	0.65 ± 0.15	0.022	0.79 ± 0.13	0.81 ± 0.10	0.436
UPP2	0.62 ± 0.27	0.56 ± 0.25	0.437	ND	ND	ND

Footnotes:

^aAnalyzed by the Mann-Whitney test

^bFold changes calculated by the REST2009 program

^cResults, which passed correction for multiple testing

^dMean ± standard deviation of percentage of sample methylation normalized to positive control (Methods)

ND not determined

Results from the testing set that have been confirmed in the validation set of patients are depicted in grey

Table 3 Differences in transcript levels in colorectal mucosa between poor and good responders to 5-FU-based chemotherapy. Transcript levels of 5-FU pathway genes were compared in mucosas of patients in the testing set divided into groups of poor responders ($n = 13$) and good responders ($n = 13$) to the first line chemotherapy regimens based on 5-FU

Gene	Expression level in poor responders vs. good responders		
	Fold difference ^b	Standard error ^b	P-value ^a
DPYD	0.76	0.31–1.69	0.259
DPYS	0.91	0.10–6.89	0.434
PPAT	0.88	0.20–3.63	0.086
RRM2	0.31	0.11–1.46	0.038
RRM1	0.59	0.22–1.18	0.014
SLC29A1	0.76	0.17–2.73	0.369
TK1	0.87	0.18–3.66	0.157
TYMP	0.56	0.12–2.46	0.130
TYMS	0.82	0.15–3.77	0.121
UCK1	0.85	0.23–1.96	0.369
UCK2	0.74	0.17–2.42	0.681
UMPS	0.68	0.23–1.21	0.024
UPB1	0.91	0.26–2.85	0.479
UPP1	0.61	0.16–2.10	0.106

Footnotes:

^aAnalyzed by the Mann-Whitney test

^bFold changes and standard error calculated by the REST2009 program
Significant results in bold

median had significantly longer DFI compared to patients with levels below the median ($n = 66$, $P = 0.009$, did not pass the correction for multiple testing, Fig. 2a, the rest of results in Additional file 1: Figure S2). A non-significant association in the same direction, was observed in the testing set ($n = 26$, Additional file 1: Figure S3). Analysis of the combined testing and validation I sets supported the findings of the validation set I for RRM2 ($n = 92$, $P = 0.006$, did not pass the correction for multiple testing, Fig. 2b, the rest of results provided in Additional file 1: Figure S4). This association was significant also in stage-adjusted analysis by the Cox regression of the combined set ($n = 92$, $P = 0.013$, HR = 4.17, 95 % CI = 1.35–12.50, for all results see Additional file 1: Table S3).

Then the combined set was analyzed in respect to chemotherapy by 5-FU containing regimens ($n = 50$). However, in the combined analysis of 5-FU-treated patients from the testing and validation I sets, neither RRM2 transcript level ($P = 0.301$) nor levels of the rest of genes did significantly associate with DFI (Additional file 1: Figure S5). Stage-adjusted analysis has shown significant association between UPB1 and DFI ($P = 0.047$, HR = 0.25, 95 % CI = 0.06–0.98, for all results see Additional file 1: Table S3), which was not significant in the univariate analysis ($P = 0.098$, Additional file 1: Figure S5).

In DFI analyses of untreated patients ($n = 32$, all stage II from the validation set 1), low level of UPB1 ($P = 0.026$, did not pass the correction for multiple testing) and TYMP ($P = 0.047$, did not pass the correction for multiple testing) significantly associated with worse DFI of patients (Additional file 1: Figure S6).

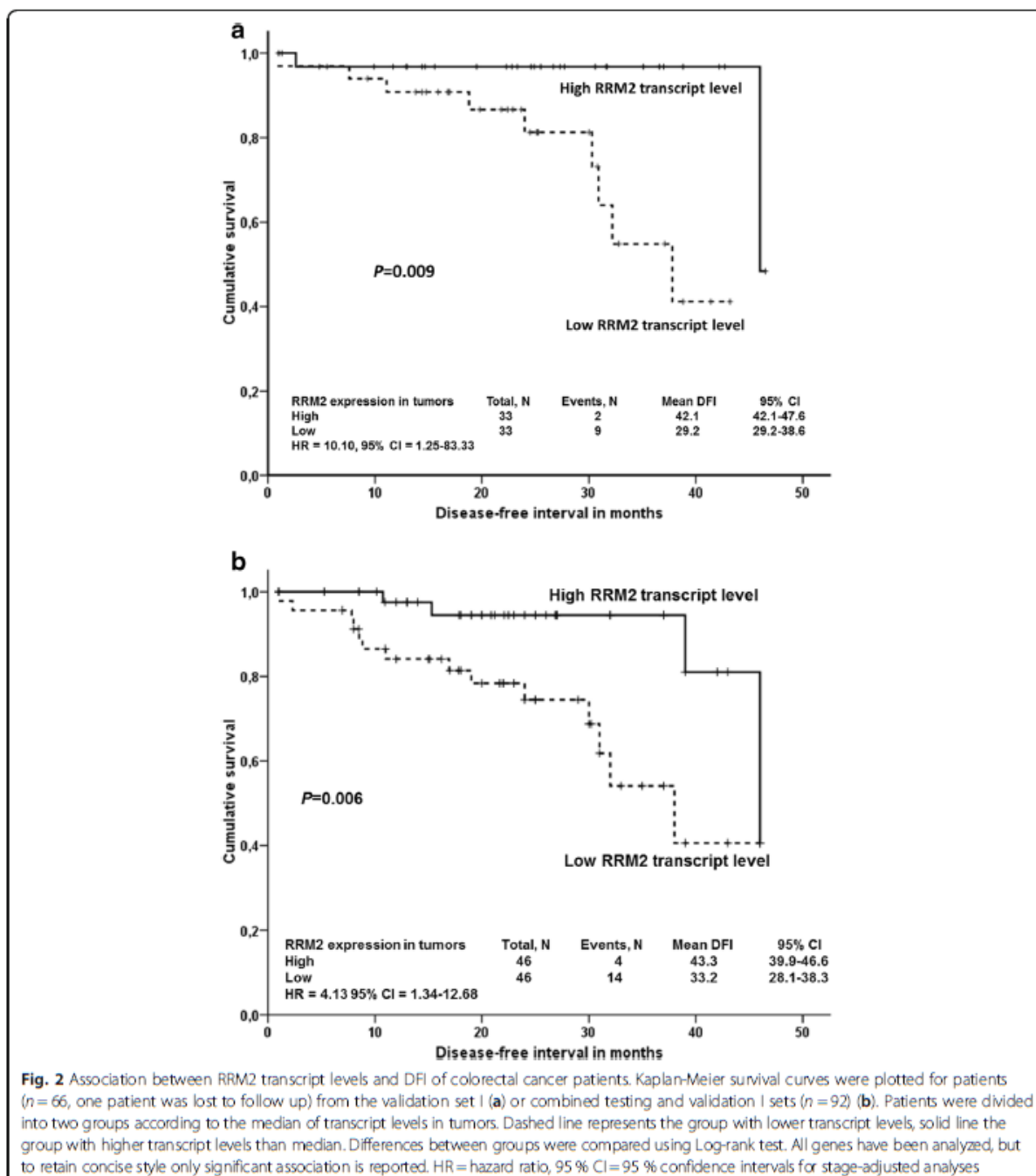
Methylation levels in tumors and non-malignant adjacent mucosa, associations with gene expression, and clinical characteristics

Methylation of CpG islands in the regulatory regions of all studied genes was initially studied in 22 pairs of tumor and adjacent mucosa (testing set) and compared with that from the independent validation set II. In the both testing and validation II sets, methylation exceeding the limit of quantitation was detected in *DPYS*, *UPB1*, and uridine phosphorylase (*UPPP2*, GeneID: 151531) genes in both tumor and adjacent mucosa samples (Table 2b, *DPYS* passed the correction for multiple testing). Significantly elevated methylation level of *DPYS* was recorded in tumor tissues compared to adjacent mucosa in both sets (Table 2b). Methylation level of *UPB1* was lower in tumors than in adjacent mucosa in the testing set, but not in the validation set II. No difference in promoter methylation was observed for *UPPP2* in the testing set by comparing tumors with non-malignant mucosa.

Methylation levels in promoter regions of *DPYS* or *UPB1* did not correlate with their corresponding transcript levels either in tumors or in adjacent mucosa samples analyzed in both sets. *UPP2* transcript expression was below the limit of quantification in both testing and validation II sets suggesting that this gene is completely silenced in colorectal tumors and corresponding adjacent mucosa tissues regardless clinical characteristics.

DPYS methylation level was associated with the tumor stage in the testing set ($P = 0.010$, data not shown), but not in the validation set II. Therefore, this association is not further discussed. On the other hand, patients with *UPB1* methylation level below the median had significantly worse DFI than those with the methylation level above the median in both sets evaluated separately (Additional file 1: Figure S7) and combined ($n = 46$, $P = 0.0002$, passed the correction for multiple testing, Fig. 3). This association was significant also in the stage-adjusted analysis by Cox regression of the combined set ($n = 46$, $P = 0.004$, HR = 9.22, 95 % CI = 2.04–41.57).

Combined analysis of *UPB1* methylation in 5-FU treated patients from testing and validation II sets failed to find significant association with DFI ($n = 32$, $P = 0.653$, data not shown). For DFI analyses, patients were divided into two groups according to the median of methylation levels in tumors. Methylation levels of *DPYS* and *UPPP2* have not associated with the DFI of patients ($P > 0.05$).



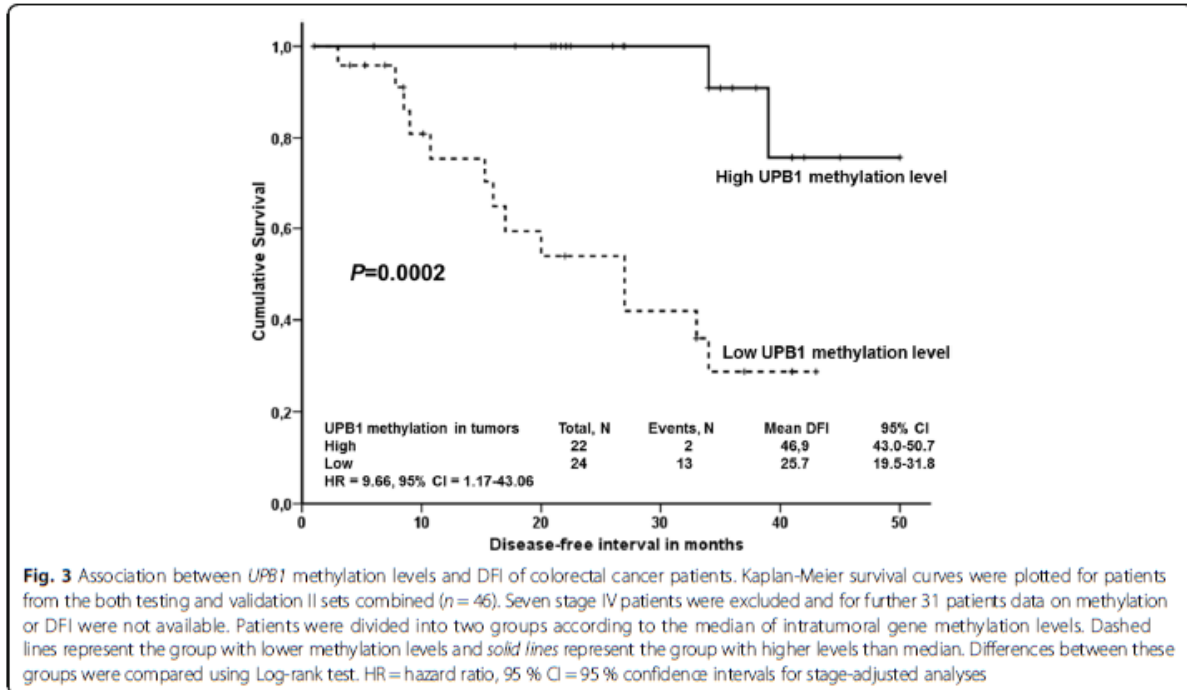
Protein levels in tumors and adjacent non-malignant mucosa

DPYS and UPB1 protein levels were analyzed in a subset of the testing set used for the methylation study, enabling an evaluation of the cascade of methylation, gene, and protein expression levels in colorectal cancer samples (Fig. 4). However, DPYS and UPB1 protein levels

did not significantly correlate either with their transcripts or methylation levels ($P > 0.05$).

Discussion

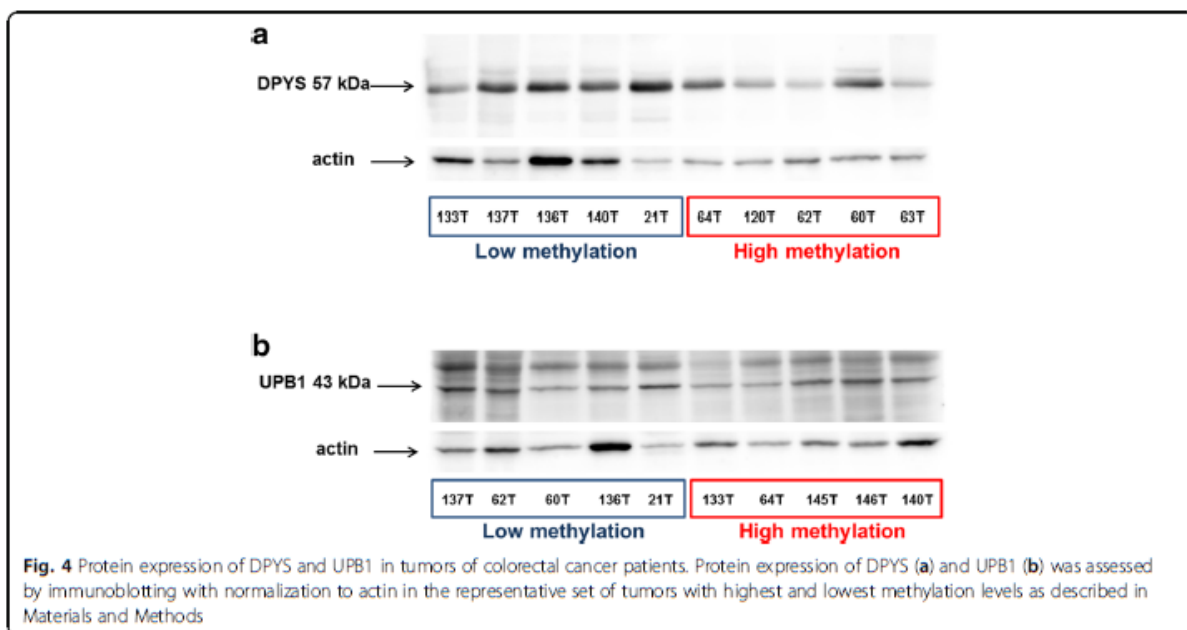
The questions connected with prognostic importance of molecular profile of 5-FU pathway in colorectal cancer remain attractive topics throughout last 15 years. Existing



studies offered a plethora of mostly conflicting results. The absence of complex understanding, focused on mechanisms of action underlying the most promising biomarkers precludes their translation into clinical setting. Apparently, the final prognostic scheme will integrate clinical factors, e.g., stage and grade of the tumor with a cascade of

molecular markers involving genetic, epigenetic, and phenotypic factors. The present study brings completely new insight into this area by comprehensive molecular profiling of major 5-FU pathway genes.

The present study shows for the first time that only three (*DPYS*, *UPB1*, and *UPP2*) out of 15 evaluated 5-



was reported that differential methylation of *DPYS* (and heat shock 27 kDa protein 1, *HSPB1*, OMIM: 602195 and cyclin D2, *CCND2*, OMIM: 123833) provides independent prognostic information for prostate carcinoma [31]. Based on the present and earlier studies, colorectal cancer-specific complex prognostic model based on gene expression and methylation profile seems to deserve further exploration.

Prognostic significance of low RRM2 transcript level for poor colorectal cancer patient's outcome observed by the present study contradicts the previously published data. High RRM2 level was poor survival predictor in colorectal cancer patients [32] reflecting the established *in vitro* ability of RRM2 to enhance cellular invasiveness and genetic instability [33]. We cannot rule out that the qPCR assay for RRM2 employed in the present study also covered the RRM2B (OMIM: 604712) subunit whose protein structure is 80 % identical to RRM2. RRM2B intriguingly exerts opposite activity to RRM2 and its expression associates with a better survival of colorectal cancer patients [34]. On the other hand, RRM2 is 5-FU activating enzyme [24] and thus the result observed by us seems logical from this point of view despite the fact that we have not observed a direct link between prognostic role of RRM2 and 5-FU therapy (perhaps due to the low number of the followed patients). Bearing in mind the issue of study size and publicly available gene expression data, we analyzed the prognostic power of RRM2 expression by SurvExpress [35] tool using data from GSE12945 set ($n = 947$). A borderline significant association towards higher risk of shorter disease-free survival of the patients with lower expression of RRM2 was apparent ($p = 0.050$, Additional file 1: Figure S8).

The present study in line with other authors [9], has not confirmed that overexpression of TYMS protein or transcript predicts poor outcome in colorectal cancer patients [7, 8]. Similarly, the results of studies indicating potential prognostic role of DPYD [10, 11] or TYMP [12] expression for survival of colorectal cancer patients after 5-FU-treatment were not replicated.

The small sample size and small patient's groups used for DFI analyses, especially of patients treated with 5-FU pose the major limitations of this study. Nevertheless, we compared the methylation profiles with the publicly available database MethHC (Methylation and gene expression in Human Cancer, <http://methhc.mbc.nctu.edu.tw>) integrating gene expression, methylation, and microRNA expression data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) [36]. Our data complies with the results reported by this database, i.e., the highest levels in *UPP2*, *UPB1*, and *DPYS* (the rest of the genes below 25 %) and significantly higher methylation of *DPYS* in tumor compared with mucosa tissues (Additional file 1: Figure S9).

The variability among the patient cohorts could also explain the lack of replication of some results. On the other hand, the use of validation sets helped to achieve more convincing interpretation of the replicated results and where possible the analysis of combined sets increased the study power. The lack of tissue aliquots for simultaneous isolation of RNA and DNA necessitated the use of two different validation sets. This fact precluded us to perform the otherwise preferable combined analyses of both validation sets. Consequently, missing data for comparison of methylation levels with DFI may be seen as a study limitation.

Conclusions

In this study, we addressed importance of genes involved in the 5-FU pathway for the prognosis of colorectal cancer patients. In conclusion, chemotherapy-naïve colorectal tumors seem to have favorable 5-FU pathway gene expression profile. Additionally, low RRM2 gene expression and *UPB1* methylation level represent treatment-independent poor prognostic factors for colorectal carcinoma patients and should be further investigated in relation to other epigenetic regulation pathways (such as microRNAs) and in a complexity with other relevant systems, such as DNA repair.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Lists TaqMan Gene Expression Assays used in the study. **Table S2** shows sequence of primers and PCR conditions used for promoter CpG methylation profiling. **Table S3** shows results of stage-adjusted Cox regression of associations between transcript levels and DFI of colorectal cancer patients from the combined testing and validation I sets. **Figure S1** depicts 5-Fluorouracil pathway gene expression levels in the studied sets of colorectal cancer patients. **Figure S2** shows results of analysis of associations between transcript levels and disease-free survival of colorectal cancer patients from the validation set I. **Figure S3** shows results of analysis of associations between transcript levels and disease-free survival of colorectal cancer patients from the testing set. **Figure S4** shows results of analysis of associations between transcript levels and disease-free survival of colorectal cancer patients from the combined testing and validation I set. **Figure S5** shows results of analysis of associations between transcript levels and disease-free survival of 5-fluorouracil-treated colorectal cancer patients from the combined testing and validation I set. **Figure S6** shows results of analysis of associations between transcript levels and disease-free survival of untreated colorectal cancer patients from the validation I set. **Figure S7** shows results of analysis of associations between *UPB1* methylation levels and disease-free survival of colorectal cancer patients. **Figure S8** shows analysis of association of RRM2 expression with disease-free survival of colorectal cancer patients based on publicly available GEO database. **Figure S9** shows analysis of methylation profiles of 5-FU pathway genes in human colorectal tumor (red boxes) and mucosa (green boxes) tissues from publicly available MethHC database. (DOC 1916 kb)

Abbreviations

5-FU: 5-fluorouracil; 95 % CI: 95 % confidence interval; CCND2: Cyclin D2; cDNA: Complementary DNA; CDX2: Caudal-type homeobox transcription factor 2; CpG: Cytosine-phosphate-guanine; CR: Complete response; DFI: Disease-free interval; DFS: Disease-free survival; DPYD: Dihydropyrimidine

dehydrogenase; DPYS: Dihydropyrimidinase; dTTP: Deoxythymidine triphosphate; EIF2B1: Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1; FDR: False discovery rate; FdUMP: Fluorodeoxyuridine monophosphate; GEO: Gene expression omnibus; HR: Hazard ratio; HRM: High resolution melting; HSPB1: Heat shock 27kDa protein 1; ICD-10: The international classification of diseases, version 10; MIQE: Minimum information for publication of qPCR experiments; MRPL19: Mitochondrial ribosomal protein L19; OMIM: Online mendelian inheritance in man; PCR: Polymerase chain reaction; PD: Progression of the disease; PharmGKB: The pharmacogenomics knowledgebase; POLR2A: DNA-directed RNA polymerase II subunit A; PPAT: Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase; PR: Partial response; PSMC4: Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4; qPCR: Quantitative real-time PCR; RECIST: Response evaluation criteria in solid tumors; RRM1/2: Ribonuclease reductase subunit M1/2; SD: Stabilization of the disease; SLC29A1: Solute carrier transporter 29A1; Ta: Annealing temperature; TK1: Thymidine kinase; Tm: Melting temperature; TYMP: Thymidine phosphorylase; TYMS: Thymidylate synthase; UCK1/2: Uridine cytidine kinase 1/2; UICC: Union for international cancer control; UMPS: Uridine monophosphate synthetase; UPB1: Beta-ureidopropionase; UPP1/2: Uridine phosphorylase 1/2

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (project no.: NT/14329-3 to VL), Czech Science Foundation (project no.: P301/12/1585 to P.V.), Grant Agency of Charles University in Prague (project no. 1200314 to TK), and by the National Sustainability Program I (NPU I) (project no. LO1503 to P.S.).

Availability of data and materials

The datasets during and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

TK, PaP, IK, PB, PM, SS, and HV carried out the experimental studies, participated in the evaluation of results, and drafted the manuscript. PS, VL, and PP designed and coordinated the study, performed statistical analyses, and drafted the manuscript. NP, SM, PIP, BJ and VO recruited patients, collected clinical data, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All patients, aware of the study aims, methods and potential risks, signed consensually an informed consent form. The study was approved by the Ethical Committees of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen and General Teaching Hospital in Prague, Czech Republic.

Author details

¹Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic. ²Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. ³Biomedical Centre, Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic. ⁴Department of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 00 Prague 4, Czech Republic. ⁵Department of Surgery, Teaching Hospital and Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic. ⁶Department of Surgery, General University Hospital in Prague, First Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic. ⁷Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic.

Received: 4 January 2016 Accepted: 30 September 2016

Published online: 12 October 2016

References

- Bray F, Ren JS, Masuyer E, et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132:1133–45.
- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.
- Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;352:476–87.
- Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*. 1989;16:215–37.
- Mattison LK, Soong R, Diasio RB. Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2002;3:485–92.
- Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, et al. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:282–98.
- Donada M, Bonin S, Barbazza R, et al. Management of stage II colon cancer - the use of molecular biomarkers for adjuvant therapy decision. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:36.
- Lu Y, Zhuo C, Cui B, Liu Z, et al. TYMS serves as a prognostic indicator to predict the lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. *Clin Biochem*. 2013;46:1478–83.
- Li S, Zhu L, Yao L, et al. Association between ERCC1 and TS mRNA levels and disease free survival in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin and fluorouracil (5-FU) adjuvant chemotherapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:154.
- Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann Oncol*. 2008;19:915–9.
- Goto T, Shinmura K, Yokomizo K, et al. Expression levels of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and thymidine phosphorylase in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012;32:1757–62.
- Ogawa M, Watanabe M, Mitsuyama Y, et al. Thymidine phosphorylase mRNA expression may be a predictor of response to post-operative adjuvant chemotherapy with S-1 in patients with stage III colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2014;8:2463–8.
- Clarke ML, Mackey JR, Baldwin SA, et al. The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. *Cancer Treat Res*. 2002;112:27–47.
- Phua LC, Mal M, Koh PK, et al. Investigating the role of nucleoside transporters in the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71:817–23.
- Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis*. 2012;27:187–96.
- Slyskova J, Korenkova V, Collins AR, et al. Functional, genetic, and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18:5878–87.
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:205–16.
- Brynychova V, Hlavac V, Ehrlichova M, et al. Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression. *Future Oncol*. 2013;9:427–38.
- Soucek P, Azenbacher P, Skoumalova I, et al. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 2005;23:1417–22.
- Hlavac V, Brynychova V, Vaclavikova R, et al. The role of cytochromes P450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients. *Medicine*. 2014;93:e2552014.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611–22.
- Hlavac V, Brynychova V, Vaclavikova R, et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics*. 2013;14:515–29.

23. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e36.
24. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, et al. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21:237–42.
25. van Kuilenburg AB, Meisma R, Beke E, et al. b-Ureidopropionase deficiency: an inborn error of pyrimidine degradation associated with neurological abnormalities. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2793–801.
26. Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, et al. Contribution of the β -ureidopropionase (JPB1) gene alterations to the development of fluoropyrimidine-related toxicity. *Pharmacol Rep.* 2012;64:1234–42.
27. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489:57–74.
28. Verzi MP, Shin H, He HH, et al. Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev Cell.* 2010;19:713–26.
29. Kidd EA, Yu J, Li X, et al. Variance in the expression of 5-Fluorouracil pathway genes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2612–9.
30. Chung W, Kwabi-Addo B, Iltmann M, et al. Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS One.* 2008;3:e2079.
31. Vasiljevic N, Ahmad AS, Thorat MA, et al. DNA methylation gene-based models indicating independent poor outcome in prostate cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:655.
32. Liu X, Zhang H, Lai L, et al. Ribonucleotide reductase small subunit M2 serves as a prognostic biomarker and predicts poor survival of colorectal cancers. *Clin Sci.* 2013;124:567–78.
33. D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, et al. Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell.* 2012;149:1023–34.
34. Liu X, Lai L, Wang X, et al. Ribonucleotide reductase small subunit M2B prognoses better survival in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2011;71:3202–13.
35. Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martinez-Ledesma E, et al. SurVExpress: an online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis. *PLoS One.* 2013;8(9):e74250.
36. Huang WY, Hsu SD, Huang HY, et al. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D856–61.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



SVOBODA, M., J. SLYŠKOVÁ, M. SCHNEIDEROVÁ, P. MAKOVICKÝ, L. BIELIK, M. LEVÝ, L. LIPSKÁ, B. HEMMELOVÁ, Z. KALA, M. PROTIVANKOVÁ, O. VYČÍTAL, V. LIŠKA, L. SCHWARZOVÁ, L. VODIČKOVÁ a P. VODIČKA. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis* [online]. 2014, **35**(7), 1510-1515 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1093/carcin/bgu055. ISSN 0143-3334. IF 5,635.

HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients

Miroslav Svoboda^{1,2,8,†}, Jana Slysokova^{1,2,†},
Michaela Schneiderova³, Peter Makovicky⁴,
Ludovit Bidik^{1,2,5}, Miroslav Levy⁶, Ludmila Lipska⁶,
Beata Hemmelova⁷, Zdenek Kala⁷, Marketa Protivankova⁸,
Ondrej Vycital^{9,10}, Vadav Liska^{9,10}, Lucie Schwarzova²,
Ludmila Vodickova^{1,2} and Pavel Vodicka^{1,2}

¹Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague 14220, Czech Republic, ²Institute of Biology and Medical Genetics, First Medical Faculty, Charles University, Prague 12000, Czech Republic, ³Department of Surgery, General University Hospital in Prague, First Medical Faculty, Charles University, Prague 12111, Czech Republic, ⁴Department of Veterinary Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague 16521, Czech Republic, ⁵Faculty of Science, Charles University, Prague 12800, Czech Republic, ⁶Department of Surgery, Thomayer Hospital and First Faculty of Medicine, Prague 14200, Czech Republic, ⁷Department of Surgery and ⁸Department of Internal Medicine, Haematology and Oncology, University Hospital Brno and Masaryk University, Brno 62500, Czech Republic, ⁹Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital Plzen, Charles University, Plzen 30606, Czech Republic and ¹⁰Biomedical Centre, Medical School Plzen, Charles University in Prague, Plzen 30605, Czech Republic

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +420 296 442 251; Fax: +420 296 442 782; Email: svoboda@oncobios.org

Correspondence may also be addressed to Pavel Vodicka. Tel: +420 296 442 694; Fax: +420 296 442 782; Email: pvodicka@biomed.cas.cz

Colorectal cancer (CRC) is one of the main causes of death of neoplasia. Demand for predictive and prognostic markers to reverse this trend is increasing. Long non-coding RNA HOTAIR (Homeobox Transcript Antisense Intergenic RNA) overexpression in tumors was previously associated with poor prognosis and higher mortality in different carcinomas. We analyzed HOTAIR expression levels in tumor and blood of incident sporadic CRC patients in relation to their overall survival with the aim to evaluate surrogate prognostic marker for CRC. Tissue donor group consisted of 73 CRC patients sampled for tumor and normal tissue. Blood donor group was represented by 84 CRC patients compared with 40 healthy controls. Patients were characterized for tumor-node-metastasis stage, tumor grade, microsatellite instability and tumor penetration by stromal cells. HOTAIR levels were assessed by real-time quantitative PCR. CRC patients had higher HOTAIR expression in blood than healthy controls ($P = 0.0001$), whereas there was no difference in HOTAIR levels between tumor and adjacent mucosa of CRC patients. HOTAIR levels positively correlated between blood and tumor ($R = 0.43$, $P = 0.03$). High HOTAIR levels in tumors were associated with higher mortality of patients [Cox's proportional hazard, hazard ratio = 4.4, 95% confidence interval: 1.0–19.2, $P = 0.046$]. The hazard ratio was even higher when blood HOTAIR levels were taken into account (hazard ratio = 5.9, 95% confidence interval: 1.3–26.1, $P = 0.019$). Upregulated HOTAIR relative expression in primary tumors and in blood of CRC patients is associated with unfavorable prognosis. Our data suggest that HOTAIR blood levels may serve as potential surrogate prognostic marker in sporadic CRC.

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; CRC, colorectal cancer; HOTAIR, Homeobox Transcript Antisense Intergenic RNA; lncRNA, long non-coding RNA; ncRNA, non-coding RNA; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; qPCR, quantitative PCR; ROC, receiver operating characteristic; TNM, tumor-node-metastasis.

[†]These authors contributed equally to this work.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Most of human genome is transcribed to RNA, but only ~2% of RNA encodes functional proteins (1,2). RNAs that lack protein-coding ability and do not contain open-reading frames longer than 100 nucleotides are referred to as non-coding RNAs (ncRNAs). ncRNAs are arbitrarily subdivided into groups of small ncRNAs and long ncRNAs (lncRNAs), the latter being longer than 200 nucleotides. lncRNAs are transcribed from at least 10 000 genomic sites located throughout all chromosomes (3). Biological roles of most lncRNAs are unknown or poorly understood. However, lncRNAs are recently increasingly emerging as molecules that take its part in human carcinogenesis. Although their exact mechanism contributing to carcinogenesis is almost unknown at present, altered expression of several lncRNAs has recently been attributed to pathogenesis of some malignant neoplasia, including colorectal cancer (CRC) (4).

An lncRNA HOTAIR (Homeobox Transcript Antisense Intergenic RNA) takes part in epigenetic regulation of gene transcription. HOTAIR interacts on its 5' end with Polycomb repressive complex 2 to remodel chromatin and ensure silencing of HOX genes during embryonic development, whereas on 3' end HOTAIR interacts with histone demethylase (5). It is thus an important epigenetic factor involved in the embryonic differentiation of tissues. In human association studies, HOTAIR has been recognized to be related with metastatic activity of primary cancer and with the patients' prognosis. HOTAIR levels were significantly elevated in gastrointestinal stromal tumors (6) and >1000-fold in metastatic breast cancer (7). Link between poor patients prognosis and higher expression of HOTAIR was reported for pancreatic (8) and hepatocellular cancers (9). One of the possible mechanisms underlying these observations was brought up by *in vitro* study (7). The authors found that HOTAIR-induced overexpression in epithelial cancer cells caused genome-wide retargeting of Polycomb repressive complex 2, resulting in altered histone methylation, gene expression and finally, cancer invasiveness. Moreover, a repression of several important tumor suppressor genes and an induction of certain prometastatic genes were identified to explain prometastatic effect of high HOTAIR expression (7).

In the present study, we analyzed HOTAIR lncRNA levels in tumors and in blood of sporadic CRC patients and in association with their overall survival. There is only one study currently available focused on HOTAIR in relation to sporadic CRC, which showed that HOTAIR overexpression is associated with higher risk of metastasis and poor prognosis of patients (10). Levels of HOTAIR have not yet been studied in peripheral blood of CRC patients. Therefore, our aim was to explore whether tumor levels of HOTAIR may predict sporadic CRC patient's survival and if so, whether blood levels of HOTAIR might represent a surrogate prognostic marker. Furthermore, since higher tumor stage [tumor-node-metastasis (TNM) 3 and 4], its particular localization (left colon), histology (high content of stromal cells in tumor) and microsatellite instability are hallmarks of worse prognosis of CRC patients, HOTAIR relative expression in tumor tissue and blood have been analyzed with respect to all these clinicopathological parameters in our study. Sporadic CRC is still a leading malignancy in Western countries, regarding both incidence and mortality, partially due to a late diagnosis and a lack of cost-effective predictive and prognostic markers (11). Reliable predictive and prognostic marker, analyzed in non-invasively obtained surrogate samples, may have vast clinical potential.

Materials and methods

Study subjects

Incident CRC cases were recruited at the time of the diagnosis among patients treated at surgical departments of Thomayer Hospital in Prague, General

University Hospital in Prague, University Hospital in Brno and Medical School and Teaching Hospital in Hlsen, all located in the Czech Republic, between 2008 and 2012. Only histologically confirmed new CRC cases that had not been previously diagnosed for cancer or inflammatory bowel disease were included into the study. Collected clinical data contained information about tumor localization, TNM stage according to American Joint Committee on Cancer (12), tumor grade and microsatellite instability status analyzed according the reference (13). To evaluate overall survival (from diagnosis until death or censoring event), patients were followed-up over a period of 35 months on average (with range 12–54 months).

Study involved two different groups of sporadic CRC patients. The first group (tissue donors) consisted of 73 patients who underwent surgical resection or probatory biopsy of the tumor, and in 52 of them adjacent healthy tissue was available as well. Patients did not undergo any adjuvant therapy prior to sampling. Regarding 14 patients with rectal cancer who underwent preoperative neoadjuvant chemoradiotherapy, the tissue specimens were collected as a part of probatory biopsy to determine precise pretreatment TNM stage. The second group (blood donors) involved 84 patients who were sampled for peripheral blood, taken at the time of diagnosis, i.e. before surgery and any therapy. In a subgroup of 26 patients paired tumor and healthy tissues and peripheral blood were available. To investigate whether HOTAIR lncRNA can be detected in plasma, 12 patients and 8 controls were studied.

Blood-measured HOTAIR levels in CRC patients were compared with 40 healthy controls, recruited from healthy volunteers residing retirement homes, blood bank donors and older healthy relatives of our collaborators and laboratory staff. Only subjects with no previous diagnosis of CRC or any malignant disease and without manifestation of any acute disease or injury at the time of blood collection were enrolled. Controls had not been exposed to any potentially harmful chemicals except for those common to everyday environmental sources and were sampled without any particular requirement for fasting prior to blood sampling. Structured questionnaire was received from all blood donor CRC patients and healthy controls. They reported their smoking habits, alcohol consumption, body mass index (calculated from weight and height) and presence of diabetes. All participants were of Caucasian origin. Participating subjects were properly informed about the aims of the research; they signed a written consent and approval for molecular genetic analysis, in accord with the Helsinki declaration. The Ethics Committees of all collaborating hospitals approved the design of the study.

Histological examination of tumor and mucosa samples

Tumor samples were taken from macroscopically distinguishable tumor central area far from the visible tumor edge and necrotic sites. Mucosa samples were taken 5–10 cm distant from the tumor. Samples were immersed in RNA-preserving solution RNALater according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies, Carlsbad, CA) immediately after tissue removal. Tissues were evaluated for carcinoma/stromal cells ratio by objective morphometry using the NikonElipse E600 microscope and by NIS-Elements version 3.0 software (Nikon Instruments, Amsterdam, Netherlands). Ten microscopic fields per sample were randomly selected and measured for content of stromal cells. The average of 10 measurements per sample was determined. Samples were categorized to a 'high' stroma group when >50% of tumor content was formed by stromal cells, the rest was attributed to 'low' stroma category.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral venous blood was drawn from each subject into EDTA-K2 tubes (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany), gently shaken and kept at 4°C until the processing, no longer than 1 h since the sampling. Two ml of blood were layered over Ficoll-Paque™ Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and separated according to the manufacturer's recommendations. Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were immediately mixed with 1 ml of Trizol reagent and stored at –80°C for subsequent RNA isolation. To obtain plasma, the whole blood was centrifuged at 160g at room temperature. Plasma was stored at –80°C.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA from tumors, healthy mucosa and blood plasma was isolated by a MirVana isolation kit (Life Technologies). Total RNA from PBMC was isolated using TRIzol according to the manufacturer's procedure (Life Technologies) and kept at –80°C. RNA concentration and purity was measured on a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). The OD_{260/280} ratios for all samples were between 1.8 and 2.0. RNA integrity was determined using Agilent 2100 Bioanalyzer, with RNA 6000 Nano Assay Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The RNA integrity of all samples ranged between 6.0 and 10.0. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 500 ng of total RNA by using a RevertAid™ Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) with random hexamer primers in a final volume of 40 µl, following the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at –20°C.

Reverse transcriptase qPCR

Reverse transcriptase quantitative PCR (qPCR) was performed on a real-time 7500 PCR system (Life Technologies) using Precision™ 2x qPCR Mastermix and custom-designed real-time PCR assays with PerfectProbe™ (Primer Design Ltd, Southampton, UK). TaqMan-based fluorescence detection (fluorogenic 5'-nuclease) assay for routine real-time PCR analyses was used. The most suitable reference housekeeping gene from a panel of commonly known references ACTB, GAPDH, HPRT, 18S rRNA, PPIA and GUS was selected using both Genorm and Normfinder algorithms implemented in Genex software. For the normalization of tissue-obtained data, GUS (glucuronidase) was used as the best reference gene, whereas PPIA (cyclophilin A) was selected for normalization of blood-obtained data. The sequence of HOTAIR primer set is as follows: sense: 5'-ACATTCTGCC TGATTTCG-3', antisense: 5'-CTTACCC CACGGAGCAG-3' detecting transcript sequence under Accession Number NR_003716.

The PCR reactions were performed in a volume of 30 µl, containing 30ng of cDNA for each sample. The cycling program was set for initial hold at 95°C for 10min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing and extension at 50°C for 32 s and 72°C for 15 s. Each run contained positive (interplate calibrator, 30ng of human cDNA) and negative (no template) control. Results were analyzed using integrated System SDS 7500 Software version 1.3.1 (Life Technologies). The detection limit was established by calibration curve experiments. The calibration curve was linear until C_T 35. HOTAIR levels exceeding cutoff value of C_T 35 were considered negative. Sensitivity and specificity of HOTAIR detection were calculated by means of receiver operating characteristic (ROC) curve method using MedCalc software. Data are expressed as relative to median quantities using $\Delta\Delta C_T$ method. Negligible role of relative expression evaluation method on the precision of reverse transcriptase qPCR data was confirmed by comparison of ROC curves from three different evaluation methods. The difference between evaluation methods was represented by the use of three different reference values: (i) sample with the lowest expression, (ii) percentage of total expression and (iii) median expression of control group. Method used for data evaluation had no effect on the area under the ROC curves (Supplementary Material S1, available at *Carcinogenesis* Online).

Statistical analysis

HOTAIR relative expression data did not exhibit normal distribution according to the Shapiro–Wilk test (SH-W = 0.597, $P = 0.000$) and were therefore processed by non-parametric tests (Mann–Whitney *U*-test, Kruskal–Wallis and Spearman correlation test). Survival rates were calculated by Kaplan–Meier survival analysis and log-rank test. Hazard ratios were evaluated by means of Cox proportional hazards model univariate and multivariate analyses. Statistical analyses were performed using Statistica 9 (StatSoft, Tulsa, OK), Medcalc (MedCalc, Ostend, Belgium), GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) and IBM SPSS Statistics 18 (IBM, NY) softwares.

Results

Characteristics of study population

Clinicopathological characteristics of CRC patients who provided tissue samples (tissue donors) or blood samples (blood donors) are depicted in Table I. Median age of tissue donors was 67 years (range 38–85) and they consisted of 46 males and 27 females. Median age of blood donors was 67 years (range 32–88), and this group involved 58 males and 26 females. Healthy controls were of similar age distribution as CRC patients, with median of 66 years (range 32–85; $P = 0.301$) and consisted of 16 males and 24 females. The effect of possible confounding factors (age, sex, smoking, alcohol intake, body mass index and diabetes) was assessed by logistic regression. None of the confounders influenced HOTAIR expression neither in blood donors nor healthy controls (Supplementary Material S2, available at *Carcinogenesis* Online).

HOTAIR relative expression in tumor versus healthy mucosa

There was no difference in HOTAIR relative expression between tumor and adjacent cancer cells-free mucosa (1.18 versus 1.00, $P = 0.81$; Figure 1A), and expression levels correlated between both tissues ($R = 0.32$, $P = 0.022$). HOTAIR relative expressions in tumors were not significantly associated with any investigated clinicopathological features (Table I). The ratio of stromal cells content in the tumor had no influence on HOTAIR relative expression (1.11 versus 1.21, $P = 0.44$).

Table 1. Clinicopathological characteristics of tissue donor and blood donor CRC patients and their respective HOTAIR relative expression levels measured in tumor and blood samples

		Tissue donors, n (%)	HOTAIR in tumor	<i>P</i> ^a	Blood donors, n (%)	HOTAIR in blood	<i>P</i> ^a	
Age ^b	>67	39 (53)	1.31	0.96	41 (49)	4.66	0.31	
	≤67	34 (47)	1.15		43 (51)	6.16		
Sex	Men	46 (63)	1.15	0.87	58 (69)	5.71	0.31	
	Women	27 (37)	1.25		26 (31)	4.71		
TNM staging ^c	I–III	51 (69)	1.16	0.43	51 (60)	4.78	0.20	
	IV	22 (31)	1.29		33 (40)	5.28		
	Grade ^d	1–2	61 (84)		1.03	57 (69)		6.16
3	12 (16)	3.36	26 (31)	3.74				
Tumor localization	Colon	36 (49)	1.15	0.76	43 (51)	4.78	0.58	
	Rectum	37 (51)	1.25		41 (49)	5.73		
	Right colon	17 (23)	1.15		13 (15)	2.75		0.03
	Left colon	56 (77)	1.20		71 (85)	5.73		
Adjuvant therapy	Yes	57 (78)	1.31	0.13	45 (54)	5.17	0.32	
	No	16 (22)	0.68		39 (46)	5.27		
MSI	Stable	37 (92)	1.23	NA ^e	55 (87)	4.14	NA ^e	
	Unstable	3 (8)	0.62		8 (13)	3.54		

MSI, microsatellite instability; NA, not available.

^aMann–Whitney two-sided *U*-test.

^bGroups were split by mean age of the study group.

^cTNM stage system according to American Joint Committee on Cancer classification.

^dGrade 1 stands for well-differentiated tumor, grade 3 stands for poorly differentiated tumor.

^e*P* values not presented due to low number of patients with MSI unstable CRC.

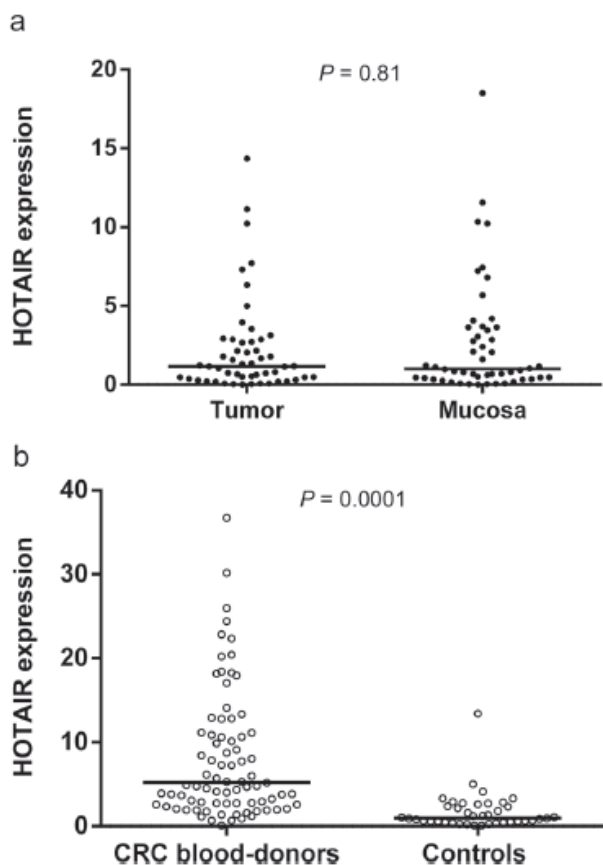


Fig. 1. Comparison of HOTAIR lncRNA levels between tumors ($n = 73$) and healthy mucosa ($n = 52$) (a) and difference between HOTAIR expression in blood of CRC blood donors ($n = 84$) and healthy controls ($n = 40$) (b).

HOTAIR relative expression in blood of CRC patients versus healthy controls

Significantly higher HOTAIR median relative expression was observed in PBMC of patients as compared with controls (5.22 versus 1.00, $P = 0.0001$; Figure 1B). In accordance with this significant difference, ROC analysis exhibited area under curve 0.87%, $P < 0.0001$ at 67% sensitivity and 92.5% specificity of tumor detection, respectively (Supplementary Material S3, available at *Carcinogenesis* Online). Patients with tumors localized in right colon had lower blood levels of HOTAIR as compared with patients with left colon tumors ($P = 0.03$). Patients with the poorly differentiated tumors (grade 3) showed lower median levels of HOTAIR than those with differentiated tumors (grade 1 and 2, $P = 0.03$; Table 1). TNM staging did not show any association with HOTAIR expression (Table 1). Since tissue and blood samples from patients were collected from different hospitals, we have also tested possible effect of the sampling center on the observed HOTAIR levels. No significant differences in HOTAIR expression between recruiting hospitals were observed (Supplementary Material S4, available at *Carcinogenesis* Online). In the plasma samples of CRC patients HOTAIR lncRNA levels never reached the limit of detection of $C_T = 35$. Only in three out of eight healthy controls, HOTAIR was present within the limit of detection. Therefore, HOTAIR expression in plasma was not further analyzed.

Correlation of HOTAIR relative expression between tumor tissue, healthy tissue and blood

In a subgroup of 26 patients sampled for all three biological specimens, significant correlation was observed between HOTAIR relative expression in tumors and paired healthy mucosa ($R = 0.68$, $P < 0.001$), mucosa and PBMC ($R = 0.70$, $P < 0.001$) and also between tumor and PBMC ($R = 0.41$, $P = 0.036$).

Relationship of HOTAIR relative expression with patients' prognosis

Univariate and multivariate Cox proportional hazards analysis was performed using main clinicopathological variables including TNM stage, histologic grade and HOTAIR expression. Cox analysis was calculated using all effects building, Breslow likelihood. We have arbitrarily subdivided patients according to their HOTAIR tumor/blood expression into two groups using best fit cutoff values based on

ROC analysis. Expression levels of HOTAIR above 0.7 for tumors and 4.4 for blood, respectively, were considered as 'high' HOTAIR relative expression groups. Univariate Cox proportional hazards analysis showed that patients with high HOTAIR expressions in tumors and patients with metastases had significantly higher risk of death. High HOTAIR tumor level together with the presence of metastases was negative prognostic factor according to multivariate Cox proportional hazards analysis (Table II). High HOTAIR levels detected in mucosa did not have any significant impact on death hazard. High HOTAIR level in blood was also associated with higher hazard ratio of death in univariate analysis, together with TNM IV stage. Multivariate analysis using main clinicopathological features such as TNM and histologic grade showed major effects of HOTAIR overexpression and TNM stage IV on the patients' prognosis (Table III). Cumulative proportion survival (Kaplan–Meier) showed significantly shorter survival in patients with high HOTAIR relative expression detected in tumor tissue (log-rank test $P = 0.030$; Figure 2A) as well as in blood (log-rank test $P = 0.008$; Figure 2B).

Discussion

HOTAIR lncRNA contributes to complex regulation of homeobox genes, important in the determination of spatiotemporal evolution

of developing embryo. HOTAIR is therefore expressed at defined stages and sites of embryonal development (14). On the other hand, HOTAIR relative expression in adults have been documented in skin fibroblasts and its expression levels copy anteroposterior developmental axis, the highest expression being present in skin fibroblasts of the lower part of human body (14). HOTAIR is aberrantly overexpressed in several tumors, including breast, CRC and gastrointestinal stromal tumors (6,7,10). Although all these tumors exhibiting HOTAIR overexpression generally contain various amounts of fibroblast-like and inflammatory stromal components, a little is known, whether the HOTAIR overexpression is confined strictly to carcinoma cells or how extensively it could be associated with fibroblast-like or inflammatory stromal component of CRC tumors. Very recent contribution reports a semiquantitative determination of HOTAIR in formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues in breast cancer (15). Our present results show a lack of significant difference in HOTAIR overexpression between tumors containing mostly carcinoma cells and tumors containing predominantly stromal components. This finding suggests that high HOTAIR relative expression level is not specifically associated with either epithelial or fibroblast-like component of CRC carcinomas. This fact may have an important implication for the role of HOTAIR in tumor pathogenesis: HOTAIR relative expression levels do not seem to be directly associated with mutated carcinoma cell

Table II. Cox proportional hazard analysis: influence of HOTAIR tumor levels and different clinicopathological parameters on overall survival in tissue donor CRC patients

Univariate analysis	Category		Hazard ratio	Confidence interval		P
HOTAIR in tumor ^a	Low (n = 37)	High (n = 36)	4.43	1.02	19.19	0.046
Age	≤67 (n = 36)	>67 (n = 37)	1.96	0.77	4.97	0.157
Sex	F (n = 27)	M (n = 46)	1.25	0.40	3.85	0.703
TNM staging ^b	I–III (n = 51)	IV (n = 22)	3.61	1.447	9.017	0.006
Grade	1–2 (n = 61)	3 (n = 12)	3.42	0.46	25.67	0.232
Tumor localization	Colon (n = 36)	Rectum (n = 37)	1.43	0.54	3.81	0.470
	R. c. ^c (n = 17)	L. c. ^c (n = 56)	1.50	0.59	3.82	0.396
Stromal content	≤50% (n = 33)	>50% (n = 40)	0.70	0.20	2.50	0.582
Multivariate analysis	Category		Hazard ratio	Confidence interval		P
HOTAIR in tumor ^a	Low (n = 37)	High (n = 36)	4.46	1.02	19.79	0.048
TNM staging ^b	I–III (n = 22)	IV (n = 22)	3.87	1.49	10.07	0.006
Grade	1–2 (n = 61)	3 (n = 12)	0.60	0.20	1.77	0.352

First value in the 'Category' column serves as a reference value for hazard ratio calculation.

^aLow and high HOTAIR groups were split by the cutoff value 0.7.

^bTNM stage system according to American Joint Committee on Cancer classification.

^cR. c. = right colon, L. c. = left colon.

Table III. Cox proportional hazard analysis: influence of HOTAIR blood levels and different clinicopathological parameters on survival in blood donor CRC patients

Univariate analysis	Category		Hazard ratio	Confidence interval		P
HOTAIR in blood ^a	Low (n = 36)	High (n = 48)	5.90	1.34	26.1	0.019
Age	≤67 (n = 43)	>67 (n = 41)	1.19	0.45	3.18	0.722
Sex	F (n = 26)	M (n = 58)	1.74	0.56	5.43	0.334
TNM staging ^b	I–III (n = 51)	IV (n = 33)	7.18	2.02	25.48	0.002
Grade	1–2 (n = 57)	3 (n = 26)	0.81	0.28	2.35	0.697
Tumor localization	Colon (n = 43)	Rectum (n = 41)	1.42	0.49	4.09	0.514
	R. c. ^c (n = 13)	L. c. ^c (n = 71)	NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d
Multivariate analysis	Category		Hazard ratio	Confidence interval		P
HOTAIR in blood ^a	Low (n = 36)	High (n = 48)	4.96	1.10	22.37	0.037
TNM staging ^b	I–III (n = 51)	IV (n = 33)	8.38	2.22	31.56	0.002
Grade	1–2 (n = 57)	3 (n = 26)	2.23	0.722	6.90	0.163

NA, not available. First value in the 'Category' column serves as a reference value for hazard ratio calculation.

^aLow and high HOTAIR groups split by the cutoff value 4.4.

^bTNM stage system according to American Joint Committee on Cancer classification.

^cR. c. = right colon, L. c. = left colon.

^dData are not available due to low number of patients with right colon tumor.

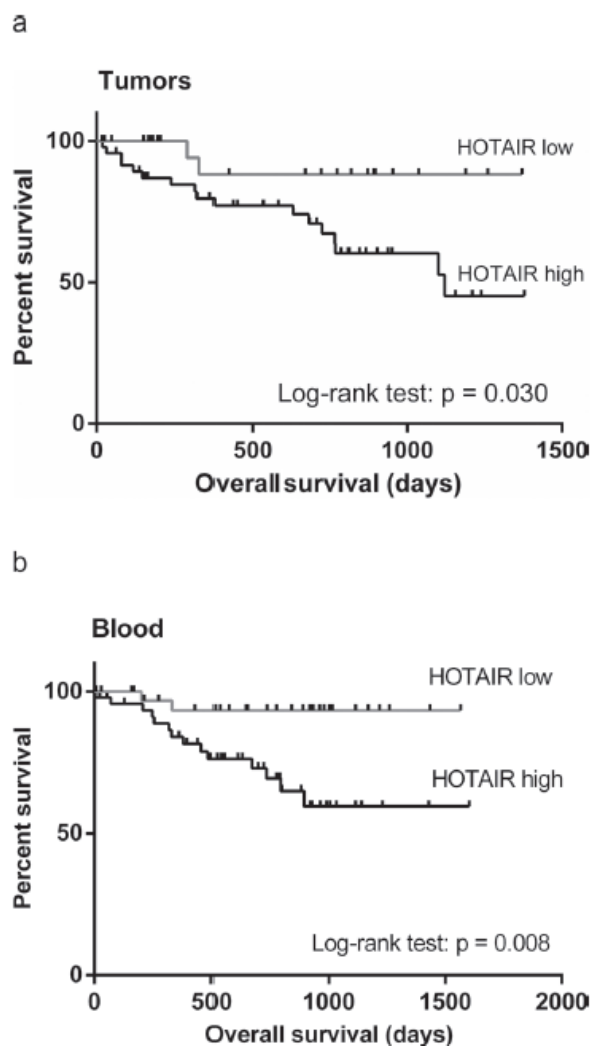


Fig. 2. Kaplan–Meier overall survival of 73 CRC tissue donors (a) and 84 CRC blood donors (b) stratified for low and high HOTAIR relative expressions.

clone from which carcinoma may originate, or with its clonal expansion. Most likely aberrant HOTAIR relative expression is rather a consequence of yet not fully identified (epigenetic) changes that force both epithelial and stromal (fibroblast-like eventually inflammatory) cells to upregulate HOTAIR within the tumor microenvironment. Mutual exosome transfer between breast carcinoma cells and stromal cells was documented (16). This may be one of many events that participate on the mutual communication between carcinoma cells and stroma and that can influence expression of prometastatic genes.

Interestingly, we did not observe any difference in median level of HOTAIR expression between tumors and adjacent healthy mucosae. Taking this observation with caution, we have controlled for potential role of relative expression evaluation method on the precision of reverse transcriptase qPCR data. Three different evaluation methods (i.e. use of reference sample with the lowest expression, percentage of total expression and median expression of control group) were applied to compare ROC curves. The data suggest that the evaluation method had no effect on the final observation.

We have observed that high HOTAIR levels in tumor tissue were associated with overall patients' prognosis, being related to higher risk of death and shorter survival. By multivariate Cox proportional hazard

analysis we have further recorded that HOTAIR relative expression in tumor may serve as prognostic marker independent on major clinicopathological characteristics, except for metastasis status. Kogo *et al.* (10) reported that HOTAIR relative expression in tumors was an independent prognostic indicator of overall survival, with relative risk of death being 5.6 times higher in CRC patients with higher HOTAIR levels. This value is comparable with our observation of hazard ratio 4.4 in CRC patients with higher HOTAIR relative expression in tumors. Moreover, high HOTAIR levels were found to be related to poor prognosis in several other cancers such as pancreatic (8), nasopharyngeal (17), gastrointestinal stromal tumors (6), hepatocellular (9) and breast carcinoma (7).

Comparing HOTAIR levels measured in blood of CRC patients and healthy controls, patients had 4-fold higher levels of HOTAIR lncRNA. Moreover, these levels positively correlated with those in tumors and healthy mucosa. We assume therefore that HOTAIR expression in blood may be used as a surrogate to cancer target tissue and, additionally, levels of HOTAIR in blood might serve as a surrogate marker associated with CRC progression. High HOTAIR levels in PBMC were again associated with patients' overall survival, by increasing risks of death while decreasing survival period. However, HOTAIR relative expression in blood appeared to be prognostic factor in univariate Cox proportional hazard analysis only, whereas in multivariate analysis high HOTAIR relative expression was dependent on the presence of metastases, a phenomenon frequently observed in other cancers (7,8,17). Since HOTAIR blood levels were not yet reported for CRC patients and their survival, our novel contribution is related to the use of HOTAIR relative expression from non-invasively obtained surrogate tissue for an early estimation of the prognosis of CRC.

On the contrary to HOTAIR relative expression in primary tumors, its expression in PBMC was related to tumor localization. PBMCs from patients with ascendant (right) and transversal colon carcinomas exhibited lower HOTAIR relative expression compared with those with the tumors in descending (left) and sigmoideal parts of the bowel and rectum. Assuming that low HOTAIR is associated with better prognosis and *vice versa*, our data are in consent with the fact that colorectal tumors with chromosomal instability and aneuploidy, often localized in the left part of the bowel, exhibit an overall worse prognosis than those in the right colon (18). Thus, our study underlines the prognostic potential of HOTAIR expression level in tumor tissues of CRC patients, and for the first time also the prognostic value of HOTAIR expression in PBMCs. The study was conducted on ethnically homogeneous Central European population, which was well characterized for clinicopathological parameters and inspected for possible confounders. Moreover, all patients were incident, sampled for blood or tissue prior to any radio- or chemotherapy, to prevent possible interference with examined parameters. However, due to a relatively limited extent of the study population, the study should be considered as an exploratory. These facts underline the need to further validate above promising data on the replication set of CRC patients.

In summary, our results show that HOTAIR overexpression both in blood and primary tumors is associated with unfavorable prognosis and it may identify patients that would require more intensive care concerning personally tailored preventive medical examinations and treatment.

Supplementary material

Supplementary Materials S1–S4 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

European Regional Development Fund (CZ.GACR: GAP 304/12/1585, IGA: NT14329-3, PRVOUK-P27/LF1/1, CZ.1.05/2.1.00/03.0076).

Acknowledgement

We thank to all study participants for donating biological material that made this study possible.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Bertone, P. *et al.* (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*, **306**, 2242–2246.
- Carninci, P. *et al.*; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, **309**, 1559–1563.
- Derrien, T. *et al.* (2012) The GENCODE v7 catalog of human long non-coding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.*, **22**, 1775–1789.
- Wapinski, O. *et al.* (2011) Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.*, **21**, 354–361.
- Zeng, X. *et al.* (2011) Phosphorylation of EZH2 by CDK1 and CDK2: a possible regulatory mechanism of transmission of the H3K27me3 epigenetic mark through cell divisions. *Cell Cycle*, **10**, 579–583.
- Niihuma, T. *et al.* (2012) Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.*, **72**, 1126–1136.
- Gupta, R.A. *et al.* (2010) Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, **464**, 1071–1076.
- Kim, K. *et al.* (2013) HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene*, **32**, 1616–1625.
- Geng, Y.J. *et al.* (2011) Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *J. Int. Med. Res.*, **39**, 2119–2128.
- Kogo, R. *et al.* (2011) Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res.*, **71**, 6320–6326.
- Ahnen, D.J. (2011) The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture—the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived? *Am. J. Gastroenterol.*, **106**, 190–198.
- Edge, S.B. *et al.* (2010) The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.*, **17**, 1471–1474.
- Buhard, O. *et al.* (2006) Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J. Clin. Oncol.*, **24**, 241–251.
- Rinn, J.L. *et al.* (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, **129**, 1311–1323.
- Chisholm, K.M. *et al.* (2012) Detection of long non-coding RNA in archival tissue: correlation with polycomb protein expression in primary and metastatic breast carcinoma. *PLoS One*, **7**, e47998.
- Suetsugu, A. *et al.* (2013) Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 383–390.
- Nie, Y. *et al.* (2013) Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival. *Cancer Sci.*, **104**, 458–464.
- Pritchard, C.C. *et al.* (2011) Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, **60**, 116–129.

Received November 4, 2013; revised January 22, 2014; accepted February 22, 2014

PITULE, P., M. ČEDÍKOVÁ, O. DAUM, J. VOJTÍŠEK, O. VYČÍTAL., P. HOŠEK, V. TŘEŠKA, O. HES, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. LIŠKA. Immunohistochemical Detection of Cancer Stem Cell Related Markers CD44 and CD133 in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1-7 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1155/2014/432139. ISSN 2314-6133. IF 2,88.

Research Article

Immunohistochemical Detection of Cancer Stem Cell Related Markers CD44 and CD133 in Metastatic Colorectal Cancer Patients

Pavel Pitule,^{1,2} Miroslava Cedikova,^{1,2} Ondrej Daum,³ Jan Vojtisek,² Ondrej Vycital,^{1,4} Petr Hosek,¹ Vladislav Treska,⁴ Ondrej Hes,³ Milena Kralickova,^{1,2} and Vaclav Liska^{1,4}

¹Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Husova 3, 306 05 Pilsen, Czech Republic

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Karlovarská 48, 301 00 Pilsen, Czech Republic

³Sikl's Department of Pathology, Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Dr. E. Benese 13, 305 99 Pilsen, Czech Republic

⁴Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Pavel Pitule; pavel.pitule@lfp.cuni.cz

Received 21 February 2014; Accepted 2 April 2014; Published 22 April 2014

Academic Editor: Georgios Tsoulfas

Copyright © 2014 Pavel Pitule et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aim. The goal of this study was to semiquantitatively detect presence of cancer stem cells markers CD44 and CD133 in immunohistochemically stained paired samples of colorectal cancer (CRC) and colorectal liver metastases (CLM). Level of staining intensity was compared to clinical and pathological characteristics of tumors with the aim to identify impact of CD44 or CD133 expression on tumor behavior. **Patients and Methods.** Formalin fixed paraffin embedded samples from 94 patients with colorectal tumor and liver metastases were collected at Sikl's Department of Pathology. Samples were stained by antibodies against CD44 and CD133. Presence and intensity of staining was assessed semiquantitatively by three trained researchers. **Results.** Patients with higher level of CD133 staining in CRC had longer disease free interval (Cox-Mantel $P = 0.0244$), whereas we found no relation between CD44 expression and overall survival or disease free interval. CD133 expression in CRC and CLM differed based on CRC grading; in case of CD44 we found differences in staining intensity in individual stages of tumor lymph node invasion. **Conclusion.** Effect of cancer stem cell markers on prognosis of colorectal cancer can vary depending on pathological classification of tumor, and we have shown that CD133, generally considered to be a negative marker, can bear also clinically positive prognostic information in group of patients with colorectal liver metastases.

1. Introduction

For a long time, tumors were considered to be unhierarchical cell mass, sometimes with several clonal populations, where all cells had almost the same potential for development, growth, or secondary tumor formation. The last two decades brought new findings and tumors have gradually become regarded as hierarchical tissues, similarly to normal tissues, with different cell populations, each having a distinct function and characteristic within the tumor. One minor

population is of particular importance—small percentage of tumor cells called cancer stem cells (CSCs).

Hierarchical organization of tumors was for the first time identified in acute myeloid leukemia in 1997 [1], where cells with CD34⁺CD38⁻ phenotype were described as primitive leukemic stem cells with the potential to differentiate into the leukemic blasts. Similar subpopulation with low level differentiation was later described also in many different solid tumors, including breast [2], prostate [3], colon [4, 5], or pancreatic cancer [6]. Today, there are two main models

describing involvement of CSCs in tumor development: deterministic, according to which all tumor cells arise from CSCs, which are dividing asymmetrically and stochastic, which supposes the tumor cells to be randomly acquiring mutations and undergoing clonal evolution that can result in the formation of a clone with stem-cell properties. The latter model assumes that the cells are dividing symmetrically [7].

Cancer stem cells share many similarities with physiologically normal adult stem cells. Both of these cell types are undifferentiated with the capacity to differentiate into hierarchical sequence of other tumor or normal cells; they are capable of self-renewal and asymmetric division and they have relatively long cycling times and long-term survival [8]. In addition to this, CSCs were described to be highly resistant to chemotherapy and radiotherapy which makes them very difficult to target and eliminates them by common therapy regimens. This characteristic makes them a possible source of later recurrence of the disease or therapy-driven selection of resistant clones [9]. Several treatment regimens specifically targeting CSCs are now emerging to overcome this problem. One of these approaches is forced differentiation of CSCs combined with targeted therapy [10].

During the initial attempts to identify CSCs, tumor cells were usually separated according to the expression of a particular marker into two groups (positive and negative). The capacity of the cells to form new tumors was then assessed and compared between the two groups. Using this approach in colorectal cancer, it was described that cells expressing CD133 are more tumorigenic than CD133 negative ones [4, 5]. Later on, additional markers were described, for example, CD44 and CD166 [11], CD29, CD24, and Lgr5 [12], and ALDH1 [13]. Many of these markers are also expressed in normal colonic stem cells (e.g., Lgr5, ALDH1, or CD29), which complicates the distinction between CSCs and normal stem cells. There are also other discrepancies regarding these markers. It was described, for example, that cells with stem cell capacity also exist within the CD133 negative cell population and that CD133 negative cells can form tumors with the same frequency as CD133 positive cells [14]. Further studies are necessary to identify the characteristics of cancer stem cells more precisely, because their unbiased identification and understanding of their biology can open new options for cancer treatment.

In the presented study, we selected two putative cancer stem cell markers, CD44 and CD133, to compare their expression in matched primary colorectal tumor and colorectal liver metastases within clinically well-specified set of patients. We evaluated the relationship between markers expression in primary and secondary tumor and tested the impact of CD44 and CD133 positivity on clinical behavior of tumor, mainly on overall survival and disease free interval.

2. Methods

Assessment of positivity or negativity for CD44 and CD133 was performed semiquantitatively from immunohistochemically stained sections of matched primary and secondary tumor samples from patients with colorectal carcinoma

TABLE 1: Description of set of patients used for the study.

Total number	94
Gender (males/females)	57/37
Age at primary surgery (years)	
Median	61.9
Interquartile range	12.4
Age at liver surgery (years)	
Median	63.2
Interquartile range	11.9
Tumor size (T)	
T1	3
T2	3
T3	73
T4	9
Unknown	6
Lymph nodes involvement (N)	
N0	27
N1	37
N2	16
Unknown	14
M classification	
M0	45
M1	49
Grade	
G1	19
G2	53
G3	13
Unknown	9

and either synchronous or metachronous liver metastasis. Immunohistochemical staining was selected as a method of choice, because it is a commonly used technique in many pathology departments and new markers can be easily implemented to current protocols.

2.1. Selection of Samples. Samples used for this study were collected from the depository of formalin fixed paraffin embedded samples of Sikl's Department of Pathology, Medical School and Teaching Hospital in Pilsen. We have selected patients who underwent surgery for primary colorectal cancer between years 1996 and 2010 and who were afterwards subjected to the surgery for colorectal cancer liver metastases at Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital in Pilsen.

The data required to determine overall survival and disease free interval, as well as grading and staging (TNM classification) scores, were available from the clinical information system of Teaching Hospital in Pilsen. The patients' data were anonymized by authorized medical personnel before being processed. Description of the patient sample is summarized in Table 1.

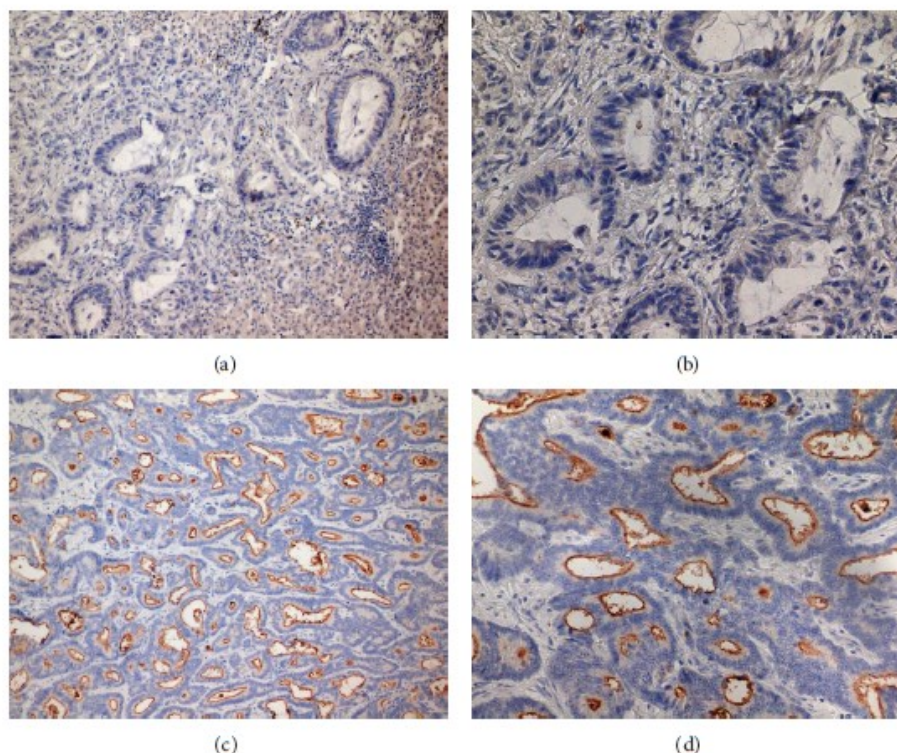


FIGURE 1: Expression of CD133. (a, b) Samples negative for CD133 in the lumen of tumor glands, (c, d) samples with positive CD133 staining on the apical portions of tumor cells. Magnification 200x (a, c) and 400x (b, d) of the same samples.

2.2. Immunohistochemical Staining. Tissue samples for light microscopy were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five-micrometer thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin.

For immunohistochemical staining the following primary antibodies were used: CD133/1 (AC133, 1:100, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and CD44 (DF1485, 1:100, Dako, Glostrup, Denmark). No special pretreatment was used. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA). Appropriate positive and negative control slides were employed.

2.3. Semiquantitative Analysis of Slides. A method based on previous study was used for analysis of slides [15]. All slides stained for CD44 and CD133 were analyzed independently by three trained researchers (Pavel Pitule, Miroslava Cedikova, and Jan Vojtisek). Tumors were localized using 10x objective and level of positivity on scale from 0 (negative) to 3 (highly positive) was assessed for CD44 staining. For CD133 we evaluated five microscopical fields using 40x objective and the percentage of CD133 positive tumor glands compared to all tumor glands in the view field were assessed. Positive staining of bile duct walls that should occur after every successful CD133 staining was used as an internal control

of the staining process in case of liver metastasis samples. CLM slides with unstained bile ducts were excluded from the analysis. Examples of markers expression are summarized in Figures 1 and 2.

2.4. Statistical Analysis. CD44 and CD133 positivity assessments provided by the three researchers were averaged for every slide and in case of high variability of the scores the slide was reviewed by all of the three researchers. Resulting scores were on the scale from 0 to 3 for CD44 as described above and from 0 to 1 for CD133 expressing an average ratio of CD133 positive glands to all present glands.

Two overall survival (OS) times were defined for every patient, one from the time of the CRC surgery and the other from the time of the CLM surgery. Disease free interval (DFI) was calculated from the time of the CLM surgery to the time of metastases recurrence. The analyses of OS and DFI were performed using two-sample Kaplan-Meier method with Cox-Mantel test. The two samples (patient groups to be compared) were formed independently for each variable based on its median. Positive results ($P < 0.05$) were validated by Cox proportional hazards model with subsequent Chi-square test. Possible relations between tumor grading/staging and CD44/CD133 positivity were investigated using Mann-Whitney U test. Correlations between CD44/CD133 in CRC/CLM (all combinations) were explored using Spearman

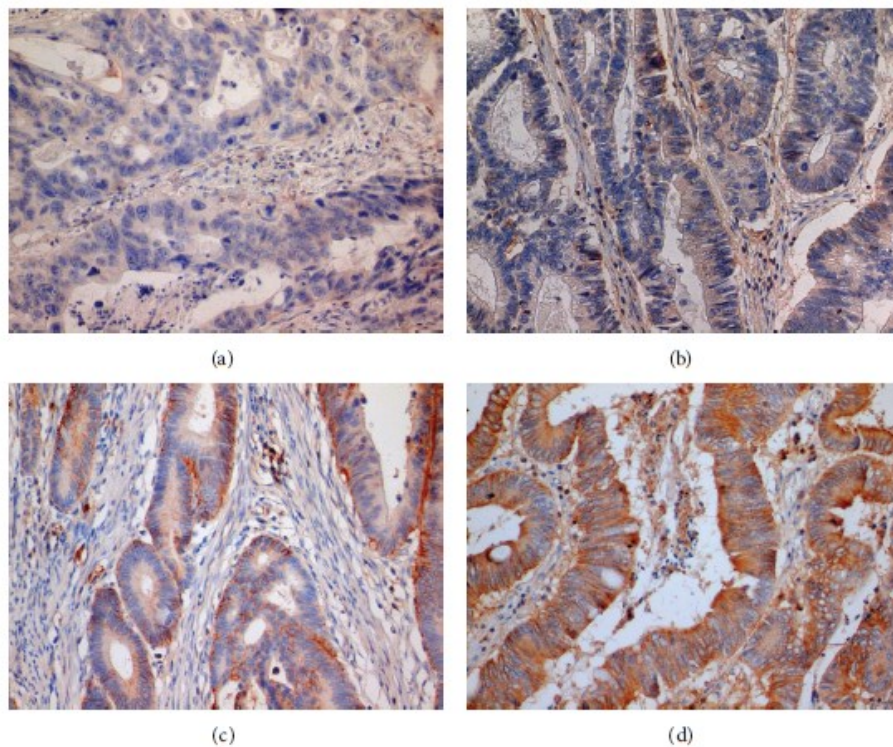


FIGURE 2: Example of samples with different levels of CD44 staining intensity. On our semi quantitative scale, samples were marked as intensity 0 (a), intensity 1 (b), intensity 2 (c), and intensity 3 (d). Magnification 400x.

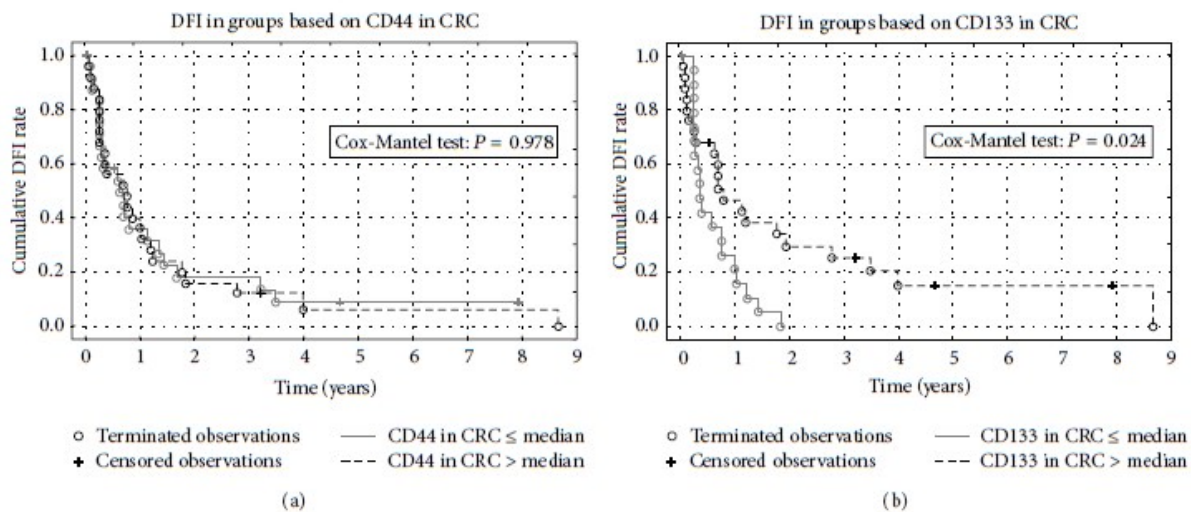


FIGURE 3: Kaplan-Meier curves comparing the levels of CD44 (a) or CD133 (b) staining intensity in primary colorectal cancer sample to the disease free interval.

rank-order method. Statistical analysis was performed using the statistical software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2011, Tulsa, OK, USA).

3. Results

We have included 94 patients with primary and secondary CRC in our study. Samples with low quality staining were

excluded from analyses. OS after CLM surgery at 1, 3, and 5 years was 88%, 65%, and 35%, respectively, and DFI at 1, 3, and 5 years was 38%, 16%, and 8%, respectively.

We did not find any statistically significant effect of CD44 expression in CRC or CLM on either OS or DFI Figure (3(a)). CD133 positivity over median in primary tumor was found to be a positive prognostic factor of DFI (Cox-Mantel $P = 0.0244$) (Figure 3(b)). This finding was confirmed by Cox

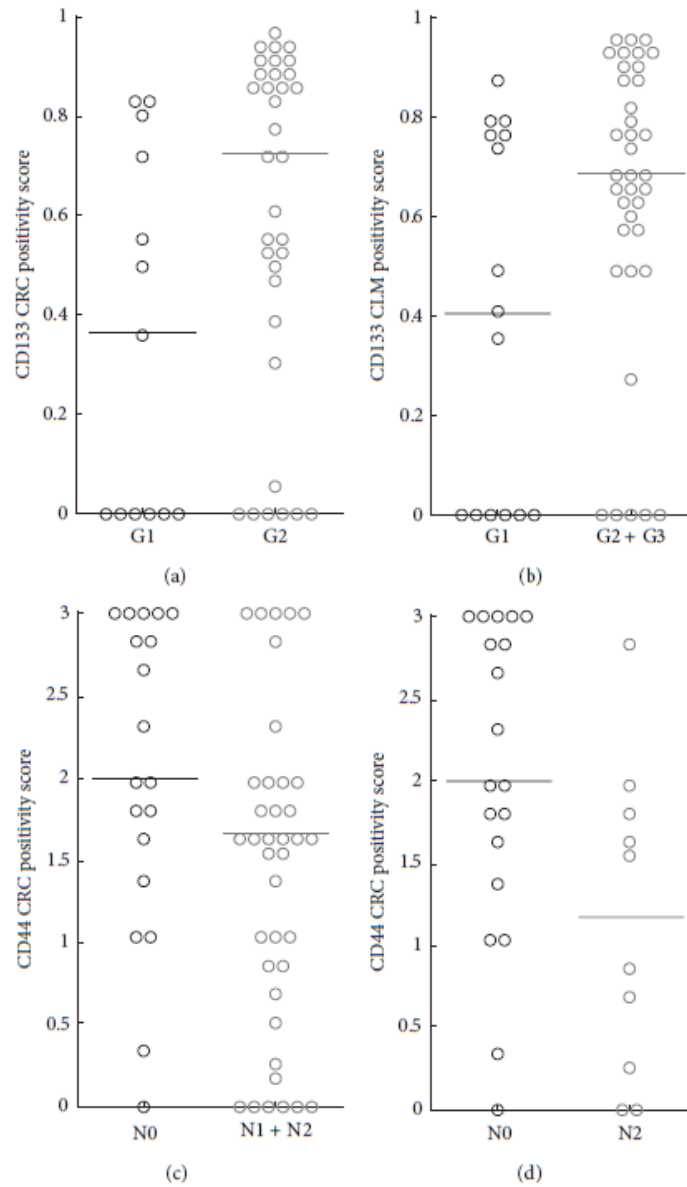


FIGURE 4: Comparison of the clinical data with the levels of markers abundance. (a) Difference of CD133 positivity in CRC based on tumor grade, (b) difference of CD133 positivity in CLM based on primary tumor grade, (c) comparison of CD44 intensity in CRC between N0 and N1 + N2 groups, and (d) comparison of CD44 intensity in CRC between N0 and N2 groups only.

proportional hazards model using the CD133 CRC score as a single independent variable (Chi-square $P = 0.0137$). CD133 positivity in CLM was not connected to any effect on OS or DFI (Cox-Mantel $P = 0.3855$). We identified differences in markers quantity based on grading, where CD133 in CRC was present in lower amount in G1 compared to G2 (Mann-Whitney U Test $P = 0.0248$) and CD133 in CLM had lower expression in G1 compared to combined G2 and G3 stage (Mann-Whitney U Test $P = 0.0470$) (Figures 4(a) and 4(b)). Comparison of studied markers with TNM classification revealed differences in CD44 in CRC depending on lymph node invasion—higher expression of CD44 was detected in

N0 stage compared to combined N1 and N2 groups (Mann-Whitney U Test $P = 0.0287$) as well as N0 compared to N2 (Mann-Whitney U Test $P = 0.0212$) (Figures 4(c) and 4(d)).

Spearman correlation revealed a relationship between expression of CD133 in primary CRC and CLM (Spearman $R = 0.5466$, $P = 0.00068$).

4. Discussion

The concept of contribution of colorectal cancer stem cells to tumor development is widely accepted, but the relation of individual CSC markers expression to disease prognosis is

still not completely clear [16]. In case of CD44, various splice variants differ in function and reports for CD44 in general usually fail to find any correlation with DFI or OS [17–19]. This was the case also for our set of patients, suggesting that use of CD44 as a single prognostic marker of CRC behavior is impossible. However, we observed a difference in CD44 expression when we stratified the patients according to tumor lymph node invasion with the data showing a decrease of CD44 expression in CRC in sequence from N0 to N2. Higher invasiveness of tumors with lower expression of CD44 into the lymph nodes can be related to weaker CD44 mediated binding to extracellular matrix [17].

CD133 was used as a first marker for identification of colorectal CSC [4, 5]. Immunohistochemical analysis of CD133 expression and its relevance to clinical and pathological features of CRC depends on sample type and size. Another problem is the posttranslation modification of CD133, which can mask AC133 epitope, which is the target for most antibodies against CD133 [20]. Some studies have shown that not the presence or absence of CD133 is important for CSCs identification, but that the abundance of CD133 protein can distinguish cells with different growth capacity [21]. Presented study did not assess the role of CD133 in cancer stem cell biology, but we wanted to find out whether it can be used as a marker providing new information to patients' prognosis. Large meta-analysis of CD133 expression in colorectal cancer confirmed that overexpression can be associated with several clinicopathological factors and can be used as an independent negative prognostic factor [22]. Surprisingly, the level of CD133 positivity had the opposite effect in our very confined group of patients as the statistical analysis revealed that higher levels of CD133 were associated to longer DFI. CD133 was described to be expressed in well and moderately differentiated tumors compared to undifferentiated tumor buds, which tend to be CD133 negative [23]. In metastatic CRC, CD133 expressing cells were described to be more often in G1/G0 phase of cell cycle than in S and G2/M phases [24]. Based on this information, CD133 cells can be considered to be those with low cycling rate and also those typical for tumors with better clinical outcome. These facts could be connected to positive prognostic effect of higher CD133 expression on DFI described in presented study.

Based on the described association between longer DFI and CD133 positivity in CRC but not in CLM, it is possible to speculate that the primary tumor has more important role in disease recurrence than liver metastasis.

5. Conclusion

Our study shows that in the field of cancer stem cells markers and their role on tumor behavior there is still a large space for further research. It seems that even commonly used CSCs marker CD133 can bear both negative and positive prognostic information depending on the clinical specification of studied patients and therefore there is a need for new studies aiming at describing the effect and role of CSCs markers in well-defined sets of samples. Also testing of combination of several markers can be of particular importance. It would

be of great importance to fully understand the biology of individual proteins used as markers, because it can provide a new point of view on the seemingly contradictory results from individual studies. Generally, if applied with underlying understanding mentioned above, cancer stem cell markers can bring valuable information to patients' prognosis and can help to modify diagnostic and treatment strategy.

Disclosure

Pavel Pitule and Miroslava Cedikova contributed equally to this work.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

This study was supported by IGA MZ CR12025 and14329 and Grant GAUK 1268213, by the project ED2.1.00/03.0076 from the European Regional Development Fund and the Charles University Research Fund (Project no. P36).

References

- [1] D. Bonnet and J. E. Dick, "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell," *Nature Medicine*, vol. 3, no. 7, pp. 730–737, 1997.
- [2] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 7, pp. 3983–3988, 2003.
- [3] A. T. Collins, P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower, and N. J. Maitland, "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells," *Cancer Research*, vol. 65, no. 23, pp. 10946–10951, 2005.
- [4] L. Ricci-Vitiani, D. G. Lombardi, E. Pilozzi et al., "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells," *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 111–115, 2007.
- [5] C. A. O'Brien, A. Pollett, S. Gallinger, and J. E. Dick, "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice," *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 106–110, 2007.
- [6] C. Li, D. G. Heidt, P. Dalerba et al., "Identification of pancreatic cancer stem cells," *Cancer Research*, vol. 67, no. 3, pp. 1030–1037, 2007.
- [7] S. Gottschling, P. A. Schnabel, F. J. F. Herth, and E. Herpel, "Are we missing the target? Cancer stem cells and drug resistance in non-small cell lung cancer," *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 9, no. 5, pp. 275–286, 2012.
- [8] C. Aguilar-Gallardo and C. Simón, "Cells, stem cells, and cancer stem cells," *Seminars in Reproductive Medicine*, vol. 31, no. 1, pp. 5–13, 2013.
- [9] H. Ishii, M. Iwatsuki, K. Ieta et al., "Cancer stem cells and chemoradiation resistance," *Cancer Science*, vol. 99, no. 10, pp. 1871–1877, 2008.

- [10] M. D. Friedman, D. S. Jeevan, M. Tobias, R. Murali, and M. Jhanwar-Uniyal, "Targeting cancer stem cells in glioblastoma multiforme using mTOR inhibitors and the differentiating agent all-trans retinoic acid," *Oncology Reports*, vol. 30, no. 4, pp. 1645–1650, 2013.
- [11] P. Dalerba, S. J. Dylla, I.-K. Park et al., "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 24, pp. 10158–10163, 2007.
- [12] L. Vermeulen, M. Todaro, F. De Sousa Mello et al., "Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 36, pp. 13427–13432, 2008.
- [13] E. H. Huang, M. J. Hynes, T. Zhang et al., "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis," *Cancer Research*, vol. 69, no. 8, pp. 3382–3389, 2009.
- [14] S. V. Shmelkov, J. M. Butler, A. T. Hooper et al., "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133⁺ and CD133⁻ metastatic colon cancer cells initiate tumors," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 6, pp. 2111–2120, 2008.
- [15] V. Liska, O. Vycital, O. Daum et al., "Infiltration of colorectal carcinoma by S100⁺ dendritic cells and CD57⁺ lymphocytes as independent prognostic factors after radical surgical treatment," *Anticancer Research*, vol. 32, no. 5, pp. 2129–2132, 2012.
- [16] F. Ren, W. Q. Sheng, and X. Du, "CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 17, pp. 2603–2611, 2013.
- [17] G. Galizia, M. Gemei, L. Del Vecchio et al., "Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer," *Archives of Surgery*, vol. 147, no. 1, pp. 18–24, 2012.
- [18] X. D. Li, M. Ji, J. Wu, J. T. Jiang, and C. P. Wu, "Clinical significance of CD44 variants expression in colorectal cancer," *Tumori*, vol. 99, no. 1, pp. 88–92, 2013.
- [19] R. C. Langan, J. E. Mullinax, S. Ray et al., "A pilot study assessing the potential role of non-CD133 colorectal cancer stem cells as biomarkers," *Journal of Cancer*, vol. 3, pp. 231–240, 2012.
- [20] K. Kemper, M. R. Sprick, M. De Bree et al., "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation," *Cancer Research*, vol. 70, no. 2, pp. 719–729, 2010.
- [21] Y. Liao, X. Hu, X. Huang, and C. He, "Quantitative analyses of CD133 expression facilitate researches on tumor stem cells," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 33, no. 5, pp. 738–742, 2010.
- [22] S. Chen, X. Song, Z. Chen et al., "CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Article ID e56380, 2013.
- [23] D. Horst, L. Kriegel, J. Engel, T. Kirchner, and A. Jung, "CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 99, no. 8, pp. 1285–1289, 2008.
- [24] M. Gharagozloo, H. R. Mirzaei, B. Bagherpour et al., "Cell cycle analysis of the CD133⁺ and CD133⁻ cells isolated from human colorectal cancer," *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, vol. 8, no. 3, pp. 399–403, 2012.

PITULE, P., O.VYČÍTAL, J. BRŮHA, P. NOVÁK, P. HOŠEK, V. TŘEŠKA, I.
HLAVATÁ, P. SOUČEK, M. KRÁLÍČKOVÁ a V. LIŠKA. Differential expression and
prognostic role of selected genes in colorectal cancer patients. *Anticancer Research* 2013,
33(11), 4855-4865. ISSN 0250-7005. IF 1,725.

Differential Expression and Prognostic Role of Selected Genes in Colorectal Cancer Patients

PAVEL PITULE^{1,2}, ONDREJ VYCITAL³, JAN BRUHA³, PETR NOVAK³, PETR HOSEK^{1,4}, VLADISLAV TRESKA³,
IVONA HLAVATA⁵, PAVEL SOUCEK^{1,5}, MILENA KRALICKOVA^{1,2} and VACLAV LISKA^{1,3,6}

¹Biomedical Center, ²Department of Histology and Embryology and ⁶Department of Surgery,
Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic;

³Department of Surgery, Teaching Hospital and Medical School, Pilsen, Czech Republic;

⁴Department of Biomedical Informatics, Faculty of Biomedical Engineering,
Czech Technical University in Prague, Kladno, Czech Republic;

⁵Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

Abstract. Aim: Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant diseases. The aim of our study was to describe the expression status of 12 selected candidate genes, by comparing paired samples of healthy colon mucosa and tumour tissues and to correlate obtained data with clinical and pathological features, with the goal of revealing associations for individual gene expressions and tumour behaviour. Materials and Methods: Samples from 53 patients with CRC were analyzed. Patients were divided into two groups based on the presence or absence of distant metastases at the time of primary tumour surgery. Expression levels were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Results: We found changes in the expression of 10 out of 12 analyzed genes. Four genes were significantly up-regulated in tumour tissues: leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5; $p < 0.001$), collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1; $p < 0.001$), visinin-like 1 (VSNL1; $p < 0.001$) and versican (VCAN; $p = 0.001$). Six genes were down-regulated: destrin (DSTN; $p = 0.004$), mesoderm induction early response 1, family member 3 (MIER3; $p < 0.001$), acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (ACSL5; $p = 0.002$), mitogen-activated protein kinase 1/ERK (MAPK1; $p < 0.001$), claudin 23 (CLDN23; $p < 0.001$) and solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (SLC26A2; $p < 0.001$). We recorded longer overall survival (OS) in the group of patients with higher expression of VSNL1 ($p = 0.032$). Patients with more pronounced down-

regulation of CLDN23 had shorter OS ($p = 0.045$). In the group of patients without distant metastases, longer OS and disease-free interval (DFI) were found for patients with higher SLC26A2 expression in tumour tissues ($p = 0.036$ and $p = 0.011$, respectively). In the same group, lower expression of VSNL1 in healthy tissue corresponded to a longer DFI ($p = 0.020$), smaller decrease of SLC26A2 and ACSL5 meant longer DFI ($p = 0.041$ and $p = 0.040$, respectively), as did greater increase of LGR5 expression ($p = 0.026$). Conclusion: We identified differences in the expression of 10 genes in colorectal cancer tissue compared to healthy colon mucosa, and found prognostic significance for these changes which could be used for the development of a disease risk scoring system.

The incidence of colorectal cancer (CRC) is increasing and globally, this malignant disease has the third highest incidence (after breast and lung cancer) and the fourth highest mortality rate (after lung, liver and stomach cancer) (1). In the first stages of its development, CRC can be treated by surgical intervention. In later stages, it has a high capacity to form secondary tumours, mainly in the liver and lungs (2). Therefore it is necessary to combine surgery and chemotherapy to achieve higher efficacy of treatment.

The selection for optimal treatment is also complicated by the high heterogeneity of CRC, which can be divided into three main subtypes: type with chromosomal instability, type with microsatellite instability and type with CpG island methylator phenotype (3). Individual subtypes differ in disease prognosis and prediction, and their identification is often crucial for the effective eradication of residual disease by oncological treatment.

Currently, there are several chemotherapeutic regimens and the possibility of biological treatment also exists. The most commonly used chemotherapeutics are 5-fluorouracil,

Correspondence to: Pavel Pitule, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Karlovarská 48, 301 00 Pilsen, Czech Republic. E-mail: pitulep@seznam.cz

Key Words: Colorectal cancer, prognostic markers, gene expression.

Table 1. Summary of genes selected for the study.

GeneID	Symbol	Full name	mRNA RefSeq
7447	<i>VSNLI</i>	Visinin-like 1	NM_003385.4
11034	<i>DSTN</i>	Dextrin (actin-depolymerizing factor)	NM_006870.3
154075	<i>SAMD3</i>	Sterile alpha motif domain containing 3	NM_001017373.2
8549	<i>LGR5</i>	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5	NM_003667.2
1462	<i>VCAN</i>	Versican	NM_004385.4
5594	<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1/ERK	NM_002745.4
1836	<i>SLC26A2</i>	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	NM_000112.3
137075	<i>CLDN23</i>	Claudin 23	NM_194284.2
166968	<i>MIER3</i>	Mesoderm induction early response 1, family member 3	NM_152622.3
11132	<i>CAPN10</i>	Calpain 10	NM_023083.3
51703	<i>ACSL5</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	NM_016234.3
115908	<i>CTHRC1</i>	Collagen triple helix repeat containing 1	NM_138455.2

oxaliplatin and irinotecan, usually in various combinations (4). Biological treatment is targeted against the epidermal growth factor receptor (EGFR) or vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR). Two categories of agents acting against EGFR exist: small tyrosine kinase inhibitors (gefitinib, erlotinib) and monoclonal antibodies (panitumumab and cetuximab) (5). The most complicated step in the treatment is the selection for the appropriate agent for each patient individually.

At present, only a few predictive and prognostic markers are used in CRC therapy and several others are in the phase of experimental validation. Two of these predictive markers are related to the use of biological treatment, the expression status of the EGFR and the mutational status of the EGFR proximal effector, the small G-protein Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) (6, 7). Only patients who have tumours positive for EGFR expression and have a wild-type allele for the KRAS gene can be treated by anti-EGFR treatment, but there is still a substantial proportion of patients who meet the eligibility criteria but lack treatment benefit (8). Other markers are being studied, namely the mutational status of other RAS family genes, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF) and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) or the expression of phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein (negative regulator of the PI3K pathway) (9, 10). Markers predicting the efficacy of classical chemotherapy are also studied, for example the excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (ERCC1) polymorphisms in the oxaliplatin treatment (11) or DNA topoisomerase 1 (TOP1) expression level in irinotecan treatment (12). Markers with prognostic function are of particular interest because on their potential to inform about disease aggressiveness and for their possible contribution to follow-up optimization.

Despite the number of studied genes, there is still a need to identify for novel markers whose mutation or expression status would provide additional information that would be useful for more precise patient selection, with the final goal of individualized medicine. Therefore, here, we have selected potentially interesting candidate genes according to their known or possible function in diverse aspects of tumour progression, *i.e.* angiogenesis, metabolism or cell adhesion, and tried to relate their altered expression with clinical behaviour of primary CRC.

Materials and Methods

Selection of studied genes. The selection of studied genes was based on a search through the dataset from the high-throughput studies focused on colorectal cancer (13, 14). Our aim was to find genes whose expression change was already identified in the large-scale analysis, but was never confirmed by different approaches. Our search finally narrowed down 12 candidate genes whose names and identifiers are summarised in Table I.

Two of the genes - leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (*LGR5*) and mitogen-activated protein kinase 1/ERK (*MAPK1*) - were selected as control genes with known and verified expression change in CRC. Selection of reference genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A (*POLR2A*) was based on the data from our collaborators (15) and our own laboratory practice.

Primer design. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) primers for the selected genes were designed using Primer-3 software (16) with focus on having similar annealing temperatures and lengths of the PCR product. Primer sequences are listed in Table II. Primers were synthesised by Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO USA) using their custom oligo synthesis service.

Collection of tissue samples. Samples for the analysis were collected during surgery for the colorectal tumour. Within 20 min after the removal of the tumour tissue from the patient, small samples of

Table II. List of primer sequences, annealing temperatures and amplicon lengths. *tm*, Melting temperature; *a.l.*, amplicon length.

Name	Sequence 5'-3'	tm	a.l.	Name	Sequence 5'-3'	tm	a.l.
<i>F_hVSNL1</i>	agaactgttgagttttatcatttcg	59	90	<i>F_hMAPK1</i>	ccgtgacctaagccttc	59	72
<i>R_hVSNL1</i>	caggggccagtttgctatt	60		<i>R_hMAPK1</i>	gccaggccaagtcacag	60	
<i>F_hDSTN</i>	cctggcatcttggaatcat	59	99	<i>F_hSLC26A2</i>	ggttgagcactgtaacct	60	64
<i>R_hDSTN</i>	aaagcagattacaatgtagccctaa	59		<i>R_hSLC26A2</i>	cacttgaagaaagccatcg	60	
<i>F_hSAM3</i>	catgcaaacagaagcagctc	59	96	<i>F_hCLDN23</i>	ttgcatcaatataattattgggttt	59	66
<i>R_hSAM3</i>	ttttcagctgtagaagaatgg	59		<i>R_hCLDN23</i>	agtttgcattgcaaggagtt	59	
<i>F_hLGR5</i>	aatcccctgccagctctc	60	74	<i>F_hCAPN10</i>	tgccagaggaggatg	60	73
<i>R_hLGR5</i>	cccttgggaatgtatgcaga	59		<i>R_hCAPN10</i>	gctctaggaccatggac	60	
<i>F_hVCAN</i>	gcacctgtgtccaggata	60	70	<i>F_hACSL5</i>	ttcctgtctcttcataaagggtt	59	95
<i>R_hVCAN</i>	cagggattagatgacattatca	60		<i>R_hACSL5</i>	ccaattcggagatgacac	60	
<i>F_hMIER3</i>	ttgaggaagaaataatgattggt	60	113	<i>F_hCTHRC1</i>	ccaaggggaagcaagg	60	74
<i>R_hMIER3</i>	caccaagtaactgtcttcggt	59		<i>R_hCTHRC1</i>	cccctgtaagcacattcatta	59	

tumour and healthy mucosa (anatomically the most distant tissue which was macroscopically healthy, usually in the range of 15-20 cm from the tumour location) were collected. Samples were immediately frozen in cryotubes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at -80°C .

Isolation of RNA and quality validation. RNA was isolated from frozen samples using the standard protocol for the RT Trisol Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). The tissue was removed from the cryotube and placed in liquid nitrogen in a mortar. The tissue was pulverized and transferred into an Eppendorf tube with 1ml of chilled Trisol RT and total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol. Total isolated RNA was dissolved in nuclease-free water (Ambion, Carlsbad, CA, USA). RNA concentration was assessed by absorbance measurement using the Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland) in the NanoQuant setting. Only samples with a 230 nm/260 nm ratio >1.7 and samples with proper bands without degradation on agarose gel electrophoresis were used for further analysis. Selected samples were additionally analysed by measurement of RNA integrity number (RIN) using a 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Reverse transcription (DNase, PCR control). cDNA was synthesised using 500 ng of total RNA in 20 μl reaction by RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Before reverse transcription, isolated RNA was treated for 5 min at room temperature with DNaseI (Top-Bio, Vestec, Czech Republic) to remove potential traces of genomic DNA. For priming of reverse transcription, we used a combination of oligo(dT)₁₈ and random hexamer primers each at 2.5 μM final concentration. The quality of cDNA and possible contamination by genomic DNA was assessed by control PCR reaction (*GAPDH* amplification, 40 cycles) and agarose gel electrophoresis.

Quantitative real-time PCR. For the quantitative PCR we used Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). cDNA was diluted to final concentration of 0.5 ng/ μl and 4 μl of cDNA were used in each reaction. Optimal cycling parameters and annealing temperatures were assessed by the

measurement of sensitivity, specificity and efficiency of individual quantitative PCR reactions. After this initial analysis, genes were divided into two groups based on their initial annealing temperature (58°C for *CLDN23*, *SLC26A2*, *VSNL1*, *CAPN10*, *VCAN* and *MAPK1*; 60°C for *LGR5*, *DSTN*, *MIER3*, *ACSL5*, *CTHRC1* and *SAMD3*). The instrument used for the analysis was 7500 Fast (Life Technologies). Cycling parameters were: initial hold at 50°C for 20 s and initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 42 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and annealing and polymerization at 58°C (60°C) for one minute. Results were analysed by the 7500 instrument software and basic statistical analysis was carried out using the REST2009 software (Qiagen, Hildesheim, Germany).

Collection of clinical information. Clinical data were retrieved from the patient's records. We focused on the pathological examination of the samples (pTNM classification, grading and histological type of tumour) and on the patient's data (gender, age, date of diagnosis and surgical intervention and date of the last follow-up examination, recurrence, death). All data were anonymised.

Statistical analysis. Since the normality of the measured expression levels is not certain, nor can it be reliably tested given the limited sample size, non-parametric statistical methods, which do not require any assumption regarding the distribution shape, were preferred during the analysis.

First the differences in the candidate genes expressions between tumorous and healthy tissue were tested for significance using the Wilcoxon signed-rank test.

Then a series of two-sample survival analyses was performed in order to investigate possible relations between the expression data (healthy tissue expression level, tumorous tissue expression level and tumorous/healthy tissue expression ratio for each candidate gene) and patient survival (calculated from the day of surgery). The two patient groups to be compared were formed independently for each variable based on its median value. In cases where patients were later removed from the analysis due to missing data or when only a subset of patients was analyzed, the median value used to divide patients into two groups was kept at its original value. The relation between the expression variables and overall survival (OS) time was analyzed for all the patients and also in the subsets of

Table III. Clinical and pathological description of the analysed group.

	Group A (palliative) n=25	Group B (adjuvant) n=28	p-Value	Test
Gender (males/females)	17/8	19/9	1	Fisher's exact
Age at diagnosis (years)			0.485	Mann-Whitney U
Median	65	63.5		
Interquartile range	7	12		
Tumour size			0.989	Pearson Chi-square
T2	1	1		
T3	19	21		
T4	5	6		
Lymph node involvement			0.681	Pearson Chi-square
N0	7	11		
N1	11	10		
N2	7	7		
M Classification			<0.001	Fisher's exact
M0	0	28		
M1	25	0		
Grade			0.101	Pearson Chi-square
G1	4	3		
G2	20	18		
G3	1	7		
Primary tumour localization			0.025	Fisher's exact
Colon	9	19		
Rectosigmoideum or rectum	16	8		

adjuvantly and palliatively treated patients separately. In the group of patients treated adjuvantly, the correspondence between the expression data and the disease-free interval (DFI) after surgery was also investigated. The date of disease recurrence was determined as the average of the date of the last negative and the first positive examination if the interval between the examinations was 180 days or less. In cases of a longer examination interval, the recurrence date was set 90 days before the first positive examination based on previous methodology (17). During each analysis, Kaplan-Meier curves were plotted for the two patient groups based upon the variable of interest and the significance of the survival (or DFI) difference was tested by Gehan-Wilcoxon, Cox-Mantel and "log-rank" test.

To examine the possible relation between tumour localisation and candidate gene expression, the patients were first divided into two groups according to tumour localization (first group with the CRC of the colon, second group with CRC of the rectum and rectosigmoid). The candidate gene expression levels (in both tumour and healthy tissue) and expression ratios were then tested for significant differences between the groups using Mann-Whitney U-test.

Correlations of expression variables were investigated using Spearman's correlation coefficient with appropriate significance test.

All the analyses were performed in STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Results

In the present study, we analysed the expression of 12 genes in a sample set of 53 patients. Patients were divided into two groups, palliative and adjuvant (25 and 28 patients,

respectively), depending on the presence or absence of distant macrometastases at the time of surgery. Clinical and pathological description of both groups is summarised in Table III. Both groups differed clinically in overall survival, with patients of the adjuvant group having longer survival than those in the palliative group.

Different RNA expression between tumour tissue and healthy mucosa. In the set of 12 selected genes, 10 exhibited a difference in expression level between tumour and normal tissue in the group of all patients. Four (*LGR5*, *CTHRC1*, *VSNL1* and *VCAN*) were up-regulated in tumour, six (*DSTN*, *MIER3*, *ACSL5*, *MAPK1*, *CLDN23* and *SLC26A2*) were down-regulated (Figure 1). Expression differences in both subgroups were similar to those obtained for the whole set of patients, except for *DSTN*, the expression of which was not different in the palliative group, but was down-regulated in the adjuvant group.

Correlation between candidate gene expressions and clinical data. Dependence of clinical characteristics on relative expression levels of candidate genes was statistically analyzed by the tests described above. We did not find any significant result at a p-value of 0.05 for correlation with age, individual parameters of TNM classification and tumour grading.

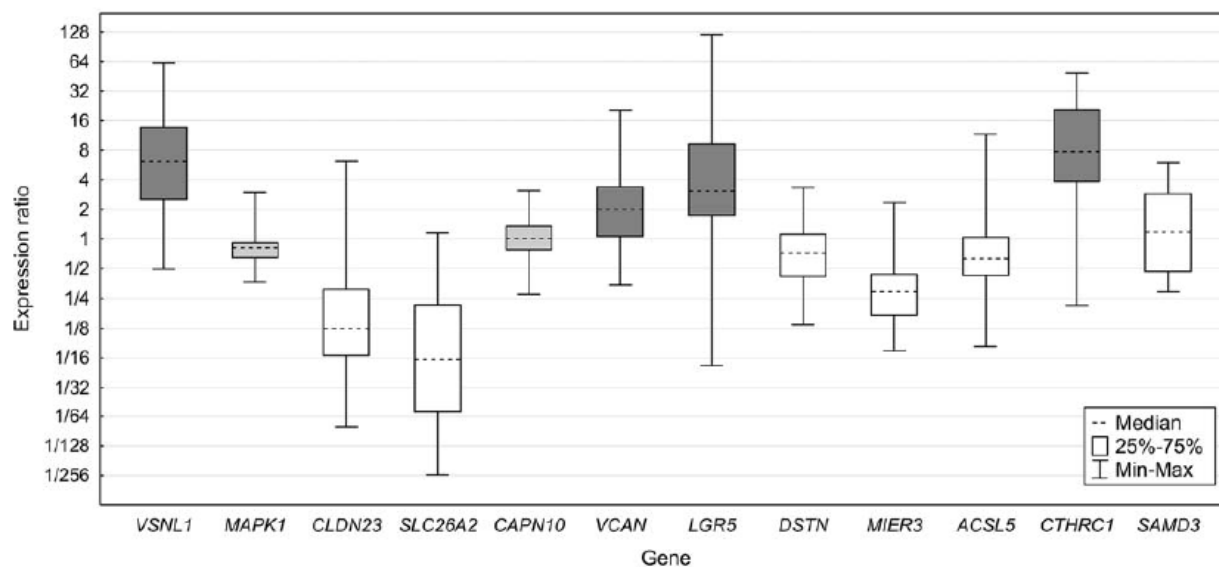


Figure 1. Expression of candidate genes in tumour tissue relative to healthy tissue. Genes in dark grey were up-regulated in tumour tissue, genes in light grey did not change in expression and genes in white were down-regulated in tumour tissue.

When investigating the dependence of overall survival and disease-free survival on relative gene expression, in the overall group of patients, we found correlation of *VSNL1* expression with OS (significantly longer OS was observed among patients with *VSNL1* expression level in tumour tissues above the median value; Cox-Mantel $p=0.033$ and log rank $p=0.032$) (Figure 2A).

In the adjuvant group, patients with *SLC26A2* expression above the tumour tissue median had a longer OS than those with an expression level below the median (Cox-Mantel $p=0.036$) (Figure 2B). In the case of DFI, patients with *VSNL1* expression in the healthy tissue below the median had a longer DFI than patients with higher expression (Cox-Mantel $p=0.022$, log-rank $p=0.020$) (Figure 2C). The opposite trend was observed for *SLC26A2* (Cox-Mantel $p=0.012$, Wilcoxon $p=0.014$ and log-rank $p=0.011$) (Figure 2D).

Then we analyzed the OS and DFI of the patients with respect to the difference in candidate gene expression between healthy and tumour tissues. In the overall group of patients, we found that the greater the down-regulation of *CLDN23* expression in tumour, the worst the outcome for the patient in terms of shorter OS (Wilcoxon $p=0.045$) (Figure 2E). In the adjuvant group, a smaller decrease of *SLC26A2* and *ACSL5* expression in tumour led to a longer DFI (Wilcoxon $p=0.046$, Cox-Mantel $p=0.045$ and log-rank $p=0.041$ for *SLC26A2*, and Wilcoxon $p=0.040$ for *ACSL5*) (Figure 2F and 2G) as did a greater increase of *LGR5* expression (Wilcoxon $p=0.046$, Cox-Mantel $p=0.028$ and log-rank $p=0.026$) (Figure 2H).

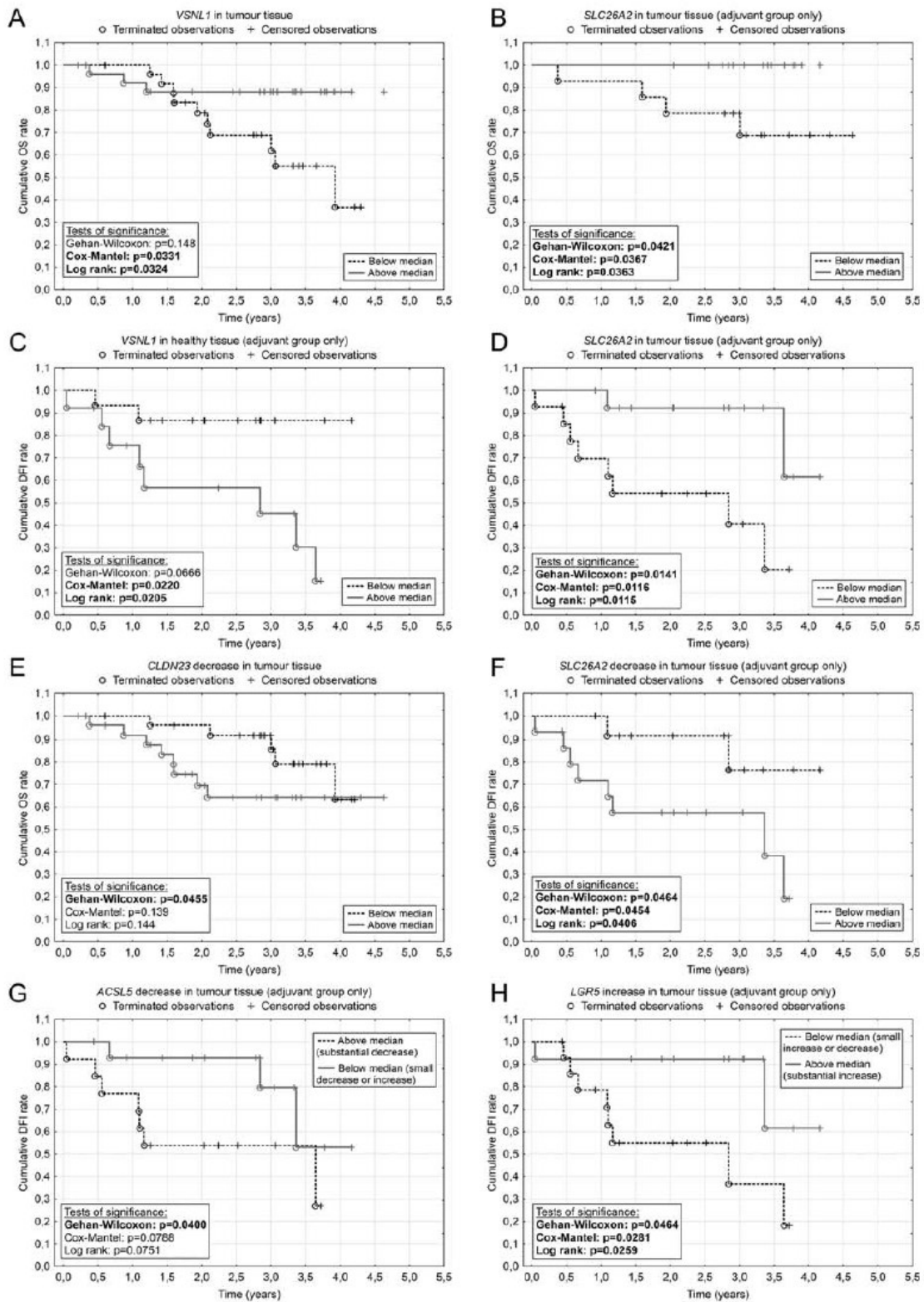
Impact of tumour location on candidate gene expression.

Patients were divided into two groups according to the location of the primary CRC and gene expression was analysed using the Mann-Whitney *U*-test. The groups did not exhibit any significant difference in candidate gene expression in tumour tissue, but we found differential expression of *MAPK1* ($p=0.032$), *LGR5* ($p=0.003$), *MIER3* ($p=0.026$) and *CTHRC1* ($p=0.042$) in healthy mucosa. All of these genes were expressed more highly in the group of patients with tumours localised in the colon. Regarding the difference in expression, we found a significant difference in *VCAN* expression change between patients with colon localisation (smaller increase) and those with rectosigmoid/rectum-localised tumours (greater increase) ($p=0.031$).

Discussion

The relationship between the change of gene expression and potential functional effects is not usually straightforward. In the following paragraphs, we briefly summarise present knowledge about the individual genes analyzed here and discuss our results with respect to current literature, focusing on possible explanations of the role of these expression changes on the clinical behaviour of colorectal tumours. Because of the heterogeneity of the selected genes, we discuss individual genes separately.

VSNL1. This gene encodes neuronal calcium sensor protein which can modulate the activity of adenylate cyclase (18) and



has been described to be a prognostic marker in Alzheimer's disease (19, 20). *VSNL1* is also considered to be a potentiator of invasiveness and inhibitor of proliferation of neuroblastoma cells (21), a tumour suppressor in non-small cell lung carcinomas (22), and an inhibitor of epithelial-to-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells (23).

In colon cancer, *VSNL1* was found to be down-regulated after selenomethionine-induced growth arrest of the colon cancer cell line HCT116 (24) and it was described to be a putative marker for identification of circulating tumour cells in peripheral blood (25). We did not observe the correlation of *VSNL1* overexpression with lymph node metastasis that was described earlier (26), but we confirmed overexpression of *VSNL1* in tumour tissue compared to healthy mucosa, and, more importantly, we found a relation between higher expression of *VSNL1* in tumour tissue and longer survival of patients, hence our results should support the possible function of *VSNL1* as tumour suppressor as reported for other types of tumour (22, 27). The opposite effect of *VSNL1* expression in healthy tissue on DFI is the subject of further investigation.

VCAN. Versican protein, encoded by the *VCAN* gene, is one of the major components of the extracellular matrix (ECM) with various functions in the regulation of cell migration (28), proliferation (29) and cell adhesion (30). *VCAN* was shown to play a role in many types of cancer, including gastric (28), pancreatic (31) and colorectal (32).

We found an up-regulation of *VCAN* mRNA in tumour, which is in agreement with previously described changes of expression on the protein level, which was accompanied by altered post-translation modifications (32, 33). The level of up-regulation found here was different depending on the tumour location (colon *versus* rectosigmoid/rectum).

LGR5. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled

receptor 5 protein is a wingless-type MMTV integration site family (WNT) signaling target and a marker of intestinal (34) and liver stem cells (35). Expression of *LGR5* is increased in intestinal tumours, and can be found in cancer cells with stem cell properties (36, 37).

In our study, we observed an up-regulation of *LGR5* expression in tumour tissue, and a greater increase of expression in tumour tissue compared to healthy tissue correlated significantly with a longer DFI in adjuvantly treated patients, which is contradictory to previously published data, where overexpression in malignant tissue was shown to have adverse effects on disease outcome in CRC and other types of tumours (38, 39, 40). This finding needs to be further evaluated.

CTHRC1. *CTHRC1* exhibited the highest up-regulation in tumour tissue among the genes we analyzed. *CTHRC1* gene encodes a protein involved in vascular remodeling (41) and an expression change has been described in many types of solid tumours (42), including CRC (43). Recently, the expression status of *CTHRC1* was identified as being a predictor of poor prognosis in CRC patients (44). We confirmed the expression change, but we were not able to significantly prove the prognostic role of *CTHRC1* expression at a *p*-value below 0.05. Nevertheless, we identified a trend for shorter survival of patients with higher *CTHRC1* expression levels in tumour tissues.

SLC26A2. In mammals, there are 11 genes of the SLC26 family, which function as anion exchangers or channels. The main role of SLC26A2 is to transport SO_4^{2-} anions and its altered function was related to several types of chondrodysplasias (45).

Lower expression of *SLC26A2* was related to enhanced proliferation of colon cancer cells *in vitro* (46). A decrease of expression was also observed in bioptic samples (47), and we detected a severe down-regulation of *SLC26A2* in tumour tissue. Based on these data, we can conclude that *SLC26A2* down-regulation is also important for tumour propagation *in vivo*. The expression level of *SLC26A2* was associated with the decrease of OS and DFI in the adjuvantly treated group of patients. A probable effect of down-regulation of *SLC26A2* is disorganisation of the ECM by improper sulfation of ECM proteins, therefore helping tumour cells to migrate through the tissue.

CLDN23. This gene belongs to the claudin family of 24 genes encoding proteins with four transmembrane domains involved in formation of tight junctions among adjacent cells (48). *CLDN23* itself was described to be down-regulated in intestinal-type gastric cancer (49), but there are no studies focused on this gene in a larger set of patients with colon cancer.

Figure 2. Kaplan-Meier curves of statistically significant associations between gene expression and disease-free survival (DFI)/overall survival (OS). Relation of the gene expression in the tumour (TT) and healthy (HT) tissue to the DFI and OS (A-D). Relation of gene expression change to the DFI and OS (E-H). Patients were divided by the median of the expression change. In the case of *ACSL5*, one group consisted of patients with substantial decrease of *ACSL5* expression and the second group consisted of patients with slight decrease or increase of *ACSL5* expression. Similarly, for *LGR5*, we grouped patients with small increase or decrease of expression and compared them with patients with a substantial increase in *LGR5* mRNA. A: Visinin-like 1 (*VSNL1*); B: Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (*SLC26A2*); C: Visinin-like 1 (*VSNL1*); D: Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (*SLC26A2*); E: Claudin 23 (*CLDN23*); F: Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (*SLC26A2*); G: Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (*ACSL5*); H: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (*LGR5*).

In our set of patients, *CLDN23* was down-regulated in tumour tissue and we found that the level of down-regulation correlates with the OS: a smaller difference of *CLDN23* expression between tumour and normal tissue was associated with a better prognosis. This effect can be explained by the fact that for the migration of tumour cells, it is necessary to break the bonds between adjacent cells and strong down-regulation of tight junction proteins, including *CLDN23*, is one such crucial step in this process. Therefore, patients with very low *CLDN23* expression would be more prone to progression of CRC.

ACSL5. This gene encodes an enzyme implicated in lipid biosynthesis and fatty acid degradation. *ACSL5* down-regulation was associated with small intestine carcinoma (50), but *ACSL5* was found to be up-regulated in CRC by microarray analysis (51). In gliomas, it can be considered as a cancer survival factor (52). The function of *ACSL5* is probably dependent on the particular splice variant, since the full-length *ACSL5* is pro-apoptotic (53). Our analysis found *ACSL5* to be down-regulated in tumour tissue, and we also identified that the greater the decrease, the shorter the DFI observed in the adjuvantly-treated group of patients, assuming a protective function for *ACSL5*.

DSTN, *MIER3* and *MAPK1*. These three genes were found to be down-regulated in tumour tissues, but in our set of samples, we did not identify any correlation with clinical characteristics.

The product of the *DSTN* gene is the actin-binding protein destrin, also known as actin-depolymerizing factor, which has an important function in regulation of actin dynamics (54). Regarding the role of *DSTN* in cancer development and progression, there are several pieces of information about its role in membrane androgen receptor-induced apoptosis of prostate cancer cells (55), and its positive regulation of the migration of neuroblastoma cells (56); the down-regulation of *DSTN* also blocks migration and invasive capacity of gastric cancer (57). We found a slight down-regulation in tumour tissue, but this change did not correlate with any clinical parameter.

MIER3 is a practically unresearched gene, but in 2012, it was shown that it probably plays a role in tumorigenesis because it was described as a candidate breast cancer susceptibility gene (58) and also a highly mutated gene in hypermutated colorectal tumours (59). Our data suggest down-regulation in CRC, but without strong correlations to clinical data.

Mitogen-activated protein kinase 1 is the final kinase in the MAPK pathway, which has a pleiotropic role like regulation of proliferation, differentiation and gene transcription (60). In CRC, down-regulation of *MAPK1* was shown in a previous study (61), as well as in our set of samples.

CAPN10 and *SAMD3*. The function of sterile alpha motif domain-containing 3 is unknown; this gene was selected because of its possible up-regulation during CRC development (13). This gene is interesting regarding its observed interaction with Fanconi anemia, complementation group G (FANCG) (62), which plays a role in the maintenance of genomic integrity (63), but we did not observe any change of its expression. This was also the case with *CAPN10*, a member of the calcium activated cysteine proteases (64). Particular single nucleotide polymorphisms in the *CAPN10* gene were shown to be associated with type 2 diabetes mellitus (65), and another was also associated with CRC susceptibility (66).

Conclusion

We have described significant expression changes of 10 studied genes in the CRC tissue compared to healthy mucosa. We also identified associations between different gene expressions and overall and disease-free survival, which could provide with useful information for disease prognosis and patient follow-up. We identified several putative positive prognostic factors, such as *ACSL5* and *CLDN23*, in tumour tissues. Our results will serve for the development of a disease risk scoring system based on the expression of these selected genes. This system will be validated and evaluated on a new group of patients with CRC. The most promising genes (mainly up-regulation of *SLC26A2* and down-regulation of *CLDN23* and *ACSL5*) will be further studied individually on a larger set of patients.

Acknowledgements

The publication of this article was supported by grants IGA MZ CR 12025 and 14329, grant GAUK 12536, project CZ.1.05/2.1.00/03.0076 from the European Regional Development Fund and the Charles University Research Fund (project number P36). Study was approved by Institutional Review Board and Ethical Committee of Teaching Hospital and Medical Faculty in Pilsen number 421/2012.

References

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917, 2010.
- 2 Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B and Starling N: Colorectal cancer. *Lancet* 375(9719): 1030-1047, 2010.
- 3 Armaghany T, Wilson JD, Chu Q and Mills G: Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 5: 19-27, 2012.
- 4 Aparo S and Goel S: Evolution of the treatment paradigm for metastatic colon cancer. From chemotherapy to targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 83(1): 47-58, 2012.

- 5 Ng K and Zhu AX: Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 65: 8-20, 2008.
- 6 Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F and Laurent-Puig P: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66: 3992-3995, 2006.
- 7 Cunningham H, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I and Van Cutsem E: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-345, 2004.
- 8 Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, Ciardiello F and Tejpar S: EGFR-targeted therapy. *Exp Cell Res* 317: 2765-2771, 2011.
- 9 De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, Frattini M, Molinari F, Saletti P, De Dosso S, Martini M, Bardelli A, Siena S, Sartore-Bianchi A, Tabernero J, Macarulla T, Di Fiore F, Gangloff AO, Ciardiello F, Pfeiffer P, Qvortrup C, Hansen TP, Van Cutsem E, Piessevaux H, Lambrechts D, Delorenzi M and Tejpar S: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11: 753-762, 2010.
- 10 Grossmann AH and Samowitz WS: Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med* 135: 1278-1282, 2011.
- 11 Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I and Kerr D: Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 489-499, 2009.
- 12 Braun MS, Richman SD, Quirke P, Daly C, Adlard JW, Elliott F, Barrett JH, Selby P, Meade AM, Stephens RJ, Parmar MK and Seymour MT: Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: Results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 26(16): 2690-2698, 2008.
- 13 Kleivi K, Lind GE, Diep CB, Meling GI, Brandal LT, Nesland JM, Myklebost O, Rognum TO, Giercksky KE, Skotheim RI and Lothe RA: Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomas. *Mol Cancer* 6: 2, 2007.
- 14 Kwong KY, Bloom GC, Yang I, Boulware D, Coppola D, Haseman J, Chen E, McGrath A, Makusky AJ, Taylor J, Steiner S, Zhou J, Yeatman TJ and Quackenbush J: Synchronous global assessment of gene and protein expression in colorectal cancer progression. *Genomics* 2: 142-158, 2005.
- 15 Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka P and Soucek P: The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 2: 187-96, 2012.
- 16 Rozen S and Skaletsky HJ: Primer3. 1998. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
- 17 Liska V, Holubec L Jr, Treska V, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Pesta M, Finek J, Rousarova M and Topolcan O: Dynamics of serum levels of tumour markers and prognosis of recurrence and survival after liver surgery for colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 27(4C): 2861-2864, 2007.
- 18 Braunewell KH, Spilker C, Behnisch T and Gundelfinger ED: The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: Amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem* 68(5): 2129-39, 1997.
- 19 Braunewell KH: The visinin-like proteins VILIP-1 and VILIP-3 in Alzheimer's disease – old wine in new bottles. *Front Mol Neurosci* 5: 20, 2012.
- 20 Tarawneh R, D'Angelo G, Macy E, Xiong C, Carter D, Cairns NJ, Fagan AM, Head D, Mintun MA, Ladenson JH, Lee JM, Morris JC and Holtzman DM: Visinin-like protein-1: diagnostic and prognostic biomarker in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 70(2): 274-285, 2011.
- 21 Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W, Miao X, Yuan Z, Wang H, Tam PK and Ren Y: Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis* 28(10): 2122-2130, 2007.
- 22 Fu J, Fong K, Bellacosa A, Ross E, Apostolou S, Bassi DE, Jin F, Zhang J, Cairns P, Ibañez de Caceres I, Braunewell KH and Klein-Szanto AJ: VILIP-1 down-regulation in non-small cell lung carcinomas: Mechanisms and prediction of survival. *PLoS One* 3(2): e1698, 2008.
- 23 Schönrrath K, Klein-Szanto AJ and Braunewell KH: The putative tumour suppressor VILIP-1 counteracts epidermal growth factor-induced epidermal-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells. *PLoS One* 7(3): e33116, 2012.
- 24 Goulet AC, Watts G, Lord JL and Nelson MA: Profiling of selenomethionine responsive genes in colon cancer by microarray analysis. *Cancer Biol Ther* 6(4): 494-503, 2007.
- 25 Findeisen P, Röckel M, Nees M, Röder C, Kienle P, Von Knebel Doeberitz M, Kalthoff H and Neumaier M: Systematic identification and validation of candidate genes for detection of circulating tumour cells in peripheral blood specimens of colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 33(5): 1001-1010, 2008.
- 26 Akagi T, Hijiya N, Inomata M, Shiraiishi N, Moriyama M and Kitano S: Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 131(6): 1307-1317, 2012.
- 27 Fu J, Jin F, Zhang J, Fong K, Bassi DE, Lopez De Cicco R, Ramaraju D, Braunewell KH, Conti C, Benavides F and Klein-Szanto AJ: VILIP-1 expression *in vivo* results in decreased mouse skin keratinocyte proliferation and tumour development. *PLoS One* 5(4): e10196, 2010.
- 28 Zhang Z, Zhang J, Miao L, Liu K, Yang S, Pan C and Jiao B: Interleukin-11 promotes the progress of gastric carcinoma *via* abnormally expressed versican. *Int J Biol Sci* 8(3): 383-393, 2012.
- 29 Miquel-Serra L, Serra M, Hernández D, Domenzain C, Docampo MJ, Rabanal RM, de Torres I, Wight TN, Fabra A and Bassols A: V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumour growth and metastasis. *Lab Invest* 86(9): 889-901, 2006.
- 30 Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT and Wight TN: Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol* 31(2): 90-100, 2012.
- 31 Skandalis SS, Kletsas D, Kyriakopoulou D, Stavropoulos M and Theocharis DA: The greatly increased amounts of accumulated versican and decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* 1760(8): 1217-1225, 2006.

- 32 Tsara ME, Theocharis AD and Theocharis DA: Compositional and structural alterations of proteoglycans in human rectum carcinoma with special reference to versican and decorin. *Anticancer Res* 22(5): 2893-2898, 2002.
- 33 Theocharis AD: Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. *Biochim Biophys Acta* 1588(2): 165-172, 2002.
- 34 Becker L, Huang Q and Mashimo H: Immunostaining of LGR5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *Sci World J* 8: 1168-1176, 2008.
- 35 Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M and Clevers H: *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494(7436): 247-250, 2013.
- 36 Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y and Sakamoto M: Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci* 101(7): 1731-1737, 2010.
- 37 Kleist B, Xu L, Li G and Kersten C: Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 4(4): 327-335, 2011.
- 38 Nakata S, Campos B, Bageritz J, Bermejo JL, Becker N, Engel F, Acker T, Momma S, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B and Goidts V: LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathol* 23(1): 60-72, 2013.
- 39 Simon E, Petke D, Böger C, Behrens HM, Warneke V, Ebert M and Röcken C: The spatial distribution of LGR5⁺ cells correlates with gastric cancer progression. *PLoS One* 7(4): e35486, 2012.
- 40 Wu XS, Xi HQ and Chen L: LGR5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J Surg Oncol* 10: 244, 2012.
- 41 Pyagay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE and Lindner V: Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res* 96(2): 261-268, 2005.
- 42 Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G and Zhou Y: Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* 12(12): 3716-3722, 2006.
- 43 Palma M, Lopez L, García M, de Roja N, Ruiz T, García J, Rosell E, Vela C, Rueda P and Rodriguez MJ: Detection of collagen triple helix repeat containing-1 and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 in colorectal cancer. *BMC Clin Pathol* 12: 2, 2012.
- 44 Tan F, Liu F, Liu H, Hu Y, Liu D and Li G: CTHRC1 is associated with peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer: A new predictor for prognosis. *Med Oncol* 30(1): 473, 2013.
- 45 Alper SL and Sharma AK: The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol Aspects Med* 34(2-3): 494-515, 2013.
- 46 Yusa A, Miyazaki K, Kimura N, Izawa M and Kannagi R: Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene *DTDST* induces sialyl Lewis^x expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res* 70(10): 4064-4073, 2010.
- 47 Galamb O, Sipos F, Solymosi N, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Tulassay Z and Molnár B: Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign, and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(10): 2835-2845, 2008.
- 48 Lal-Nag M and Morin PJ: The claudins. *Genome Biol* 10(8): 235, 2009.
- 49 Katoh M and Katoh M: *CLDN23* gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of the CLAUDIN gene family. *Int J Mol Med* 11(6): 683-689, 2003.
- 50 Gassler N, Schneider A, Kopitz J, Schnölzer M, Obermüller N, Kartenbeck J, Otto HF and Autschbach F: Impaired expression of acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumours of the small intestine. *Hum Pathol* 34(10): 1048-1052, 2003.
- 51 Yeh CS, Wang JY, Cheng TL, Juan CH, Wu CH and Lin SR: Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by microarray-bioinformatics analysis. *Cancer Lett* 233(2): 297-308, 2006.
- 52 Mashima T, Sato S, Okabe S, Miyata S, Matsuura M, Sugimoto Y, Tsuruo T and Seimiya H: Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci* 100(8): 1556-1562, 2009.
- 53 Gassler N, Roth W, Funke B, Schneider A, Herzog F, Tischendorf JJ, Grund K, Penzel R, Bravo IG, Mariadason J, Ehemann V, Sykora J, Haas TL, Walczak H, Ganten T, Zentgraf H, Erb P, Alonso A, Autschbach F, Schirmacher P, Knüchel R and Kopitz J: Regulation of enterocyte apoptosis by acyl-CoA synthetase 5 splicing. *Gastroenterology* 133(2): 587-598, 2007.
- 54 Bamberg JR and Wiggan OP: ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 12(12): 598-605, 2002.
- 55 Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A and Stourmaras C: RHO/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 314(17): 3162-3174, 2008.
- 56 Lefranc F, Sauvage S, Van Goietsenoven G, Mégalizzi V, Lamoral-Theys D, Debeir O, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Mathieu V, Decaestecker C and Kiss R: Narciclasine, a plant growth modulator, activates RHO and stress fibers in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 8(7): 1739-1750, 2009.
- 57 Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TC, Go MY, Tao Q, Chang Z and Sung JJ: Zinc-finger protein 331, a novel putative tumour suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene* 32(3): 307-317, 2013.
- 58 denDekker AD, Xu X, Vaughn MD, Puckett AH, Gardner LL, Lambring CJ, Deschenes L and Samuelson DJ: Rat *Mcs1b* is concordant to the genome-wide association-identified breast cancer risk locus at human 5q11.2 and *MIER3* is a candidate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 72(22): 6002-6012, 2012.
- 59 Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407): 330-337, 2012.
- 60 Zasadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C and Cassinat B: Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell Signal* 24(12): 2369-2377, 2012.
- 61 Wang Q, Ding Q, Dong Z, Ehlers RA and Evers BM: Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer Res* 20(1A): 75-83, 2000.

- 62 Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP and Vidal M: Towards a proteome-scale map of the human protein - protein interaction network. *Nature* 437(7062): 1173-1178, 2005.
- 63 Fei P, Yin J and Wang W: New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle* 4(1): 80-86, 2005.
- 64 Ono Y and Sorimachi H: Calpains: An elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta* 1824(1): 224-236, 2012.
- 65 Harris F, Biswas S, Singh J, Dennison S and Phoenix DA: Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 1084: 452-480, 2006.
- 66 Frances CP, Conde MC, Saez ME, Diez SF, Rey CM, Ramirez-Armengol JA, Pascual MH, Gonzalez-Perez A, Torres PP, Real LM, Serrano-Rios M, López JL, Ruiz A and Royo JL: Identification of a protective haplogenotype within CAPN10 gene influencing colorectal cancer susceptibility. *J Gastroenterol Hepatol* 22(12): 2298-2302, 2007.

Received August 25, 2013

Revised September 25, 2013

Accepted September 27, 2013

HLAVATÁ, I., B. MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, R. VÁCLAVÍKOVÁ, V. LIŠKA, P. NOVÁK, J. BRŮHA, O. VYČÍTAL, L. HOLUBEC, V. TŘEŠKA, P. VODIČKA a P. SOUČEK. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187-196 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1093/mutage/ger075. ISSN 0267-8357. IF 3,983.

The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer

I. Hlavata^{1,2}, B. Mohelnikova-Duchonova¹,
R. Vaclavikova¹, V. Liska³, P. Pitulec³, P. Novak³, J. Bruha³,
O. Vycital³, L. Holubec⁴, V. Treska⁵, P. Vodicka⁵ and
P. Soucek^{1,*}

¹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic, ²Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, Prague 10, 100 00 Czech Republic, ³Department of Surgery, ⁴Department of Oncology, Teaching Hospital and Medical School Pilsen, Charles University in Prague, Alej svobody 80, Pilsen, 304 00, Czech Republic, ⁵Department of the Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science, Videnska 1083, Prague 4, 142 20 Czech Republic

*To whom correspondence should be addressed. Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic. Tel: +420 267082711; Fax: +420 267311236; Email: psoucek@szu.cz

Received on August 3, 2011; revised on September 23, 2011; accepted on September 27, 2011

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with the highest mortality rates occurring in Central Europe. The use of chemotherapy to treat CRC is limited by the inter-individual variability in drug response and the development of cancer cell resistance. ATP-binding cassette (ABC) transporters play a crucial role in the development of resistance by the efflux of anticancer agents outside of cancer cells. The aim of this study was to explore transcript levels of all human ABCs in tumours and non-neoplastic control tissues from CRC patients collected before the first line of treatment by 5-fluorouracil (5-FU)-containing regimen. The prognostic potential of ABCs was evaluated by the correlation of transcript levels with clinical factors. Relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy efficacy were also addressed. The transcript profile of all known human ABCs was assessed using real-time polymerase chain reaction with a relative standard curve. The majority of the studied ABCs were down-regulated or unchanged between tumours and control tissues. ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues. Transcript levels of ABCA12, ABCC7 and ABCC8 increased in direction from colon to rectum. Additionally, transcript levels of ABCB9, ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the reverse significant trend, i.e. a decrease in direction from colon to rectum. The transcript level of ABCC10 in tumours correlated with the grade ($P = 0.01$). Transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 were significantly lower in non-responders to palliative chemotherapy in comparison with responders. The disease-free interval of patients treated by adjuvant chemotherapy was significantly shorter in patients with low transcript levels of ABCA7, ABCA13, ABCB4, ABCC11 and ABCD4. In conclusion, ABCC11 may be a promising candidate marker for a validation study on 5-FU therapy outcome.

Introduction

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with an estimated 1 233 700 newly diagnosed cases and 608 700 deaths/year in 2008. For this type, Central Europe has repeatedly recorded the highest mortality rates (1).

Although inherited susceptibility underlies roughly 35% of variance in CRC risk (2), germ line mutations in genes with high penetrance account for <6% of cases (3). There is growing evidence that lifestyle and environmental factors contribute to the CRC development (4).

Systemic chemotherapy is an important component of the complex treatment of CRC, with regimens based on 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan and/or oxaliplatin used as standard. These drugs are often used in combination with biological therapy in patients with advanced disease. Generally, the use of chemotherapy to treat cancers is limited by the inter-individual variability in drug response and the development of cancer cell resistance. Xenobiotics, including anticancer drugs, are extensively metabolised in the body by Phase I (activation enzymes, e.g. cytochromes P450) and Phase II (conjugation enzymes as glutathione *S*-transferases, GSTs, or glucuronide transferases, UGTs) enzymes. Phase III of biotransformation represented by ATP-binding cassette (ABC) transporters presents another important component of xenobiotic metabolism (5). ABC transporters play a crucial role in the development of resistance by the efflux of anticancer agents outside of cancer cells (6). In fact, the expression of ABCs may significantly vary among individuals and thus affects the efficacy of drug treatment (7).

The human ABC transporters are encoded by a large transporter gene superfamily, which is composed of 49 members grouped into seven subfamilies (A–G) according to the sequence homology. ABC proteins facilitate translocation of heterogeneous substrates including metabolic products, lipids and sterols, peptides and proteins, saccharides, amino acids, inorganic and organic ions, metals and drugs across the cell membrane. To transport these substrates across extracellular and intracellular membranes against a concentration gradient, ABCs use energy acquired by the hydrolysis of ATP (8). Genetic variation in these genes causes a variety of genetic diseases and disorders (9). The structure of ABC transporters consists of two types of domains: ATP-binding domains, also known as nucleotide-binding folds (NBFs) and transmembrane domains (TMDs). The NBFs contain typical motifs: Walker A and Walker B and so-called ABC-signature sequence. The TMDs are formed by 6–11 alpha helices and provide the substrate specificity (10). Although all share a similar NBF, their domains are organised in different ways, with different numbers and localisations of TMDs (11). Some of the ABCs behave as full transporters with two TMDs, each with six transmembrane segments, and two NBFs. Others are half transporters with only one TMD and become functional after dimerisation or oligomerisation (12).

The ABCA subfamily contains 12 members acting as full transporters (13; supplementary Table IS, available at *Mutagenesis* Online). ABCA5 mRNA was detected in poorly differentiated colon adenocarcinoma cell lines G-112 but not in normal colon. In contrast, ABCA2 mRNA was detected in well-differentiated colon adenocarcinoma cell lines CX-1. Thus, induction of ABCA5 may correlate with the differentiation status of human colon tumours and contribute to the tumour development (14).

The ABCB subfamily consists of 11 members (supplementary Table IIS, available at *Mutagenesis* Online). Four of them are full transporters (ABCB1, ABCB4, ABCB5 and ABCB11) and the rest is composed of half transporters. P-glycoprotein, a product of *ABCB1* gene, is localised in epithelial cells of the small and large intestine as a part of the barrier that protects cells against xenobiotics from diet, bacterial toxins, drugs and other biologically active compounds (15). ABCB1 confers MDR phenotype to cancer cells (16). ABCB1 substrates are generally amphipathic lipid-soluble compounds including anticancer drugs as *vinca* alkaloids, anthracyclines, taxanes, epipodophyllotoxins, camptothecins or anthracenes (17). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ABCB1* have been shown to influence its phenotype (expression, protein function and drug response) in context with numerous diseases [(11,18,19); supplementary Table VS, available at *Mutagenesis* Online]. ABCB1 is highly expressed in the apical membrane of enterocytes, where it pumps xenobiotics back into the intestinal lumen. No relationship was seen between ABCB1 protein expression, genotype and long-term prognosis of patients treated by 5-FU and leucovorin (20). Hypoxia is generally associated with chemoresistance. Ding *et al.* (21) suggested that hypoxia induced the expression of hypoxia-inducible factor, alpha subunit and ABCB1 in colon carcinoma. Complementary DNA (cDNA) microarray analysis of cell sublines derived from K562 leukaemia, MCF7 breast cancer and S1-colon cancer with acquired resistance against daunorubicin, doxorubicin, vincristine, etoposide and mitoxantrone has shown that ABCB1, ABCB4 and ABCG2 were up-regulated in several resistant sublines (22). ABCB2 and ABCB3 expressions were significantly associated with major histocompatibility complex class I antigen (MHC1) expression in 336 sporadic CRC tumours examined by immunohistochemistry. Thus, the expression of key components of the antigen-processing machinery represented by ABCB2 and ABCB3 is linked with the density of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), which are positive prognostic factors in CRC *in vivo* (23).

The ABCC family contains 13 members; nine of them are the multidrug resistance-associated proteins (MRPs; ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11 and ABCC12, supplementary Table IIIS, available at *Mutagenesis* Online). *In vitro* ABCC transporters can collectively confer resistance to anticancer drugs and their conjugated metabolites, platinum compounds, folate antimetabolites, nucleoside and nucleotide analogues (24). ABCC1 and ABCC2 have been shown to act synergistically with several Phase II enzymes including GSTs and UGTs and this synergy conferred resistance to several drugs (25,26). ABCC1 exports drug conjugates with glutathione and unconjugated drugs together with free glutathione (17). By contrast, ABCC2 transports a wide range of unconjugated organic anions, including e.g. methotrexate, irinotecan or ampicillin (27). ABCC2 haplotype predicted variability in

pharmacokinetics of irinotecan in Japanese metastatic CRC patients treated by FOLFIRI (regimen containing 5-FU and irinotecan) (28). mRNA expression of ABCC2 was significantly associated with resistance to cisplatin but not 5-FU (29). 5-FU significantly suppressed ATP7B and the organic cation transporter SLC22A2 and increased ABCC2 mRNA expression (5.8-fold) in human cells from colon adenocarcinoma (LS180). Overexpression of ABCC2, ABCC3 and ABCG2 was demonstrated to be beneficial for the efficacy of oxaliplatin in Madin-Darby canine kidney II cells (MDCKII). Thus, the authors predicted that the modulation of expression of transporters of both drugs could favour the synergic action of the FOLFOX (5-FU/leucovorin/oxaliplatin) combination (30). ABCC5 protein confers resistance to 5-FU by the efflux of monophosphate metabolites. The overexpression of ABCC5 in CRC may contribute to the resistance to 5-FU (31). In cell lines, celecoxib induced ABCC4 and ABCC5 expression at both mRNA and protein levels, but no induction of ABCC1 and ABCC2 was found. This observation suggested that the low response rate observed in clinical trials using combinations of celecoxib with 5-FU or irinotecan may reflex celecoxib-mediated induction of efflux of drugs from cancer cells through the up-regulation of ABCs (32). Interestingly, patients treated with oxaliplatin- and 5-FU-based regimen for metastatic CRC ($n = 40$) had a significantly shorter progression-free survival in the case where their circulating tumour cells (CTCs) expressed alcohol dehydrogenase (ALDH) I, survivin and ABCC5. Thus, detection of survivin+/ABCC5+ CTCs from peripheral blood may help in identifying metastatic CRC patients resistant to standard oxaliplatin- and/or 5-FU-based regimen (33). ABCC11 shares the highest structural similarity with ABCC4 and ABCC5. ABCC11 was also shown to confer resistance to 5-FU and certain fluoropyrimidines (supplementary Table IIIS, available at *Mutagenesis* Online). The rs17822931 SNP in *ABCC11* affects enzyme function that determines earwax type (34).

The ABCD subfamily consists of four half transporters localised in peroxisomes, providing thus peroxisomal transport of long-chain fatty acids (supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). ABCE and ABCF subfamilies contain genes that are clearly derived from ABC transporters and have ATP-binding domains but not TMDs (35, supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). There are currently no data available on the role of ABCD and ABCF subfamilies in CRC.

The six known members of ABCG subfamily are half transporters that have a reversed structure. N-terminus contains NBF and TMD is at the C-terminus (supplementary Table IVS, available at *Mutagenesis* Online). ABCG2 is a multidrug resistance enzyme that can export both unmodified drugs and drug conjugates, including mitoxantrone, bisantrene, epipodophyllotoxins (e.g. etoposide), camptothecins (topotecan and irinotecan) or flavopiridol (17). Patients harbouring the -19572 to 19569delCTCA mutation in *ABCG2* had a significantly lower relative extent of conversion of irinotecan to its SN-38 metabolite than patients carrying the ancestral genotype without this deletion ($P = 0.019$; 36). Dietrich *et al.* (37) examined 29 colon adenomas from 21 patients and 8 adenomas from C57BL/6 *Apc*^{Min/+} mice. ABCG2 protein was significantly down-regulated in both human and mice colon adenomas. ABCG2 confers resistance to a narrower range of anticancer agents than ABCB1 and ABCC1 or ABCC2, e.g. anthracyclines, mitoxantrone and irinotecan. ABCG2 transports the glucuronide conjugate of SN-38, the active metabolite of irinotecan, but with ~7-fold lower affinity than unconjugated

SN-38 (38). Dye-efflux effective side population (SP) of SW480 colon cancer cells has shown a higher resistance to 5-FU and irinotecan, higher ABCB1 and ABCG2 expressions and activation of the Wnt signalling pathway when compared to non-SP containing cells. Silencing the Wnt signalling pathway may thus present a promising strategy for targeting chemotherapy-resistant CRC cells (39). The ABCG5 and ABCG8 form heterodimers and overexpression of putative stem cell marker EpCAM with ABCG5 within the buds of colorectal tumours is frequently observed and associated with poor prognosis (40).

The current state of knowledge shows that ABCs are functionally important for anticancer drug disposition and efficacy. However, apart from functional data obtained using cell and animal models, there is a limited amount of information on the importance of ABCs for the prognosis of individual patients and the prediction of the chemotherapy outcome. Some of the published studies in patients suggested that ABCs may influence not only cancer initiation but also its progression, invasion and metastasis. The aim of our study is to: (i) explore transcript levels of ABCs in tumour and control tissues from CRC patients treated by substrates of ABCs, (ii) evaluate prognostic potential of ABCs by the correlation of transcript levels with clinical factors such as tumour size, lymphatic node involvement and grading and (iii) elucidate relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy efficacy. In our pilot study presented here, we have addressed these points in a complex way by an assessment of the transcript profile of all known human ABCs. This is because some of the drugs under study are transported by numerous and in some cases unknown transporters. The selection and validation of candidate genetic markers identified in the pilot study are the final goal of our current research.

Materials and methods

Materials

Phenol, chloroform, agarose and chemicals for preparation of buffers were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) for polymerase chain reaction (PCR), molecular weight standard for electrophoresis Φ X174DNA-HaeIII digest and Lambda DNA EcoRI + HindIII Marker were products of New England Biolabs Inc (Ipswich, MA, USA) and Fermentas Inc (Vilnius, Lithuania), respectively. Taq-Purple DNA polymerase and Combi PPP Master Mix for PCR were supplied by Top-Bio s.r.o. (Prague, Czech Republic).

Subjects

Tissue samples of primary tumour of human colorectal carcinoma and paired distant unaffected mucosa were collected from CRC patients diagnosed and treated at the Departments of Surgery and Oncology, at the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen and Charles University in Prague, both in the Czech Republic during the period 2008–10. Native tissue samples were taken during surgery, macrodissected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA isolation. The control mucosa samples were taken from the macroscopically unaffected resection margins of colon tissues. The resection margins were microscopically evaluated and only samples free of malignant cells were further analysed. Corresponding tumour tissue samples were verified by the experienced pathologist. Only histologically verified patients and their samples were included in this study. The following data on patients were retrieved from medical records: age, gender, date of diagnosis, pTNM stage according to Union for International Cancer Control (41), histological type and grade of the tumour, type of chemotherapy and treatment response.

The following eligibility criteria were applied to the recruitment of patients into the study: (i) patients who were subject to surgery for CRC, (ii) no prior chemotherapy before surgery (in order to eliminate its influence on transcript levels), (iii) patients who received only first-line chemotherapy in either palliative (Group A) or adjuvant (Group B) setting and (iv) patients who received regimens based on 5-FU, leucovorin and/or oxaliplatin, e.g. FOLFOX.

Response to the treatment was evaluated by Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) criteria (42) based on routinely used imaging techniques for assessment of tumour mass (by computer tomography, with or without positron emission tomography, magnetic resonance or ultrasonography).

Increase in tumour mass or the appearance of new lesions in patients with palliative treatment (Group A) indicated progression and thus no response to the treatment. Response to the treatment was defined as a decrease of the number or volume of metastases or stabilisation of the disease.

In patients treated by adjuvant therapy after radical surgical resection R0 (Group B), disease-free interval (DFI) served as the treatment outcome for analyses. DFI was defined as the time elapsed between radical surgical R0 resection and disease recurrence. CRC patients treated by 5-FU and/or oxaliplatin were monitored for adverse symptoms of treatment and toxicity was scored according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, Version 2, during the whole period of treatment. Grade 3 or 4 toxicity was followed as an important factor of toxicity of the administered regimens.

All patients were informed about the study aims, methods and potential risks and signed consensually an informed consent form in agreement with the requirements of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic.

Isolation of total RNA and cDNA preparation

Methods were published (19,43) and are presented in the supplementary Material, available at *Mutagenesis* Online.

Quantitative real-time PCR

The diluted amplified cDNA was used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) by the relative standard curve method performed in 7500 and ViiA7 Real-Time PCR System using TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies). The following criteria were applied to the selection of TaqMan Gene Expression Assays: (i) exon-exon boundaries span where possible, in order to minimise signals from traces of contaminating DNA, (ii) as short as possible amplicons and (iii) location near to 3'-end of the transcript to reduce possible influence of RNA quality on qRT-PCR. The list of reference genes, genes of interest and respective assays is given in supplementary Table VI, available at *Mutagenesis* Online. Cycling parameters of qRT-PCR were initial hold at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing at 60°C for 60 sec (except ABCG9, ABCG4 and ABCG5 where 90 sec and ABCB1 where 58°C for 90 sec were used). Each reaction contained 2.5 μl of 20 times diluted preamplified cDNA, 5 μl of TaqMan Gene Expression Master Mix and 0.5 μl of TaqMan Gene Expression Assay in a final reaction volume of 10 μl . Fluorescence was acquired after each extension step. Each sample was assessed in duplicate and the mean value was used for further analyses. Samples with $>15\%$ variation between duplicates were reanalysed. The non-template control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. One sample of normal colon mucosa was used as calibrator for preparation of standard curves for each gene to assess reaction efficiency. For the real-time PCR reactions, preamplified cDNA of the calibrator diluted 1:4 was used as the highest template concentration point for construction of the standard curve. The rest of the standard curve points were prepared by five subsequent serial five times dilutions. The resulting standard curve was used for calculation of PCR efficiency (E) according to the following formula: $E = 10^{-1/\Delta\text{slope}} - 1$ (supplementary Table VI, available at *Mutagenesis* Online). Reference genes were selected on the basis of our pilot study, where the TaqMan Array Plates (Life Technologies) were used to compare the stability of 24 different potential reference genes chosen from the literature in a set of 10 pairs of human CRC tumours and distant unaffected mucosa samples. Stability of reference genes was analysed by geNorm version 3.5 of March 2007 (44) and NormFinder version 19 of June 2009 (45) software programs. According to both programs, EIF2B1, MRPL19, PSMC4, POLR2A, PPIA and HPRT1 were selected as the most stable genes for normalisation of transcript levels of target genes. The qRT-PCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; 46).

Statistical analyses

Transcript levels were analysed by 7500 and ViiA7 System Software. Acquired average C_T values were further processed by relative expression software tool (REST) 2009 Software (47; Qiagen, Hildenheim, Germany). REST is routinely used for the determination of differences between different types of sample and control groups and considers both normalisation to numerous reference genes and reaction efficiency. For statistical analyses of correlation of transcript levels of all established genes with clinical data, the non-parametric tests as Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Spearman rank tests were used according to the

distribution of data. The mean, median, SD, variance, minimum, maximum, quantiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in the given groups and subgroups. The relations between the parameters were computed by Spearman correlation coefficient. The DFI analyses were performed by Kaplan–Meier Survival estimates and Cox regression hazard model. In the first step, each of the investigated covariates were divided into four groups using quartiles of the investigated variable. For these groups, the Kaplan–Meier survival functions were computed. All possible cut-offs were tested and the 'optimal cut-off' was defined as the highest statistical significance in Kaplan–Meier (log-rank test). For these cut-offs, the hazard ratios (HRs) were then computed. In order to reduce the chance of Type I and II errors, only the cut-offs, where the DFI divided by quartiles had a similar direction to the DFI, were used. *P*-values are always departures from two-sided tests. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses of clinical data were performed using SPSS v15.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Results

Fifty-one patients meeting the eligibility criteria were recruited into the study (26 patients in the palliative Group A and 25 patients in the adjuvant Group B). The clinical and pathological characteristics of the patients are listed in Table I. Patients in both groups did not significantly differ in terms of gender, age at diagnosis, tumour size, lymph node involvement and grading. On the other hand, patients significantly differed in metastatic spread of the disease (all patients in the palliative group were M1 versus M0 in all adjuvant patients) and subsequent treatment (the palliative group was treated predominantly by more aggressive FOLFOX regimen). Tumour localisation also significantly differed between both groups (rectum prevailed in the palliative group versus adjuvant group,

P = 0.008). The median of follow-up was 20 months. Neither the median overall survival nor the median DFI was reached. Therefore, the importance of transcript levels of ABCs for overall survival was not evaluated. DFI was evaluated as a measure of short-term survival; 72% of censors occurred in the course of follow-up.

Differences in transcript levels of ABCs between tumour and control tissues

A large number of ABC transcripts were down-regulated in tumour versus control mucosa tissues (REST 2009 software, Table II). Among these, ABCA1, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11, ABCC3, ABCC5, ABCC6, ABCC7, ABCC8, ABCC13, ABCD2, ABCD3, ABCD4, ABCG1 and ABCG2 transcripts were down-regulated at a very high level of significance (*P* ≤ 0.001). Contrastingly, ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues to a high extent (Table II). The remaining ABCs did not show significant deregulation in compared tissues. Transcript level of ABCC12 was below the limit of detection in all samples.

Correlations between transcript levels of ABCs in tissues and clinical data

Relative transcript levels of ABCs were first normalised to six reference genes. Average *C_T* value of EIF2B1, MRPL19, PSMC4, POLR2A, PPIA and HPRT1 transcript levels was calculated for each sample and designated as ENDO value.

Table I. Clinical characteristics of studied groups

	Group A (palliative), <i>n</i> = 26	Group B (adjuvant), <i>n</i> = 25	<i>P</i> ^a
Gender (males/females)	19/7	16/9	0.555 (Fisher's exact test)
Age at diagnosis (years), median ± SD	64.5 ± 9.7	63.0 ± 8.5	0.676 (ANOVA)
Tumour size (T)			0.798
T2	2	2	
T3	19	20	
T4	5	4	
Lymphnodes involvement (N)			0.856
N0	7	7	
N1	11	11	
N2	8	7	
M classification			<0.001
M0	0	25	
M1	26	0	
Grade			0.361
G1	4	2	
G2	21	18	
G3	1	5	
Primary tumour localisation			0.008
Colon	8	17	
Rectosigmoideum	6	6	
Rectum	12	2	
Chemotherapy			0.006 (Fisher's exact test)
5-FU ± leucovorin ^b	6	12	
FOLFOX	20 ^c	13	
Grade 3 or 4 toxicity	1	3	
Post-operative radiotherapy	3	4	0.477
Chemotherapy outcome			NA
Responders/non-responders	13/13	NA	
Relapse/remission	NA	7/18	

Footnotes:

^aAnalysed by Pearson chi-square test. The use of Fisher's exact test or analysis of variance (ANOVA) is specified in brackets; NA—not applicable.

^bTen patients received deGrammonte regimen, six patients received Xeloda (capecitabine) and four patients received 5-FU and leucovorin (FUFA) combination.

^cTwelve patients also received Avastin in combination. Significant differences between groups in bold.

Table II. Differences in transcript levels of ABCs between tumour and control tissues

Gene	All patients, <i>n</i> = 51 ^a	Tumour versus control
ABCA1	0.001	Down-regulation
ABCA2	NS	No change
ABCA3	0.017	Down-regulation
ABCA4	0.001	Down-regulation
ABCA5	<0.001	Down-regulation
ABCA6	<0.001	Down-regulation
ABCA7	NS	No change
ABCA8	<0.001	Down-regulation
ABCA9	<0.001	Down-regulation
ABCA10	<0.001	Down-regulation
ABCA12	<0.001	Up-regulation
ABCA13	0.002	Up-regulation
ABCB1	<0.001	Down-regulation
ABCB2	NS	No change
ABCB3	NS	No change
ABCB4	<0.001	Down-regulation
ABCB5	<0.001	Down-regulation
ABCB6	0.004	Up-regulation
ABCB7	NS	No change
ABCB8	NS	No change
ABCB9	NS	No change
ABCB10	0.003	Down-regulation
ABCB11	<0.001	Down-regulation
ABCC1	<0.001	Up-regulation
ABCC2	0.001	Up-regulation
ABCC3	<0.001	Down-regulation
ABCC4	0.008	Down-regulation
ABCC5	<0.001	Down-regulation
ABCC6	<0.001	Down-regulation
ABCC7	0.001	Down-regulation
ABCC8	<0.001	Down-regulation
ABCC9	NS	No change
ABCC10	NS	No change
ABCC11	NS	No change
ABCC13	<0.001	Down-regulation
ABCD1	NS	No change
ABCD2	<0.001	Down-regulation
ABCD3	<0.001	Down-regulation
ABCD4	<0.001	Down-regulation
ABCE1	<0.001	Up-regulation
ABCF1	NS	No change
ABCF2	NS	No change
ABCF3	NS	No change
ABCG1	<0.001	Down-regulation
ABCG2	<0.001	Down-regulation
ABCG4	NS	No change
ABCG5	NS	No change
ABCG8	NS	No change

^aSignificantly deregulated genes by REST software (*P*-value displayed); NS—non significant.

Then, the ratio of C_T values for ABC gene/ENDO was calculated and used for non-parametric tests as described in Materials and methods. Thus, the higher ABC/ENDO ratios signify lower relative ABC transcript levels. Clinical characteristics presented in Table I were correlated with transcript levels of ABC genes in tumour tissues. A significant inverse correlation between ABCC10 and tumour grade was found; the higher the grade, i.e. the more aggressive the tumour, the lower the ABCC10 transcript level (Table III). Transcript levels of ABCA12, ABCC7 and ABCC8 in tumour tissues had the following significant trend in tumour localisation: colon < rectosigmoidum < rectum. Interestingly, all three of the above listed transcripts followed exactly the same trend in control tissues as in tumours (Table III). However, ABCB9,

ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the opposite significant trend, i.e. a decrease in transcript levels in the direction from colon to rectum (Table III).

Relations between transcript levels of ABCs in tumours and chemotherapy outcome

In the group of patients with metastatic CRC, the response to the palliative chemotherapy significantly correlated with the transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 (Table III). In the group of patients with radically R0 removed tumours, the DFI after adjuvant chemotherapy was influenced by transcript levels of several ABCs. Patients with a low transcript level of ABCA7 (cut-off ≥ 1.25) had a significantly shorter DFI ($P = 0.033$, log-rank test) and a higher HR of progression than patients with a high transcript level (HR = 5.09, 95% HR confidence limits = 0.97–6.7; Figure 1A). Similarly, patients with low transcript levels of ABCA13 (cut-off ≥ 1.58), ABCB4 (cut-off ≥ 1.48), ABCC11 (cut-off ≥ 1.68) and ABCD4 (cut-off ≥ 1.19) had a shorter DFI and a higher HR of progression ($P = 0.011$, HR = 5.75, 95% HR confidence limits = 1.25–26.37; $P = 0.003$, HR = 15.83, 95% HR confidence limits = 1.72–145.92; $P = 0.016$, HR = 8.81, 95% HR confidence limits = 1.05–74.16; $P = 0.023$, HR = 5.51, 95% HR confidence limits = 1.07–28.48, respectively, Figure 1B–E) than patients with high transcript levels. ABCC11 was thus a significant predictor of chemotherapy outcome in both groups of patients.

Discussion

The efflux of endogenous substrates and also xenobiotics including anticancer drugs out of the cells presents the principal activity of ABCs. Thus, ABCs could be important for both CRC onset and CRC treatment outcome. A number of monogenic disorders have been associated with ABCs, e.g. mutations in *ABCC7* gene with the onset of cystic fibrosis and thus, the analysis of mutations in ABCs is routinely used for genetic testing (9). Although some of the studies observed significant associations between polymorphisms in ABCs and the cancer risk, including CRC, there has been no validated marker among all known 49 human ABCs for CRC prognosis and therapy outcome prediction until now. Based on the results of our pilot study, we propose ABC10 and ABCC11 as such markers and targets for validation studies focused on their confirmation or rejection.

Despite numerous published studies in animals and cell models showing the functional impact of ABCs on multidrug resistance, no convincing evidence of a clinical utility of ABCs as markers for the prediction of chemotherapy outcome in cancer patients has been published to date. The majority of published studies deal with associations of SNPs with therapy outcome or toxicity. However, there is limited knowledge about the association between genotype and phenotype. The reason may be the complexity of ABCs, which are promiscuous and overlap in spectra of transported substrates. The lack of information about gene and protein expressions and activity of ABCs in homogenous groups of patients treated by the same spectra of drugs further complicates the evaluation of their importance. CRC seems to be a suitable disease for the pharmacogenomic profiling of ABCs because it is routinely treated by prototypical substrate of certain ABCs, 5-FU. Therefore, we have conducted a pilot study aimed at the evaluation of transcript profiles of all human ABCs in two

Table III. Significant correlations of transcript levels of ABCs with clinical data

Grade	G1 (<i>n</i> = 6) ^a	G2 (<i>n</i> = 38) ^a	G3 (<i>n</i> = 7) ^a	<i>P</i> ^b
ABCC10	1.14 ± 0.04	1.17 ± 0.04	1.23 ± 0.05	0.010
Primary localisation—tumour tissue	Colon (<i>n</i> = 24) ^a	Rectosigmoideum (<i>n</i> = 12) ^a	Rectum (<i>n</i> = 14) ^a	<i>P</i> ^b
ABCA12	1.65 ± 0.22	1.50 ± 0.10	1.46 ± 0.17	0.020
ABCC7	1.14 ± 0.18	1.07 ± 0.10	1.02 ± 0.04	0.017
ABCC8	1.78 ± 0.15	1.77 ± 0.14	1.67 ± 0.15	0.042
Primary localisation—control tissue				
ABCA12	1.76 ± 0.14	1.64 ± 0.10	1.59 ± 0.10	0.001
ABCC7	1.04 ± 0.08	1.01 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.005
ABCC8	1.52 ± 0.08	1.50 ± 0.05	1.44 ± 0.04	0.002
ABCB9	1.25 ± 0.03	1.27 ± 0.04	1.29 ± 0.03	0.005
ABCB11	1.29 ± 0.11	1.32 ± 0.05	1.37 ± 0.05	0.004
ABCG5	1.52 ± 0.10	1.62 ± 0.07	1.65 ± 0.09	<0.001
ABCG8	1.47 ± 0.11	1.58 ± 0.07	1.60 ± 0.10	<0.001
Response in palliative group	Responders (<i>n</i> = 13) ^a	Non-responders (<i>n</i> = 13) ^a	<i>P</i> ^b	
ABCC6	1.23 ± 0.05	1.28 ± 0.06	0.033	
ABCC11	1.57 ± 0.06	1.69 ± 0.06	<0.001	
ABCF1	1.06 ± 0.03	1.08 ± 0.03	0.044	
ABCF2	1.09 ± 0.03	1.12 ± 0.03	0.015	

^aMean ± SD.^bSignificant differences analysed by independent Kruskal–Wallis test.

groups of CRC patients strongly differing in prognosis. Patients who underwent the radical surgical resection of the tumour have better prognosis than patients with the metastatic disease. Both groups were treated by chemotherapy regimens based on 5-FU and the short-term evaluation of response to this treatment was available. We hypothesised that a strong effect of potential marker(s) should be clearly visible in both groups. As far as we are aware, this is the first complex study of the role of ABC transporters in the tumour development and treatment conducted on CRC patients.

The majority of the studied ABCs were down-regulated or unchanged between tumours and non-neoplastic control tissues in this study. ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCC1, ABCC2 and ABCE1 were up-regulated in tumours versus control tissues. There are several studies on the assessment of transcript or protein levels of the selected ABCs (usually ABCB1, ABCG2 and members of ABCC subfamily) in the literature of CRC. Our data comply with the previous reports with regard to the down-regulation of ABCB1 (20) and ABCC3 as well as the up-regulation of ABCC2 in colorectal tumours (29). In addition, we found the up-regulation of ABCC1 that had not been previously detected (29). Moreover, our results confirmed the previously observed down-regulation of ABCG2. ABCG2 mRNA showed a 6-fold decrease in colorectal tumours in comparison with control tissues (48). A ubiquitous expression of ABCE1 mRNA in normal and tumour colon tissues was found. Among 21 peptides with the HLA-A2-binding motifs, two ABCE1-derived peptides were recognised by the colon cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in a dose-dependent manner. The authors suggested that ABCE1 and its peptides could be target molecules in specific immunotherapy for HLA-A2-positive CRC patients (49). Our observation of significant up-regulation of ABCE1 in tumour tissue of CRC patients, if confirmed by independent study, may be relevant for targeted therapy of CRC. There are no literature data on transcript or protein levels of other ABCs in tumour and non-neoplastic tissues from a series of CRC patients.

The analysis of the tumour localisation has identified highly interesting trends. Transcript levels of certain ABCs increased or declined in direction from colon to rectum in a significant trend. Firstly, we noticed this effect in the tumour tissues. To discern this effect from possible deregulation of mRNA expression by the tumour pathophysiology, we analysed the tissue distribution of transcripts of ABCs also in non-neoplastic control tissues. The same ABCs as in tumours, namely ABCA12, ABCC7 and ABCC8, were found differentially distributed in control tissues maintaining the same trend towards localisation (increase from colon to rectum). Additionally, ABCB9, ABCB11, ABCG5 and ABCG8 followed the opposite significant trend, i.e. a decrease in transcript levels in direction from colon to rectum. Significant changes in gene and protein expression along the anterior–posterior intestinal axis were observed for solute carrier transporters in mice (50). Moreover, mRNA expression levels of murine *Abcb2*, *Abcb3*, *Abcb9*, *Abcc3*, *Abcc6*, *Abcd1*, *Abcg5* and *Abcg8* displayed significantly differential gene expression along the duodenum, jejunum, ileum and colon (51). In human samples, the expression of mRNA for ABCB1 and ABCC2 was highest in jejunum and decreased towards more distal regions, whereas ABCC1 was equally distributed in all intestinal regions (52). We did not confirm the results of Gutmann *et al.* (53) who found that mRNA expression of ABCG2 was maximal in the duodenum and decreased continuously down to the rectum, perhaps due to the fact that we had no access to samples from duodenum. Moreover, human ABCs identified by us to be differentially distributed in colorectal tissues have not been studied in this regard yet. A possible relevance of the observed gradient in expression of ABCs for efficacy of CRC chemotherapy shall be further studied.

The majority of clinically associated ABCs were either down-regulated or unchanged in tumours versus control tissues. In terms of chemotherapy outcome, the induction of mRNA levels of ABCs and subsequent enhancement of their effect cannot be ruled out. In fact, the ABCG2 mRNA content in hepatic metastases was found to be higher after an

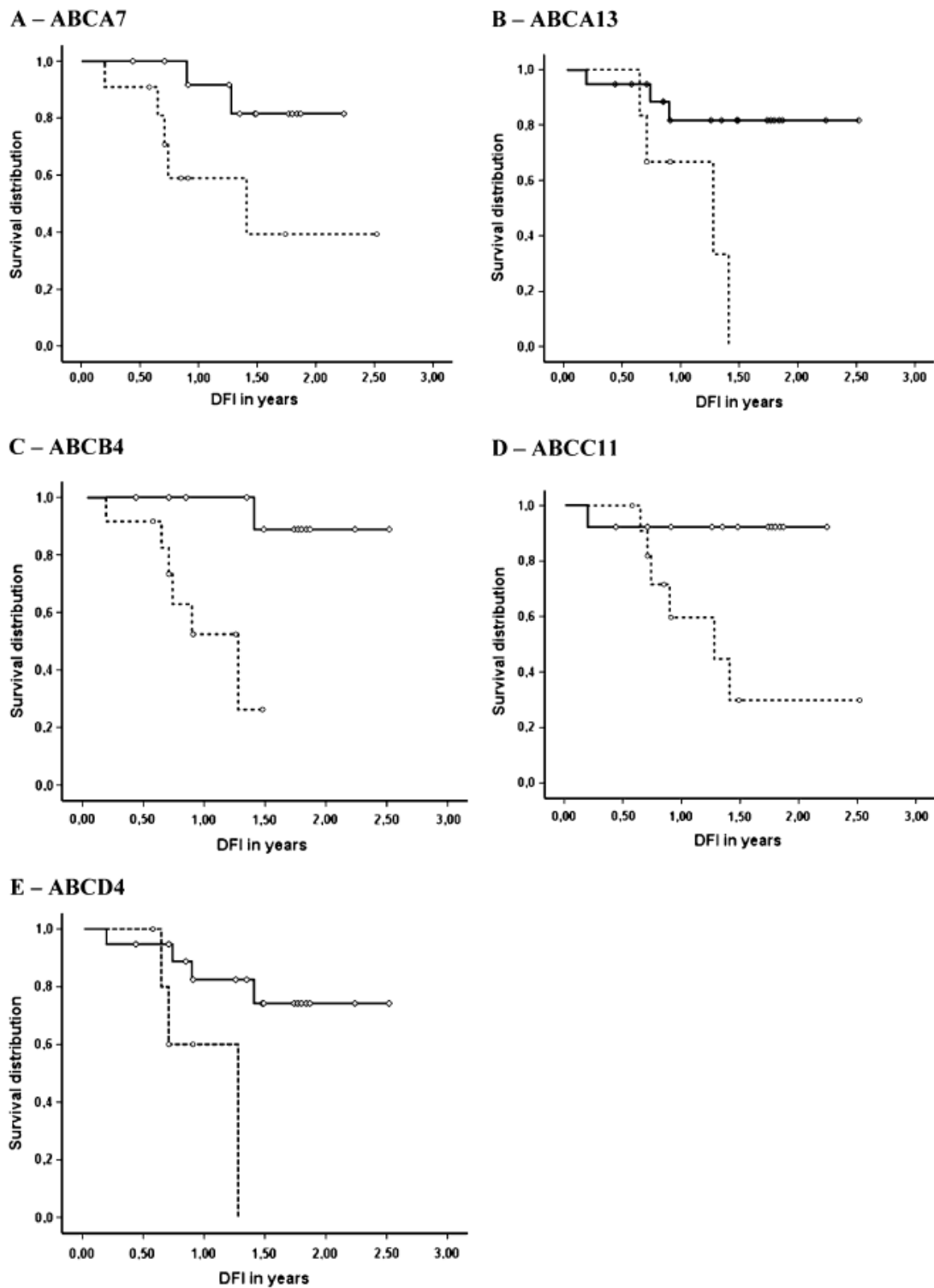


Fig. 1. Kaplan–Meier survival plots presenting the relation between DFI and transcript levels of ABCs. Survival curves are shown for two groups of patients divided by cut-off (for evaluation of cut-off, see Materials and methods). Individual figures illustrate Kaplan–Meier survival plots of patients with respect to transcript levels of ABCA7 (A, cut-off 1.25), ABCA13 (B, 1.58), ABCB4 (C, 1.48), ABCC11 (D, 1.68) and ABCD4 (E, 1.19). Dashed lines represent the group with higher normalised values than cut-off (meaning low transcript levels of ABCs) and solid lines represent the group with lower or equal values than cut-off (high transcript levels of ABCs).

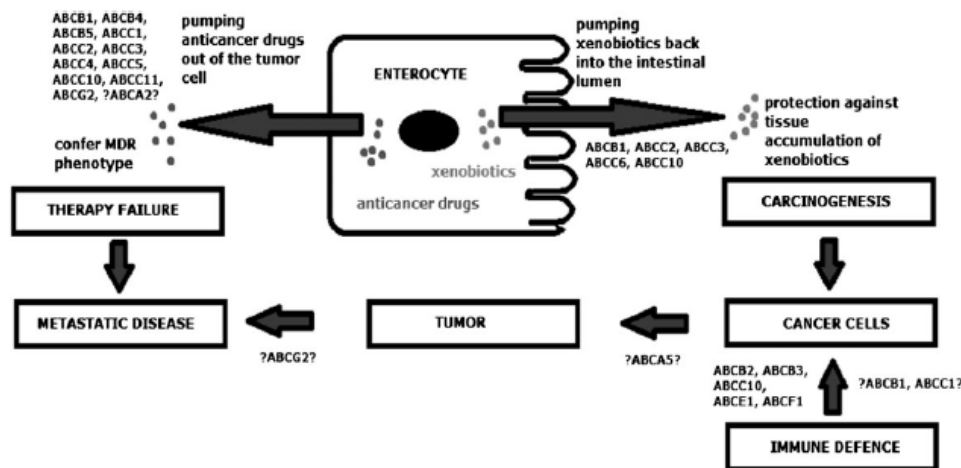


Fig. 2. Proposed involvement of ABCs in CRC development, progression and treatment outcome.

irinotecan-based chemotherapy than in irinotecan-naïve metastases (54). However, the access to post-operative liver metastases in the studied group of patients was limited and such analysis will be the subject of the validation study. In this context, it seems quite interesting that, according to recent study, synchronous or metachronous liver metastases could be treated differently on the basis of different gene expression signatures (55).

The transcript level of ABCC10 in tumours correlated with the grade in our study. There are no data on ABCC10 role in CRC in the literature. The lower ABCB1 expression was found in poorly differentiated CRC tumours ($P < 0.05$; 20) in line with the study on cell lines, where ABCB1 had a higher expression in well-differentiated colon cancer cells, when compared with the poorly differentiated ones (14). An increasing expression of another member of ABCC subfamily, ABCC3 with higher grade, i.e. the opposite trend to our observation with ABCC10, was found in pancreatic tumours (56). No further data on the association of other ABCs with grading in CRC are currently available. Zhang *et al.* (57) indicated that ABCB1 expression significantly correlated with tumour localisation ($P = 0.039$) and gender ($P = 0.043$). The intensity of immunohistochemical ABCG2 protein staining was higher in tumours of CRC patients with lymph node positive than in negative disease (30 versus 6.7%, respectively; $P < 0.025$). Thus, it seemed that ABCG2 expression may be important for progression and metastasis of CRC (58). Our pilot study, however, did not confirm any of the above published associations.

In the group of patients treated by palliative chemotherapy, the response was analysed using RECIST criteria. Patients were divided into two groups (responders versus non-responders). Transcript levels of ABCC6, ABCC11, ABCF1 and ABCF2 were significantly higher in responders in comparison with non-responders. In the group of patients treated by the adjuvant chemotherapy after the radical surgical resection of tumour, the relation between transcript levels of ABCs and DFI was evaluated. DFI was significantly shorter and HR of progression higher in patients with low transcript levels of ABCA7, ABCA13, ABCB4, ABCC11 and ABCD4, suggesting that these genes play a role in the therapy outcome

of patients treated by the adjuvant chemotherapy. Thus, ABCC11 was up-regulated in the chemotherapy-naïve tumours from patients who subsequently achieved a good response to the chemotherapy in both palliative and adjuvant groups. ABCC11 was shown to be a resistance factor for fluoropyrimidines (34). Oguri *et al.* (59) discovered that expression of the ABCC11 is induced by 5-FU and that ABCC11 is directly involved in 5-FU resistance by the efflux transport of the active metabolite FdUMP in human small-cell lung cancer cell lines. We hypothesise that the high ABCC11 expression in tumours before chemotherapy observed in both groups of CRC patients studied by us may limit further induction of ABCC11 by 5-FU treatment. However, to confirm or reject our idea, we need to analyse post-chemotherapy samples from the same patients or run a larger validation study.

It is also interesting that the most studied ABCs in the area of chemoresistance, ABCB1, ABCC1-5 and ABCG2 did not predict 5-FU therapy outcome in our CRC patients. We cannot add more evidence to the results of the recent study reporting that ABCC1 in CRC tissues could predict the reduced folate level after leucovorin administration and determine the efficacy of treatment by leucovorin (60). Schmidt *et al.* (61) observed up-regulation of ABCC6 in 5-FU-resistant colon tumour cell lines. Quite recently, ABCC3, ABCC4 and ABCC5 were found up-regulated in 5-FU-resistant pancreatic carcinoma cells (62). Nevertheless, results obtained using rather uniform cell line models cultured in the presence of a drug for a long time may not reflect the real situation in such a heterogeneous entity as colorectal tumour or a series of such tumours. As regards, observation in cancer patients, a significant down-regulation of gene expression in a number of ABCs was found in breast cancer patients ($n = 19$) receiving preoperative (neoadjuvant) chemotherapy regimens including 5-FU. ABCA1, ABCA12, ABCB6, ABCC5, ABCC11 and ABCC13 were down-regulated in patients with complete pathological response, in comparison with patients with residual disease. In contrast, ABCB2, ABCC7 and ABCF2 were up-regulated in patients with complete pathological response (63). In breast cancer patients treated with endocrine therapy, ABCF2 protein immunopositive tumours had a longer disease-free survival when the tumours were oestrogen receptor negative or

progesterone receptor negative ($P = 0.002$ and 0.005 , respectively; 64). Thus, the up-regulation of ABCF2 observed by us in CRC patients corresponds to available data on breast and cervical cancers. It seems obvious that ABCs have tumour-specific expression profiles (65) and thus also different roles in the mechanism of chemoresistance of the cancer cell (summarised in Figure 2). Thus, further studies are needed to evaluate the importance of the results obtained by this study.

The study of transcript levels rather than protein expression may be seen as the major limitation of our study. The power of protein analysis is obvious. However, the use of immunohistochemical analysis is semi-quantitative and reflects only protein level and not its activity. In addition, the issue of availability, specificity and selectivity of the antibodies further limits protein analysis. The correlations between transcript and protein levels of human ABCs are mostly unknown and thus, we shall consider transcript levels as independent markers. For the assessment of transcript levels, we have used highly sensitive methods based on real-time PCR, which is superior to relative or semi-quantitative approaches. The small sample size and absence of correction for multiple testing could be seen as another limitation of our pilot study. Thus, all results should be interpreted with caution and need to be confirmed by both retrospective and prospective validation studies on a larger and independent series of CRC patients.

In conclusion, our pilot study brings to light new and interesting data. Transcript levels of all known human ABC transporter genes were assessed in a series of tumour and control tissue samples from well-characterised CRC patients. Several genes were found deregulated in tumours compared with control tissues and a gradient of transcript levels along the superior–inferior axis of the large intestine was observed for the first time. The comparison of outcomes of patients treated by the 5-FU-based regimens suggested that ABCC11 may present a promising candidate marker. The validation of candidate genetic markers identified in the pilot study will be the next goal of our current research.

Supplementary data

Supplementary Table IS–VIS and Material are available at *Mutagenesis* Online.

Funding

Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (NR 10230-3 to V.L. and P.S.); Czech Science Foundation (310/07/1430 to P.S. and P.V.) and Grant Agency of Charles University (GAUK 15109/2009 to I.H.).

Acknowledgements

Authors wish to thank Dr Stanislav Kormunda for survival analysis.

Conflict of interest statement: None declared.

References

1. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. D. and Parkin, D. (2010) *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France*, International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr> (accessed September 8, 2010).
2. Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 78–85.
3. Aaltonen, L., Johns, L., Jarvinen, H., Mecklin, J. P. and Houlston, R. (2007) Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 356–361.
4. Watson, A. J. and Collins, P. D. (2011) Colon cancer: a civilization disorder. *Dig. Dis.*, **29**, 222–228.
5. Soucek, P. (2008) Xenobiotics. In Schwab, M. (ed.), *Encyclopedia of Cancer*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, NY.
6. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H. et al. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258**, 1650–1654.
7. Mendoza, J. L., Urcelay, E., Lana, R. et al. (2007) MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 585–590.
8. Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67–113.
9. Kaminski, W. E., Piehler, A. and Wenzel, J. J. (2006) ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 510–524.
10. Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J. et al. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, **346**, 362–365.
11. Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 48–58.
12. Ejendal, K. F. and Hrycyna, C. A. (2002) Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **3**, 503–511.
13. Broccardo, C., Luciani, M. and Chimini, G. (1999) The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 395–404.
14. Ohtsuki, S., Kamoi, M., Watanabe, Y., Suzuki, H., Hori, S. and Terasaki, T. (2007) Correlation of induction of ATP binding cassette transporter A5 (ABCA5) and ABCB1 mRNAs with differentiation state of human colon tumor. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1144–1146.
15. Choudhuri, S. and Klaassen, C. D. (2006) Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.*, **25**, 231–259.
16. Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O. et al. (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **97**, 3473–3478.
17. Sharom, F. J. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, **9**, 105–127.
18. Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. and Kim, R. B. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**, 13–33.
19. Vacklavikova, R., Nordgard, S. H., Alnaes, G. I. et al. (2008) Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics*, **18**, 263–273.
20. De Iudicibus, S., De Pellegrin, A., Stocco, G., Bartoli, F., Bussani, R. and Decorti, G. (2008) ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res.*, **28**, 3921–3928.
21. Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., He, J. and Liang, H. (2010) Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **136**, 1697–1707.
22. Johnsson, A., Vallon-Christensson, J., Strand, C., Litman, T. and Eriksen, J. (2005) Gene expression profiling in chemoresistant variants of three cell lines of different origin. *Anticancer Res.*, **25**, 2661–2668.
23. Kasajima, A., Sers, C., Sasano, H. et al. (2010) Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum. Pathol.*, **41**, 1758–1769.
24. Zhou, S. F., Wang, L. L., Di, Y. M., Xue, C. C., Duan, W., Li, C. G. and Li, Y. (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1981–2039.
25. Leslie, E. M., Haimeur, A. and Waalkes, M. P. (2004) Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32700–32708.
26. Smitherman, P. K., Townsend, A. J., Kute, T. E. and Morrow, C. S. (2004) Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCG2) in alkylating agent

- detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 260–267.
27. Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G. and Cole, S. P. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.*, **5**, 21–53.
 28. Fujita, K., Nagashima, F., Yamamoto, W. et al. (2008) Association of ATP-binding cassette, sub-family C, number 2 (ABCC2) genotype with pharmacokinetics of irinotecan in Japanese patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI). *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2137–2142.
 29. Hinoshita, E., Uchiyama, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M. (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2401–2407.
 30. Theille, D., Grebhardt, S., Haefeli, W. E. and Weiss, J. (2009) Involvement of drug transporters in the synergistic action of FOLFOX combination chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 1366–1373.
 31. Pratt, S., Shepard, R. L., Kandasamy, R. A., Johnston, P. A., Perry, W., III and Dantzig, A. H. (2005) The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 855–863.
 32. Gradilone, A., Pulcinelli, F. M., Lotti, L. V. et al. (2008) Celecoxib upregulates multidrug resistance proteins in colon cancer: lack of synergy with standard chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **8**, 414–420.
 33. Gazzaniga, P., Gradilone, A., Petracca, A., Nicolazzo, C., Raimondi, C., Iacovelli, R., Naso, G. and Cortesi, E. (2010) Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients. *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 2073–2077.
 34. Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G. and Kruh, G. D. (2003) MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29509–29514.
 35. Shani, N. and Valle, D. (1996) A Saccharomyces cerevisiae homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 11901–11906.
 36. Campa, D., Pardini, B., Naccarati, A. et al. (2008) A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BRCP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Mutat. Res.*, **645**, 56–60.
 37. Dietrich, C. G., Vehr, A. K., Martin, I. V., Gafner, N., Rath, T., Roeb, E., Schmitt, J., Trautwein, C. and Geier, A. (2011) Downregulation of breast cancer resistance protein in colon adenomas reduces cellular xenobiotic resistance and leads to accumulation of a food-derived carcinogen. *Int. J. Cancer*, **129**, 546–552.
 38. Nakatomi, I., Yoshikawa, M., Oka, M. et al. (2001) Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 827–832.
 39. Chikazawa, N., Tanaka, H., Tasaka, T., Nakamura, M., Tanaka, M., Onishi, H. and Katano, M. (2010) Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Res.*, **30**, 2041–2048.
 40. Hostettler, L., Zlobec, I., Terracciano, L. and Lugli, A. (2010) ABCG5-positivity in tumor buds is an indicator of poor prognosis in node-negative colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.*, **16**, 732–739.
 41. Sobin, L. H. and Wittekind, C. (eds) (2002) *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th edn. Wiley-Liss, New York, NY.
 42. Therasse, P., Arbuck, S. G., Eisenhauer, E. A. et al. (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States and National Cancer Institute of Canada. *J. Natl Cancer Inst.*, **92**, 205–216.
 43. Soucek, P., Anzenbacher, P., Skoumalova, I. and Dvorak, M. (2005) Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, **23**, 1417–1422.
 44. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**, research0034.1–research0034.11.
 45. Andersen, C. L., Jensen, J. L. and Ørntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, **64**, 5245–5250.
 46. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A. et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
 47. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e36.
 48. Gupta, N., Martin, P. M., Miyauchi, S., Ananth, S., Herdman, A. V., Martindale, R. G., Podolsky, R. and Ganapathy, V. (2006) Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 571–577.
 49. Shichijo, S., Ishihara, Y., Azuma, K. et al. (2005) ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncol. Rep.*, **13**, 907–913.
 50. Anderle, P., Sengstag, T., Mutch, D. M., Rumbo, M., Praz, V., Mansourian, R., Delorenzi, M., Williamson, G. and Roberts, M. A. (2005) Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC Genomics*, **6**, 69.
 51. Mutch, D. M., Anderle, P., Fiaux, M., Mansourian, R., Vidal, K., Wahli, W., Williamson, G. and Roberts, M. A. (2004) Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract. *Physiol. Genomics*, **17**, 11–20.
 52. Berggren, S., Gall, C., Wollnitz, N., Ekelund, M., Karlbom, U., Hoogstraate, J., Schrenk, D. and Lemmäs, H. (2007) Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol. Pharm.*, **4**, 252–257.
 53. Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C. and Drewe, J. (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 695–699.
 54. Candeil, L., Gourdiere, I., Peyron, D. et al. (2004) ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int. J. Cancer*, **109**, 848–854.
 55. Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Nannini, M. et al. (2008) Gene expression profiling of liver metastases from colorectal cancer as potential basis for treatment choice. *Br. J. Cancer*, **99**, 1729–1734.
 56. König, J., Hartel, M., Nies, A. T., Martignoni, M. E., Guo, J., Büchler, M. W., Friess, H. and Keppler, D. (2005) Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, **115**, 359–367.
 57. Zhang, Z., Deng, X., Ren, X., Zhang, B., Chen, X., Yang, J., Ding, H., Sui, J. and Song, X. (2010) Expression of mutant p53 and of the multidrug resistant proteins P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi correlated in colorectal adenocarcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.*, **45**, 925–934.
 58. Liu, H. G., Pan, Y. F., You, J., Wang, O. C., Huang, K. T. and Zhang, X. H. (2010) Expression of ABCG2 and its significance in colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **11**, 845–848.
 59. Oguri, T., Bessho, Y., Achiwa, H., Ozasa, H., Maeno, K., Maeda, H., Sato, S. and Ueda, R. (2007) MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 122–127.
 60. Sadahiro, S., Suzuki, T., Maeda, Y. et al. (2010) Molecular determinants of folate levels after leucovorin administration in colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **65**, 735–742.
 61. Schmidt, W. M., Kalipcian, M., Dornstauder, E., Rizovski, B., Steger, G. G., Sedivy, R., Mueller, M. W. and Mader, R. M. (2004) Dissecting progressive stages of 5-fluorouracil resistance in vitro using RNA expression profiling. *Int. J. Cancer*, **112**, 200–212.
 62. Haggmann, W., Jesnowski, R., Faissner, R., Guo, C. and Löhner, J. M. (2009) ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatol.*, **9**, 136–144.
 63. Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T. et al. (2006) Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, **99**, 9–17.
 64. Ogawa, Y., Tsuda, H., Hai, E. et al. (2006) Clinical role of ABCF2 expression in breast cancer. *Anticancer Res.*, **26**, 1809–1814.
 65. Zhang, W., Shannon, W. D., Duncan, J., Scheffer, G. L., Schepher, R. J. and McLeod, H. L. (2006) Expression of drug pathway proteins is independent of tumour type. *J. Pathol.*, **209**, 213–219.

LIŠKA, V., P. NOVÁK, O. DAUM, V. TŘEŠKA, O. VYČÍTAL, J. BRŮHA a P. PITULE.
Tumor infiltrating lymphocytes as prognostic factor of early recurrence and poor prognosis
of colorectal cancer after radical surgical treatment. In: ETTARH, R., ed. *Colorectal
Cancer Biology: From Genes to Tumor*. Rijeka: Intech, 2012, 413-428. ISBN 978-953-
307-707-9.

Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Factor of Early Recurrence and Poor Prognosis of Colorectal Cancer After Radical Surgical Treatment

Vaclav Liska¹, Ondrej Daum², Petr Novak¹, Vladislav Treska¹,
Ondrej Vycital¹, Jan Bruha¹, Pavel Pitule¹ and Lubos Holubec³

¹*Department of Surgery,*

²*Institute of Pathology,*

³*Department of Oncology, Charles University Prague,
Medical School and Teaching Hospital Pilsen,*

Czech Republic

1. Introduction

Sixty percent of patients with colorectal cancer (CRC) are afflicted with distant metastases (liver or lung metastatic process) or a local relapse of malignancy (Bird et al., 2006). The possibilities of surgical and oncological treatment of this disease offer us a large spectrum of treatments including the combination of surgical procedures and consecutive oncological treatments. In the case of radical surgical therapy we can consider the curative access. The main medical problem of CRC is the high rate of recurrences after radically performed surgical therapy. The operability of recurrence is only about 30% in the case of local relapse and 20% in the case of distant metastases (Coleman et al., 2008; Kobayashi et al., 2007). The second dominant problem is the early recurrence of CRC after radical surgical treatment, when the patients undergo a difficult and exhausting procedure with a high risk of perioperative complications without any significant differences in overall survival against modern palliative therapy (Van den Eynde & Hendlitz, 2009).

Contemporary clinical and histopathological prognostic factors (staging, grading, etc.) used for the detection of patients with a high risk of relapse and a short overall survival rate and for the indication of adjuvant oncological treatment after radical surgery are not sufficient. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were described as a good prognostic factor for patients with a high risk of relapse. They are critical indicators of efficient antitumor immunological response. Their number, type and morphology of TIL cells determine resulting tumor prognosis (Atreya & Neurath, 2008; Galon et al., 2006). They could be connected also with the suppression of micrometastatic disease after radical surgery (Gajewski et al., 2006; Pages et al., 2005). We can recognize either the type of immune cells or distinguish their morphological aspects (infiltration of any part of tumor or surrounding of tumor or tributary lymph nodes) (Talmadge et al., 2007).

We detail only short overview of their types and function. We recommend the readers with deeper interest in these problems to find comprehensive reviews in the cited papers (Jochems et al., 2011; Ohtani 2007). From this view we find CD8+ and CD4+ T lymphocytes (Fig. 1a & Fig. 1b), natural killer cells (Fig. 1c), dendritic cells (Fig. 1d), macrophages, etc. The exact function of these cells is under current discussion. We only know that they play main role in controlling tumor development and growth. CD8+ T lymphocytes within cancer cell nests of colorectal cancer have significant impact on the survival of patients. They contain the cytolytic enzyme granzyme-B. In case of increased proliferating activity of CD8+ T lymphocytes we observe their activated and cytotoxic phenotype that is significantly associated with the absence of early metastatic events (vascular emboli, lymphatic invasion or perineural invasion of tumor cells) and with a decreased rate of cancer recurrence (Atreya & Neurath, 2008, Pages et al., 2010). A high density of memory T lymphocytes within colorectal cancer tissue was more frequently observed in patients without early detectable signs of metastatic events and was associated with both improved disease free interval (DFI) and prolonged overall survival (OS) (Galon et al., 2006; Pages et al., 2005).

Natural killer cells (NK cells) mediate an effective lysis of cancer cells but the mechanism of detection of cancer cells is different from CD8+ T lymphocytes (Cooper et al., 2009). NK cells are mainly involved in the innate immune response and do not recognize specific tumor associated antigen on the surface of cancer cells as CD8+ T lymphocytes. NK cells lyse the cancer cells that are opsonized by surface antibody. NK cells also respond to other signals as cytokines produced by antigen presenting cells, which allow them to mediate early host responses against pathogen (Moretta et al., 2006). Decreased preoperative number of NK cells was associated with increased frequency of postoperative recurrence of colorectal cancer (Atreya & Neurath, 2008; Cooper et al., 2001). Their crucial role in the elimination of haematological malignancies, primary and secondary tumors has been recognized (Lucas et al., 2007; Ljunggren & Malmberg, 2007, Stojanovic & Cerwenka, 2011). In the last year there are some signs that NK-cells have the capacity for memory-like responses, a property that was previously thought to be limited to adaptive immunity, but in this view the discussion still continues (Cooper et al., 2009).

Dendritic cells are considered to be most potent antigen presenting cells. They play key role in activation, stimulation and recruitment of T lymphocytes. They can also induce antigen-specific unresponsiveness or immune tolerance. Immature dendritic cells enter tumor tissue, uptake and process its antigens. Then after they migrate to lymph nodes, undergo maturation and interact with T-lymphocytes that are able to recognize presented antigen and so T-lymphocytes play effector role of this tumor-specific immunity (Atreya & Neurath, 2008; Pages et al., 2005; Sandel et al., 2005; Steinman et al., 2003).

Macrophages are important producers of different factors that have function during tumor progression and also during tumor progression control. Their function is not fully understand, but it was described that the number of tumor infiltrating macrophages correlates with overall survival of colorectal cancer patients (Atreya & Neurath, 2008; Pollard, 2004; Forssell et al., 2007). It seems that several types of tumor infiltrating macrophages influence the balance between pro- and anti-tumor properties of immune system (Forssell et al., 2007).

From the morphologic view we can observe TIL in the specific portions of tumor and so we detect lymphocytic infiltration intratumoral (ITL - intratumoral lymphocytes) (Fig.

2a), intrastromal (ISL - intrastromal lymphocytes) (Fig. 2b), peritumoral (PTL - peritumoral lymphocytes) (Fig. 2c) and Crohn-like reaction (Crohn-like PTL)(Fig. 2d). We can also describe reactive histological changes in tributary lymph nodes (LN reactions). It means follicular hyperplasia (LN-FH) (Fig. 3a.), sinus histiocytosis (LN-SH) (Fig. 3b.) and the presence of granulomas (LN-GR) (Fig. 3c) (Ogino et al, 2009; Pages et al., 2005).

The aim of this study was to analyze the relationship of contemporary clinical and histopathological factors and TIL to determine patients with a high risk of poor overall survival and tendency to early recurrence of malignancy with shortened disease free interval (DFI) after radical surgery for CRC.

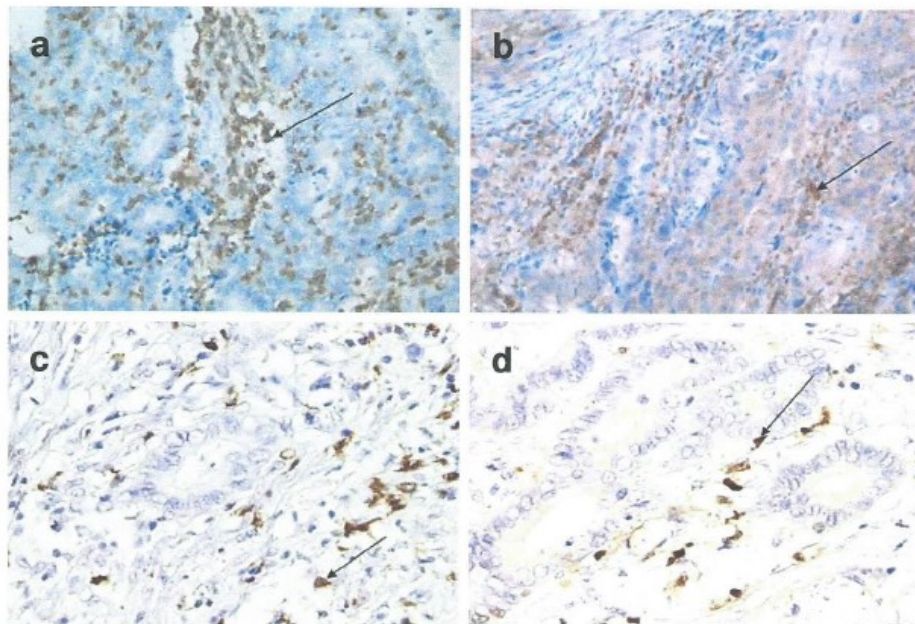


Fig. 1. Examples of tumor infiltration by immune cells: a) CD8+ T lymphocytes; b) CD4+ T lymphocytes; c) Natural killer cell (CD 57 staining) and d) Dendritic cells (S 100 staining).

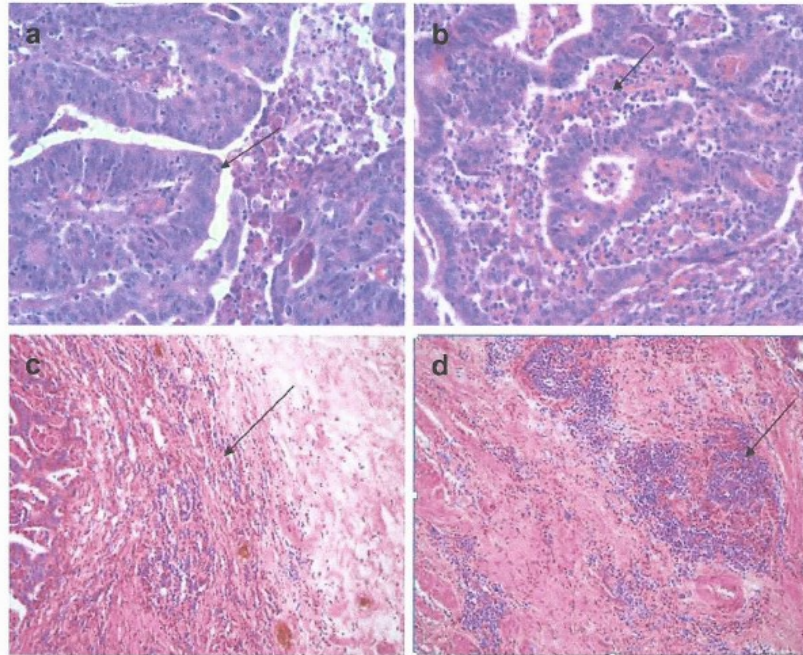


Fig. 2. Different localisation of TIL within the tumor tissue: a) intratumoral lymphocytes; b) intrastromal lymphocytes; c) peritumoral lymphocytes and d) Crohn-like peritumoral lymphocytes. All sections stained with hematoxylin-eosin.

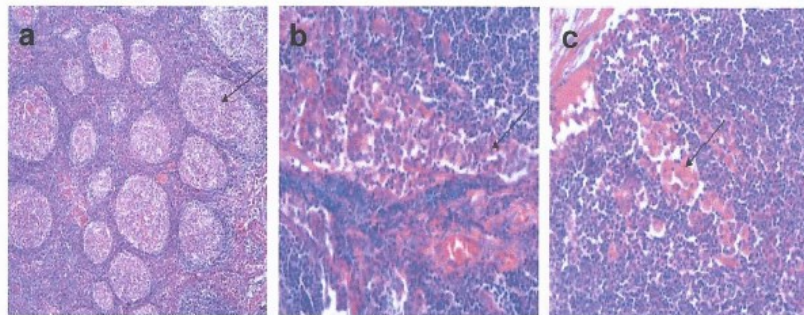


Fig. 3. Reactive histological changes in tributary lymph nodes: a) follicular hyperplasia; b) sinus histiocytosis and c) presence of granulomas. All sections stained with hematoxylin-eosin.

2. Methods

We analyzed 150 patients who underwent radical surgical procedure for CRC between the years 2004-2007 at the Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital in Pilsen, Charles University in Prague. We selected only patients who were operated on electively - our aim was to decrease the risk of inflammation that is often connected with the acute operation of CRC and does not depend on the immune reaction against a tumor but could be evoked by the distension of the bowel. We also excluded patients who had risk of understaging (for example low number of analysed lymph nodes) and patients with a synchronous metastatic process. The inclusion standard was also the entire follow-up of patients during the whole postoperative period to increase the number of patients with a diagnosed early recurrence of CRC.

The following clinical parameters were statistically analysed in relation to the disease free interval (DFI) and the overall survival (OS): staging, grading, preoperative leukocytosis, type of surgical procedure (radical vs. palliative), postoperative complications and postoperative oncological treatment.

2.1 Histology

We examined three different sections of each tumor and also sections of all found lymph nodes. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin.

The type and grade of all tumors were determined according to WHO 2000 guidelines. The stage of tumors was established according to UICC 2002 guidelines. We evaluated endovascular (VI), endolymphatic (LI) and perineural infiltration (PI) by cancer cells (0 - none, 1 - yes). Lymphocytic infiltration was detected as intratumoral (ITL - intratumoral lymphocytes), intrastromal (ISL - intrastromal lymphocytes), peritumoral (PTL - peritumoral lymphocytes) and Crohn-like reaction (Crohn-like PTL), and scaled as none (0), mild (1), moderate (2) and severe (3). Reactive histological changes in lymph nodes (LN reactions) were detected as follicular hyperplasia (LN-FH), sinus histiocytosis (LN-SH) and the presence of granulomas (LN-GR), and all these parameters were quantified in the same manner as lymphocytic infiltration.

2.2 Immunohistochemistry

For immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD4 (clone 4B12, 1:50, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and CD8 (clone C8/144B, 1:50, Dako, Glostrup, Denmark). Microwave pretreatment was used in both cases. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA). Appropriate positive and negative control slides were employed. The density of intratumoral infiltration by lymphocytes was evaluated in five High power microscopical fields (HPF) and expressed as the number of immunopositive cells per HPF.

2.3 Statistical evaluation

Statistical analysis was processed by the statistical software Statistica 9.0. The mean, median, standard deviation (SD), minimum, maximum, quartiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in given groups and subgroups of patients corresponding to studied clinical and histopathological parameters.

The relationships between the variables were described by Spearman rank correlation coefficients.

The analyses of Overall survival (OS) and Disease free interval (DFI) were performed by Kaplan-Meier's survival functions. The influence of given covariates (clinical and histopathological factors) was tested by the Log-Rank test and Wilcoxon test. The Cox regression hazard model, hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI) for HR were computed for the evaluation of given clinical and histopathological factors to OS or DFI. Multivariate analysis was performed by the use of classification and regression trees (CART). The Cox regression hazard model (stepwise regression) was applied to find the predictors in CART.

3. Results

The statistical analysis of the studied cohort of patients after surgical treatment for colorectal cancer demonstrated an acceptable distribution of basic statistical description parameters (gender ratio 93:57 (male vs. female)). 1, 3 and 5 years overall survival was 92.2%, 76.5% and 70.2% and 1, 3 and 5 year DFI was 85.3%, 64.3% and 49.4%.

The Spearman rank correlation coefficient did not prove any stronger correlation than a moderate correlation at endolymphatic invasion (LI) and lymph node infiltration by metastatic process (Spearman rank correlation coefficient 0.56, $p < 0.05$). All the other studied factors were independent factors or factors with a low correlation.

Statistical analysis proved lymph node infiltration by metastatic process as statistically significant for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$) and N2 status of lymph nodes increased the risk of shorter overall survival 9.3x (Fig. 4).

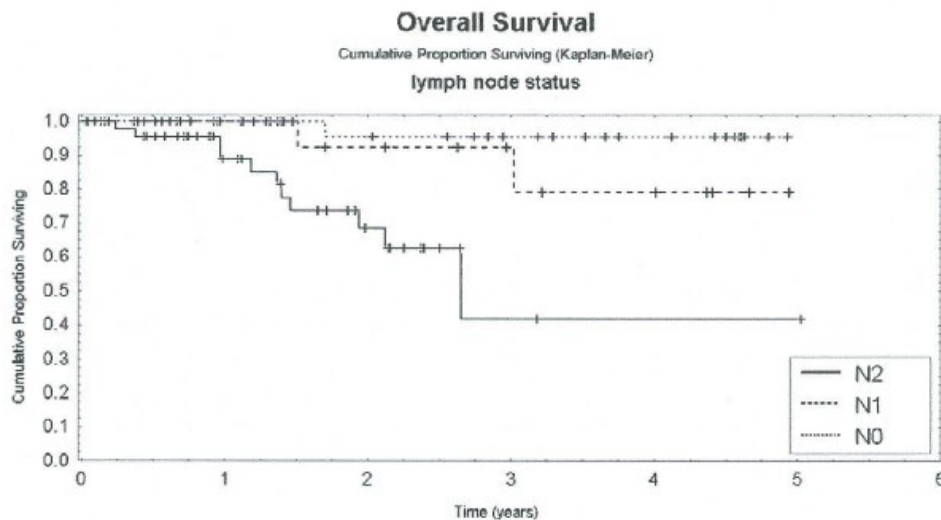


Fig. 4. Statistical analysis proved the lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$), and the N2 status of lymph nodes increased the risk of a shorter overall survival 9.3x.

Endovascular infiltration (VI) was proved as a negative prognostic factor of shorter overall survival (Fig.5.). Patients with positive histopathological findings of VI have 3.1x increased risk for shorter overall survival. The presence of peritumoral lymphocytes (PTL) (Fig.6.) and of Crohn-like PTL (Fig.7.) was proved as a positive prognostic factor of OS. Patients with a positive histopathological finding of PTL and Crohn-like PTL have a decreased risk for shorter overall survival (2.3x and 2.3x respectively). Lymph node follicular hyperplasia (LN-FH) was verified as a positive prognostic factor for longer overall survival (Fig.8.). The statistical significance of LN-FH increased also with the raised density of infiltration. LN-FH positivity decreased the risk of shorter overall survival 3.3times.

The severity of CD8+ lymphocytic infiltration was proved by the Cox regression hazard model as a positive prognostic factor enlarging overall survival (cut off 30 cells/HPF). The severity of CD4+ lymphocytic infiltration was proved as a significant factor for the prognosis of overall survival (cut off 4cells/HPF) with 2.5x increased hazard ratio in patients over the cut off (Fig.9.). Statistical analysis did not confirm the statistical significance of CD8/CD4 ratio.

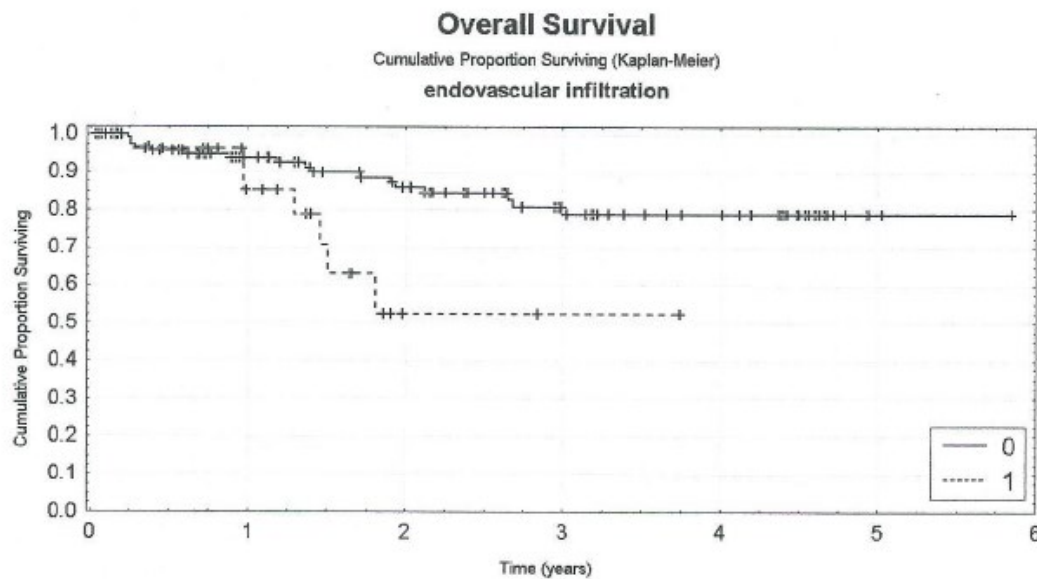


Fig. 5. Endovascular infiltration by cancer cells (VI) was proved as a statistically significant factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of VI have 3.1x higher risk ratio for shorter overall survival.

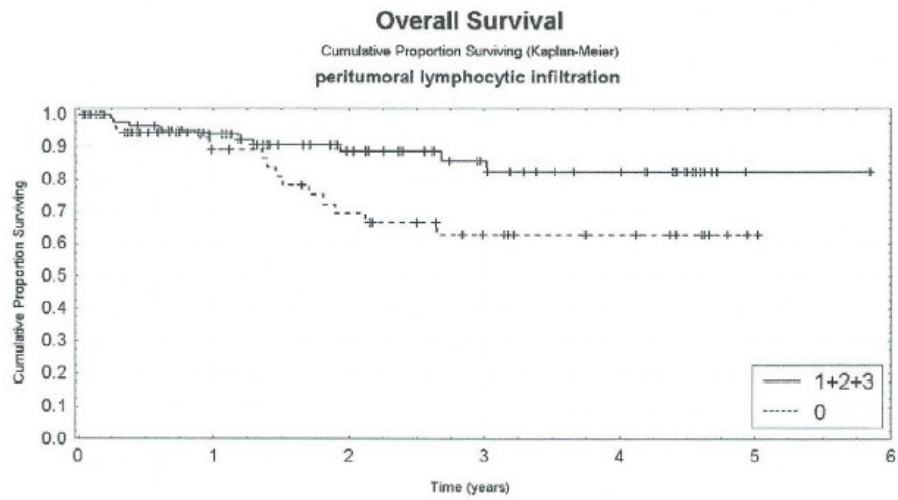


Fig. 6. Presence of peritumoral lymphocytes (PTL) was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

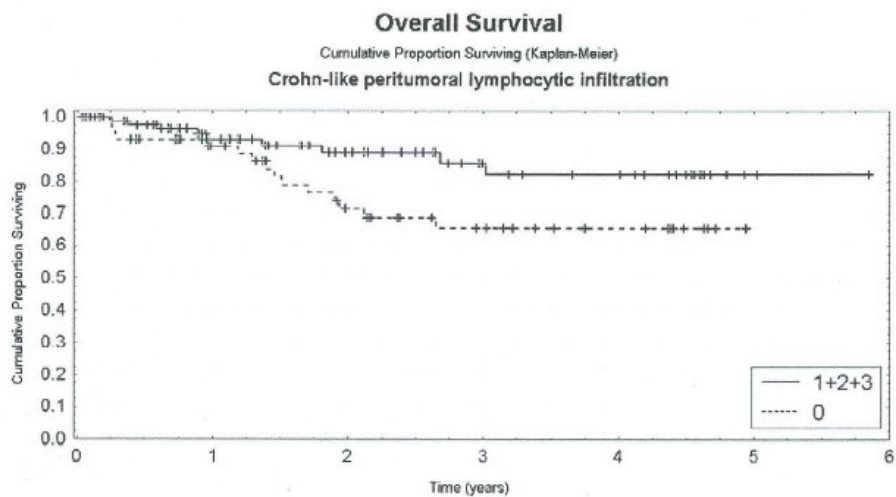


Fig. 7. Presence of Crohn-like PTL was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

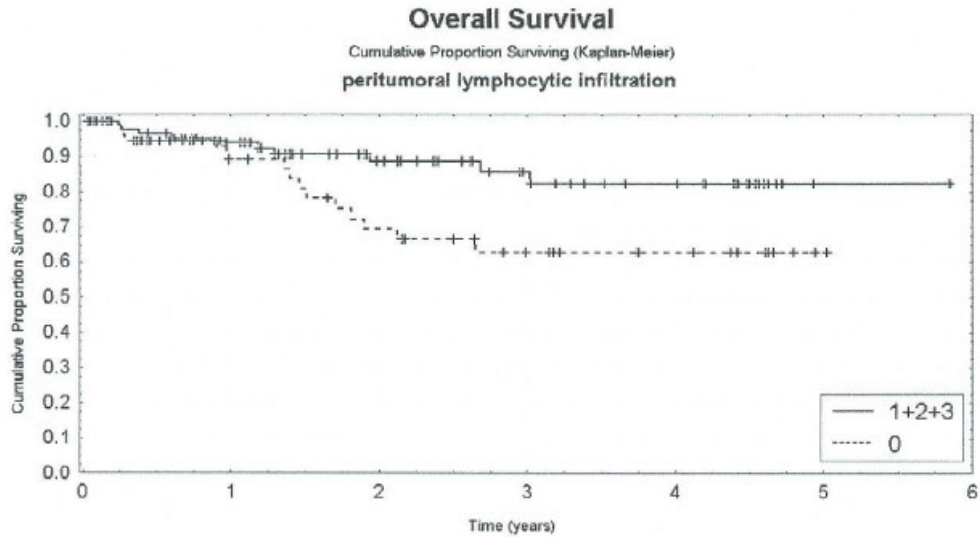


Fig. 6. Presence of peritumoral lymphocytes (PTL) was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

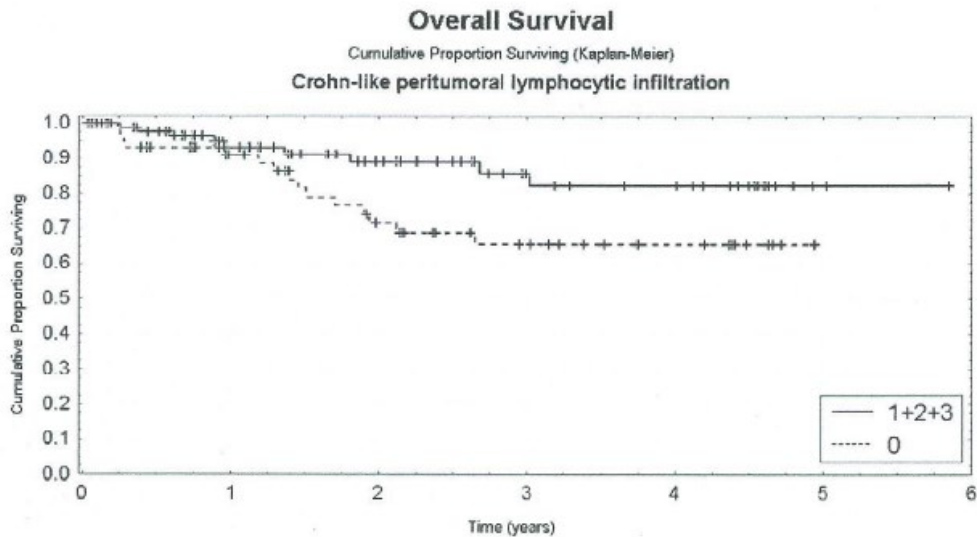


Fig. 7. Presence of Crohn-like PTL was proved as a statistically significant positive factor for the prognosis of overall survival ($p < 0.05$). The patients with a positive histopathological finding of PTL have 2.3x lower risk ratio for a shorter overall survival.

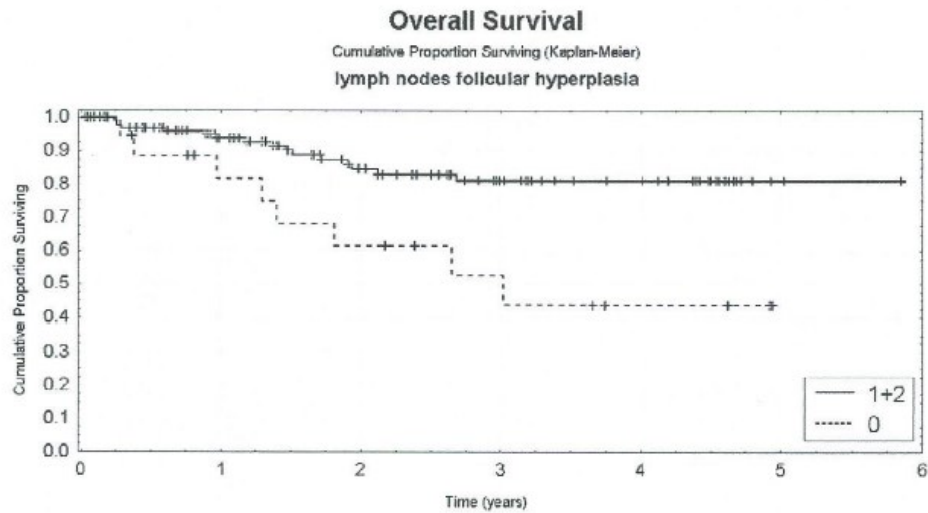


Fig. 8. Lymph node follicular hyperplasia (LN-FH) was verified as a positive prognostic factor for a longer overall survival ($p < 0.05$). The statistical significance of LN-FH increased also with the raised density of infiltration. LN-FH positivity decreased the risk of a shorter overall survival 3.3x.

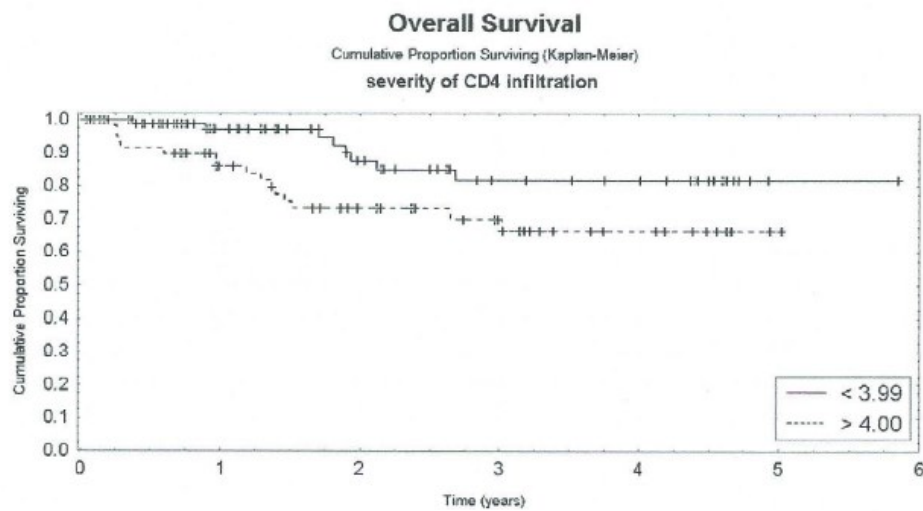


Fig. 9. Severity of CD4+ lymphocytic intratumoral infiltration was proved as a significant factor for the prognosis of overall survival (cut off 4cells/HPF) with a 2.5x increased hazard ratio in patients over the cut off ($p < 0.05$).

The Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by metastatic process and LN-FH as the best prognostic factors for the prediction of the risk of shorter overall survival. This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART)($p < 0.05$) (Fig.10.). All other studied parameters were not proved as statistically significant for the prognosis of overall survival.

Classification and Regression Tree

Overall Survival

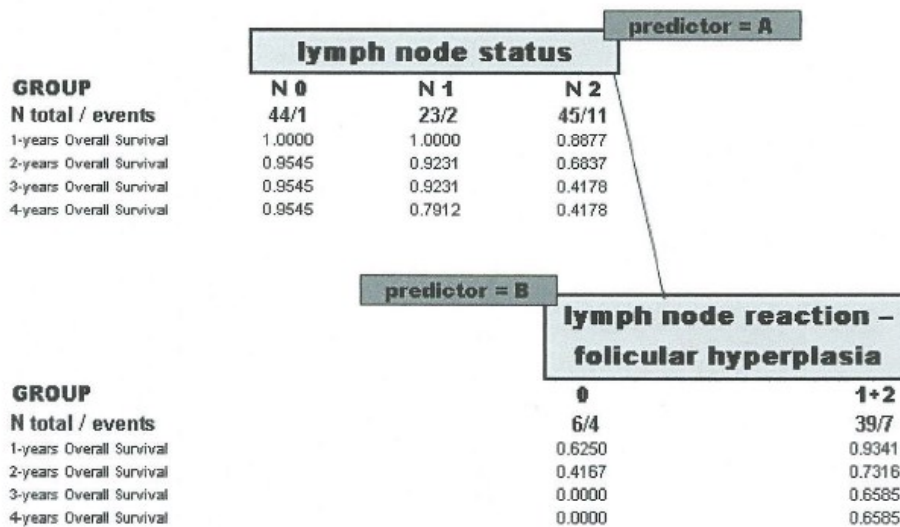


Fig. 10. Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by a metastatic process and LN-FH as the best prognostic factors for the prediction of risk of a shorter overall survival ($p < 0.05$). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART).

Perineural infiltration (PI) was proved as a negative prognostic factor of an earlier recurrence (Fig.11.). Patients with a positive histopathological finding of PI have 3.8x increased risk for shorter DFI.

The severity of CD8+ lymphocytic infiltration was proved by the Cox regression hazard model as a positive prognostic factor enlarging DFI (cut off 30cells/HPF) (Fig.12.). Patients over the cut off have 2.2x increased risk of an early recurrence. The severity of CD4+ lymphocytic infiltration was not proved as a significant factor for the prognosis of DFI. Statistical analysis did not confirm the statistical significance of the CD8/CD4 ratio.

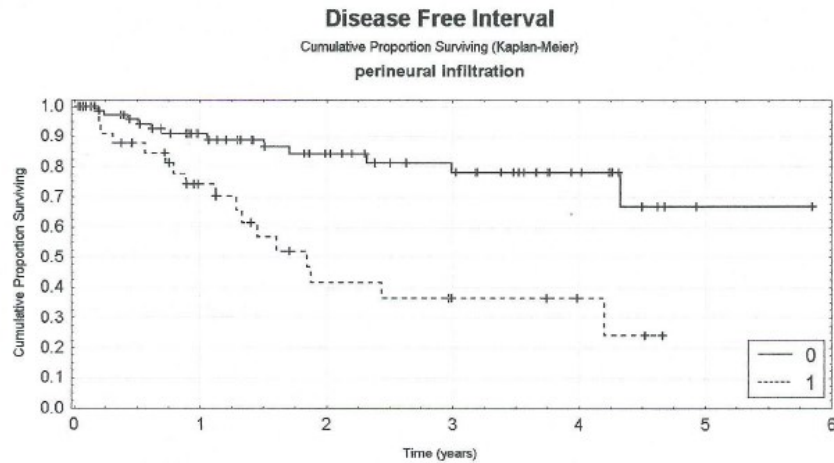


Fig. 11. Perineural infiltration (PI) was proved as a negative prognostic factor of an earlier recurrence ($p < 0.05$). Patients with a positive histopathological finding of PI have a 3.8x increased risk for shorter DFI.

Statistical analysis proved lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of DFI and N2 status of lymph nodes increased the risk of shorter DFI 5x (Fig. 13.).

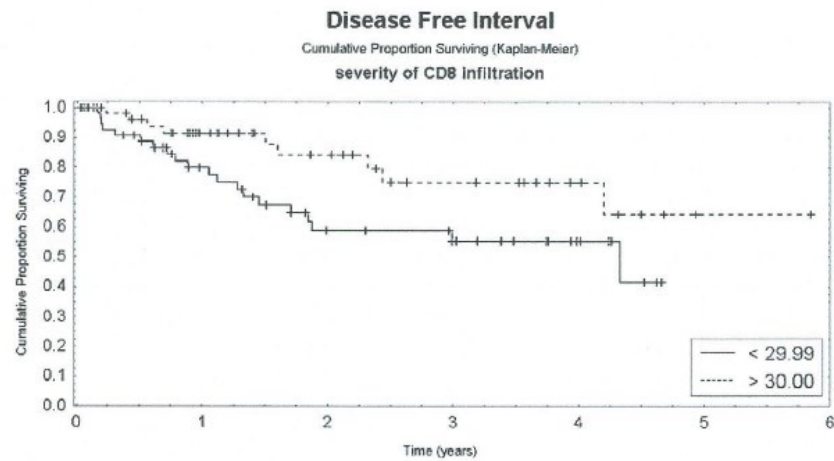


Fig. 12. Severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration was proved as a positive prognostic factor enlarging DFI (cut off 30 cells/HPF) by the Cox regression hazard model ($p < 0.05$). Patients over the cut off have a 2.2x increased risk of an early recurrence.

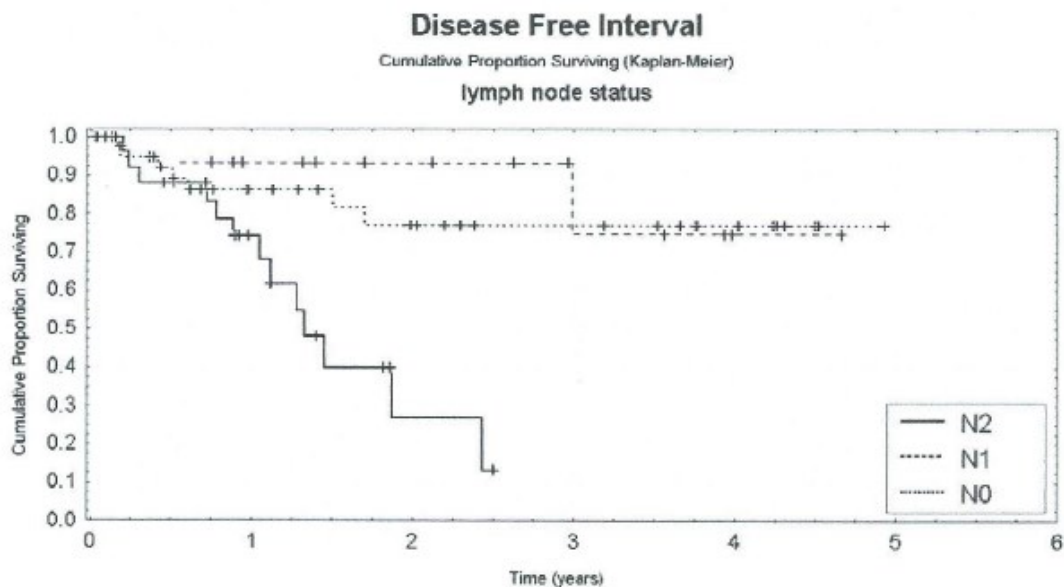


Fig. 13. Statistical analysis proved lymph node infiltration by a metastatic process as statistically significant for the prognosis of DFI, and a N2 status of lymph nodes 5x increased the risk of a shorter DFI ($p < 0.05$).

The Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8 positivity of infiltrating lymphocytes as the best prognostic factors for the prediction of risk of early recurrence ($p < 0.05$). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART) (Fig. 14). All other studied parameters were not proved as statistically significant for the prognosis of DFI.

4. Discussion

The role of the adaptive immunological response in controlling the growth and relapse of CRC remains controversial and contemporary studies have not answered all the questions about the prognosis of patients after radical surgical treatment of CRC (Galon et al., 2006; Ohtani, 2007; Van den Eynde & Hendlisz, 2009). We analysed our large cohort of patients of CRC with consideration to detect the negative and also positive prognostic factors of early recurrence of the disease and the poor overall survival after radical surgery. It was stimulated by the unsatisfactory situation and some dilemmas in the indication of surgical and oncological treatment, when early recurrence depreciates our effort to radical surgery with a high risk of complications and the long time of the decreased quality of life of our patients.

In the presented clinico-pathological study we demonstrated that lymph node infiltration by a metastatic process, N2 status of lymph nodes, VI, and extent of CD4+ lymphocytic intratumoral infiltration as negative prognostic factors of OS. In contrary PTL, Crohn-like PTL, LN-FH, and severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration were proved as positive prognostic factors of the overall survival.

Classification and Regression Tree

Disease Free Interval

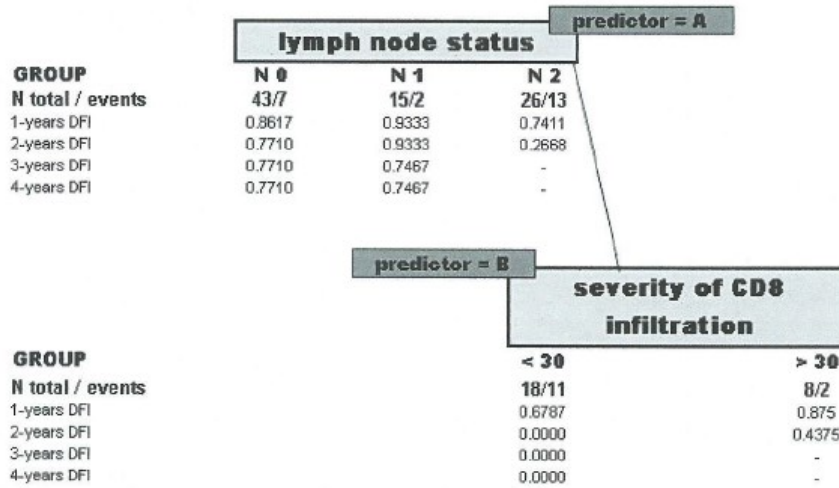


Fig. 14. Multivariate Cox Regression Hazard Model proved the combination of the severity of lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8 positivity as the best prognostic factors for the prediction of risk of an early recurrence ($p < 0.05$). This situation is demonstrated in the Classification and Regression Tree (CART).

The combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and LN-FH were proved as the best prognostic factors for the prediction of risk of a shorter overall survival by the Multivariate Cox Regression Hazard Model.

We also demonstrated PI, lymph node metastatic infiltration and the N2 status of lymph nodes as negative prognostic factors of an earlier recurrence, and the severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration as a positive prognostic factor enlarging DFI. The combination of the severity of the lymph node infiltration by a metastatic process and the severity of CD8+ lymphocytic intratumoral infiltration were proved as the best prognostic factors for the prediction of the risk of an early recurrence by the Multivariate Cox Regression Hazard Model.

Our results support the hypothesis that the adaptive immunological response in tumor tissue and its reaction in regional lymph nodes can influence the behavior of CRC and so affect the prognosis of patients (Atreya & Neurath, 2008; Galon et al., 2006). CD4 and CD8 positivity of ITL was demonstrated as a key histopathological sign of tumor-specific immune response that could reflect the contemporary clinical situation and a tendency to relapse (CD4+) or the larger overall survival (CD8+) (Chiba et al. 2004; Koch et al., 2006, Pages et al., 2010).

We assessed several types of tumor infiltrating lymphocytes and clearly identified their relationships to relapse and the overall survival as positive or negative prognostic factors in contrary to previous publications that evaluated only the infiltration of the tumor but not the quality and type of infiltration (Ogino et al., 2009).

Tumor infiltration by lymphocytes seems to be a promising prognostic factor reflecting the risk of patients to early recurrence or poor overall survival. Future work has to be focused on the molecular-biological background of tumor infiltration by lymphocytes to understand their pathophysiological functions (Pages et al., 2005, Zbar, 2004).

5. Conclusion

Tumor infiltrating lymphocytes seem to be promising prognostic factors that could find their use in colorectal surgery and consecutive oncological treatment as an indicator of the type or combinations of therapies reflecting the risk of patients to early recurrence or poor overall survival. The TIL status corresponds to immune control of cancer progression.

6. Acknowledgment

This article was supported by research project MSM 0021620819 (Replacement of and support to some vital organs) and grant IGA MZ CR 10230 and IGA MZ CR 12025 and specific students research grant of Charles University SVV-2011- 262 806.

7. References

- Atreya, I., & Neurath, M. F. (2008). Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol.8, No.4, (April 2008), pp. 561-572, ISSN 1473-7140
- Bird, N. C., Mangnall, D., & Majeed, A. W. (2006). Biology of colorectal liver metastases: a review. *Journal of Surgical Oncology*, Vol.94, No.1, (July 2006), pp. 68-80, ISSN 0022-4790
- Chiba, T., Ohtani, H., Mizoi, T., Naito, Y., Sato, E., Nagura, H., Ohuchi, A., Ohuchi, K., Shiiba, K., Kurokawa, Y. & Satomi, S. (2004). Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *British Journal of Cancer*, Vol.91, No.9, (November 2004), pp. 1711-1717, ISSN 0007-0920
- Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J. M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T., Micheli, A., Sant, M., Weir, H. K., Elwood, J. M., Tsukuma, H., Koifman, S., Silva, E., Francisci, S., Santaquilani, M., Verdecchia, A., Storm, H. H., Young, J. L. & CONCORD Working Group. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*, Vol.9, No.8, (August 2008), pp. 730-756, ISSN 1470-2045
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer – cell subsets. *Trends in Immunology*, Vol.22, No.11, (November 2001), pp. 633-640, ISSN 1471-4906
- Cooper, M. A., Colonna, M., & Yokoyama, W. M. (2009). Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *Embo reports*, Vol.10, No.10, (October 2009), pp. 1103-1110, ISSN 1469-221X

- Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., & Palmquist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical Cancer research*, Vol.1, No.13, (March 2007), pp. 1472-1479, ISSN 1078-0432.
- Gajewski, T. F., Meng, Y., Harlin, H. (2006). Immune suppression in the tumor microenvironment. *Journal of Immunotherapy*, Vol.29, No.3, (May-June 2006), pp. 233-240, ISSN 1524-9557
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H. & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, Vol.313, No.5795, (September 2006), pp. 1960-1964, ISSN 0036-8075
- Jochems C, Schlom J. (2011). Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood)*. Vol. 236, No.5 (May 2011), pp. 567-79, ISSN 1535-3702
- Kobayashi, H., Mochizuki, H., Sugihara, K., Sugihara, K., Morita, T., Kotake, K., Teramoto, T., Kameoka, S., Saito, Y., Takahashi, K., Hase, K., Oya, M., Maeda, K., Hirai, T., Kameyama, M., Shirouzu, K. & Muto T. (2007). Characteristics of recurrence and surveillance tools after curative resection for colorectal cancer: a multicenter study. *Surgery*, Vol.141, No.1, (January 2007), pp. 67-75, ISSN 0039-6060
- Koch, M., & Beckhove, P. (2006). Op den Winkel J et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Annals of Surgery*, Vol.244, No.6, (December 2006), pp. 986-992, ISSN 0003-4932
- Ljunggren, H.G., & Malmberg, K.J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews. Immunology*, Vol.7, No.5, (May 2007), pp. 329-339, ISSN 1474-1733
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., & Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, Vol.26, No.4, (April 2007), pp. 503-517, ISSN 1074-7613
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari M. C., & Moretta, A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interaction. *Immunological Reviews*, Vol.214, No.1, (December 2006), pp. 219-228, ISSN 0105-2896
- Ogino, S., Nosho, K., Iraha, N., Meyerhardt, J. A., & Baba, Y. (2009). Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylation phenotype. *Clinical Cancer Research*, Vol. 15, No. 20, (October 2009), pp. 6412-6420, ISSN 1078-0432
- Ohtani, H. (2007). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer, *Cancer immunity*, Vol. 7, (February 2007), pp. 4, ISSN 1474-9634
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Galon, J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, Vol.353, No.25, (December 2005), pp. 2654-2666, ISSN 0028-4793

- Pagès, F., Galon, J., Die-Nosjeanu, M. C., Tartour, E., & Sautes-Fridman, C. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, Vol.29, No.8, (February 2010), pp. 1093-1102, ISSN 0950-9232
- Pollard, J. W. (2004). Tumor-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, Vol.4, No.1, (January 2004), pp. 71-78, ISSN 1474-175X
- Sandel, M. H., Dadabayev, A. R., Menon, A. G., Morreau, H., Melief, C. J., Offringa, R., van der Burg, S. H., Janssen-van Rhijn, C. M., Ensink, N. G., Tollenaar, R. A., van de Velde, C. J., & Kuppen, P. J. (2005). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clinical Cancer Research*, Vol.11, No.7, (April 2005), pp. 2576-2582, ISSN 1078-0432
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*, Vol.21, pp. 685-711, ISSN 0732-0582
- Stojanovic, A., & Cerwenka, A. (2011). Natural Killer cells and solid tumors. In: *Journal of Innate Immunity*, 10.6.2011, Available from: <<http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?doi=325465>>.
- Talmadge, J. E., Donkor, M., & Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer and Metastasis Reviews*. Vol.26, No.3-4, (December 2007), pp. 373-400, ISSN 0167-7659
- Van den Eynde, M., & Hendlish, A. (2009) Treatment of colorectal liver metastases: a review. *Reviews on Recent Clinical Trials*, Vol.4, No.1, (January 2009), pp. 56-62, ISSN 1574-8871
- Zbar, A. P. (2004) The immunology of colorectal cancer. *Surgical Oncology*, Vol.13, No.2-3, (August-November 2004), pp. 45-53, ISSN 0960-7404

LIŠKA, V., O. VYČÍTAL, O. DAUM, P. NOVÁK, V. TŘEŠKA, J. BRŮHA, P. PITULE
a L. HOLUBEC. Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+
lymphocytes as independent prognostic factor after radical surgical treatment. *Anticancer
Research*, 2012, **32**(5), 2129-2132. ISSN 0250-7005. IF 1,414.

Infiltration of Colorectal Carcinoma by S100+ Dendritic Cells and CD57+ Lymphocytes as Independent Prognostic Factors after Radical Surgical Treatment

VACLAV LISKA¹, ONDREJ VYCITAL¹, ONDREJ DAUM², PETR NOVAK¹,
VLADISLAV TRESKA¹, JAN BRUHA¹, PAVEL PITULE¹ and LUBOS HOLUBEC³

¹Department of Surgery, ²Sídl Department of Pathology and ³Department of Oncology,
Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Czech Republic

Abstract. Background: S100⁺ dendritic cells and CD57⁺ lymphocytes are factors reflecting the immune system's ability to suppress the progress of tumor growth. CD57⁺ cells include natural killer cells and late stages of T-effector lymphocytes. We evaluated the relationship between the known clinical and histological factors and tumor markers as well as the presence of S100⁺ and CD57⁺ cells in the tissue of colorectal carcinoma with the aim of detecting patients at high risk of short overall survival (OS) or short disease-free interval (DFI) after radical surgical treatment and we further analyzed whether S100⁺ and CD57⁺ positivity could bring on new information regarding the treatment regimen. Materials and Methods: Data of 150 patients (97 males and 53 females) that underwent an elective radical surgical procedure for colorectal cancer were studied. The influence on DFI and on OS of the following parameters was evaluated: grading, staging and positivity for S100 and CD57 by immunohistochemical staining. We also analyzed the relation of preoperative serum levels of the tumor markers Carcinoembryonic Antigen (CEA), Cancer Antigen 19-9 (CA19-9), Cancer Antigen 72-4 (CA72-4), Thymidine kinase (TK), Tissue-Specific Polypeptide Antigen (TPS) and Tissue Polypeptide Antigen (TPA) in relation to S100 and CD57 positivity/negativity for the same patients. Results: OS at 1, 3 and 5 years was 92.2%, 76.5% and 70.2%; the DFI at 1, 3 and 5 years was 85.3%, 64.3% and 49.4%. CD57 positivity in the tumor mass was proven as a positive prognostic factor for OS. Risk of short OS was 2.5-fold higher in patients with low tumor infiltration by CD57⁺ lymphocytes. The combination of N2 stage for lymph nodes and the absence of CD57⁺ cells was

proven to be the strongest negative prognostic factor for OS. No significant influence of CD57 positivity on DFI appeared. There was no significant influence of S100 positivity on OS or DFI; nor was there any statistical dependence of CD57 and S100 positivity or negativity on preoperative serum levels of CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS or TPA. Both studied factors were shown to be statistically independent factors. Conclusion: The present study showed infiltration of colorectal cancer tissue by CD57⁺ cells as being an important independent positive prognostic factor for OS.

S100⁺ dendritic cells (DC) and CD57⁺ lymphocytes are factors reflecting the immune system's ability to suppress the progress of tumor growth. Atreya and Neurath demonstrated their role in suppression of the progress of colorectal carcinoma (1). CD57 is a glycoprotein with cell adhesion function also called human natural killer-1 or LEU7 (2). CD57⁺ cells include natural killer (NK) and late stages of T-effector lymphocytes. NK cells as a part of the cellular innate immunity are able to destroy malignant cells (2). NK cells mediate lysis of malignant cells but the mechanism of detection of cancer cells is different from that of the CD8⁺ T-lymphocytes (3); NK cells do not recognize specific tumor-associated antigens of cancer cells as CD8⁺ T-lymphocytes do. NK cells lyse cancer cells that are opsonized by surface antibodies or after stimulation by other signals such as cytokines, produced by antigen-presenting cells (4). A lower preoperative number of NK cells was associated with increased postoperative recurrence of colorectal cancer (5). The S100 antigen protein is present in many types of cells: cells of neural crest, chondrocytes, adipocytes, myoepithelial cells, macrophages, Langerhans cells and dendritic cells. In particular dendritic cells (DC) (antigen-presenting cells) play a key role in activating naive T-lymphocytes and NK cells. DC gather antigens in their surrounding tissues, process them and migrate to the secondary lymphoid organs to present antigens on major histocompatibility complexes class I or class II to CD8⁺ cytotoxic lymphocytes or CD4⁺ helper T-lymphocytes (2, 6). In the majority of the available studies, increased

Correspondence to: Vaclav Liska, MD, Ph.D., Department of Surgery, Medical School and Teaching Hospital Pilsen, Charles University in Prague, Alej Svobody 80, 304 00 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 377104271, e-mail: Vena.Liska@seznam.cz, LiskaV@fnplzen.cz

Key Words: S100⁺ dendritic cells, CD57⁺ lymphocytes, colorectal cancer, prognosis.

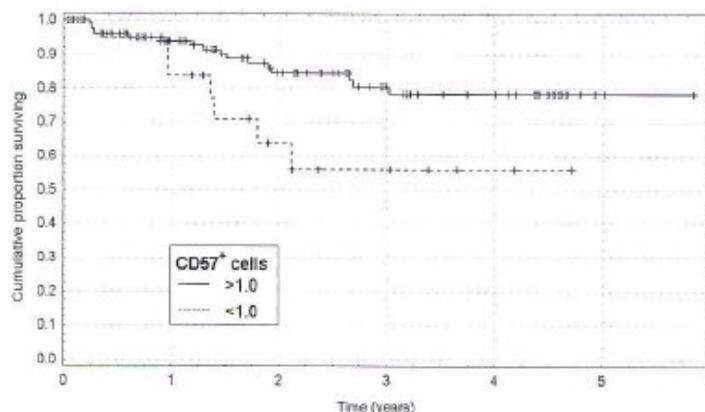


Figure 1. CD57 positivity as a statistically significant prognostic factor for OS (cut-off 1 cell, p-value=0.0350).

numbers of immune cells infiltrating the tumors correlate with an improved prognosis for cancer patients (7), but the role of certain lymphocytes remains unclear (8). Here we evaluated the relationship between the known clinical, histological factors and tumor markers that are used in standard clinical follow-up of patients and the presence of S100+ and CD57+ cells in the tissue of colorectal carcinoma (CRC) with the aim of detecting patients with a high risk of short overall survival (OS) or short disease-free interval (DFI), after radical surgical treatment and to analyze whether S100+ and CD57+ positivity could bring new information on the treatment regimen, independently of standard clinical examinations.

Materials and Methods

Data from 150 patients (97 males and 53 females) in a patient cohort that underwent an elective radical surgical procedure at the Department of Surgery of the Teaching Hospital and Medical School in Pilsen between 2004-2007. The influence on DFI and on OS of following parameters was evaluated: grading, staging and positivity of S100 and CD57 by immunohistochemical staining.

Histological and immunohistochemical analysis. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and was embedded in paraffin. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin-eosin. Three different sections of each tumor were examined.

For the immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: CD57 (clone NK1, ready-to-use; Ventana, Rocklin, CA, USA), and S100 (polyclonal, 1:1000; Dako, Glostrup, Denmark). Microwave pretreatment was used in both cases. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA, USA). The appropriate positive and negative control slides were employed. The number of DCs and NK cells was evaluated in five high power microscopical fields and was expressed as the number of immunopositive cells per high power microscopical field.

Oncomarkers. All the blood samples for assessment of tumor markers were obtained under standard conditions from the cubital vein during

Classification and regression tree

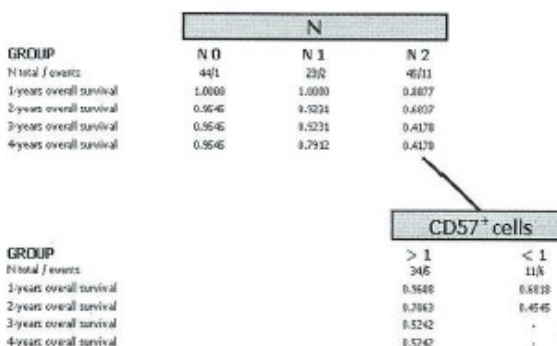


Figure 2. Classification and regression tree diagram presenting the strongest negative prognostic factor combination for OS.

the morning hours. The serum for the assessment of routine tumor markers was acquired through centrifugation and was stored at -20°C until laboratory analysis. Tumor markers were assessed at the Department of Nuclear Medicine, Faculty Hospital Pilsen with commercial laboratory kits, in accordance with the manufacturers' recommendations. The following tumor markers were assessed: CEA (ng/ml, Immunotech, Czech Republic), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9, IU/l, Shering-CIS BioInternational, France), cytokeratins: tissue-specific polypeptide antigen (TPS, kIU/l, IDL, Sweden), tissue polypeptide antigen (TPA, kIU/l, DiaSorin, Italy). Thymidine kinase (TK, IU/L) was measured by radioenzyme analysis (REA) using the Immunotech (Prague, Czech Republic) assay kits.

Statistical analysis. Statistical analysis was processed by the statistical software Statistica 9.0 (StatSoft, CA, USA). The relationships between the variables were described by the Spearman rank correlation coefficients. The analyses of OS and DFI were performed by Kaplan-Meier survival functions. The influence of given covariates (clinical and histopathological factors or tumor markers) was tested by the log-rank test and the Wilcoxon test. The Cox regression the hazard model, hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (CI) for HR were computed for the evaluation of given clinical and histopathological factors and tumor markers to OS or DFI. Multivariate analysis was

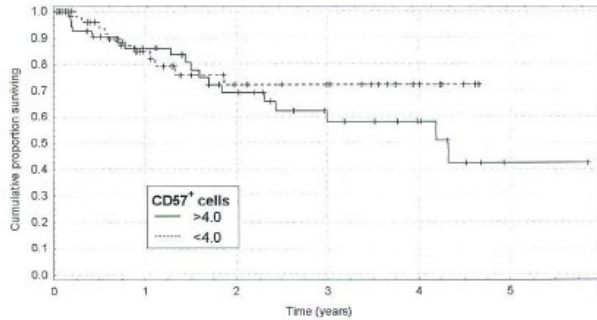


Figure 3. CD57 positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for DFI (cut-off 4 cells, p-value=0.3415).

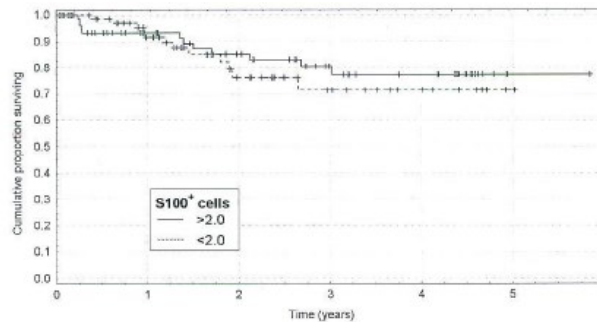


Figure 4. S100 positivity was not proven as being a statistically significant prognostic factor for OS (cut-off 2 cells, p-value=0.5877).

performed by the use of classification and regression trees (CART). The Cox regression hazard model (stepwise regression) was applied in order to find the predictors in CART.

Results

There were 93 males (mean age=65.27 years, median=65.94 years) and 57 females (mean=68.07 years median=67.72 years) in studied patients cohort. No statistically significant differences were proven regarding the age between males and females. OS at 1, 3 and 5 years was 92.2%, 76.5% and 70.2%; the resulting DFI at 1, 3 and 5 years was 85.3%, 64.3% and 49.4%. CD57 positivity of cells in the mass of tumor was a statistically significant positive prognostic factor (cut-off 1 cell, p-value=0.0350, Figure 1) of OS. Risk of short OS was 2.5-fold higher in patients with low tumor infiltration by CD57⁺ lymphocytes. CART showed that the combination of N2 stage of lymph node disease and the absence of CD57⁺ cells was the strongest negative prognostic factor of OS (Figure 2). No

statistically significant influence of CD57 positivity on DFI appeared (Figure 3).

There was no statistically significant influence of S100 positivity on OS nor on DFI (Figures 4 and 5). There was no statistical dependency or correlation of CD57 and S100 positivity or negativity on preoperative serum levels of CEA, CA19-9, CA72-4, TK, TPS or TPA. Both studied factors were found to be statistically independent factors.

Discussion

The role of the immunological response in controlling the growth and relapse of CRC remains controversial and contemporary studies have not answered all the questions about the prognosis of patients after radical surgical treatment of CRC (9, 10, 11, 14). We analyzed a large cohort of patients with CRC aiming at detecting the relation between these types of immune cells and the prognosis of patients after radical CRC surgery. This aim was stimulated by some dilemmas in the decision for

LIŠKA, V., M. EMINGR, M. SKÁLA, R. PÁLEK, O. TROUP, P. NOVÁK, O. VYČÍTAL,
T. SKALICKÝ a V. TŘEŠKA. Jaterní metastázy karcinomů kolon a rekta z pohledu
rozdílů v klinických parametrech. *Rozhledy v chirurgii*. 2016, **95**(2), 69-77. ISSN 0035-
9351

Původní práce

Jaterní metastázy karcinomů kolon a rektu z pohledu rozdílů v klinických parametrech

V. Liška^{1,2}, M. Emingr¹, M. Skála^{1,2}, R. Pálek¹, O. Troup¹, P. Novák¹,
O. Vyčítal^{1,2}, T. Skalický¹, V. Třeška¹

¹Chirurgická klinika LF Univerzity Karlovy a FN Plzeň,
přednosta: prof. MUDr. V. Třeška, DrSc.

²Biomedicínské centrum LF Univerzity Karlovy v Plzni,
vedoucí pracoviště: doc. MUDr. M. Štengl, Ph.D.

Souhrn

Úvod: Z klinického hlediska je zřejmé, že karcinom rektu a karcinom kolon jsou ve svém průběhu a léčbě odlišné nosologické jednotky. Cílem bylo analyzovat a objasnit rozdíly mezi chováním jaterních metastáz karcinomu kolon a karcinomu rektu. Studie těchto faktorů je důležitá pro stanovení přesné prognózy a indikace jejich co nejefektivnější terapie a léčby karcinomu kolon a karcinomu rektu jako systémového onemocnění.

Metoda: Do našeho souboru bylo zařazeno 223 pacientů s metastatickým postižením jater kolorektálním karcinomem, kteří byli operováni na Chirurgické klinice LF UK a FN Plzeň od 1. 1. 2006 do 31. 1. 2012. Z celkového počtu 223 jedinců bylo 145 (65 %) mužů a 78 (35 %) žen. Jednalo se celkem o 275 výkonů. Resekční výkon byl proveden u 177 pacientů a ošetření pomocí radiofrekvenční ablace (RFA) v celkem 98 případech. Soubor byl rozdělen do kategorií podle lokalizace primárního tumoru na C (kolon) čítající 58 pacientů, S (c. sigmoideum) čítající 61 pacientů a R (rektum) čítající celkem 101 pacientů. Analýza významnosti jednotlivých studovaných parametrů (věk, pohlaví, TNM klasifikace, grading, typ operačního výkonu) byla provedena pomocí ANOVA testu. Celkové přežití (OS), bezpříznakové přežití (DFI) nebo období bez známek onemocnění (NED) bylo hodnoceno za pomoci Kaplan-Meierových křivek, které byly porovnávány pomocí Log-Rank a Wilcoxon testů.

Výsledky: Z hlediska porovnávání primárního origa jaterních metastáz kolorektálního karcinomu bez ohledu na jejich ošetření (resekce i RFA) z naší studie vyplývá, že metastázy karcinomu rektu mají statisticky významně časnější recidivu (kratší NED/DFI). V případě ostatních faktorů byl pro prognózu časně recidivy statisticky významný lokálně pokročilý nález u primárního nádoru kolon a sigmoidea, dále podstoupená R2 resekce jaterních metastáz a pozitivita uzlinových metastáz v případě primárního nádoru kolon a sigmoidea. Dále jsme prokázali, že u nemocných s primárním postižením rektu nemá na DFI po resekcí metastáz jater vliv pozitivita uzlinových metastáz ani lokální pokročilost primárního nádoru. Další studované faktory (časový odstup diagnózy orgánových metastáz od primární operace, grading, pohlaví či věk) nebyly pro prognózu OS i DFI (souborně u kolorektálního karcinomu) prokázány jako statisticky významné.

Závěr: Z naší studie je zřejmé, že u karcinomu rektu a karcinomu kolon lze ve vztahu k jejich jaterním metastázám předpokládat různé chování se specifickými prognostickými faktory. Tyto rozdíly nejsou dosud plně objasněny a vyžadují další zkoumání a rozdělení, a to nejen na základě histopatologických, imunohistochemických a klinických faktorů, ale i molekulárně biologických parametrů.

Klíčová slova: metastázy karcinomu kolon – metastázy karcinomu rektu – prognostické faktory – celkové přežití – jaterní metastázy

Summary

Liver metastases from colon and rectal cancer in terms of differences in their clinical parameters

V. Liska, M. Emingr, M. Skala, R. Palek, O. Troup, P. Novak, O. Vycital, T. Skalicky, V. Treska

Introduction: From the clinical point of view, rectal cancer and colon cancer are clearly different nosological units in their progress and treatment. The aim of this study was to analyse and clarify the differences between the behaviour of liver metastases from colon and rectal cancer. The study of these factors is important for determining an accurate prognosis and indication of the most effective surgical therapy and oncologic treatment of colon and rectal cancer as a systemic disease.

Method: 223 patients with metastatic disease of colorectal carcinoma operated at the Department of Surgery, University Hospital in Pilsen between January 1, 2006 and January 31, 2012 were included in our study. The group of patients comprised 145 men (65%) and 117 women (35%). 275 operations were performed. Resection was done in 177 patients and radiofrequency ablation (RFA) in the total of 98 cases. Our sample was divided into 3 categories according to the location of the primary tumor to C (colon), comprising 58 patients, S (c. sigmoideum) in 61 patients, and R (rectum), comprising 101 patients. Significance analysis of the studied factors (age, gender, staging [TNM classification], grading, presence of mucinous carcinoma, type of operation) was performed using ANOVA test. Overall survival (OS), disease-free interval (DFI) or no evidence of disease (NED) were estimated using Kaplan-Meier curves, which were compared with the log-rank and Wilcoxon tests.

Results: As regards the comparison of primary origin of colorectal metastases in liver regardless of their treatment (resection and RFA), our study indicated that rectal liver metastases showed a significantly earlier recurrence than colon liver metastases (shorter NED/DFI). Among other factors, a locally advanced finding, further R2 resection of liver metastases and positivity of lymph node metastases were statistically significant for the prognosis of an early recurrence of the primary colon and sigmoid tumor. Furthermore, we proved that in patients with primary rectal carcinoma, DFI (after the resection of liver metastases) was not influenced by the positivity of lymph node metastases of primary tumor or locally advanced primary tumor. The other factors studied (time from diagnosis of organ metastases to primary operation, grading, sex or age) were not shown to be statistically significant for the prognosis of OS and DFI (colorectal cancer in total).

Conclusion: As proven by our study, rectal cancer and colon cancer are two different nosological units with specific prognostic factors with respect to their liver metastases. These differences have not been fully understood yet and require further exploration and classification based not only on histopathological, immunohistochemical and clinical factors, but also on molecular biological parameters.

Key words: colon carcinoma metastases – rectal carcinoma metastases – prognostic factors – overall survival – liver metastases

Rozhl Chir 2016;95:69–77

ÚVOD

Česká republika patří na první místo mezi rozvinutými státy v incidenci kolorektálního karcinomu, u něhož výskyt vzdálených metastáz, a to jak synchronních, tak i metachronních dosahuje až 60 %. Je třeba proto předpokládat, že výskyt jaterních metastáz kolorektálního karcinomu bude vysoký i přes radikální léčbu primárního karcinomu [1].

Z hlediska klinického průběhu, možností léčebné strategie a prognózy lze vyzorovat rozdíly mezi karcinomem kolon a rekta. To je dáno morfologií a funkcí jednotlivých částí tračníku a rekta, které odpovídají rozdílnému cévnímu zásobení. Z tohoto důvodu lze soudit, že i metastázy kolorektálního karcinomu budou mít vzhledem ke svému origu odlišné chování (agresivita, preference ve směru metastazování, žilní nebo lymfatické šíření, rychlost růstu a způsob projevu).

Naším cílem bylo analyzovat a objasnit rozdíly mezi chováním metastáz karcinomu kolon a karcinomu rekta v jaterním parenchymu. Studie těchto faktorů je důležitá pro stanovení přesné prognózy a indikace jejich co nejefektivnější terapie a léčby karcinomu kolon a karcinomu rekta jako systémového onemocnění. Výsledky z vlastního souboru jsme porovnali s publikovanými výsledky dostupnými v odborné literatuře. V této studii se zabýváme chováním a klinickým projevem jaterních metastáz karcinomu kolon a karcinomu rekta ve vztahu k jejich léčbě a léčebné strategii.

METODA

Do našeho souboru bylo zařazeno 223 pacientů s metastatickým postižením jater kolorektálním karcinomem, kteří byli operováni na Chirurgické klinice LF UK a FN Plzeň od 1. 1. 2006 do 31. 1. 2012. Z celkového počtu 223 jedinců bylo 145 (65 %) mužů a 78 (35,0 %) žen. Průměrný věk pacientů byl 63,95 roku (medián věku 64,6 roku, rozsah: 33,32–80,85 roku). Jednalo se celkem o 275 výkonů. Resekční výkon byl proveden u 177 pacientů a ošetření pomocí radiofrekvenční ablace (RFA) celkem v 98 případech u 56 pacientů. Postižení jater metastatickým procesem bylo synchronní u 79 pacientů a metachronní u 144 pacientů. Průměrný časový odstup od primární operace byl u kolon a sigmoidu 1,46 roku a u rekta 1,18 roku. V případě opakovaných výkonů tyto výkony prodělalo 31 pacientů (2 operace), 6 pacientů (3 operace) a u 3 pacientů byl proveden chirurgický výkon čtyřikrát. V případě prvních výkonů na játrech, ke kterým jsme i nadále vztahovali veškerá sledování a výpočet celkového (OS) a bezpříznakového přežití (DFI) nebo období bez známkem onemocnění (NED), bylo v případě resekce docíleno R0+R1 nálezu ve 130 případech, R2 resekce v 29 případech. U RFA jsme docílili kompletní ablace u 42 pacientů. Non-ablace byla zaznamenána u 16 pacientů. Medián sledování souboru byl 1,8 roku (0,1–7,7 roku). Jednalo se o retrospektivní typ studie.

Soubor byl rozdělen do kategorií podle lokalizace primárního tumoru na C (kolon) čítající 58 pacientů,

S (c. sigmoideum) čítající 61 pacientů a R (rektum) čítající celkem 101 pacientů. U 3 pacientů nebylo možné lokalizovat primární origo tumoru vzhledem k velkému časovému odstupu od primární operace a nedostupnosti dokumentace ze spádového chirurgického pracoviště.

Statistická analýza souboru byla provedena pomocí statistického softwaru SW SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA) a SW Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). U jednotlivých porovnávaných kohort pacientů byly stanoveny standardní statistické deskripční faktory. Analýza významnosti jednotlivých studovaných parametrů (věk, pohlaví, TNM klasifikace, grading, typ operačního výkonu) byla provedena pomocí ANOVA testu. Celkové přežití (OS), bezpříznakové přežití (DFI) nebo období bez známkem onemocnění (no evidence of disease – NED) bylo hodnoceno za pomoci Kaplan-Meierových křivek, které byly porovnávány pomocí Log-Rank a Wilcoxon testů.

VÝSLEDKY

V uvedené studii jsme analyzovali závislost prognózy pacientů s karcinomem kolon nebo rekta na klinických a patologických faktorech tak, aby bylo zřejmé, které faktory jsou unikátní ve svém chování pro jednu z uvedených malignit a kde lze očekávat jiný klinický průběh. Tato analýza by měla být podkladem pro další studium rozdílného průběhu onemocnění a úpravu jejich léčebné strategie.

Ve sledovaném souboru byl medián OS 60 měsíců. 1, 3 a 5leté OS bylo pak 94,45 %, 75,5 %, 56,9 % (viz Graf 1). OS nemocných po resekci bylo 94,08 %, 79,37 %, 55,43 % (1, 3 a 5 let, medián 5 let). OS nemocných po RFA bylo paradoxně 97,83 % po jednom roce. 3leté a vyšší OS nelze definovat z důvodu malého počtu probandů v tomto souboru a vysokého počtu cenzorovaných pacientů. Při porovnávání obou souborů nenalézáme statistickou významnost. Ta je však dána poslední definovanou událostí u RFA po 2,5 roku (viz Graf 2).

OS nemocných po operaci jaterních metastáz s primárním tumorem v oblasti kolon bez sigmoidea (C) bylo 93,7 %, 79,45 %, 35,75 %, v oblasti sigmoidea (S) bylo 94,53 %, 71,37 %, 64,88 % a rekta (R) bylo 95,88 %, 88,74 %, 59,21 % (1, 3 a 5 let). Při porovnávání těchto tří souborů také nenalézáme statisticky významný rozdíl (viz Graf 3).

Sledujeme-li OS nemocných dle typu provedeného výkonu, pak pacienti, kteří podstoupili RFA s dokonalou ablací, měli OS 96,97 % a 66,07 % a pacienti, u kterých byla po RFA prokázána non-ablace, měli OS 96,97 % a 56,82 % (1 a 3 roky). OS pacientů, kteří podstoupili resekci R0+R1 (statisticky nebyl zjištěn rozdíl mezi pacienty s R0 nebo R1 resekci), bylo 94,98 %, 79,29 %, 55,82 % (medián OS 4,81 roku) v porovnání s R2 resekci, kde OS bylo 89,1 %, 75,94 %, 50,63 % (1, 3 a 5 let, medián OS 3,23 roku). Při porovnání zde nenacházíme statistický rozdíl (viz Graf 4).

V případě lokální pokročilosti primárního nádoru bylo OS u nemocných s lokalizovanou malignitou

(T1+T2) 93,33 % a 66,67 % (1 a 3 roky) a lokálně pokročilou malignitou (T3+T4) 93,22 %, 66,63 % a 36,51 % (1, 3 a 5 let). Ani zde nenacházíme statistickou významnost (viz Graf 5).

U nemocných s negativními uzlinovými metastázami (N0) bylo OS bylo 93,32 %, 81,69 % a 66,56 % (medián 5 let) a v případě nemocných s pozitivními uzlinovými metastázami (N1+N2) OS bylo 92,6 %, 60,69 % a 29,94 % (1, 3 a 5 let, medián 3,23 roku). Obě skupiny jsou bez statistického rozdílu (viz Graf 6).

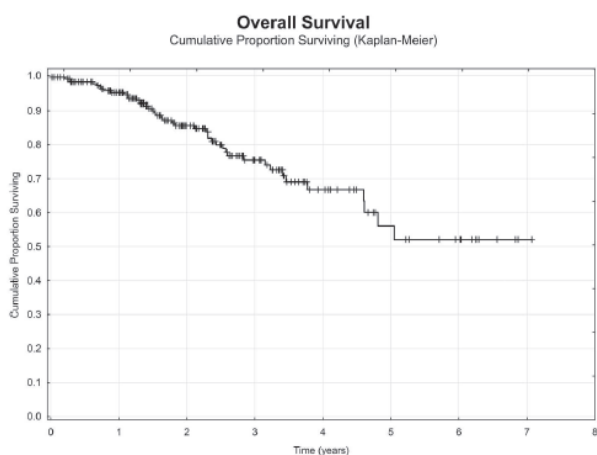
U metachronních metastáz bylo OS 97,3 %, 73,08 % a 54,81 % (medián 4,6 roku) a u synchronních metastáz bylo OS 90,86 %, 63,25 % a 33,99 % (1, 3 a 5 let, medián 3,41 roku). Rovněž nenacházíme statistickou významnost mezi skupinami (viz Graf 7).

Z hlediska předpokládané radikality můžeme DFI sledovat jen u resekci, kde lze předpokládat R0 resekci. V případě RFA se jedná o výkon ponechávající nekrotickou tkáň, kde současnými metodami nemůžeme vyloučit zbytkovou proliferativní aktivitu maligních bu-

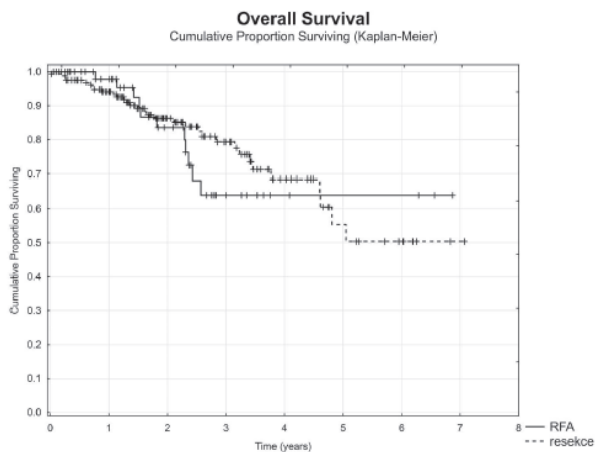
ňek z tohoto důvodu hodnotíme NED. Vyhodnocovali jsme vždy 1leté, 3leté a 5leté periody. Z celkových 223 pacientů bylo vyřazeno 6 pacientů pro ztrátu dat a 14 pacientů, u kterých byla provedena non-ablace. Do NED/DFI analýzy tedy vstoupilo celkem 209 pacientů. Ve sledovaném souboru byl u všech výkonů medián bezpříznakového přežití 0,98 roku. Kombinované NED/DFI bylo pak 49 %, 18 %, 10,9 % (1, 3 a 5 let) (viz Graf 8).

NED nemocných po RFA bylo 33,2 % a 20,1 % (1 a 3 roky, 5leté NED nelze hodnotit, medián 0,73 roku). DFI nemocných po resekci bylo 53,6 %, 16,6 %, 11,0 % (1, 3 a 5 let, medián 1,1 roku). Při porovnání obou souborů nenalézáme statistickou významnost (viz Graf 9).

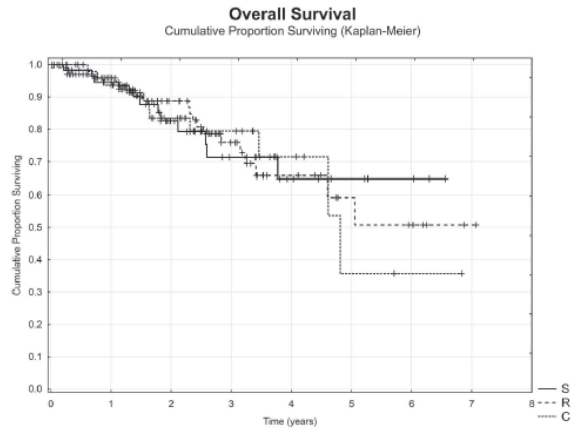
Rozdíly v NED/DFI v závislosti na origu tumoru (C vs. S vs. R), nejsou statisticky významné. Proto porovnáваме primární tumor kolon (C) a c. sigmoideum (S) jako jeden celek proti primárnímu tumoru rekta (R) jako celek druhý z důvodu jejich anatomické, embryonální a histologické odlišnosti. NED/DFI nemocných u první skupiny (C+S) je 53,9 %, 25 %, 16,3 % (medián 1,1 roku)



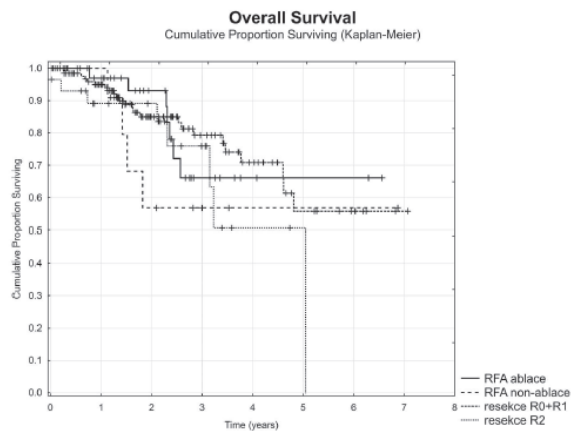
Graf 1: Celkové přežití nemocných
Graph 1: Overall survival of the patients



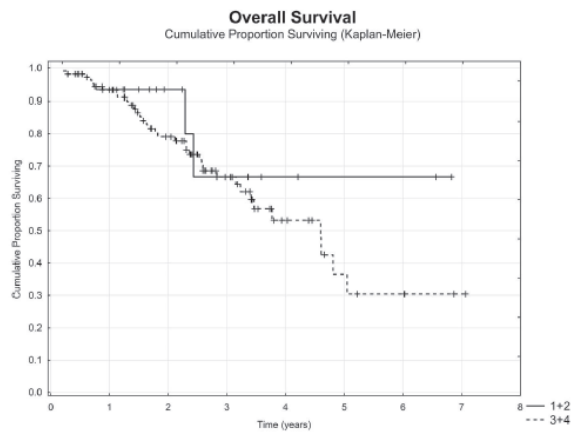
Graf 2: Celkové přežití nemocných v závislosti na typu výkonu (RFA vs. resekce)
Graph 2: Overall survival with respect to type of procedure (RFA vs resection)



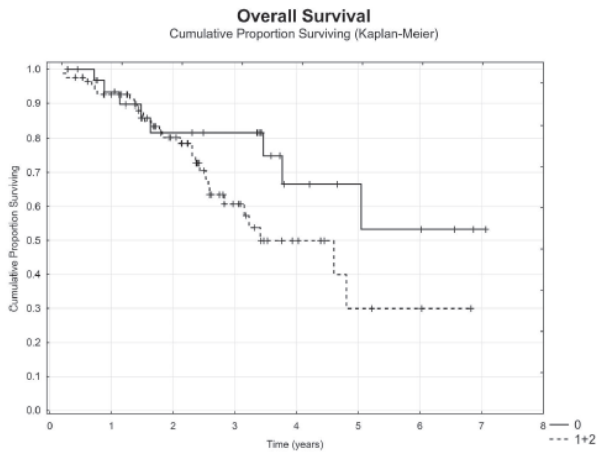
Graf 3: Celkové přežití nemocných v závislosti na origu tumoru (sigmoideum (S) vs. kolon (C) vs. rektum (R))
Graph 3: Overall survival with respect to location of tumor (sigmoideum (S) vs colon (C) vs rectum (R))



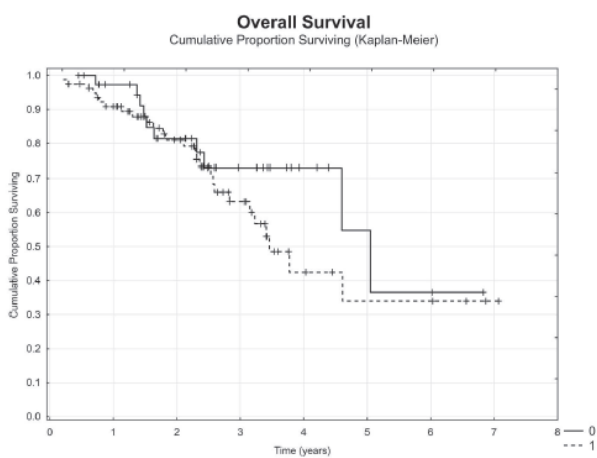
Graf 4: Celkové přežití dle typu výkonu a radikality
Graph 4: Overall survival based on type of procedure and radicality



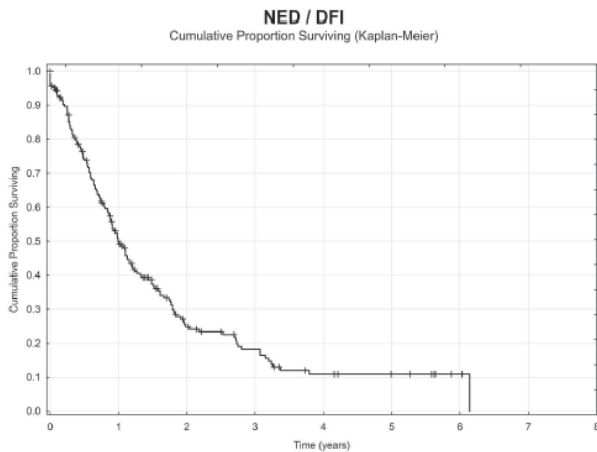
Graf 5: Celkové přežití nemocných dle pokročilosti lokálního nálezu (lokalizovaná malignita (T1+T2) vs. lokálně pokročilá malignita (T3+T4))
Graph 5: Overall survival with respect to local staging (localized (T1+T2) vs locally progressed (T3+T4))



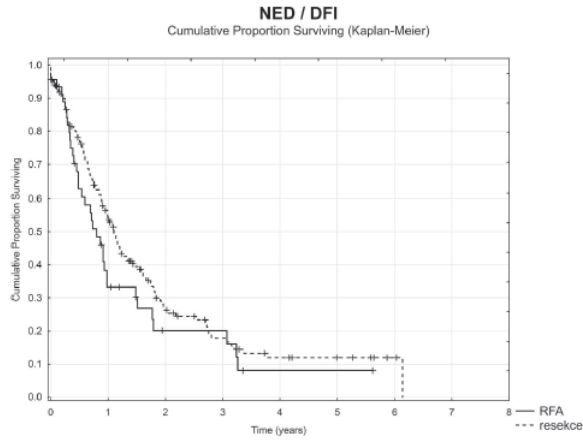
Graf 6: Celkové přežití nemocných dle metastatického postižení uzlin (negativní uzlinové metastázy (N0) vs. pozitivní uzlinové metastázy (N1+N2))
Graph 6: Overall survival with respect to lymph node metastases (negative lymph node metastases (N0) vs positive negative lymph node metastases (N1+N2))



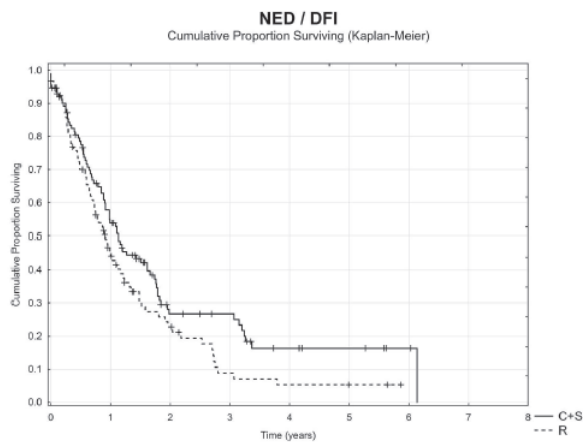
Graf 7: Celkové přežití u pacientů dle výskytu vzdálených metastáz při primární operaci (metachronní (M0) vs. synchronní metastázy (M1))
Graph 7: Overall survival in terms of distant metastases (metachronous (M0) vs synchronous (M1))



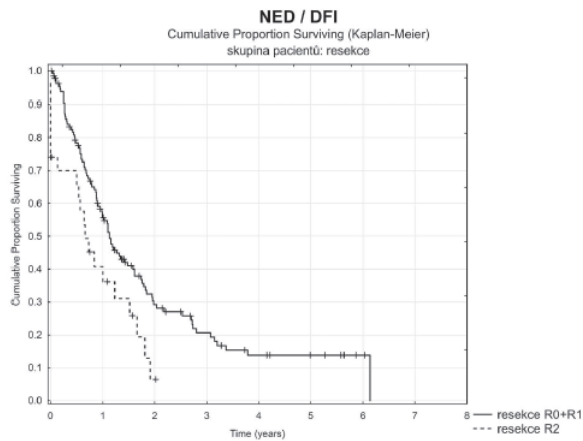
Graf 8: Kumulované NED/DFI přežití nemocných po resekci a RFA
Graph 8: Cumulative NED/DFI survival after resection and RFA



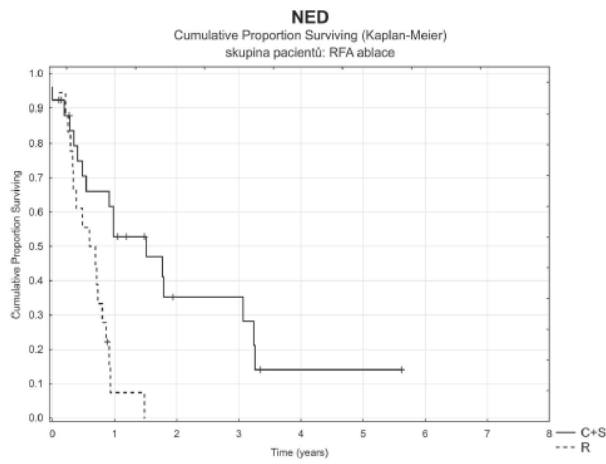
Graf 9: NED/DFI nemocných v závislosti na typu výkonu (RFA vs. resekce)
Graph 9: NED/DFI based on type of procedure (RFA vs resection)



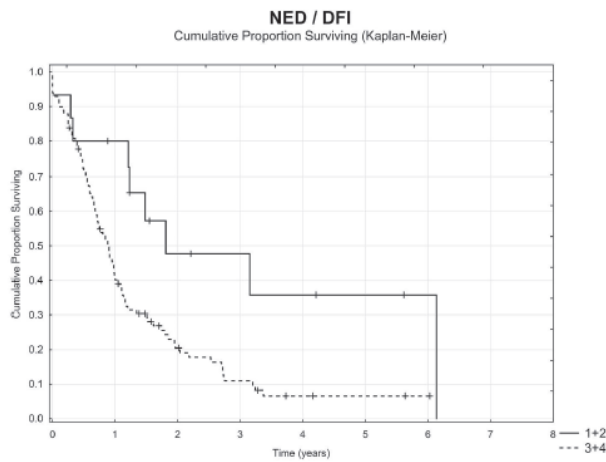
Graf 10: NED/DFI v závislosti na origu tumoru (kolon + sigmoideum (C+S) vs. rektum (R))
Graph 10: NED/DFI based on location of tumor (colon + sigmoideum (C+S) vs rectum (R))



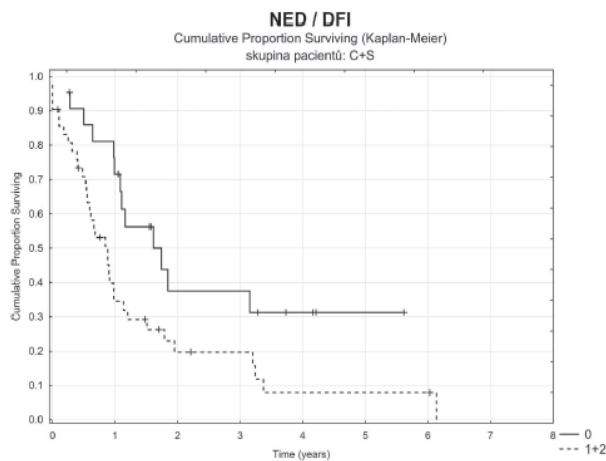
Graf 11: NED/DFI u skupiny resekce R0+R1 vs. skupiny resekce R2
Graph 11: NED/DFI for R0+R1 resection vs R2 resection



Graf 12: Srovnání NED RFA (kolon+ sigmoideum (C+S) vs. rektum (R))
Graph 12: Comparison of NED for RFA (colon+ sigmoideum (C+S) vs rectum (R))



Graf 13: NED/DFI nemocných dle pokročilosti lokálního nálezu (lokalizovaná malignita (T1+T2) vs. lokálně pokročilá malignita (T3+T4))
Graph 13: NED/DFI based on local staging (localized (T1+T2) vs locally progressed (T3+T4))



Graf 14: NED/DFI nemocných (C+S) dle metastatického postižení uzlin (negativní uzlinové metastázy (N0) vs. pozitivní uzlinové metastázy (N1+N2))
Graph 14: NED/DFI (C+S) based on lymph node metastases (negative lymph node metastases (N0) vs positive lymph node metastases (N1+N2))

a u druhé skupiny (R) NED/DFI nemocných je 44,2 %, 7 %, 5,3 % (1, 3 a 5 let, medián 0,89 roku). Zde nacházíme statisticky významný rozdíl ve smyslu kratšího NED/DFI u nemocných s primárním tumorem rekta (viz Graf 10).

U provedených výkonů porovnááme mezi sebou skupinu pacientů, kteří podstoupili resekční výkon v radikalitě R0 a R1, kde NED/DFI nemocných bylo 55,68 % a 13,83 % (1 a 3 roky, medián 1,1 roku), a skupinu pacientů, kteří podstoupili resekci R2, kde u jednoletého NED nemocných bylo 36,2 % (medián 0,66 roku). Nacházíme statistickou významnost, kde R2 resekce má statisticky kratší NED/DFI (viz Graf 11).

Porovnááme-li primární tumor kolon (C) a c. sigmoideum (S) jako jeden celek proti primárnímu tumoru rekta (R) v případě provedení RFA, NED nemocných u první skupiny (C+S) je 52,8 % a 28,2 % (1 a 3 roky, medián 1,51 roku) a u druhé skupiny (R) je 7 % (u 1 roku, medián 0,59 roku). Nacházíme zde statistickou významnost, kde pacienti s tumorem rekta, kterým byla provedena RFA, mají kratší NED (viz Graf 12).

V případě lokální pokročilosti nádoru bylo NED/DFI u nemocných s lokalizovanou malignitou (T1+T2) 80 % (1 rok) a s lokálně pokročilou malignitou (T3+T4) 40,1 % a 9 % (1 a 3 roky). Statistickou významnost se nám podařilo prokázat v případě pacientů s pokročilou lokální malignitou, u nichž je kratší NED/DFI (viz Graf 13). V další analýze se výsledky rozcházejí v závislosti na origu tumoru. U pacientů, kteří byli zařazeni do skupiny kolon+sigmoideum, je tento rozdíl významný, v případě pacientů s postižením rekta nemá lokální pokročilost na NED/DFI vliv.

U skupiny nemocných s postižením kolon a sigmoidea a s negativními uzlinovými metastázami (N0) bylo NED/DFI 71,5 % a 31,2 %, naproti tomu s pozitivními uzlinovými metastázami (N1+N2) NED/DFI bylo 34,5 % a 15,7 %, (1 a 3 roky). Prokazujeme statisticky významný rozdíl u nemocných s postiženými uzlinami, u nichž je kratší NED/DFI (viz Graf 14). Nicméně u skupiny nemocných s postižením rekta nemá výskyt uzlinových metastáz na DFI vliv.

Když jsme porovnali NED/DFI u skupiny pacientů se synchronními metastázami a u skupiny pacientů s metachronními metastázami, nenašli jsme mezi těmito skupinami statistickou významnost.

DISKUZE

Výsledky naší studie jsme porovnali s dostupnou literaturou s cílem zhodnotit jejich význam jako prognostických faktorů definujících rozdíly v klinickém chování jaterních metastáz karcinomu kolon nebo rekta. Vzhledem k tomu, že není studováno mnoho faktorů, které by se vázaly vysloveně na porovnání jaterních metastáz karcinomu rekta nebo kolon, uvádíme v následující diskuzi i faktory, které se nevážou k jaterní rekurenci, ale definují obě malignity i z pohledu porovnání primárního karcinomu. I když v případě OS u nemocných nenačázíme v závislosti na origu tumoru v naší studii signifikantní rozdíl, dřívější studie dokazují, že karcinom rekta má nižší, pětileté přežití [2]. V případě dělení dle

klinického stadia platí, že ve stadiích UICC I-III je kratší OS u nemocných s karcinomem rekta než kolon [3,4,5] a ve stadiu UICC IV naopak delší OS u nemocných s karcinomem rekta [4].

Z naší studie vyplynula kratší DFI u nemocných s karcinomem rekta. Tento nálezn není obecně přijímán. Li popisuje stejné DFI u obou karcinomů při nižších stadiích bez uzlinových metastáz v případě primární malignity dle stagingu UICC (I–II) a naopak kratší DFI u karcinomu rekta stadia UICC III [6]. Zde není názor jednotný a uzlinové metastázy u karcinomu rekta nejsou negativním prognostickým faktorem v porovnání s karcinomem kolon v případě dvou studií [7,8]. Statistickou analýzu u našeho souboru nebyl prokázán vztah lokálně pokročilého nálezu a postižení lymfatických uzlin u primárního karcinomu rekta ve vztahu k NED/DFI po operaci metastáz jater.

Z důvodu relativně malého souboru našich nemocných se dále zabýváme i faktory, které jsme nebyli schopni statisticky validovat nebo v naší studii nebyla prokázána statistická signifikance.

Extrahepatická rekurence byla v případě studie Meimakarise, který se zabýval výlučně metastatickým procesem v plicích, prokázána jako vyšší u nemocných s karcinomem rekta [9]. Z hlediska naší studie nás spíše zajímala obecně veškerá extrahepatická rekurence, kde Lee prokazuje vyšší četnost v případě pacientů s karcinomem rekta [10] v porovnání s Kleespiesem, který tuto skutečnost popírá [7]. Vlastní recidiva v jaterním parenchymu se ukázala jako statisticky nevýznamná při srovnání obou skupin v případě studie Leeho [10].

Nemocní s primárním karcinomem rekta trpěli vyšší pooperační morbiditou [7,11], ale naopak v případě pooperační mortality se autoři rozcházejí – Massoomi a Nedrebø uvádějí, že byla vyšší u nemocných s karcinomem kolon [12,2], Kleespies udává mortalitu stejnou u obou onemocnění [7]. Samostatně pak stojí studie Verhoefova, kde vyšší mortalita je u karcinomů rekta jen v případě předchozí neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapie [11].

Z hlediska budoucnosti budeme více využívat i faktory ne obecně klinicko-patologické, ale spíše molekulárně-biologické. Zde můžeme poznamenat, že proteiny asociované s nádory jako B catenin a p53 jsou exprimovány více u nemocných s karcinomem rekta [13]. K-RAS můžeme v případě karcinomu rekta považovat za méně prognosticky významný než v případě karcinomu kolon [14]. Tentýž autor dokládá, že v případě karcinomu rekta je nacházeno více významných mutací s prokázaným vztahem ke kolorektálnímu karcinomu [14]. Z nádorových markerů, které jsou zlatým standardem sledování recidivy kolorektálního karcinomu, je prokazatelně vyšší exprese CEA u karcinomu rekta než u karcinomu kolon [6].

V případě mucinózního karcinomu víme, že pacienti mají horší OS, ale nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi karcinomem kolon a rekta [15].

Při srovnávání karcinomu kolon a rekta zůstává problémem, na který poukázal už Roncucci, že každý z těchto karcinomů má naprosto specifické prognostické faktory, například věk u době diagnózy, který je

signifikantně významný pro prognózu karcinomu kolon, selhává u karcinomu rekta. Opačně velmi silným prognostickým faktorem je charakter růstu tumoru. Toto je vzhledem k anatomickým poměrům u tračniku nemožné aplikovat na karcinom kolon [16].

Výskyt uzlinových metastáz mezi oběma karcinomy nemá dle provedených studií signifikantní rozdíly [7,8]. Mapování sentinelových uzlin v případě studie Sahy dokazuje, že karcinom kolon i karcinom rekta mají stejný počet výskytu přeskokových (skip) metastáz [8].

Wei se zabývá ve své epidemiologické studii jednotlivými prediktivními faktory zvláště pro karcinom kolon a karcinom rekta. Věk, pohlaví, rodinný výskyt, BMI, pohybová aktivita, příjem folátu, zvýšená konzumace hovězího, vepřového a jehněčího masa nebo alkoholu jsou signifikantně spokojovány s rizikem postižení kolon. Naproti tomu pro postižení rekta jsou rizikové faktory jen pohlaví a věk. Signifikantně rozdílné relativní riziko mezi oběma karcinomy je u rodinného výskytu a pohybové aktivity [17].

ZÁVĚR

Z naší studie vyplývá z hlediska porovnávání primárního origa metastáz kolorektálního karcinomu v játrech bez ohledu na jejich ošetření (resekce i RFA), že metastázy karcinomu rekta mají statisticky významně časnější recidivu (kratší NED/DFI). Při samostatné sta-

tistické analýze jaterních metastáz ošetřených pomocí resekce není však origo primárního postižení statisticky signifikantní pro DFI. Na druhou stranu jsme v naší studii prokázali významně kratší NED u pacientů s jaterními metastázami karcinomu rekta, které byly ošetřeny pomocí RFA. V případě ostatních faktorů byl pro prognózu časně recidivy statisticky významný lokálně pokročilý nález u primárního nádoru kolon a sigmoidea, dále podstoupená R2 resekce jaterních metastáz a pozitivita uzlinových metastáz v případě primárního nádoru kolon a sigmoidea. Dále jsme prokázali, že u nemocných s primárním postižením rekta nemá na DFI po resekci metastáz jater vliv pozitivita uzlinových metastáz ani lokální pokročilost primárního nádoru. Další faktory pro prognózu OS i DFI (souhrnně u kolorektálního karcinomu) jako časový odstup orgánových metastáz, grading, pohlaví či věk se neukázaly jako statisticky významné.

Poděkování

Tato práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 13326 a 14329, projektem ED2.1.00/03.0076 (European Regional Development Fund) a Programem rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36).

Konflikt zájmů

Autoři článku prohlašují, že nejsou v souvislosti se vznikem tohoto článku ve střetu zájmů a že tento článek nebyl publikován v žádném jiném časopise.

LITERATURA

- Dusek L, Muzik J, Maluskova D, et al. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol* 2014;27:406–23.
- Nedrebø BS, Søreide K, Eriksen MT, et al. Excess mortality after curative surgery for colorectal cancer changes over time and differs for patients with colon versus rectal cancer. *Acta Oncol* 2013;52:933–40.
- Gatta G, Faivre J, Capocaccia R, et al. Survival of colorectal cancer patients in Europe during the period 1978–1989. *Eur J Cancer* 1998;34:2176–83.
- Rutter CM, Johnson EA, Feuer EJ, et al. Secular trends in colon and rectal cancer relative survival. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1806–13.
- Xu FY, Zhai MJ, Dong JK, et al. Clinical pathological factors function differently in colonic and rectal cancer prognosis. *Journal of Zhejiang University* 2006;3:303–10.
- Li M, Li JY, Zhao AL, et al. Colorectal cancer or colon and rectal cancer? Clinicopathological comparison between colonic and rectal carcinomas. *Oncology* 2007;73:52–7.
- Kleespies A, Füesl KE, Seeliger H, et al. Determinants of morbidity and survival after elective non-curative resection of stage IV colon and rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:1097–109.
- Saha S, Monson KM, Bilchik A, et al. Comparative analysis of nodal upstaging between colon and rectal cancers by sentinel lymph node mapping: a prospective trial. *Dis Colon Rectum* 2004;47:1767–72.
- Meimarakis G, Spelsberg F, Angele M, et al. Resection of pulmonary metastases from colon and rectal cancer: factors to predict survival differ regarding to the origin of the primary tumor. *Ann Surg Oncol* 2014;21:2563–72.
- Lee H, Choi DW, Cho YB, et al. Recurrence pattern depends on the location of colon cancer in the patients with synchronous colorectal liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2014;21:1641–6.
- Verhoef C, van der Pool AE, Nuyttens JJ, et al. The "liver-first approach" for patients with locally advanced rectal cancer and synchronous liver metastases. *Dis Colon Rectum* 2009;52:23–30.
- Masoomi H, Kang CY, Chen A, et al. Predictive factors of in-hospital mortality in colon and rectal surgery. *J Am Coll Surg* 2012;215:255–61.
- Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, et al. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001;195:171–8.
- Frattini M, Balestra D, Suardi S, et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10:4015–21.
- Papadopoulos VN, Michalopoulos A, Netta S, et al. Prognostic significance of mucinous component in colorectal carcinoma. *Tech Coloproctol* 2004;8:123–5.
- Roncucci L, Fante R, Losi L, et al. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer* 1996;32A:295–302.
- Wei EK, Giovannucci E, Wu K, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004;108:433–42.

MUDr. Václav Liška, PhD.
Chirurgická klinika LF UK a FN Plzeň
alej Svobody 80
304 00 Plzeň
e-mail: vena.liska@gmail.com

NOVÁK, P., V. LIŠKA, V. TŘEŠKA, J. KOPALOVÁ, O. VYČÍTAL a J. BRŮHA.
Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě. *Rozhledy v chirurgii*. 2012, **91**(4), 219-222. ISSN 0035-9351.

Původní práce

Klinické prognostické faktory kolorektálního karcinomu po jeho radikální léčbě

P. Novák, V. Liška, V. Třeška, J. Kopalová, O. Vyčítal, J. Brůha

Chirurgická klinika LFUK a FN Plzeň, Karlova univerzita v Praze,
přednosta: Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.

Projekt byl podpořen grantem IGA MZ CR NR 12025.

Souhrn

Úvod: Střevní anastomózy jsou častým místem komplikací operací kolorektálního karcinomu. Dehiscence anastomózy značně ovlivňuje pooperační průběh a může ovlivňovat i celkové přežití (OS) a bezpříznakové přežití (DFI). Cílem studie byla analýza klinicko-patologických faktorů, které mohou odhalit dehiscenci a mají vztah k další prognóze nemocných.

Materiál a metoda: Byla provedena statistická analýza souboru nemocných (340 pacientů, 207 mužů, 133 žen) s kolorektálním karcinomem, řešených radikální resekci s provedením anastomózy na tlustém střevě či rektu v letech 2003–2007. Mezi studované faktory byly zařazeny: věk, pohlaví, staging, protektivní stomie, neoadjuvantní chemoterapie, neoadjuvantní radioterapie, adjuvantní chemoterapie, adjuvantní radioterapie, insuficience anastomózy. Komplikace byly hodnoceny dle Clavienu a Dinda.

Výsledky: Provedená analýza prokázala jako statisticky významné pro prognózu celkového přežití tyto faktory. Nemocní se stadiem T4 měli 2,5krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s nižšími stadii malignity a 1,9krát vyšší riziko recidivy. Při uzlinovém postižení N2 měli nemocní 3,7krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s N0 a N1 uzlinovým postižením a 3,6krát vyšší riziko recidivy malignity. Přítomnost pooperační komplikace III.–V. stupně podle Clavienu zvyšovala riziko úmrtí 4krát. Nemocní s dehiscencí anastomózy měli 5,5krát vyšší riziko úmrtí. Překvapivě i přítomnost protektivní stomie zvyšovala riziko úmrtí 5,4krát. V případě nepodání adjuvantní chemoterapie se riziko úmrtí zvýšilo 2krát. U pacientů s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocených na základě stupnice dle Clavienu a Dinda byly statisticky významné tyto parametry: leak, protektivní stomie, adjuvantní chemoterapie, adjuvantní léčba. U pacientů s komplikacemi I a II byla statistická významnost vyhodnocena u rozsahu primárního tumoru pozitivitu lymfatických uzlin. Multivariační analýzou CART byly prokázány silné vztahy u pozitivitu lymfatických uzlin a Clavienuv hodnocení komplikací.

Závěr: Analýza klinicko-patologických faktorů je důležitá pro predikci prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem, po jejich radikální léčbě. Sledování a zohledňování těchto prognostických faktorů v pooperačním období může ovlivnit strategii léčby a tím i celkové přežití nemocných po radikální resekci kolorektálního karcinomu. Nepodání adjuvantní chemoterapie významně snižuje celkové a bezpříznakové přežití.

Klíčová slova: kolorektální karcinom – pooperační komplikace – Clavienu-Dindo klasifikace – celkové a bezpříznakové přežití – prognóza

Summary

Novák P, Liška V, Třeška V, Kopalová J, Vyčítal O, Brůha J. Prognostic clinical factors in colorectal cancer after radical therapy

Introduction: Colorectal anastomoses frequently become the site of complications after surgical procedures for colorectal cancer. Anastomotic dehiscence has a significant impact on the whole postoperative disease course, may influence the overall survival (OS) and disease free interval (DFI). The aim of our study was to analyze clinical and histopathological factors, that could facilitate detection of dehiscences and are related to the prognosis of patients.

Material and methods: The authors performed statistical analysis of a cohort of patients (340 patients, 207 males, 133 females) who underwent radical resection followed by anastomosis on the large intestine during 2003–2007. The following factors were assessed: age, gender, staging, protective stoma, neoadjuvant chemotherapy, neoadjuvant radiotherapy, adjuvant chemotherapy, adjuvant radiotherapy and anastomotic insufficiency. Complications were evaluated according to Clavien and Dindo classification.

Results: The analysis confirmed the following factors to be statistically significant for prognosis of OS and DFI. In stage T4 subjects, the risk of death was 2.5 x higher and the risk of recurrence was 1.9 x higher than in the lower disease stage subjects. The presence of N2 lymph node metastases increases the risk of death 3.7 x and the risk of recurrence 3.6 x, compared to N0 and N1 cases. The presence of postoperative complications classified as III–V grade according to Clavien and Dindo classification increases the risk of death 4x. The risk of death was 5.5 x higher in patients with dehiscence of anastomosis. The surprising finding was that even protective stoma increases the risk of death 5.4 x. Patients who did not undergo adjuvant chemotherapy were at 2 x higher risk of death. In patients with IIIA, IIIB, IV, V complications, the following factors proved to be statistically significant for prognosis of OS: leakage, protective stoma, adjuvant chemotherapy and adjuvant oncological treatment. In patients with complications I and II, the following factors were proved to be statistically significant for prognosis of OS: staging and lymph nodes metastases. Multivariate analysis CART confirmed significant correlation between the lymph nodes positivity and the Clavien and Dindo classification of complications.

Conclusion: Analysis of clinical and histopathological factors is important for prediction of prognosis in patients with colorectal cancer after radical surgical treatment. Detection and application of these prognostic factors in postoperative period could influence the strategy of treatment and thus the overall survival in patients with radical resections for colorectal carcinoma. Non-administration of adjuvant chemotherapy results in a significant decrease in OS and DFI.

Key words: colorectal cancer – postoperative complication – Clavien-Dindo classification – overall survival – disease free interval – prognosis.

Rozhl Chir 2012;91:219–222

ÚVOD

Kolorektální karcinom (KRCa) lze považovat za celospolečenský problém. Patří mezi nejčastější nádory bez rozdílu pohlaví a věku. V určitých věkových skupinách je vůbec nejčastější malignitou. Každý rok je v České republice nově diagnostikováno v průměru 8000 nových případů a 5000 pacientů na tuto chorobu zemře [1].

Prognostické faktory KRCa lze rozdělit do tří skupin: 1. Faktory biologického chování nádoru. 2. Faktory pacientovy odpovědi na nádorové onemocnění. 3. Faktory ve vztahu k léčbě. Ve výsledku se prakticky jedná o kombinaci všech tří aspektů. Naše práce byla zaměřena na faktory, které souvisejí s léčbou. Rozhodujícím faktorem z hlediska prognózy je radikální operace a R0 odstranění nádoru. S tím samozřejmě úzce souvisejí faktory biologického chování nádoru. Jeho stadia, invazivity, přítomnosti vzdálených metastáz. Tyto faktory jsou nejlépe hodnotitelné dle TNM klasifikace. Dalším důležitým faktorem, který má podíl na výskytu hlavně lokální recidivy, je komplikovaný pooperační průběh ve smyslu infekčních komplikací při prosakování či dehiscenci anastomóz. [2].

Tyto komplikace mají jednak bezprostřední dopad ve formě těžkých sepsí někdy s ireverzibilním průběhem a úmrtím nemocného, a jednak dopad z hlediska dlouhodobé prognózy. Zjistilo se, že nemocní, kteří měli v pooperačním období zánětlivou komplikaci ve smyslu prosakování nebo dehiscence anastomózy, měli častější výskyt lokální recidivy a významně snížené celkové přežití [3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 10]. V literatuře jsme našli i práce, které tuto hypotézu nepotvrdily [11, 12, 13, 14].

Existuje několik teorií, které vysvětlují mechanismus důvodu vyššího výskytu lokálních recidiv a snížení celkového přežití nemocných při prosakování anastomóz. Jedna z teorií je výskyt životaschopných nádorových buněk v místě anastomózy [15, 16]. V případě prosakování se mohou tyto buňky dostat do okolí a způsobit recidivu onemocnění. Dále se na tomto mechanismu podílejí volně cirkulující nádorové buňky, které mohou být příčinou vzdálených metastáz, čímž dochází i ke snížení doby přežití [1, 17]. V případě infekce, která je způsobena prosakováním z anastomózy, může dojít k systémové zánětlivé odpovědi organismu a vyplavení zánětlivých cytokinů, které mohou změnit imunitu a podpořit růst zbytkových implantovaných nádorových buněk [18, 19]. Určitě se na horší prognóze u pacientů s prosakováním anastomózy podílí i ten fakt, že se významně prodlouží vlastní pooperační období, čímž dojde k pozdějšímu zahájení následné onkologické léčby. V některých případech z důvodu dlouhodobého pooperačního stonání není onkologická léčba ani zahajována.

Prosakování střevního obsahu anastomózou je poruchou zásadního významu. Klinický projev záleží na umístění anastomózy, na obsahu střeva, předoperační přípravě střeva, množství uniklého obsahu a možnostech

dutiny břišní stran schopnosti ohraničit tento infekční materiál. Větší únik střevního obsahu může vést k difúzní sterkorální peritonitidě, ke vzniku abscesu nebo píštěle. Řada prací prokázala, že k drobnému úniku může docházet až u 50 % anastomóz, ale klinicky se projeví jen asi v 5 %. Výskyt rentgenologicky prokázaných úniků podstatně převyšuje jejich počet zjištěný na základě klinických příznaků [20]. Hlavním faktorem, který ovlivňuje prosakování, popřípadě dehiscenci anastomózy, je výška anastomózy. Všechny anastomózy do 7 cm od análního okraje jsou vystaveny zvýšenému riziku prosakování a dehiscence. Dalšími faktory, které zvyšují riziko septické komplikace, jsou předoperační chemoterapie nebo radioterapie, mužské pohlaví, vyšší věk, abusus alkoholu a kouření, obezita, imunosuprese, podvýživa a diabetes mellitus [21, 22, 23]. Typ operace (laparoskopicky nebo otevřeně) a způsob šití (ručně nebo staplerem) nemají žádný význam z hlediska rizikového faktoru. Naopak na snížení rizika dehiscence anastomózy mají podle některých autorů vliv mobilizace lénální flexory, J-pouch anastomóza a zakládání protektivních stomií u nízkých resekcí rekta [22, 23, 24].

Nejčastěji dochází k prosakování anastomóz v levé polovině tračníku a rekta. Čím je anastomóza uložena distálněji, tím se zvyšuje riziko prosakování a dehiscence anastomóz. Prosakování je definováno jako defekt integrity střevní stěny, který vede ke komunikaci mezi intra a extraluminálním prostorem. Pánevní absces v blízkosti anastomózy je taktéž považován za ohraničenou formu prosakování. Prosakování můžeme jako hlavní chirurgickou komplikaci z hlediska léčby rozdělit na tři stupně (Tab. 1).

Z důvodu srovnání výsledků a kvality léčby v roce 1992 vytvořil Clavien klasifikaci pooperačních komplikací, která měla 4 stupně. První stupeň komplikací byl alternativou k ideálnímu pooperačnímu průběhu. Druhý stupeň byly stavy život ohrožující, ale bez trvalých následků. Do druhého stupně patřily komplikace vyžadující chirurgickou intervenci. Třetí stupeň zahrnoval rozšíření chirurgické intervence nebo perzistující život ohrožující stavy. Poslední čtvrtý stupeň byla smrt jako následek pooperačních komplikací [25]. Tuto klasifikaci dále v roce 2004 rozpracoval Dindo. V současné době se tato klasifikace používá k obecnému popisu pooperačních komplikací (Tab. 2) [26, 27].

Klinický obraz prosakování nebo dehiscence je velmi pestrý. Mezi klinické příznaky patří subfebrilie až febrilie

Tab. 1: Rozdělení chirurgických komplikací z hlediska léčby
Tab. 1: Distribution of surgical complications according to their treatment

A	nevyžaduje aktivní terapeutickou intervenci
B	vyžaduje aktivní léčebný zásah, ale lze zvládnout bez laparotomie
C	vyžaduje re-laparotomii

Tab. 2: Clavien-Dindo klasifikace chirurgických komplikací
 Tab. 2: Clavien-Dindo classification of surgical complications

Stupně	Definice
I.	Normální pooperační průběh bez potřeby farmakologické nebo chirurgické léčby, endoskopické nebo radiologické intervence. Možnost léčby: léky jako antiemetika, antipyretika, analgetika, diuretika, elektrolyty, fyzioterapie. Zahrnuje otevření rány pro infekci na lůžku.
II.	Stav vyžadující farmakologickou léčbu, jiné léky než jsou povolené u stupně I. Zahrnuje krevní transfuze a totální parenterální výživu.
III a.	Vyžadující chirurgickou, endoskopickou nebo radiologickou intervenci - bez nutnosti celkové anestezie.
III b.	Vyžadující chirurgickou, endoskopickou nebo radiologickou intervenci - v celkové anestezii.
IV a.	Život ohrožující komplikace včetně komplikací CNS (krvácení, ischemie mozku) vyžadující péči na jednotkách intenzivní péče, ARO + Selhání jednoho orgánu, zahrnuje i hemodialýzu.
IV b.	Život ohrožující komplikace včetně komplikací CNS (krvácení, ischemie mozku) vyžadující péči na jednotkách intenzivní péče, ARO + Multiorgánové selhání.
V.	Úmrtí
Přípona „d“	(for disability) V případě, že ke komplikacím dojde už po propuštění, se použije přípona k danému stupni postižení.

Tab. 3: Typické klinické charakteristiky pacientů s různými stupni závažnosti úniku z anastomózy
 Tab. 3: Typical clinical characteristics of patients with various severity of anastomotic leakage

	Stupeň A	Stupeň B	Stupeň C
Klinický stav	Dobrý	Sřadně závažné potíže	Těžká porucha
Klinické příznaky	ne	břišní/ pánevní bolesti febrilie hnisavý/sterkorální vaginální výtok (přístěl) zkalená/ hnisavá sekrece z konečníku	peritonitida septikémie/ sepse
Obsah z drénů	serózní zkalený nebo zahuštěný obsah	zkalený/ hnisavý (sterkorální)	sterkorální
Laboratorní testy	normální	leukocytóza, elevace CRP	leukocytóza, elevace CRP, v důsledku sepse leukopenie
Radiologické hodnocení	malý únik	prosakování anastomózy s pánevním abscesem	prosakování anastomózy s generalizovanou odpovědí, peritonitida
Specifická léčba	ne	antibiotika intervenční drenáž, transanální laváž, drenáž	re-laparotomie s kontrolou septického ložiska

lie, tachykardie, tachypnoe, citlivost nebo bolestivost břicha, peritonismus, elevace zánětlivých parametrů, zkalená, hnisavá, enterální nebo sterkorální sekrece z drénů, odchod plynů a zápach podél drénů, radiologický průkaz kolekce či nálezu plynu v okolí anastomózy [28]. V tabulce 3 jsou popsány charakteristické příznaky ke stupňům prosakování [29].

MATERIÁL A METODA

Do retrospektivní studie byli zařazeni pacienti, kteří byli léčeni na Chirurgické klinice FN Plzeň v letech 2003–2007. Podmínkou zařazení do této studie byla R0 resekce kolorektálního karcinomu s provedením anasto-

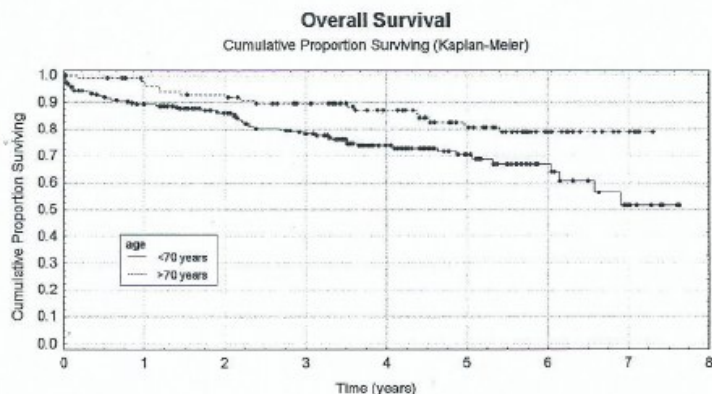
Tab. 4: Přehled operačních výkonů
 Tab. 4: Summary of surgical procedures

Pravostranná hemikolektomie	111
Nízká přední resekce rekta double stapling	75
Resekce sigmatu	63
Resekce rektosigmatu	37
Levostranná hemikolektomie	18
Ostatní (resekce transversa, lienální flexury, ileocekální resekce, subtotální kolektomie, kolektomie)	36

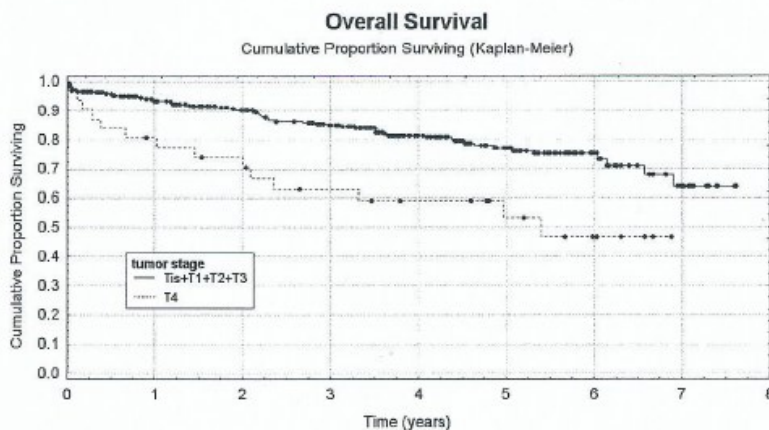
mózy. Tento soubor zahrnoval 340 pacientů, 207 mužů a 133 žen. Průměrný věk byl 69 let (32–91 let). Přehled výkonů uvádí Tab. 4.

Celkově zemřelo 64 nemocných, to znamená 18,8 % pacientů z našeho souboru. Bezprostředně na následky pooperačních komplikací zemřelo 5,8 % nemocných, 6,4 % nemocných zemřelo s odstupem 1–5 let na generalizaci zá-

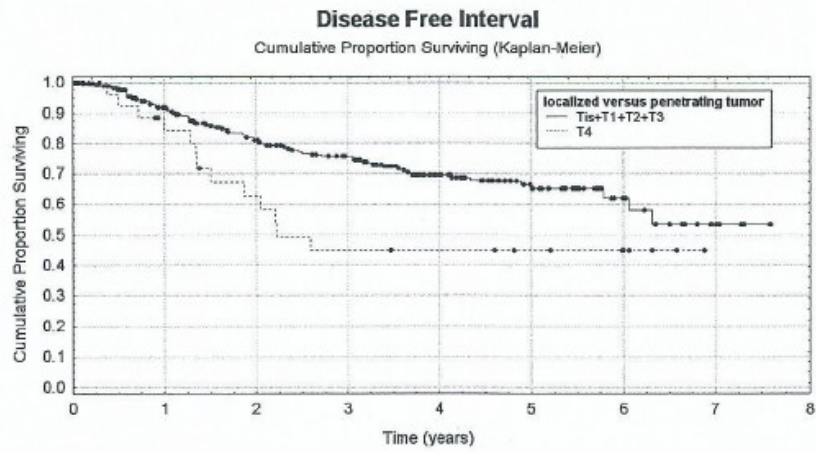
kladního onemocnění. Prokázaný leak z anastomózy mělo 12 pacientů (3,5 %). Celkové úmrtí v této skupině bylo 58,3 %. Na pooperační komplikace zemřeli 4 nemocní (33,3 %). Tři pacienti (25,0 %) zemřeli s odstupem 1–4 let na recidivu KRCA. Protektivní stomii mělo založeno 12 pacientů. U sedmi z nich byla stomie založena v rámci reoperace pro dehiscenci anastomózy. Adjuvantní chemoterapii podstoupilo 29,8 % nemocných z celého souboru 340 pacientů. Ve skupině pacientů s leakem byla pouze v jednom případě provedena adjuvantní onkologická léčba – radioterapie. Analýza celkového přežití (OS) a bezpříznakového přežití (DFI) ve vztahu ke studovaným faktorům byla zpracována pomocí Kaplan-Maierových křivek (LogRank test, Wilcoxon test). Byla provedena multivariační analýza CART zkoumaných faktorů s cílem identifikovat nejvýznamnější prognostické faktory recidivy (bezpříznakového přežití) a celkového přežití nemocných. U spojitých proměnných bylo testováno několik vhodných cut off a za „optimální cut off“ byla prohlášena taková, u které



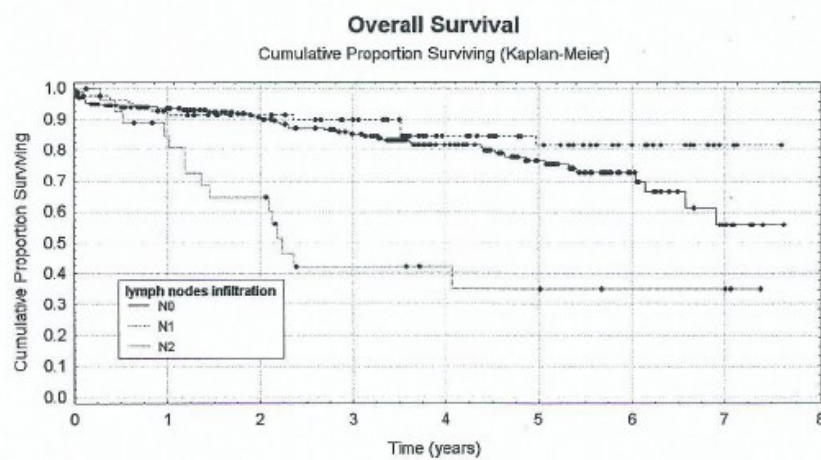
Graf 1: Věk jako rizikový faktor úmrtí, cut off 70 let
 Graph 1: Age as a risk factor for death, cut off 70 years



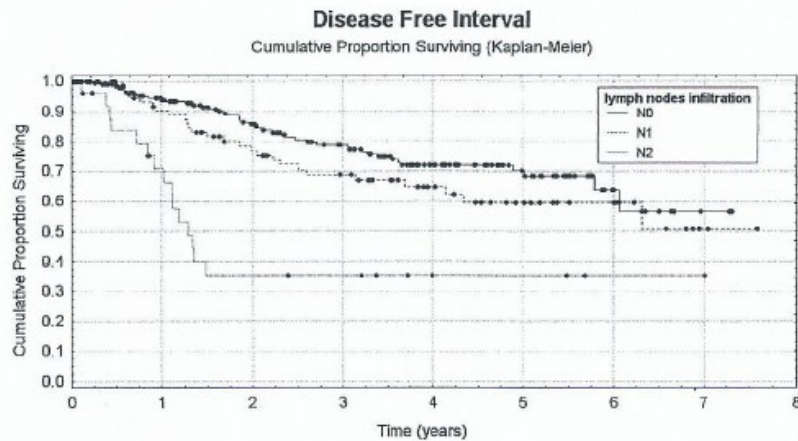
Graf 2: Lokální pokročilost nádoru jako rizikový faktor krátkého celkového přežití nemocných
 Graph 2: Localmalignancy stage as a risk factor for short overall survival



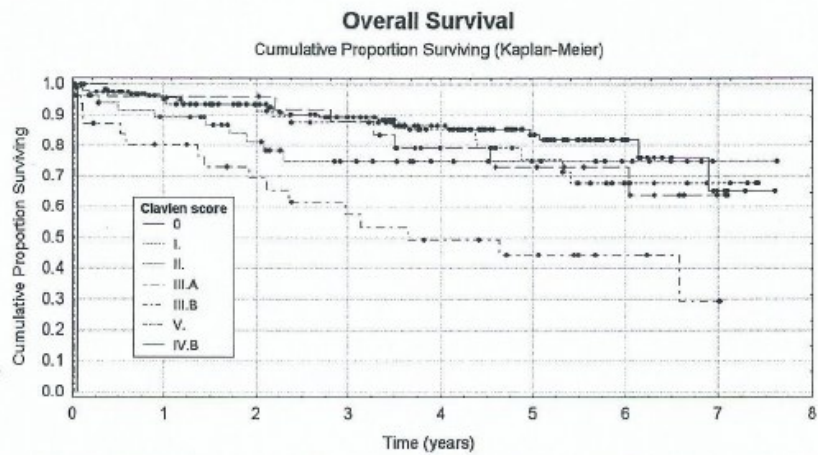
Graf 3: Lokální pokročilost nádoru jako rizikový faktor krátkého bezpříznakového přežití nemocných.
Graph 3: Local malignancy stage as a risk factor for short disease free interval



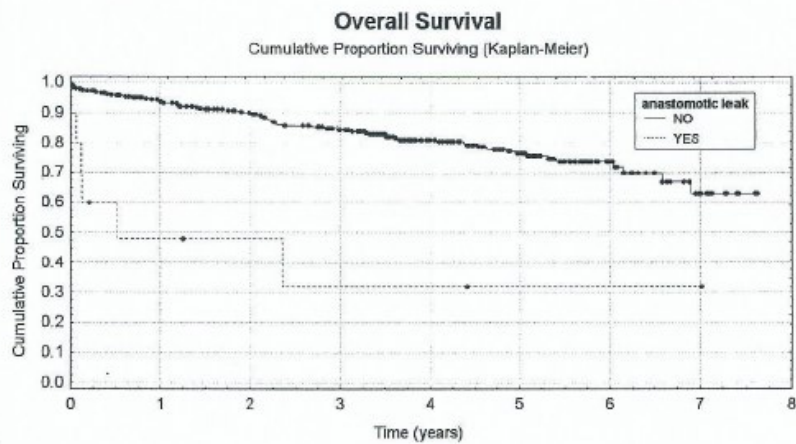
Graf 4: Uzlinové postižení jako rizikový faktor krátkého celkového přežití
Graph 4: Lymph nodes infiltration as a risk factor for short overall survival



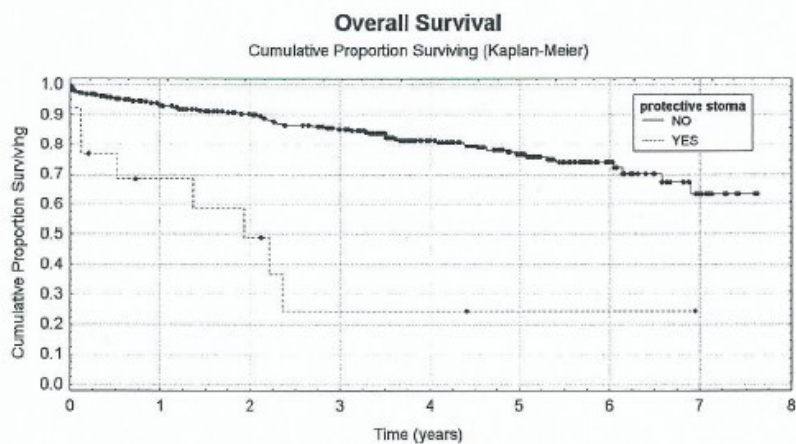
Graf 5: Uzlinové postižení jako rizikový faktor krátkého bezpříznakového přežití
Graph 5: Lymph nodes infiltration as a risk factor for short disease free interval



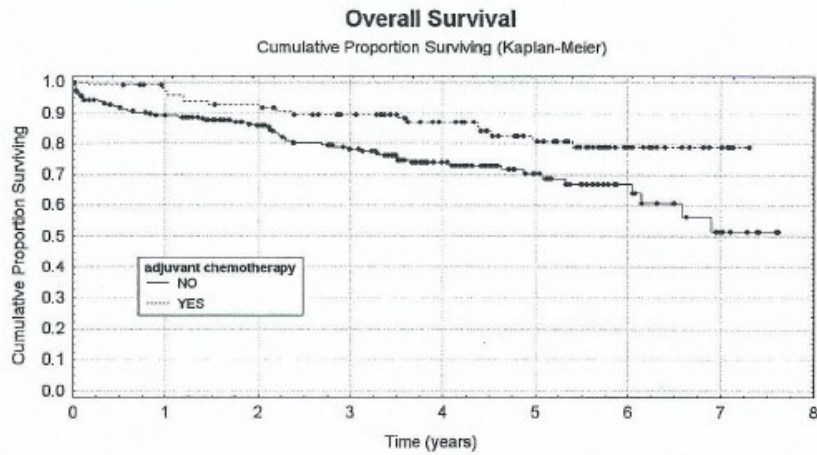
Graf 6: Pooperační komplikace hodnocené dle Claviena a Dinda jako rizikový faktor krátkého celkového přežití
Graph 6: Postoperative complications evaluated according to Clavien and Dindo classification as a risk factor for short overall survival



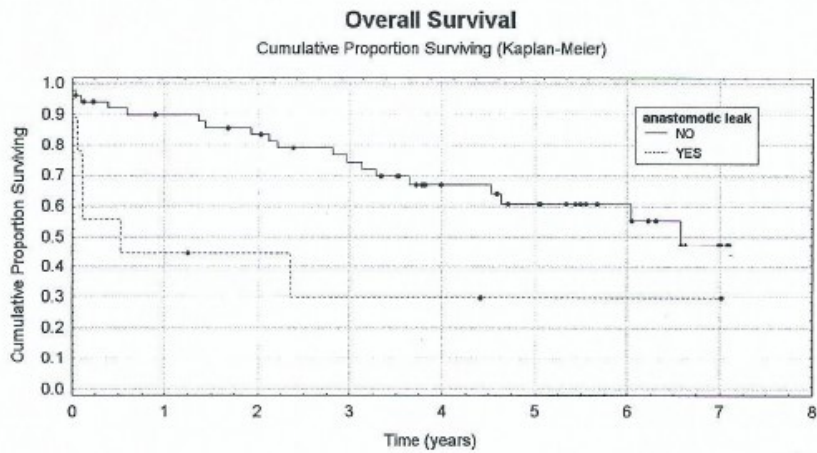
Graf 7: Leak z anastomózy jako rizikový faktor krátkého celkového přežití
Graph 7: Leakage from anastomosis as a risk factor for short overall survival



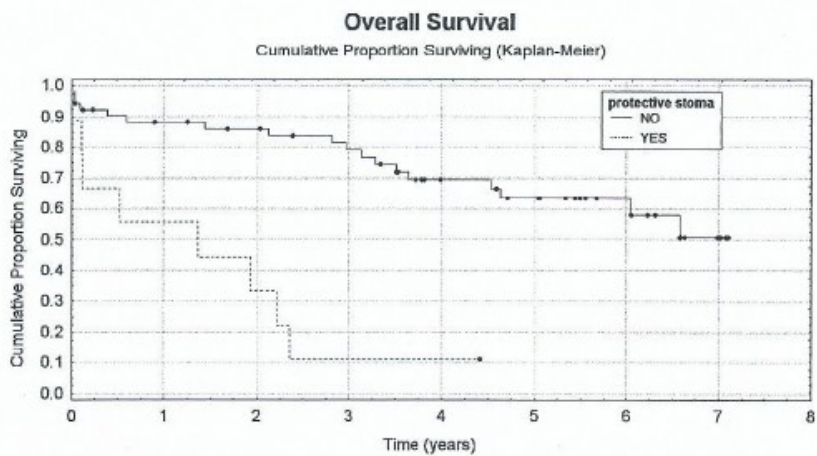
Graf 8: Význam protektivní stomie pro celkové přežití nemocných
Graph 8: Importance of protective stoma for overall survival



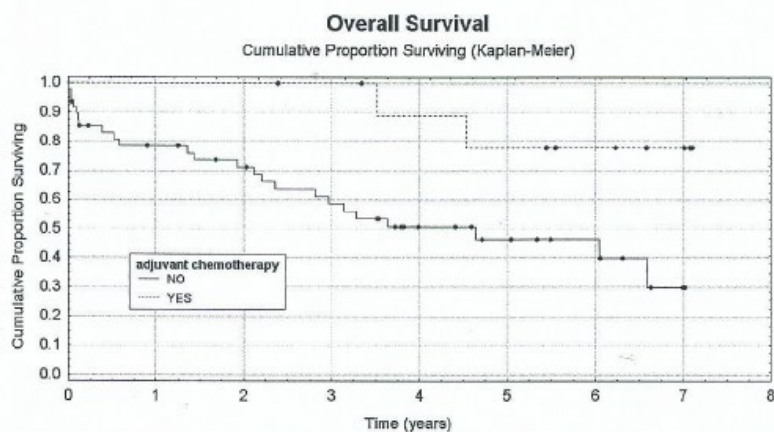
Graf 9: Adjuvantní chemoterapie jako prognostický faktor celkového přežití
Graph 9: Adjuvant chemotherapy as a prognostic factor for short overall survival



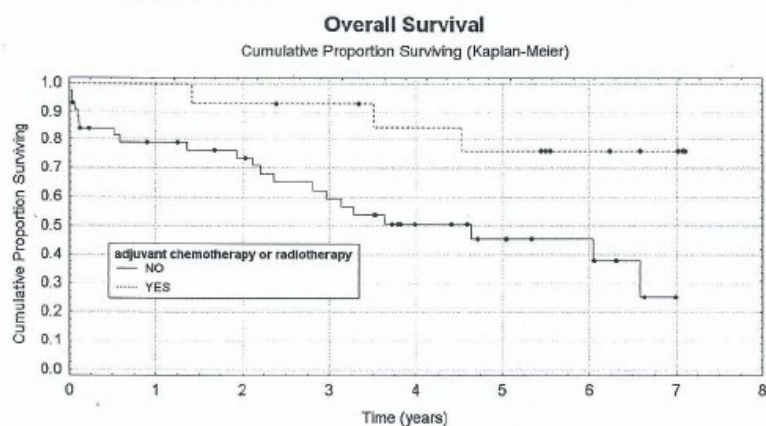
Graf 10: Leak z anastomózy jako rizikový faktor krátkého celkového přežití u skupiny pacientů s komplikacemi IIIA, IIIB, IV, V hodnocenými dle Clavienu a Dinda
Graph 10: Leakage from anastomosis as a risk factor for short overall survival at the cohort of patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



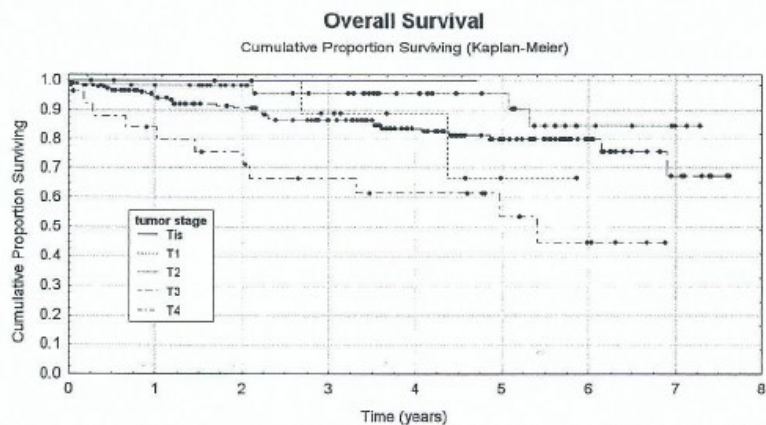
Graf 11: Význam protektivní stomie pro celkové přežití nemocných s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocenými dle Clavienu a Dinda
Graph 11: Importance of protective stoma for overall survival in patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



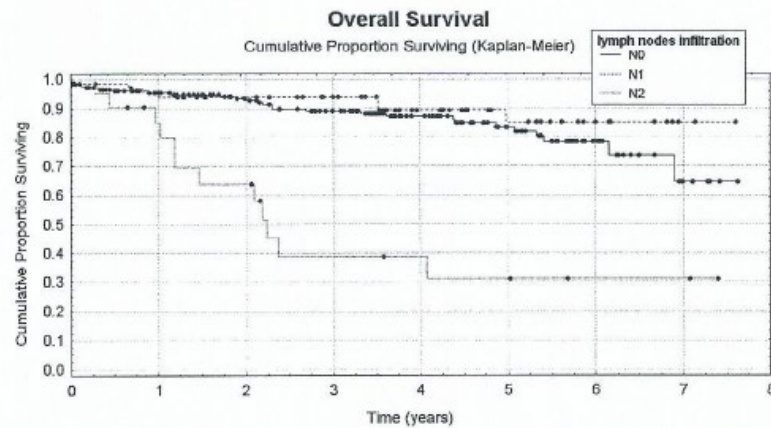
Graf 12: Adjuvantní chemoterapie jako prognostický faktor celkového přežití nemocných s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocenými dle Claviena a Dinda
 Graph 12: Adjuvant chemotherapy as a prognostic factor for overall survival in patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



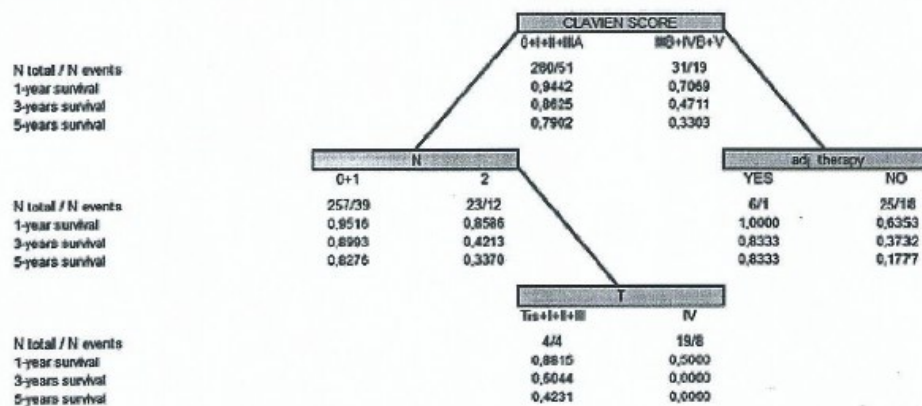
Graf 13: Adjuvantní chemoterapie nebo radioterapie jako prognostický faktor celkového přežití nemocných s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocenými dle Claviena a Dinda
 Graph 13: Adjuvant chemotherapy or radiotherapy as a prognostic factor for overall survival in patients with Grade IIIA, IIIB, IV, V complications evaluated according to Clavien and Dindo



Graf 14: Lokální pokročilost primárního tumoru jako prognostický faktor celkového přežití ve skupině pacientů s komplikacemi I a II hodnocenými dle Claviena a Dinda
 Graph 14: Local primary tumor stage as a prognostic factor for overall survival in a cohort of patients with Grade I and II complications, assessed according to Clavien and Dindo



Graf 15: Pozitivita lymfatických uzlin jako prognostický faktor celkového přežití ve skupině pacientů s komplikací I a II hodnocenými dle Clavienu a Dindo
 Graph 15: Positivity of lymph nodes as a prognostic factor for overall survival in a cohort of patients with Grade I and II complications according to Clavien and Dindo



Graf 16: Multivariacní analýzou CART celého souboru nemocných byly prokázány silné vztahy k endpointu (nižší celkové přežití) u kombinace pozitivity lymfatických uzlin, Clavienova hodnocení komplikací a lokálního rozsahu tumoru
 Graph 16: Multivariate analysis CART of the whole group of patients confirmed strong correlation between the end point (short overall survival) and the combination of the following factors: positivity of lymph nodes, Clavien evaluation of complications and local primary tumor stage

byla v Coxově regresním modelu nalezena nejvyšší statistická signifikace. Rozdíly v přežití mezi zkoumanými skupinami byly testovány pomocí Log-rank testu. U nemocných jsme sledovali věk, staging onemocnění, uzlinové postižení, podání adjuvantní chemoterapie, pooperační komplikace a vliv těchto faktorů na celkové a bezpříznakové přežití.

VÝSLEDKY

Provedená statistická analýza při hladině významnosti p -value < 0,05 prokázala věk nad 70 let, pokročilost KRCa (ve smyslu pokročilého stadiu onemocnění), pooperační komplikace, protektivní stomii a nepodání adjuvantní chemoterapie jako prognosticky vý-

znamné negativní faktory celkového přežití. Pacienti starší 70 let měli 1,7krát větší riziko úmrtí (Graf 1). Nemocní se stadiem T4 měli 2,5krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s nižšími stadii malignity (Graf 2) a 1,9krát vyšší riziko recidivy (Graf 3). Při uzlinovém postižení N2 měli nemocní 3,7krát vyšší riziko úmrtí než nemocní s N0 a N1 uzlinovým postižením (Graf 4) a 3,6krát vyšší riziko recidivy malignity (Graf 5). Přítomnost pooperační komplikace III.–V. stupně podle Clavienovy klasifikace zvyšovala riziko úmrtí 4krát (Graf 6). Nemocní s dehiscencí anastomózy měli 5,5krát vyšší riziko úmrtí (Graf 7). Překvapivě i přítomnost protektivní stomie zvyšovala riziko úmrtí 5,4krát (Graf 8). V případech nepodání adjuvantní chemoterapie se riziko úmrtí zvýšilo 2krát (graf 9). U pacientů s komplikacemi IIIA, IIIB, IV a V hodnocených

na základě stupnice dle Clavienu a Dinda byly statisticky významné pro celkové přežití tyto parametry: leak (Graf 10), protektivní stomie (Graf 11), adjuvantní chemoterapie (Graf 12) a adjuvantní léčba (chemoterapie nebo radioterapie) (Graf 13). U pacientů s komplikacemi I a II byla statistická významnost prokázána u rozsahu primárního tumoru (Graf 14) a positivity lymfatických uzlin (Graf 15). Multivariační analýzou CART celého souboru nemocných byly prokázány silné vztahy k endpointu (kratší celkové přežití a smrt) u kombinace positivity lymfatických uzlin a Clavienu hodnocení komplikací (Graf 16).

DISKUZE

Výsledky naší studie potvrdily některé prognostické faktory uváděné v literatuře a dále i nová zjištění, která mohou přinést další pohled na léčbu a pooperační péči o nemocné po radikální operaci KRCa s primárně prováděnou anastomózou. Prokázali jsme, že vyšší věk, pokročilé stadium KRCa a pooperační komplikace mají prognosticky negativní vliv na délku celkového přežití. Z hlediska dlouhodobého přežívání jsou naše výsledky ve shodě s předchozími literárními zdroji, jejichž autoři prokázali snížení celkového přežití u nemocných s komplikacemi v oblasti anastomózy, ať už se jedná o leak nebo dehiscenci anastomózy [3, 4, 5, 6, 7, 9, 10]. Otázkou zůstává vysvětlení tohoto zjištění. Tento proces je někdy vysvětlován jako nestandardní imunitní odpověď organismu na zánětlivou pooperační komplikaci, čímž může docházet k mikroskopickému šíření buněk nádoru do okolí a vzdálených orgánů. Další příčinou může být ve většině případů výskytu anastomotického leaku následná absence adjuvantní chemoterapie nebo její odložená aplikace. Profit nemocných z adjuvantní onkologické léčby je prokázán. Indikace a zahájení adjuvantní chemoterapie je individuální. Většina onkologických pracovišť se snaží o zahájení adjuvantní chemoterapie do 8 týdnů od operace. V literatuře je i statisticky prokázán profit nemocných, kteří začali adjuvantní chemoterapii i po 8–10 týdnech od operace [30]. Jiný přístup je u adjuvantní radioterapie, která může být zahájena i několik měsíců po operaci. Tato korelace s podáním nebo nepodáním adjuvantní chemoterapie byla patrná i v našem souboru. Nepodání adjuvantní onkologické léčby zvyšovalo riziko úmrtí 2krát. Zajímavým výsledkem byl prognosticky negativní vliv protektivních stomií, které zvyšovaly riziko úmrtí 5,4krát. Na základě těchto poznatků se domníváme, že příčinou negativního charakteru prognostického faktoru protektivní stomie je fakt, že většinou byly tyto stomie zakládány z důvodu pooperačních chirurgických komplikací a dalším důvodem je absence následné adjuvantní chemoterapie, která byla vyloučena z důvodů dalších komorbidit, jak vyplývá z podrobné analýzy našeho souboru.

ZÁVĚR

Analýza klinicko-patologických faktorů je důležitá pro predikci prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem po jejich radikální léčbě. Pacienti hodnocení na základě časných pooperačních klinických příznaků mohou poukázat na ne zcela manifestní dehiscenci střevních anastomóz. Sledování a zohledňování těchto prognostických faktorů v pooperačním období může ovlivnit strategii léčby a tím i celkové přežívání nemocných po radikální resekci kolorektálního karcinomu. Nepodání adjuvantní chemoterapie významně snižuje celkové a bezpříznakové přežití.

Poděkování:

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 12025.

LITERATURA

1. Pitule P, Liška V, Třeška V, Novák P, Čedíková M, Kralíčková M. Přínos molekulární biologie k diagnostice a léčbě kolorektálního karcinomu – současnost a budoucnost. *Rozhl Chir* 2011;90:315–32.
2. Lipská L, Visokai V. et al. Recidiva kolorektálního karcinomu, Grada Publishing, 2009:120–121.
3. Miccini M, Borghese O, Scarpini M, Cassini D, Gregori M, Amore Bonapasta S, Tocchi A. Anastomotic leakage and septic complications: impact on local recurrence in surgery of low rectal cancer. *Ann Ital Chir* 2011;82(2):117–23.
4. Mirnezami A, Mimezami R, Chandrakumaran K, Sasapu K, Sagar P, Finan P. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg* 2011;253(5):890–9.
5. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW, Seto CL. Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patients after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg* 2007;11(1):8–15.
6. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW. The impact of postoperative complications on long-term outcomes following curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14(9):2559–66. Epub 2007 May 24.
7. Chang SC, Lin JK, Yang SH, Jiang JK, Chen WC, Lin TC. Long-term outcome of anastomosis leakage after curative resection for mid and low rectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2003;50(54):1898–902.
8. Petersen S, Freitag M, Hellmich G, Ludwig K. Anastomotic leakage: impact on local recurrence and survival in surgery of colorectal cancer. *Int. J. Colorect Dis* (1998);13:160–163.
9. Branagan G. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal Surgery. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1021–1026.
10. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2005 Sep;92(9):1150–4.
11. Bertelsen CA, Andreassen AH, Jørgensen T, Harling H. Danish Colorectal Cancer Group: Anastomotic leakage after curative anterior resection for rectal cancer: short and long-term outcome. *Colorectal Dis* 2010;12(7 Online):e76–81. Epub 2009 Apr 29.
12. Kressner U, Graf W, Mahteme H, Pählman L, Glimelius B. Septic complications and prognosis after surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002;45(3):316–21.
13. Lee WS, Yun SH, Roh YN, Yun HR, Lee WY, Cho YB, Chun HK. Risk factors and clinical outcome for anastomotic leakage after total mesorectal excision for rectal cancer. *World J Surg* 2008;32(6):1124–9.

14. Jörgren F, Johansson R, Damber L, Lindmark G. Anastomotic leakage after surgery for rectal cancer: a risk factor for local recurrence, distant metastasis and reduced cancer-specific survival? *Colorectal Dis* 2011;13(3):272–83. doi: 10.1111/j.1463-1318.2009.02136.x.
15. Van den Tol PM, van Rossen EE, van Eijck CH, Bonthuis F, Marquet RL, Jeekel H. Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze Leeds to less implantation metastasi of spilled tumor cells. *Ann Surg* 1998;227:242–248.
16. Umpleby HC, Fermor B, Symes MO, Williamson RC. Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg* 1984;71:659–663.
17. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sreter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:4080–4085.
18. Mc Millan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003;90:215–219.
19. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Wircchow. 2001;357:539–545.
20. Hoch J. *Akutní chirurgie tlustého střeva*, Maxdorf, 1998:106–107.
21. Moran BJ. Predicting the risk and diminishing the consequences of anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *Acta Chir Jugosl* 2010;57(3):47–50.
22. Taflampas P, Christodoulakis M, Tsiftsis DD. Anastomotic leakage after low anterior resection for rectal cancer: facts, obscurity, and fiction. *Surg Today* 2009;39(3):183–8. Epub 2009 Mar 12.
23. Cong ZJ, Fu CG, Wang HT, Liu LJ, Zhang W, Wang H. Influencing factors of symptomatic anastomotic leakage after anterior resection of the rectum for cancer. *World J Surg* 2009;33(6):1292–7.
24. Feng C, Yao RQ, Huang FZ, Nie WP, Liu XY. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011;31(5):908–10.
25. Clavien PA, Sanabria JR, Strasberg SM. Proposed classification of complications of surgery with examples of utility in cholecystectomy. *Surgery* 1992;111:518–26.
26. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with valuation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240(2):205–13.
27. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, de Santibañes E, Pekolj J, Slankamenac K, Bassi C, Graf R, Vonlanthen R, Padbury R, Cameron JL, Makuuchi M. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg* 2009;250(2):187–96.
28. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg* 2006;76:579–85.
29. Rahbari N, Weitz J, Hohenberger W, Heald JR, Moran B, Ulrich A. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: A proposal by the International Study Group of Rectal Cancer Surgery 2010;147:339–51.
30. Czaykowski PM, Gill S, Kennecke HF, Gordon VL, Turner D. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: does timing matter? *Dis Colon Rectum* 2011;54(9):1082–9.

MUDr. Petr Novák
Hromnice 204
330 11 Hromnice, p. Třemošná
e-mail: novakp@fnplzen.cz