

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**Pokročilá molekulární diagnostika a individualizace léčebné strategie
u kolorektálního karcinomu**

HABILITAČNÍ PRÁCE
komentovaný soubor prací

Poděkování

Děkuji své manželce Jarmile, celé rodině včetně rodičů za podporu, kterou mi vždy všichni poskytovali.

Děkuji všem svým současným i bývalým kolegům a spolupracovníkům za spolupráci a možnost věnovat se tak zajímavému tématu, jako je molekulární diagnostika a individualizace léčby. Chtěl bych konkrétně zmínit prof. MUDr. Rostislava Vyzulu, CSc., doc. RNDr. Ondřeje Slabého, Ph.D., prof. MUDr. Jana Žaloudíka, CSc., a doc. MUDr. Marka Svobodu, Ph.D.

Za cenné rady a trvalé povzbuzování děkuji i prof. MUDr. Jiřímu Vorlíčkovi, CSc., dr.h.c.

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Kolorektální karcinom.....	4
2.1	Diagnostika kolorektálního karcinomu	6
2.1.1	Klinická diagnostika kolorektálního karcinomu.....	6
2.1.2	Histopatologická klasifikace kolorektálního karcinomu	8
2.1.3	Korelace klinického stadia s výsledkem léčby	8
2.1.4	Screening kolorektálního karcinomu.....	9
2.1.5	Aktuální stav individualizace léčby kolorektálního karcinomu	9
2.1.6	Doporučení pro individualizaci léčby metastatického kolorektálního karcinomu	12
2.1.7	Závěr.....	12
2.2	Standardní léčebné postupy	13
2.2.1	Strategie léčby časných stadií kolorektálního karcinomu	13
2.2.2	Strategie léčby pokročilého kolorektálního karcinomu	14
3	Molekulární taxonomie kolorektálního karcinomu	20
3.1	Molekulární klasifikace kolorektálního karcinomu.....	20
3.1.1	Sporadický kolorektální karcinom.....	21
3.2	Molekulární patologie nejčastějších hereditárních syndromů u kolorektálního karcinomu ..	25
4	Pokročilá molekulární diagnostika kolorektálního karcinomu.....	29
4.1	Diagnostické biomarkery pro časnou detekci kolorektálního karcinomu	29
4.2	Prognostické biomarkery kolorektálního karcinomu	31
4.3	Prediktivní biomarkery v léčbě kolorektálního karcinomu	31
4.3.1	Prediktory léčebné odpovědi na anti-angiogenní léčbu.....	32
4.3.2	Prediktory léčebné odpovědi na anti-EGFR terapii.....	33
4.3.3	MikroRNA jako prediktory léčebné odpovědi	37
4.3.4	Mikrosatelitní nestabilita jako prediktor léčebné odpovědi.....	39
5	Závěr.....	40
6	Reference.....	41
7	Citovaná literatura	41
8	Seznam zkratk.....	59
9	Seznam příloh.....	61
9.1	Kolorektální karcinom.....	61
9.2	Ostatní	61

1 Úvod

Kolorektální karcinom je dnes chápán jako molekulárně heterogenní skupina nádorových onemocnění tlustého střeva a konečníku. Léčebné úspěchy u tohoto onemocnění proto závisí také na míře individualizace léčebných strategií, která odráží nejen individuální charakteristiky pacienta, ale stále častěji zohledňuje kromě standardně užívaných klinických a histopatologických ukazatelů i molekulární biomarkery. Individualizace léčby na základě molekulárně biologické charakteristiky nádoru významně zvyšuje efektivitu léčby, prognózu pacienta, chrání pacienta před vedlejšími účinky onkologické léčby a v neposlední řadě umožňuje racionálně vynakládat nemalé finanční prostředky na léčbu nádorového onemocnění.

Předkládaná habilitační práce s názvem „Pokročilá molekulární diagnostika a individualizace léčebné strategie kolorektálního karcinomu“ je zpracována formou souboru komentovaných prací autora. Habilitační práce tematicky navazuje a především významně rozšiřuje dizertační práci autora na téma „Zhodnocení klinické korelace *in vitro* testů chemosensitivity a chemoresistence (MTT)“, kterou autor obhájil v roce 2004.

Úvodní kapitola stručně shrnuje současný stav v oblasti diagnostiky a léčby kolorektálního karcinomu. Následující kapitoly se věnují molekulární patologii kolorektálního karcinomu a pokročilé molekulární diagnostice kolorektálního karcinomu.

Každá kapitola je vždy uvedena stručným přehledem klinicky relevantních informací k dané problematice a v závěru každé kapitoly je komentovaný příspěvek autora k dané problematice. Přílohy práce tvoří publikace autora v plném znění, členěné na práce z oblasti kolorektálního karcinomu a ostatní.

2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (KRK) je nejčastějším nádorem trávicího traktu a celosvětově stále patří mezi nejčastěji se vyskytující nádory vůbec. Jen v České republice (ČR) bylo v roce 2014 hlášeno 8 324 nových případů zhoubného novotvaru tlustého střeva a konečníku. Přestože incidence kolorektálního karcinomu v České republice stoupá, mortalita dlouhodobě klesá. V roce 2014 zemřelo v České republice na toto onemocnění 4 015 pacientů (1). Mezi důvody poklesu úmrtnosti patří zavedení screeningového programu v ČR, pokroky v diagnostice a léčbě nádorů tlustého střeva a konečníku. Možné příčiny vzniku KRK lze rozdělit na faktory genetické (endogenní) a vlivy zevního prostředí (exogenní). Vznik naprosté většiny sporadických KRK je podmíněn současným působením endogenních i exogenních faktorů.

Hereditárně podmíněný kolorektální karcinom je majoritně determinován znaky endogenními. Řadíme sem onemocnění s vrozenou mutací některého z genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu či

DNA reparačních procesů. Vrozené syndromy představují významné riziko vzniku kolorektálního karcinomu a často i dalších malignit, přičemž hlavní dvě skupiny těchto syndromů představují:

a) Syndromy s mnohočetnou adenomatózní polypózou gastrointestinálního traktu (GIT), která se může kombinovat s nádorovým postižením dalších orgánových soustav. Z této skupiny je nejvýznamnější familiární adenomatózní polypóza (FAP) s prakticky 100% rizikem rozvoje karcinomu v průběhu života. Jedinci z postižených rodin proto podstupují kolonoskopické vyšetření již před 20. rokem života a při potvrzení diagnózy je zvažována totální kolektomie s pouchem či ileorektoanastomóza. Pacient je i přesto nadále dvakrát ročně sledován endoskopicky. Nověji zaváděné stanovení zodpovědné mutace v genu APC (adenomatous polyposis coli) umožňuje jednodušší vyhledávání a následnou dispenzarizaci pouze postižených jedinců.

b) Syndromy, u kterých vzniká KRK bez přítomnosti polypů, tzv. hereditární nepolypózní karcinom tlustého střeva. Též se často kombinují s postižením dalších orgánových soustav. Z nejčastějších lze zmínit např. Lynchův syndrom, syndrom Li-Fraumeni a další.

Dlouholetá anamnéza zvláště chronicky aktivně probíhající ulcerózní kolitidy či Crohnovy choroby může být považována za predisponující endogenní faktor vzniku kolorektálního karcinomu (2,3).

Zevní faktory hrají v rozvoji KRK jednoznačně významnou roli. Důkazem mohou být výrazné geografické rozdíly v jeho výskytu podmíněné především dietními návyky dané populace, které mohou být významným rizikovým faktorem rozvoje význačné části sporadicky vznikajícího KRK. Předpokládá se negativní vliv příjmu většího množství tuků, jejichž oxidace vede ke zvýšené tvorbě volných kyslíkových radikálů a následně oxidativnímu stresu. V roce 2011 byla publikována metaanalýza 13 prospektivních studií zaměřených na tuto problematiku, která však toto zvýšené riziko vzniku KRK nepotvrdila (4). Nižší obsah vlákniny a naopak vyšší obsah sacharidů o kratších řetězcích ve stravě vede k nevhodné modulaci střevní mikroflóry, zpomaluje peristaltiku střev, a dochází tak k prodloužení doby kontaktu možných karcinogenů se střevním epitelem. Vláknina je navíc schopna část těchto karcinogenně působících látek včetně žlučových kyselin na sebe vázat, a tím zabránit jejich škodlivému účinku. Dalším rizikovým faktorem je nadměrná konzumace červeného masa (5). Nevhodně tepelně upravované (grilováním, smažením, uzením) živočišné proteiny vedou k tvorbě významného množství látek s potenciálně karcinogenním působením. Zmiňován je negativní vliv protražovaného stresu, nedostatku fyzické aktivity a alkoholu (6–9). Riziko vzniku a rozvoje kolorektálního karcinomu zvyšuje též profesionální kontakt s chemickými látkami typu těžkých kovů, azbestu, chlorovaných uhlovodíků atd. Dalším predisponujícím kancerogenním faktorem může být aplikace ionizačního záření na oblast břicha či malé pánve např. z terapeutických důvodů pro gynekologickou malignitu. Rizikovým faktorem pro vznik KRK je také cigaretový kouř. V rámci prospektivní studie bylo prokázáno relativní riziko (RR) 1,19 u bývalých kuřáků cigaret ve srovnání s nekuřáky, zatímco v případě recentních kuřáků cigaret bylo RR ještě vyšší – 1,99. Kouření cigaret je

spojeno s výskytem nádorového podtypu KRK charakterizovaného mikrosatelitní nestabilitou (MSI-high), CIMP (CpG island methylator phenotype) pozitivitou a přítomností mutací BRAF.

Naopak protektivní efekt u nádorů tlustého střeva u mužů byl prokázán u kalcia (mechanismem saponifikace žlučových kyselin a tuků). V případě nádorů rektu u mužů či nádorů tlustého střeva a rektu u žen nebyl tento protektivní efekt potvrzen (10). Snížený výskyt KRK byl zaznamenán také u konzumentů ryb (11), aspirinu či nesteroidních protizánětlivých léčiv (12,13).

2.1 Diagnostika kolorektálního karcinomu

Cílem diagnostických metod v onkologii je stanovení diagnózy u pacientů asymptomatických (časná diagnostika), u pacientů symptomatických ozřejmění příčiny potíží (pozdní diagnostika). Pro diagnostiku KRK využíváme základní vyšetřovací metody, tj. anamnézu a fyzikální vyšetření včetně vyšetření per rektum, laboratorní, endoskopické a zobrazovací metody. Nedílnou součástí diagnostiky asymptomatických i symptomatických onemocnění je stanovení klinického stadia onemocnění, což je zásadní pro stanovení optimální léčebné strategie.

2.1.1 Klinická diagnostika kolorektálního karcinomu

V rámci anamnézy je kladen důraz především na rodinnou zátěž, exogenní rizikové faktory a obezřetnost je vždy na místě při postižení jednoho a více příbuzných prvního stupně (sourozenci, rodiče), zvláště pokud u nich karcinom vznikl před dosažením věku 50 let. Důležitý je též rozbor obtíží.

Fyzikální vyšetření se provádí včetně vyšetření per rektum. Často nacházíme známky anémie, může být bolestivá palpace břicha či hmatná rezistence v dutině břišní. Zvláště významné je toto vyšetření u tumorů těsně nad anorektální junkcí, které mohou být při endoskopickém vyšetření přehlédnuty.

Endoskopicky lze posoudit vzdálenost nádoru od anu, exulceraci nebo hrozbu akutní obstrukce střeva. Vyšetření musí být celý tračník až do céka. Nelze-li vyšetřit celé střevo pro distálně lokalizovanou stenózu, je nutné vyšetřit celé střevo do céka během operace nebo do šesti měsíců po operaci. Klasická rigidní rektoskopie je prováděna většinou po aplikaci lokální očisty rektu a sigmatu klyzmatem či lépe podáním roztoku sorbitolu (Yal). Podezřelý či nejasný endoskopický obraz lze verifikovat biopsií. Mnohé počínající změny jsou rovněž endoskopicky řešitelné terapeuticky (provedením bezpečné polypektomie s histologickou verifikací stopky či řešením mukosektomií). Nevýhodou kolonoskopie jsou možné komplikace při výkonu, zvláště ve spojení s polypektomií. Dalším faktorem ovlivňujícím výťažnost kolonoskopie je zkušenost endoskopisty, která jednak ovlivňuje procento komplikací, ale stejně tak souvisí i s procentem intervalových karcinomů, tj. karcinomů, které se objevují neočekávaně v intervalu, který by měl být pokryt kolonoskopií. Popisuje se v rozmezí 1,8–9,2 % cílové populace a jeho příčiny jsou: inkompletní odstranění polypu 2,4–26 % v místech po předchozím odstranění

polypu, špatná přehlednost střeva při endoskopickém vyšetření, např. při špatném vyprázdnění (přehlédnutí polypu) a odlišné biologické vlastnosti charakterizované rychlým růstem u plochých lézí s mikrosatelitovou instabilitou, CIMP fenotypem v oblasti pravého tračníku (14–16). K posouzení hloubky postižení stěny a často i vztahu tumoru k okolním strukturám v oblasti rekta je s úspěchem používána transrektální endosonografie (TRUS).

Mezi radiologické metody, které se využívají v diagnostice KRK, patří ultrazvuk (UTZ), výpočetní tomografie (CT – computed tomography), virtuální kolonoskopie (CT kolonoskopie CTC nebo MR kolonoskopie CMR) a magnetická rezonance (MR). Ultrazvuk nebo CT vyšetření břicha a pánve umožní diagnostikovat jaterní metastázy a zvětšené lymfatické uzliny. K vyloučení plicních metastáz je nutné provedení CT plic a mediastina. Vyšetření CT můžeme provádět jako CTC, což dnes v rámci screeningu i v diagnostice představuje alternativu kolonoskopie (17). Vyšetření CT je málo vhodné pro diagnostiku a staging karcinomu rekta. Využití multidetektorových CT přístrojů umožňuje vedle cíleného stagingu onemocnění (především stadium N a M) provádět tzv. celotělové vyšetření. Standardem vyšetření jater je zatím stále CT snímání s násobnými řezy (multislice CT vyšetření) s intravenózním podáním jodové kontrastní látky. Provedení podle standardů umožní hodnotit jaterní parenchym v několika fázích sycení kontrastní látkou. Správně provedeným vyšetřením dosahujeme 74,8% senzitivity a 95,6% specificity (18). Vyšetření pomocí MR tlustého střeva (MRC) je i ve světě dostupné jen na vybraných pracovištích. Senzitivita lézí větších než 5 mm se přibližuje kolonoskopii. V budoucnosti je možné očekávat častější využití MRC zejména u pacientů ohrožených vysokými radiačními dávkami při častém screeningu (ulcerózní kolitida, familiární polypózy). Magnetická rezonance dnes představuje standard ve stagingu karcinomu rekta (stadium T). Vedle nativního vyšetření využíváme celou škálu kontrastních látek (tkáňově specifické, nespecifické a smíšené). Senzitivita vyšetření u ložiskových procesů jater tak dosahuje 81–98 % a jeho specificita 97,2 % (18,19). Zvláštní pozornost je třeba věnovat vyšetření nádorů v oblasti konečníku. Přesná diagnostika rozhoduje o indikaci předoperační (neoadjuvantní) terapie a o charakteru resekčního výkonu. Typ operace je pro kvalitu života zásadní. Jde o amputaci konečníku či resekci s anastomózou. Obraz o lokálním nálezu nádoru v oblasti konečníku přinese rektoskopie či kolonoskopie. Hloubku invaze nádoru, postižení stěny rekta, eventuálně postižení pararektálních lymfatických uzlin lze posoudit transrektální endosonografií (TRUS – transrectal ultrasonography). Podobnou informaci nám přinese také MR pánve. Toto vyšetření je zvláště vhodné u fixovaných nádorů. Orientovat se dá také v této lokalizaci podle CT vyšetření pánve.

Ultrazvukové vyšetření s použitím specifické kontrastní látky (CEUS – contrast-enhanced ultrasound) a peroperační vyšetření jater ultrazvukem má 98% senzitivitu i specificitu a tyto metody jsou v diagnostice ložiskových procesů jater obecně považovány za standard (20).

Laboratorně je sledován karcinoembryonální antigen CEA (carcinoembryonic antigen) jako hlavní marker, jehož senzitivita je 50–60 % a specificita 90% (21) a CA 19-9 jako doplňkový marker.

V případě nejasného nálezu nebo k doplnění stagingu je vhodné provést CT vyšetření pomocí pozitronové emisní tomografie (PET/CT) se senzitivitou 93,8% a specificitou 98,7% (18). Role FDG-PET stoupá u pacientů s rozsáhlejším postižením jater v případě, že je zvažována kurativní resekce. V tomto případě odhalení extrahepatického postižení FDG-PET změní terapeutický plán až ve 20–30 % pacientů, zabrání chirurgické intervenci u více než 10 % pacientů (22).

Další doplňující vyšetření: při nálezu hematurie, při urologické symptomatologii nebo při podezření na šíření nádoru mimo konečník podle zobrazovacích metod se provádí urologické vyšetření, u žen je nezbytné gynekologické vyšetření. Před stanovením léčebné strategie je nezbytná předoperační biopsie.

2.1.2 Histopatologická klasifikace kolorektálního karcinomu

V České republice se užívá v současné době TNM klasifikace dle UICC (Union for International Cancer Control), 7. vydání (23), kde T = lokální pokročilost nádoru, míra prorůstání nádoru stěvnou (T1–4), N = postižení mízních uzlin (N0–2), M = přítomnost vzdálených metastáz (M0–1).

Součástí klasifikace je vyjádření stupně diferenciací nádoru, jež se označuje jako grading, přičemž grade nabývá hodnot 1 až 4. Po ukončení operační léčby je histopatologický nález doplněn také hodnocením radikality léčby. Jako stav R0 se hodnotí kompletní odstranění nádoru bez prokázaných blízkých nebo vzdálených metastáz, stav R1 znamená přítomnost mikroskopických reziduí nádoru, stav R2 makroskopicky prokázaný reziduální nádor.

TNM klasifikace a na jejím základě stanovení klinického stadia je naprosto zásadní pro plánování onkologické léčby. Bez znalostí klinického stadia nelze optimalizovat individuální léčebný postup.

2.1.3 Korelace klinického stadia s výsledkem léčby

Kolorektální karcinom je často diagnostikován ve fázi pokročilého onemocnění. V roce 2014 byl diagnostikován KRK jako lokálně pokročilé onemocnění stadium III ve 24 % a metastatické stadium IV v 18 % případů (1), čímž je limitována prognóza onemocnění. V letech 2008–2011 v ČR dosahovalo pětileté přežití celkově 62 % pacientů s KRK, přičemž pro jednotlivá stadia se tento údaj významně lišil: stadium I 90 %, II 77 %, III 58 % a logicky s nejhorší prognózou bylo spojeno IV. klinické stadium s pětiletým přežitím pouze ve 14,5 % (24).

Současně se zhoršující se prognózou pokročilejších stadií onemocnění narůstají také náklady na léčbu: stadium I a II řešené pouze chirurgicky s průměrnými náklady 31 000 Kč při hemikolektomii či resekci sigmatu a 67 000 Kč při nízké resekci rekta (25), stadium III chirurgicky (31 000 až 67 000 Kč) plus zajišťovací adjuvantní chemoterapie na bázi fluoropyrimidinů 21 000 Kč (kapecitabin

6 měsíců léčby) (26) až po nejhorší variantu, což představuje IV. klinické stadium léčené chirurgicky – metastasektomie 45 000 Kč (25) a v případě léčby chemoterapií na bázi fluoropyrimidinů s oxaliplatinou či irinotekanem v kombinaci s biologickou léčbou 30 000 až 55 000 Kč za 1 cyklus v intervalu 2 týdny, takže léčba 6 měsíců představuje náklady 350 000 až 600 000 Kč (27). Zatímco ve stadiu I a II pacient není chemoterapii vystaven vůbec, u stadia III absolvuje pouze 6měsíční zajišťovací léčbu. Ve stadiu IV absolvuje chemoterapii s cílenou léčbou či bez ní ve 3, někdy i 4 liniích léčby, což představuje v těchto příznivějších variantách onemocnění léčbu s různými přerušeními i několik let. Kromě nákladů na farmakoterapii narůstají u IV. klinického stadia i náklady na další výkony aplikované v rámci multimodální léčby: chirurgické řešení metastáz (anatomické či extranatomické metastasektomie), ablační metody (radiofrekvenční ablace, mikrovlnná ablace), stereotaktická radiochirurgie. Zapojení těchto léčebných modalit společně se systémovou léčbou stále může konvertovat inoperabilní metastatické onemocnění v radikálně resekovatelné.

2.1.4 Screening kolorektálního karcinomu

Časná diagnostika vede k lepším léčebným výsledkům, a tedy i lepší prognóze pacientů s KRK. Proto je věnováno maximální úsilí časně detekci onemocnění u asymptomatických pacientů. Screening KRK (28) byl v ČR zahájen na počátku roku 2009, přičemž původně používanou metodou byl guajakový test na průkaz okultního krvácení do stolice. Následně došlo k optimalizaci programu zavedením screeningové kolonoskopie a imunochemických testů na okultní krvácení. U jedinců ve věku 50–54 let je nabízena možnost testu okultního krvácení do stolice (TOKS) v jednoročním intervalu. V případě pozitivního nálezu je indikována screeningová kolonoskopie. Pokud je výsledek kolonoskopického vyšetření negativní, screeningový program je na 10 let přerušen. U jedinců ve věku 55 let a více jsou dvě možnosti postupu, opakované vyšetření okultního krvácení v intervalu 2 roky či primární screeningová kolonoskopie jako alternativní metoda testu v intervalu 10 let. Od roku 2014 bylo zahájeno adresné zvaní k vyšetření v rámci tohoto programu. Pro osoby s pozitivní osobní či rodinnou anamnézou rizika KRK jsou vypracovány individuální dispenzární programy, které se liší dle stupně rizika. Screening KRK je realizován prostřednictvím praktických lékařů, v případě žen navíc i registrujícími gynekology. Jak vyplývá z výsledků adresného zvaní, již v průběhu prvního roku, tj. za rok 2014, došlo k nárůstu počtu vyšetřených klientů v rámci cílové populace ve věku nad 50 let z 27 % (2013) na 32 % (2014). Je potřeba si uvědomit, že screeningový program KRK umožňuje i léčbu přednádorových stavů. V období let 2006–2015 bylo provedeno v rámci screeningu 170 814 kolonoskopií s odstraněním 58 826 adenomů a se záchytem 6 087 nádorů KRK (28).

2.1.5 Aktuální stav individualizace léčby kolorektálního karcinomu

Aktuální doporučení pro individualizovanou léčbu obecně vychází z klinického stadia onemocnění a celkového stavu pacienta včetně komorbidit a komedikací. Musí zohledňovat přání pacienta na

základě očekávaných výsledků léčby. Z molekulárněbiologických markerů pro individualizaci léčby KRK se v současné době v klinické praxi používá:

- **stanovení mikrosatelitové nestability (MSI-H)** při indikaci adjuvantní chemoterapie u II. klinického stadia KRK,
- **stanovení mutace KRAS/NRAS a BRAF** při indikaci léčby monoklonálními protilátkami proti receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v případě metastatického KRK.

Adjuvantní chemoterapie je standardem léčby u rizikových pacientů II. klinického stadia KRK. Jako vysoké riziko jsou označovány případy, kdy je přítomen alespoň jeden z následujících znaků: pT4, vyšetření patologem méně než 12 uzlin, nízký stupeň diferenciacce (G3 a více), přítomnost vaskulární, lymfatické či perineurální invaze, diagnostika nádoru ve fázi perforace či obstrukce. Na základě studie QUASAR a metaanalýzy 12 randomizovaných studií, kde kontrolním ramenem byla pouze chirurgická léčba, adjuvantní chemoterapie zlepšila výsledky léčby jak v parametru přežití 5 let, tak i doby do progresu (29,30). Mikrosatelitová nestabilita (MSI-H) je příznivým prognostickým markerem a současně negativním prediktorem adjuvantní chemoterapie na bázi 5-FU pro II. stadium onemocnění KRK (31–33) (viz tab. 1). V klinické praxi bylo zkoušeno několik multigenových panelů pro individualizaci léčby časných stadií KRK: *Oncotype DX colon cancer assay, ColoPrint, ColDx*. Všechny tyto testy byly validovány retrospektivně na řadě prospektivně vedených klinických studií, nicméně jejich přínos je v kvantifikaci rizika relapsu KRK a nelze na základě výsledků predikovat benefit adjuvantní chemoterapie u časného stadia KRK, a proto se tyto testy rutinně v praxi nepoužívají.

Tab. 1. Efekt adjuvantní chemoterapie MSI-H vs. MSS/MSI-L u stadia II a III (31).

Analýza	Počet pacientů	OS 5 let %	p	DFS 5 let %	p
bez FUFA	287				
MSS/MSI-L	245	68,4	0,004	58,7	0,004
MSI-H	42	88		82,9	
FUFA	283				
MSS/MSI-L	230	75,5	0,66	69,8	0,85
MSI-H	53	70,7		69,3	

FUFA = fluorouracil a leukovorin, MSS/MSI-L = mikrosatelitová stabilita či nízká nestabilita, OS 5let = přežití 5 let

V případě pokročilého, primárně neresekabilního, metastatického kolorektálního karcinomu je standardem systémová chemoterapie, eventuálně v kombinaci s cílenou léčbou. Pokud jsou zvažovány k léčbě protilátky proti EGFR (cetuximab, panitumumab), je předem nutné vyloučení mutací KRAS a NRAS. Jak vyplývá z výsledků studií PRIME i CRYSTAL, negativním prediktorem léčebné odpovědi na EGFR inhibitory v kombinaci s chemoterapií v první linii léčby metastatického kolorektálního karcinomu (mKRK) je mutace RAS (mutace KRAS v exonu 2, v exonu 3 a 4 KRAS, v exonech 2, 3 a 4 NRAS) (34–36).

Mutace BRAF (V600E) je dalším negativním prognostickým faktorem v případě mKRK. Postupně přibývají výsledky podporující i jeho negativní prediktivní význam pro anti-EGFR terapii v pozdějších liniích léčby mKRK. Prediktivní význam mutace BRAF v první linii zatím není jednoznačný. Ve studii PRIME byla hodnocena efektivita léčebného režimu FOLFOX s nebo bez kombinace s panitumumabem (34). Při analýze subpopulace pacientů s mutací BRAF (mtBRAF) nebyl v této studii zaznamenán benefit z kombinované léčby ani v parametru mediánu přežití (mOS) ani mediánu doby do progresu (mPFS) (37). Oproti tomu, ve sdružené analýze studií CRYSTAL a OPUS byl u podskupiny pacientů s mtBRAF prokázán benefit z kombinace chemoterapie s cetuximabem (38). Nejlepší výsledky léčby mKRK s mtBRAF však byly dosaženy u pacientů léčených intenzifikovanou chemoterapií (triplet FOLFOXIRI) v kombinaci s bevacizumabem v rámci studie TRIBE (39). Výsledky studií shrnuje tab. 2.

Tab. 2. Efektivita léčebných režimů u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem vzhledem k mutaci v onkogenu BRAF.

wtRAS/wtBRAF	PRIME (37)		CRYSTAL/OPUS (38)		TRIBE (39)	
	<i>Pan/FOLFOX</i>	<i>FOLFOX</i>	<i>Cet/CHT</i>	<i>CHT</i>	<i>Bev/FOLFOXIRI</i>	<i>Bev/FOLFIRI</i>
mOS (m)	28,3	20,9	24,8	21,1	41,7	33,5
mPFS (m)	10,8	9,2	10,9	7,7	13,7	12,2
wtRAS/mtBRAF	<i>Pan/FOLFOX</i>	<i>FOFOX</i>	<i>Cet/CHT</i>	<i>CHT</i>	<i>Bev/FOLFOXIRI</i>	<i>Bev/FOLFIRI</i>
mOS (m)	10,5	9,2	14,1	9,9	19	10,7
mPFS (m)	6,1	5,4	7,1	3,7	7,5	5,5

Pan = panitumumab, Cet = cetuximab, CHT = chemoterapie FOLFIRI či FOLFOX, Bev = bevacizumab

Významným hlediskem v procesu rozhodování o léčebné strategii je *pohled a přání pacienta*, které bude vycházet z reálného cíle léčby, ale bude ovlivněno také spektrem vedlejších nežádoucích účinků léčby, kvalitou života během léčby, domácím zázemím pacienta apod.

2.1.6 Doporučení pro individualizaci léčby metastatického kolorektálního karcinomu

Aktuální ESMO doporučení zohledňuje reálný cíl léčby, kterým může být zmenšení nádoru s cílem následné resekce či jen rychlého ústupu symptomů onemocnění nebo stabilizace onemocnění. Dalším faktorem je právě molekulární charakteristika nádoru: relevanci má mutační statut genů RAS a BRAF (jejich mutovaná vs. nemutovaná, tzv. wild-type varianta (wt RAS vs. mtRAS, wtBRAF vs. mtBRAF)).

U pacientů s cílem maximální regrese nádoru v případě:

- wtRAS/wtBRAF je doporučena dvojkombinace chemoterapie s anti-EGFR protilátkou v první linii léčby nebo trojkombinace FOLFOXIRI v kombinaci s bevacizumabem.
- mtRAS je doporučena dvojkombinace či trojkombinace chemoterapie v kombinaci s bevacizumabem
- mtBRAF je doporučena trojkombinace FOLFOXIRI s bevacizumabem

U pacientů s cílem stabilizace onemocnění v případě:

- wtRAS/wtBRAF je doporučena dvojkombinace chemoterapie s anti-EGFR protilátkou či bevacizumabem
- mtRAS je doporučena dvojkombinace chemoterapie s bevacizumabem
- mtBRAF je doporučena trojkombinace chemoterapie s bevacizumabem či bez něj

2.1.7 Závěr

KRK je jedním z nejčastějších nádorů u mužů i žen v naší populaci. I když pokroky v diagnostice KRK jsou značné, stále relativně velká část pacientů je diagnostikována ve IV. stadiu, tedy ve stadiu, kdy jsou již přítomny vzdálené metastázy. Tento fakt velmi zhoršuje prognózu těchto pacientů (pětileté přežití dosahuje pouze 14,5 %) a současně významně zvyšuje náklady na jejich léčbu. S ohledem na tyto skutečnosti je nutné vyvinout maximální úsilí s cílem zdokonalit časnou diagnostiku KRK a také zlepšit léčebné výsledky u pacientů s pokročilým onemocněním. Tato cesta začíná od zvýšení účasti ve screeningovém programu (dostupnost, informovanost) přes další rozvoj

molekulární diagnostiky, především časná detekce kolorektálního karcinomu a predikce léčebné odpovědi.

2.2 Standardní léčebné postupy

2.2.1 Strategie léčby časných stadií kolorektálního karcinomu

Pro časná stadia onemocnění je základní léčebnou modalitou chirurgická resekce, která je či není dle klinického stadia onemocnění zajištěna adjuvantní chemoterapií. Podle doporučení Evropské onkologické společnosti (ESMO) (21) je indikována adjuvantní chemoterapie pro klinická stadia pT2-pT4, pN1-pN2, M0, tedy pro klinické stadium II a III. Cílem adjuvantní chemoterapie je zničení mikrometastáz po kurativní chirurgické resekci. 5-fluorouracil v modulaci leukovorinem (FUFA) či monoterapie kapecitabinem je standardním doporučovaným schématem v této indikaci. Adjuvantní aplikace chemoterapie FUFA v případě III. klinického stadia prokazatelně vedla k 10–20% snížení rizika úmrtí pacientů.

V případě klinického stadia II nejsou výsledky adjuvantní chemoterapie tak přesvědčivé a na základě klinických studií je doporučována pouze pro pacienty s vysokým rizikem. Pokud je zvažována adjuvantní chemoterapie FUFA ve II. klinickém stadiu, je vhodné molekulární vyšetření mikrosatelitové instability (MSI), resp. proteinů zapojených do MMR (mismatch repair, oprav špatného párování bázi) v nádorové tkáni. Pacienti II. klinického stadia s defektem MMR (tedy MSI-H) nemají prospěch z adjuvantní chemoterapie na bázi 5-fluorouracilu (31,32,42–44). Adjuvantní chemoterapie je doporučována po dobu 6 měsíců, její prodloužení nepřináší další benefit.

V adjuvantní indikaci byla také zkoušena cytostatika nové generace (irinotekan, oxaliplatin) v kombinaci s FUFA. Irinotekan v kombinaci s bolusovou aplikací FUFA (IFL) měl při srovnatelné efektivitě s FUFA větší procento neutropenií, febrilních neutropenií a úmrtí. Oxaliplatin v studii MOSAIC (45), kde byla testována kombinace oxaliplatin s kontinuálním režimem FUFA (FOLFOX 4), prokázala redukci relapsů onemocnění o 26 %. Rozdíl mezi FUFA s kontinuální aplikací a chemoterapií FOLFOX4 byl ve prospěch kombinace s oxaliplatinou tím větší, čím pokročilejší bylo stadium onemocnění. Pro klinické stadium II byl benefit minimální (3,5 %), pro stadium III 8,6 %, přičemž pro N1 byl 7,2 % a pro N2 až 11,2 %. Šestileté přežití pro stadium III bylo 72,9 % ku 68,7 % ve prospěch režimu FOLFOX. Výsledky byly potvrzeny i v další analýze, kde desetileté přežití bylo s benefitem v rameni s oxaliplatinou 59 % ku 67 %, HR 0,8 p = 0,016 (46). Obdobné výsledky ve prospěch režimu s oxaliplatinou měla studie srovnávající chemoterapii FUFA (fluorouracil/leukovorin, bolusová aplikace 1x týdně – režim Rosswel Park) proti FUFA s přidáním oxaliplatin (FLOX). Pětileté bezpříznakové přežití bylo dosaženo v 64,4 % ku 69,4 % ve prospěch režimu s oxaliplatinou (47). Možnou záměnu 5-fluorouracilu za kapecitabin potvrdila studie X-ACT,

kde kapecitabin potvrdil srovnatelnou efektivitu a příznivější profil vedlejších nežádoucích účinků (48).

Naopak irinotekan v žádné studii dosud neprokázal benefit nad standardní chemoterapií FUFA, tj. ani v režimu IFL či FOLFIRI, a není tedy standardem pro adjuvantní chemoterapii (CALGB, PETTAC 3) (49,50). Přínos kombinované cílené léčby a chemoterapie v adjuvantní indikaci byl zkoušen v rámci řady klinických studií – bevacizumab (NSABP C-08, AVANT) (51,52), cetuximab (N0147, PETACC-8) (53). Ani následné subanalýzy studie PETTAC-8 zaměřené na hodnocení pacientů s wtKRAS neprokázaly benefit v této indikaci (54). Výsledky byly podobné, tedy efektivita cílené léčby v adjuvantní indikaci nebyla prokázána v případě bevacizumabu a ani cetuximabu. Proto není cílená léčba standardem v adjuvantní terapii.

2.2.2 Strategie léčby pokročilého kolorektálního karcinomu

Metastatický kolorektální karcinom je značně heterogenní nozologická jednotka. Odpověď nádoru na léčbu a jeho celková prognóza je ovlivněna řadou faktorů, mezi něž patří například výkonnostní stav pacienta před zahájením léčby, komorbidity, ale především celkový rozsah metastatického postižení, a v neposlední řadě také biologické vlastnosti nádoru.

Současná doporučení ESMO rozdělují strategii léčby dle celkového *stavu pacienta na „fit“ a „unfit“*. Tomuto dělení odpovídají možnosti intenzivní onkologické léčby – triplet či doublet chemoterapie v kombinaci s cílenou léčbou s cílem konverze primárně resekabilního onemocnění v R0 resekabilní nebo naopak sekvenční podání cytostatika v monoterapii s cílem dosažení dlouhodobé stabilizace onemocnění při minimální toxicitě léčby a nejlepší kvalitě života.

Rozsah metastatického postižení a dělení z pohledu možnosti radikální chirurgické resekce na primárně resekabilní, hraničně resekabilní či inoperabilní onemocnění je dalším prognostickým faktorem. Nejlepší prognózu mají pacienti, u nichž je metastatický proces omezen výlučně na játra, nejhorší pak mají pacienti s multiorgánovým metastatickým postižením a/nebo s karcinomatózou peritonea. Zatímco k výlučně jaternímu postižení dochází zhruba u 20–30 % pacientů s mKRK, dalších přibližně 60 % pacientů má kromě jaterního postižení též plicní anebo uzlinové metastázy. Zbývajících zhruba 20 % nemocných s mKRK má pouze mimojaterní metastatické postižení jednoho nebo více orgánů. Reálným cílem léčby pacientů s limitovaným počtem metastáz je možnost vyléčení:

- v případě solitární metastázy primární R0 resekce nebo perioperační podání systémové chemoterapie před a po kurativní resekci metastáz,
- v případě většího počtu metastáz (do 5 ložisek) i v případě primárně resekabilního nálezu je preferovaná neoadjuvantní chemoterapie s následným resekčním výkonem.

Hranice možností chirurgické resekce se s pokrokem v operativě a s pokrokem v oblasti peroperačních, ale i perkutánních ablativních metod (radiofrekvenční či mikrovlnná ablace, stereoaktická radiochirurgie) značně posouvají. Individuální kombinace těchto metod je možná pouze v komplexních onkologických centrech, kde plánování léčebné strategie probíhá na úrovni multioborových týmů, jejichž základ tvoří onkochirurg, radiolog či intervenční radiolog, klinický onkolog a radiační onkolog, případně patolog.

V případě R0 radikálně resekovatelného metastatického onemocnění jsou dvě možnosti: resekce u pacientů se solitární metastázou přímo či v kombinaci s perioperační chemoterapií. Obvykle se podávají 3 měsíce chemoterapie FOLFOX, následuje operace a poté další 3 měsíce pooperační chemoterapie FOLFOX na základě studie EPOC (55). Aktualizované výsledky 5letého přežití byly 51 % ku 48 % ve prospěch kombinované léčby. Přidání cetuximabu do kombinace s chemoterapií neprokázalo signifikantní benefit ani v případě pacientů s wtKRAS metastatickým onemocněním (56).

Pacienti s radikálně inoperabilním onemocněním jsou kandidáty systémové chemoterapie na bázi 5-fluorouracilu, oxaliplatinu, irinotekanu s cílenou léčbou či bez ní. Chemoterapeutické režimy oxaliplatinu/5-fluorouracil/leukovorin (FOLFOX) (57) či irinotekan/5-fluorouracil/leukovorin (FOLFIRI) (58) mají srovnatelnou efektivitu (59,60) a v obou případech je možné 5-fluorouracil/leukovorin substituovat kapecitabinem (XELOX, XELIRI) (61,62). U pacientů v dobrém celkovém stavu můžeme použít i trojkombinaci chemoterapie oxaliplatinu/5-fluorouracil/leukovorin/irinotekan (FOLFOXIRI) (63).

2.2.2.1 Anti-angiogenní strategie léčby

Cílená léčba bevacizumabem prokázala benefit pouze v kombinaci se systémovou chemoterapií, a to jak v bolusových režimech (64,62), tak kontinuálních režimech na bázi oxaliplatinu (61,65) a irinotekanu (BFOL, IFL, FOLFOX/XELOX, FOLFIRI/XELIRI, FOLFOXIRI) (39). Chemoterapie na bázi irinotekanu (dvojkombinace IFL, FOLFIRI) v kombinaci s bevacizumabem dosahuje 53–58 % objektivních léčebných odpovědí (ORR), s mPFS 8,4–11,2 měsíce a mOS 19,2 měsíce pro bolusový režim IFL, pro kontinuální režim nebylo v době hodnocení dosaženo (62). Chemoterapie na bázi oxaliplatinu (dvojkombinace FOLFOX, XELOX) v kombinaci s bevacizumabem dosahuje 38% ORR, s mPFS 9,3 měsíce a mOS 21,3 měsíce (65). Kombinace chemoterapie a VEGF inhibitorů (bevacizumab, aflibercept) prokázala efekt i ve II. linii léčby (66,67). Ve III. linii léčby prokázal efekt ve srovnání s nejlepší podpůrnou léčbou multikinázový inhibitor regorafenib (68). Ramucirumab (69) jako další VEGF inhibitor nemá v České republice zatím schválenou úhradu.

2.2.2.2 *Anti-EGFR strategie léčby*

V léčbě pokročilého KRK se používají 2 monoklonální protilátky cílené proti EGFR – cetuximab a panitumumab. Jejich použití v kombinaci s chemoterapií či v monoterapii je vázáno na vyloučení mutované varianty onkogenů RAS (70). Obě monoklonální protilátky prokázaly efektivitu v kombinaci s chemoterapií na bázi oxaliplatinu a irinotekanu (FOLFOX, FOLFIRI) v I. linii léčby (34,36,71) stejně jako ve II. linii (72). Ve III. linii léčby se většinou používají jen v monoterapii a i v této indikaci mají srovnatelnou účinnost (74).

V současné době nejúčinnější léčebné režimy pro metastatický KRK vycházejí z kombinované chemoterapie a cílené léčby. Kombinovaná chemoterapie FOLFIRI v kombinaci s cetuximabem u pacientů s wtRAS dosahuje ve studii CRYSTAL 66% ORR, mPFS 11,4 měsíce a mOS 28,4 měsíce. Pro subpopulaci pacientů wtRAS/wtBRAF byly výsledky ORR 71 %, mPFS 12 měsíců a mOS 29 měsíců (35). Kombinovaná chemoterapie FOLFOX ve studii PRIME dosahuje u pacientů s wtRAS ORR 60 %, mPFS 10,1 měsíce a mOS 25,8 měsíce. U subpopulace pacientů s wtRAS/wtBRAF byl mPFS 10,8 měsíce a mOS 28,3 měsíce (34). Mezi nejúčinnější režimy patří i triplet na bázi oxaliplatinu a irinotekanu FOLFOXIRI, který prokázal ve studii TRIBE ORR 65 %, mPFS 12,1 měsíce a mOS 31 měsíců. U subpopulace wtRAS/wtBRAF dosahoval mOS 41,7 měsíce a u mtBRAF mOS 19 měsíců, což je v současné době nejlepší efektivita systémové léčby (39,77).

Léčebné kombinace chemoterapie s cílenou léčbou byly konfrontovány za srovnatelných podmínek ve třech klíčových klinických studiích: FIRE III (76), PEAK (77) a CALGB (78) (shrnutí v tab. 3). Ve studii FIRE srovnávající chemoterapii FOLFIRI v kombinaci s cetuximabem či bevacizumabem bylo dosaženo v populaci pacientů s wtRAS ORR 66 % ku 60 %, mPFS 10,4 ku 10,2 měsíce, mOS 33,1 ku 25,6 měsíce. Primárním cílem studie bylo srovnání v parametru mPFS, což potvrzuje srovnatelnost obou režimů, následný benefit v parametru mOS bude mít pravděpodobně souvislost se sekvenční terapií. Obdobný výsledek byl ve studii PEAK srovnávající chemoterapie v kombinaci s panitumumabem či bevacizumabem, ORR 64 % ku 61 %, mPFS 13,0 ku 10,1 měsíce a mOS 41,3 měsíce ve prospěch kombinace s panitumumabem. Ve studii CALGB/SWOG 80405 bylo dosaženo srovnatelných výsledků v mPFS 10,4 a 10,8 měsíce, stejně jako mOS 32,5 ku 31,2 měsíce u pacientů léčených chemoterapií (rozhodnutí onkologa) v kombinaci s cetuximabem či bevacizumabem. Efektivita chemoterapie narůstá, nicméně stále velká část pacientů z léčby nemá benefit nebo vykazuje významnou toxicitu. Proto je třeba hledat další prediktivní biomarkery kromě RAS a BRAF s cílem léčbu více individualizovat, a dosáhnout tak ještě lepších léčebných výsledků.

Tab. 3. Srovnání výsledků klinických studií FIRE III, PEAK a CALGB.

	STUDIE FIRE III		STUDIE PEAK		STUDIE CALGB	
	RAS-wt		RAS-wt		RAS-wt	
	Cet + FOLFIRI N = 171	Bev + FOLFIRI N = 88	Bev + FOLFOX N = 82	Pani + FOLFOX N = 142	Beva + CHT N = 163	Pani + CHT N = 177
ORR %	66	64	61	58	54	69
mPFS, (95% CI)	10,4 m (9,5–12,2)	13,0 m (10,9–15,1)	10,1 m (9,0–12,7)	10,9 m (9,7–12,8)	11 m (9,5–13,1)	11,3 m (9,4–13,1)
PFS HR (95% CI),	0,93 (0,74–1,17), p = 0,54		0,66 (0,46–0,95), p = 0,025		1,1 (0,9–1,4), p = 0,3	
mOS, (95% CI)	33,1 m (24,5–39,4)	41,3 m (28,8–41,3)	28,9 m (23,9–31,3)	34,2 m (26,6–NR)	29 m (24–32,8)	32,5 m (26,1–40,4)
OS HR (95% CI),	0,70 (0,53–0,92), p = 0,011		0,63 (0,39–1,02), p = 0,058		0,86 (0,6–1,1), p = 0,2	

ORR % = objektivní léčebná odpověď, mPFS = medián doby do progresu, mOS = medián přežití, Pani = panitumumab, Cet = cetuximab, CHT = chemoterapie FOLFIRI či FOLFOX, Bev = bevacizumab

Vlastní přínos k problematice

V oblasti onkologické léčby mKRK jsme se zaměřili na alternativy standardních možností systémové léčby a hodnocení efektivity a toxicity léčby v různých liniích léčby inoperabilního metastatického onemocnění.

V první práci „*Chemoterapie raltitrexed a oxaliplatinu ve druhé linii léčby metastického kolorektálního karcinomu předléčeného kombinací fluorouracil/leukovorin ± irinotekan*“ publikované v roce 2003 v Klinické onkologii (79) (viz Příloha 7.1.1.) jsme hledali alternativu léčby ke standardnímu režimu na bázi oxaliplatinu v kombinaci s kontinuální aplikací 5-fluorouracilu (FOLFOX) či kapecitabinem (XELOX). Režimy FOLFOX i XELOX jsou dodnes standardními režimy. Zatímco režim FOLFOX vyžaduje kontinuální aplikaci 5-fluorouracilu 48 hod v intervalu 2 týdny současně s oxaliplatinou, tak XELOX podávání perorálního kapecitabinu 2.–15. den cyklu s aplikací oxaliplatinu v 1. den cyklu v intervalu 3 týdny. Oba režimy mají dobře popsání spektrum vedlejších nežádoucích účinků. Kromě leukopenie a neutropenie jsou v klinické praxi známy také stenokardie způsobené spazmem koronárních tepen. Tyto vzácně se vyskytující, ale klinicky závažné vedlejší účinky neumožňují u pacientů se symptomy pokračovat v léčbě. Velmi dobrou alternativou ke kontinuální aplikaci 5-fluorouracilu či kapecitabinu bez zmíněného vedlejšího účinku je dodnes

ratitrexed (Tomudex). Kombinace ratitrexedu a oxaliplatiny (TOMOX) je také velmi pohodlnou možností léčby, protože oba preparáty jsou aplikovány v krátkodobé infuzi jedenkrát za 3 týdny bez nutnosti užívání jiné medikace v meziobdobí. TOMOX se tedy jevil velmi komfortním režimem jak z pohledu pacienta a ambulantní léčby v intervalu 3 týdny, tak spektrem nežádoucích účinků. Primárním cílem studie bylo vyhodnocení účinnosti kombinace raltitrexed + oxaliplatina jako chemoterapie druhé linie u pacientů s metastatickým KRK, sekundárním cílem pak vyhodnocení celkového přežití, času do progresu a toxicity režimu. Zařazeno bylo 58 pacientů, WHO PS 0–2, z 54 vyhodnotitelných pacientů byla zaznamenána ORR 26 %, stabilizace onemocnění (SD) bylo dosaženo u 65 % léčených pacientů. Medián času do progresu onemocnění byl 5,9 měsíců. Léčba byla dobře tolerována, toxicita 3. nebo 4. stupně (NCI-CTC kritéria) se vyskytla u 8 pacientů. Z nejčastějších nežádoucích účinků se vyskytovala periferní neuropatie, nauzea, zvracení a hematologická toxicita stupně 1 a 2. Přímé srovnání standardů léčby (FOLFOX, XELOX) s režimem TOMOX nebylo cílem naší studie, nicméně jak dokládají následné publikace srovnávající efekt v první linii léčby, je efektivita režimů srovnatelná (80,81).

Zavedení klinických registrů nákladné cílené léčby umožňuje retrospektivně vyhodnocovat výsledky léčby a její toxicitu v rámci České republiky, navíc v podmínkách každodenní klinické praxe a nepřímo tato data srovnávat s výsledky registračních studií. V práci *„Efficacy and toxicity of bevacizumab on combination with chemotherapy in different lines of treatment for metastatic colorectal carcinoma“* jsme zkoumali efektivitu a vedlejší účinky léčby napříč liniemi léčby kombinací chemoterapie s bevacizumabem (82) (viz Příloha 7.1.2.). Naše výsledky na souboru 4 487 pacientů dokládají efektivitu a dobrou toleranci bevacizumabu v léčbě metastatického KRK dle jednotlivých linií léčby v kombinaci s chemoterapií. Nejlepší výsledky byly logicky v časnějších fázích léčby, tj. mPFS byl v první linii 11,3 měsíce, ve druhé linii 9,5 měsíce a ve 3. a vyšší linii léčby 7,3 měsíce. Stejný trend bylo možné pozorovat v mOS pacientů od zahájení léčby bevacizumabem v jednotlivých liniích, tj. 28,8 ku 25,9 ku 15 měsícům. Všechny tyto výsledky byly pro jednotlivé linie léčby lepší než v registračních studiích a nebyl pozorovaný nárůst toxicity ani neočekávané vedlejší účinky léčby, což podporuje tvrzení, že umíme v našich podmínkách s těmito léky dobře zacházet, počínaje dobrým výběrem pacientů až po management vedlejších účinků léčby.

V další práci *„Bevacizumab with 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin versus bevacizumab with capecitabine and oxaliplatin for metastatic colorectal carcinoma: results of a large registry-based cohort analysis“* jsme srovnávali efektivitu a toxicitu dvou nejčastějších léčebných režimů, FOLFOX a XELOX v kombinaci s bevacizumabem v první linii léčby mKRK (83) (viz Příloha 7.1.3.). Výsledky nepřímého srovnání dat z registru neukázaly žádnou statisticky významnou odchylku v parametrech mPFS 11,4 vs. 11,5 měsíce ($p = 0,337$), mOS 27 vs. 30,6 měsíce ($p = 0,281$). Prokázali jsme srovnatelnou účinnost obou režimů v kombinaci s bevacizumabem. Současně jsme prokázali, že přítomnost vícečetných metastáz a metastatického onemocnění v době stanovení

diagnózy KRK je silným negativním prognostickým faktorem pro celkové přežití bez závislosti na zvolený léčebný režim.

V klinické praxi se relativně často setkáváme se situací, kdy pacienti postupně vyčerpají všechny léčebné možnosti a stále zůstávají ve velmi dobrém celkovém stavu. Jednou z možností další léčby je pokračování v léčbě VEGF inhibitory, kdy pokračování v této strategii prokázalo v kombinaci s chemoterapií velmi dobré výsledky – studie VELOUR, TML, dokonce u pacientů s wtKRAS sekvence léčby chemoterapie/bevacizumab následovaná chemoterapií opět s bevacizumabem dosáhla lepších výsledků než změna ve 2. linii léčby na chemoterapii v kombinaci s EGFR inhibitorem (studie PRODRIGE18-ACCORD 22) (84). Vzhledem k tomu, že bevacizumab v monoterapii neprokázal efektivitu, byly zkoušeny jiné léky v této indikaci s mechanismem účinku založeným na inhibici VEGFR. Jedním z nich je regorafenib, multikinázový inhibitor VEGFR, který prokázal u pacientů s chemorezistentním onemocněním ve studii CORRECT benefit ve srovnání s podpůrnou léčbou (BSC) v parametru mOS 6,4 vs. 5,0 měsíce, $p = 0,0052$ (68), mPFS 1,9 vs. 1,2 měsíce (85). Na základě těchto výsledků byla stanovena dočasná úhrada i v ČR a výsledky z klinické praxe byly opět zaznamenávány do klinického registru, což nám umožnilo analyzovat naše vlastní výsledky léčby (86). V publikaci „*Regorafenib in the Real-Life Clinical Practice: Data from the Czech Registry*“ (viz Příloha 7.1.4.) jsme prokázali téměř dvojnásobné výsledky mOS i mPFS u pacientů léčených v našich podmínkách, mPFS 3,5 měsíce a mOS 9,3 měsíce, což opět potvrdilo správný výběr pacientů k léčbě v našich komplexních onkologických centrech, pro které je úhrada léčby regorafenibem nasmlouvána.

Výsledky léčby metastatického KRK se dlouhodobě zlepšují, což je doprovázeno narůstajícím mPFS a mOS léčených pacientů. Dnes víme, že efekt chemoterapeutických režimů na bázi oxaliplatinu i irinotekanu je srovnatelný. Neustále jsou vedeny diskuze ohledně sekvence cílené léčby v kombinaci s chemoterapií, tedy zda je primárně lepší kombinace chemoterapie bevacizumab následovaná kombinací chemoterapie/protilátka anti-EGFR a opačně. Zkouší se nová léčiva s širším mechanismem účinku. Jedním z nich je Tivozanib, inhibitor pro receptory VEGF 1-3, v perorální formě. Tento lék se dostal až do klinického hodnocení v rámci 1. linie léčby mKRK, kde jsme se jako spoluřešitelé podíleli na studii „*BATON-CRC: A Phase II Randomized Trial Comparing Tivozanib Plus mFOLFOX6 with Bevacizumab Plus mFOLFOX6 in Stage IV Metastatic Colorectal Cancer*“ (87) (viz Příloha 7.1.5.). Přímé srovnání tivozanibu a bevacizumabu v kombinaci s chemoterapií neprokázalo benefit zkoušené kombinace, výsledky byly srovnatelné, tj. mPFS 9,4 vs. 10,7 měsíce, HR = 1,091, $p = 0,706$. Analýza biomarkerů neprokázala benefit v žádném ze sledovaných parametrů. Jedním z možných standardů léčby první linie mKRK zůstává bevacizumab v kombinaci s oxaliplatinou.

Klinické registry léčiv nám umožňují sbírat, následně analyzovat a publikovat data z reálné klinické praxe a srovnat je s registračními studiemi. Kromě již výše uvedených prací k problematice KRK jsem se podílel na publikačních výstupech z registru RENIS, což je registr pro pacienty s metastatickým renálním karcinomem. Publikace studií založené na analýze léčebných výsledků z tohoto registru jsou uvedeny v samostatné příloze (viz Příloha 7.2.)

3 Molekulární taxonomie kolorektálního karcinomu

3.1 Molekulární klasifikace kolorektálního karcinomu

KRK vzniká postupnou akumulací genetických mutací a epigenetických změn. Charakter genetických změn nám umožňuje dělit KRK na dvě hlavní skupiny:

- 75 % sporadických a většina syndromických KRK s výjimkou Lynchova syndromu se vyvíjí cestou **chromozomální instability (CIN)** – charakteristická je progresivní akumulace mutací (APC, RAS, p53). Tyto karcinomy jsou charakterizovány velkými chromozomálními abnormalitami. Iniciální mutace je typická pro tumor supresorový gen APC, který tak ztrácí svou funkci (původní Vogelsteinův model) (54). Mutace v genu APC ovlivňuje Wnt/ β -kateninovou signální dráhu, vede k snížení degradace β -kateninu, dochází k jeho hromadění, což vede k jeho vstupu do jádra a vazbě na jaderné receptory. Důsledkem je stimulace proliferace a růst buňky. Pozdější změny zahrnují mutace K-RAS, SMAD2/SMAD4 a p53 (89).
- 10–15 % sporadických KRK a KRK pacientů s Lynchovým syndromem vzniká na základě ztráty schopnosti opravy špatného párování bází (MMR – mismatch repair) a následně vzniku **mikrosatelitní instability (MSI)**. V patogenezi rozlišujeme MSI-H a MSI-Low. Na funkci MMR systému se podílejí geny jako MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, MLH3, MSH3 nebo PMS1. MSI je spojena jak s hereditární formou (HNPCC), tak i se sporadickou formou KRK (15 %) (90,91).

Epigenetické alterace představují především aberantní **metylace tumor supresorových genů (CIMP)**. Geny, které jsou ovlivněny hypermetylací promotorové oblasti, jsou především APC, MCC, MLH1, MGMT a další (92). Hypermetylace promotorů těchto genů vede k umlčení jejich genové exprese, a tedy jejich inaktivaci jako tumor supresorových genů. CIMP je příčinou cca 15–20 % sporadického KRK. Tumory s CIMP bývají spojeny s přítomností BRAF mutace a MSI-H. Vyskytuje se častěji u žen, starších pacientů a kuřáků. Špatně diferencované a mucinózní tumory vychází nejčastěji z pilovitých (serrated) adenomů pravého tračníku. Jedním z důležitých reparačních genů, k jehož metylaci dochází, je MGMT (O-metylguanin DNA metyltransferáza) (93). Funkcí tohoto DNA reparačního enzymu je především ochraňovat buňky před působením exogenních karcinogenů.

3.1.1 Sporadický kolorektální karcinom

Sporadický karcinom (80–85 % případů) vzniká sekvenční cestou v důsledku postupné akumulace mutací.

- První mutace se obvykle objevuje v genu APC a celý proces vývoje v linii adenom – karcinom trvá 10 až 15 let.
- Jednou z variant sporadického karcinomu jsou nádory, kde vzniká nádor na podkladě jiné mutace, nejčastěji genu TP53 bez předchozí mutace v genu APC.
- Další variantou je vznik karcinomu v zánětlivém terénu, např. u pacientů s idiopatickým zánětem tlustého střeva (IBD), nejčastěji provázené časnou mutací v genech KRAS a BRAF. Vzniká karcinom či pilovité (serátní) adenomy.

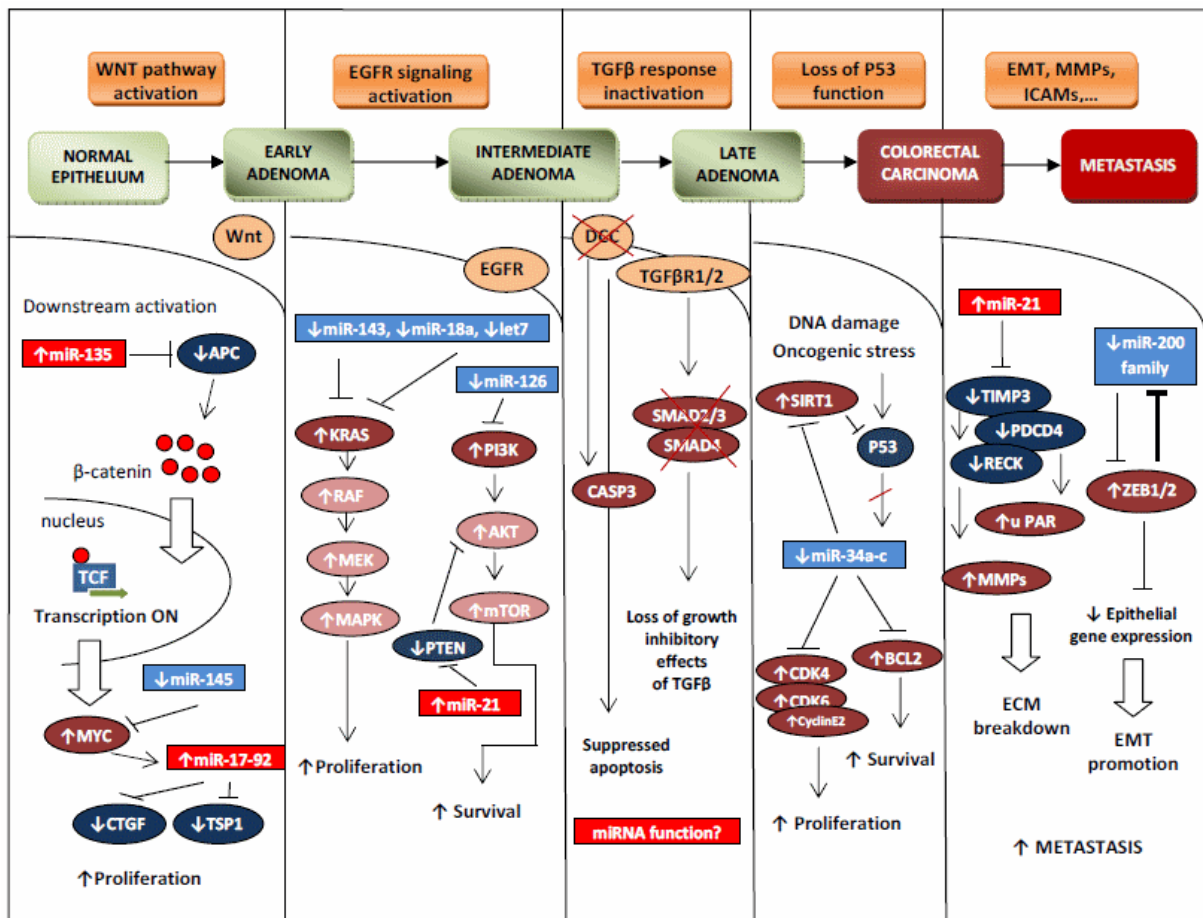
Aktuální model kancerogeneze sporadického KRK popisuje 3 základní cesty:

Tradiční cestou vzniká 60–70 % sporadických KRK, charakteristická sekvence je adenom-karcinom, vede přes prekurzorové léze: aberantní ložiska krypt – adenom s low grade dysplazií (LGD) – adenom s high grade dysplazií (HGD), následovaný vznikem KRK, obvykle s MSS/CIMP-fenotypem (94).

Cestou pilovitých (serrated) lézí 15–20 %, k iniciálnímu poškození dochází cestou mtBRAF: aberantní ložiska krypt – hyperplastický polyp – sessilní serrated adenom (SSA) – SSA s dysplazií – KRK. Pokud je iniciální poškození mtKRAS, pak dochází cestou tradičního serrated adenomu (TSA)-TSA s high grade dysplazií (HGD) ke vzniku KRAS mutovaného KRK. Cestou pilovitých lézí vznikají tedy karcinomy s mtBRAF, tak i mtKRAS. Liší se molekulárním subtypem a predilekční lokalizací nádoru (95). KRK s mtBRAF mají proximální predominanci s fenotypem MSI/CIMP+, zatímco KRK s mtKRAS mají spíše distální predilekci s fenotypem MSS/CIMP-L.

Alternativní cestou (15–20 %) kancerogeneze přes aberantní ložiska krypt – hyperplastický polyp – TSA – HSA s HGD vznikají KRAS mutované KRK. Případně drahou přes tubulární adenom – tubulovillozní adenom – karcinom vznikají APC mutované KRK s fenotypem MSS/CIMP-L (95).

Obr. 1. Zapojení mikroRNA do regulace klasického Vogelsteinova modelu sekvenční kolorektální kancerogeneze (96).



3.1.1.1 Molekulární subklasifikace sporadického kolorektálního karcinomu

Proč je z klinického hlediska potřeba dále subklasifikovat tyto nádory? Například je třeba identifikovat cca 15 % pacientů ve II. klinickém stadiu, kteří relabují po primární terapii, stejně jako dalších cca 50 % pacientů III. klinického stadia s nízkým rizikem relapsu, dále je třeba nalézt pacienty ve II. a III. klinickém stadiu mající benefit z adjuvantní chemoterapie, nebo selektovat pacienty s metastatickým KRK pro cílenou léčbu či intenzifikovanou chemoterapii. Mezer v individualizaci léčby pacientů s KRK existuje i dnes celá řada, a je to právě molekulární subklasifikace KRK, která by mohla tuto situaci zlepšit.

Na základě profilů genové exprese se v současné době KRK dělí do 4 molekulárních podtypů (97), tj. „*consensus molecular subtypes*“ (CMS) 1-4 (tab. 4).

Nádory CMS1 (tzv. imunitní) tvoří asi 14 %, jsou charakterizovány MSI, vysokým CIMP, přítomností mtBRAF a vysokou mírou aktivace imunitního systému. Jsou lokalizované do pravé poloviny tračnicku, často s mucinózním histologickým obrazem, nejčastěji se vyskytující u starších žen. Vznikají cestou MSI-H kancerogeneze. Z klinického hlediska je u II. stadia KRK typu CMS1 snížené riziko relapsu onemocnění po chirurgické resekci a adjuvantní podání chemoterapie nezlepšuje výsledky léčby. V případě IV. klinického stadia jsou asociovány se špatnou prognózou onemocnění a léčebné možnosti jsou: intenzifikovaná chemoterapie (triplet), kombinace BRAF a MEK inhibitorů v rámci klinických studií, stejně jako použití imunoterapie na bázi immune check-point inhibitorů.

Nádory CMS2 (tzv. kanonický) tvoří asi 37 %, jsou charakterizovány vysokým počtem somatických alterací na úrovni počtu genových kopií (SCNA – somatic gene copy number alterations). Většinou jsou lokalizované v levé polovině tračnicku a rekta, vznikají klasickou cestou kancerogeneze s mutací v genu APC. Mají horší prognózu než MSI-H nádory, ale lepší prognózu než nádory s mezenchymálním fenotypem.

Nádory CMS3 (tzv. metabolický) tvoří asi 13 %, jsou charakterizovány smíšeným MSI, nízkým SCNA, nízkým CIMP, přítomností mtKRAS a metabolickou deregulací. 75 % mtRAS je provázeno současnou mutací PIK3CA. Nejsou asociovány s pohlavím, věkovou skupinou ani lokalizací na střevě. Vznikají pravděpodobně alternativní cestou kancerogeneze. V případě IV. klinického stadia jsou asociovány se střední prognózou onemocnění a typická je neúčinnost anti-EGFR léčby.

Nádory CMS4 s mezenchymálními znaky tvoří asi 23 %, jsou charakterizovány vysokým SCNA. Vyskytují se častěji v pokročilých klinických stadiích KRK a mají špatnou prognózu. Jsou rezistentní na léčbu EGFR inhibitory, a to nezávisle na přítomnosti mtRAS. Jeho prekurzorem je TSA a nejsou známy žádné léčebné konsekvence.

Tab. 4. Charakteristické znaky molekulárních podtypů kolorektálního karcinomu.

CMS1 (MSI imunitní)	CMS2 (kanonický)	CMS3 (metabolický)	CMS4 (mezenchymální)
MSI ↑CIMP hypermutovaný fenotyp	↑SCNA	Smíšená MSI ↓SCNA ↓CIMP	↑SCNA
mutace BRAF imunitní infiltrace/aktivace	aktivace WNT aktivace MYC	mutace KRAS metabolická deregulace	infiltrace stromatu aktivace TNFβ angiogeneze

3.1.1.2 Zapojení regulační sítě mikroRNA do kolorektální karcinogeneze

MikroRNA jsou krátké, nekódující, jednořetězcové RNA regulující post-transkripčně genovou expresi. Na základě míry komplementarity s cílovou mRNA indukují její degradaci nebo translační represi. Existuje řada publikací dokládajících potenciál mikroRNA regulovat hladiny onkogenů a nádorových supresorů, a tak ovlivňovat řadu biologických procesů klíčových pro biologii nádorové buňky, jako je například buněčný cyklus, apoptóza, proliferace, invazivita či citlivost k protinádorové léčbě (98). Zapojení mikroRNA do karcinogeneze již bylo popsáno u různých typů nádorových onemocnění včetně kolorektálního karcinomu (99).

Podíl mikroRNA na patogenezi kolorektálního karcinomu (viz obr. 1), z nich činí nejen nadějně biomarkery, ale také potenciální terapeutické cíle. Výhodou mikroRNA je jejich vysoká stabilita a možnost detekce i v tělních tekutinách, čehož může být využito jak pro časnou diagnostiku KRK, tak pro neinvazivní diagnostiku pokročilých stadií onemocnění jako jednu z forem tzv. tekuté biopsie.

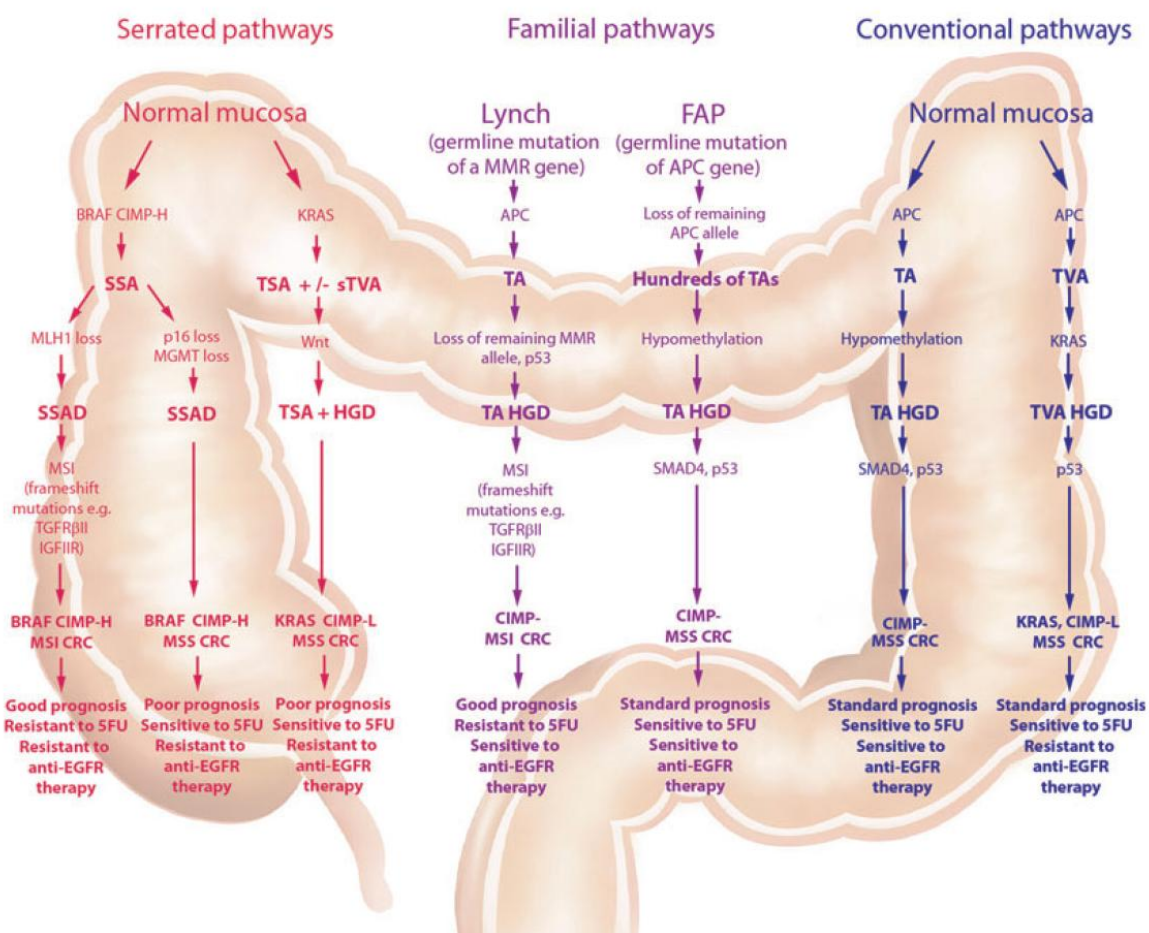
V současné době je již známa řada mikroRNA podílejících se na regulaci klíčových signálních drah souvisejících s KRK. V případě miR-135a a miR-135b byla prokázána schopnost snižovat hladiny APC, a ovlivňovat tak aktivitu Wnt/ β -kateninové signální dráhy (100). Další důležitou signální dráhou ovlivňovanou u KRK cestou mikroRNA je MAP-kinázová kaskáda, kde se uplatňují především miR-143, miR-145 a let-7 jako nádorové supresory s regulační kapacitou na úrovni onkogenu KRAS, miR-143 a miR-145 pak rovněž vazbou na RAF či ERK. Signální dráha PI3K/AKT/mTOR je regulována vazbou miR-126 na úrovni PI3K. Nádorový supresor PTEN tlumící dráhu PI3K/AKT/mTOR je zase regulován pomocí miR-19, miR-21 a miR-22. Další úroveň kaskády je kináza AKT, která je modulována skrze miR-96, miR-182, miR-183, miR-499-5p a miR-370. MikroRNA byly funkčně popsány i v rámci signální dráhy TGF- β .

Mezi další buněčné procesy ovlivňované cestou mikroRNA patří také apoptóza, a to především na úrovni nádorového supresoru p53 (rodina mikroRNA-34) a antiapoptotického proteinu Bcl-2 (101,102). MikroRNA ovlivňují i buněčný cyklus, většinou prostřednictvím p53, cyklin-dependentní kinázy-2 (CDK2), nebo zprostředkovaně ovlivněním proteinových inhibitorů (p15, p21, p27) (103–105). Pravděpodobně nejlépe popsanou onkogenní mikroRNA je miR-21. U KRK byl popsán význam miR-21 v procesu metastazování, kdy dochází vlivem nadměrné aktivace matrixových metaloproteinkináz (MMP) a urokinázového aktivátoru plazminogenu (uPA) ke zvýšené migraci buněk cestou proteolytické degradace, a umožňují tak vstup buněk do krevního řečiště.

Dalším klíčovým procesem v patogenezi kolorektálního karcinomu je neo-angiogeneze způsobená stimulací vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) v důsledku hypoxie, ke které dochází v souvislosti s růstem nádoru. VEGF je regulován pomocí miR-125, zatímco další mikroRNA

ovlivňují angiogenezi jiným způsobem, např. miR-107, miR-22 skrze transkripční faktor HIF1 α nebo miR-17-92 regulací trombospondinu (106).

Obr. 2. Molekulární dráhy vedoucí ke vzniku sporadického a zárodečného kolorektálního karcinomu (107).



3.2 Molekulární patologie nejčastějších hereditárních syndromů u kolorektálního karcinomu

Hereditární KRK (5–10 %) vzniká na podkladě vrozených mutací. Zahrnují familiární adenomatózní polypózu (FAP) charakterizovanou vrozenou mutací genu APC, hereditární nepolypózní formu kolorektálního karcinomu (HNPCC, Lynchův syndrom) s inaktivačními mutacemi na úrovni genů zapojených do procesů MMR (DNA mismatch repair genes) či MYH asociovanou polypózu a polypózní syndromy na základě mutací v MYH genech (viz obr. 1).

Lynchův syndrom (LS) je nejčastější vrozenou predispozicí pro vznik KRK. Příčinou onemocnění je zárodečná mutace v tzv. mutátorových genech MSH2, MLH1, PMS1 a PMS2. MMR geny kódují proteiny zapojené do procesů zajišťujících opravy špatného párování bází. Jejich vrozená porucha

vyvolává zvýšení četnosti genetických mutací v DNA, což způsobuje časný vznik řady maligních onemocnění včetně KRK. Celoživotní riziko vzniku KRK je 28–75 % u mužů a 24–52 % u žen. Lynchův syndrom je autozomálně dominantně dědičné onemocnění a je spjat s řadou dalších, geneticky podmíněných nádorů (gastrointestinálního traktu – žaludek, tenké střevo, pankreatobiliárního systému), gynekologických malignit (endometrium, ovarium) a nádory CNS.

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je způsobena zárodečnou mutací genu APC. Zatímco v případě LS vzniká KRK v terénu jednoho či několika adenomů, v případě FAP je typický obraz mnohočetných polypů. Riziko vzniku KRK dosahuje až 100 %, a proto je při stanovení diagnózy FAP zvažováno provedení totální kolektomie či proktokolektomie. Opět i v tomto případě je riziko další geneticky podmíněné malignity vysoké.

MYH asociovaná polypóza je podmíněnou zárodečnou mutací genu MYH. Charakteristickým klinickým projevem je mnohočetná střevní polypóza.

Turcotův syndrom představuje spojení adenomatózní polypózy a maligního nádoru mozku, které vzniká na podkladě mutací genů APC a hMSH2.

Gardnerův syndrom představuje spojení FAP s desmoidními nádory. **Hereditární smíšený polypózní syndrom** je charakterizován hyperplastickými polypy. **Peutz-Jeghersův syndrom** je asociován s výskytem hamartomových polypů v GIT a mukokutánními pigmentacemi.

Vlastní přínos k problematice

Systém aktivátorů plazminogenu (PAS) je součástí metastatické kaskády a významnou měrou se podílí na invazivním růstu a angiogenezi maligních nádorů. I když přesný mechanismus lokálního růstu a metastazování maligních nádorů není dosud zcela zmapován, je jasné, že se na něm podílí řada faktorů a především proteolytických enzymů, které narušují extracelulární matrix. Prvním krokem k malignizaci do té doby benigního nádoru se stává destrukce bazální membrány právě prostřednictvím proteolytických enzymů, která napomáhá jak lokální invazivitě tumoru, tak jeho metastazování, což jsou základní procesy maligního růstu tumoru. Tato sekvence přechodu normální tkáň – maligní nádor – metastáza je doprovázena rostoucí expresí genů uPA, uPAR, PAI-1 a PAI-2 se současným snížením exprese tPA (108,109). Plazminogenem vázané molekuly hrají zásadní roli v invazi a metastazování nádorů. Aktivace uPA je regulována prostřednictvím urokinázového receptoru (uPAR).

U KRK studie prokázaly, že exprese uPAR roste s přeměnou adenomu střeva od mírných dysplastických změn přes těžkou dysplazii až po karcinom, zvýšená exprese uPAR byla detekována u adenomů v 30 %, u karcinomů v 85 % (110,111). V nádorové tkáni KRK se zvyšuje exprese uPA ve

srovnání s normální tkání střeva či adenomy a existuje řada studií, ve kterých byl zkoumán vztah mezi expresí uPA v nádorové tkáni a prognózou pacienta (112,113). Nejvýznamnějšími specifickými inhibitory jsou PAI-1 a PAI-2, které reagují s receptorem uPA. PAI-1 je tvořen převážně v hladké svalovině cév, megakaryocytech, endoteliích, granulocytech, monocytech, makrofázích a nádorových buňkách. PAI-1 inhibuje migraci hladkých svalových buněk blokadou α v β 3 integrinu k vitronectinu. (114,115) PAI-1 je nejúčinnějším inhibitorem uPA a tPA. Plazmatická koncentrace PAI-1 je normálně nízká, u genotypu 4G/4G je vyšší, je spojována s horší prognózou a proximální lokalizací nádoru ve srovnání s genotypem 4G/5G a 5G/5G.

V naší práci „*Clinical impact of PAI 1 4G/5G gene polymorphism in colorectal carcinoma patients*“ (115) (viz Příloha 7.1.6) jsme studovali dynamiku plazmatické koncentrace PAI-1 v periferní krvi u pacientů před zahájením léčby (před resekci) a následně 6–8 týdnů po resekci v závislosti na klinickém stadiu onemocnění, věku, pohlaví, stupni diferenciaci nádoru, TNM klasifikaci a léčebné odpovědi na chemoterapii. Pro rs1799889-675 4G/5G polymorfismus jsme prokázali signifikantně vyšší plazmatickou koncentraci PAI-1 před zahájením léčby s následným poklesem po léčbě, pacienti s vysokou koncentrací PAI-1 před i po léčbě měli signifikantně kratší celkové přežití. V naší práci jsme neprokázali závislost mezi polymorfizmem PAI-1 (-675 4G/5G) ve vztahu ke klinickému stadiu, lokalizaci nádoru či přežití. PAI-1 je v praxi použitelný negativní prognostický faktor a mohl by být zohledněn při indikacích adjuvantní léčby u pacientů s kolorektálním karcinomem.

KRK je typickým multifaktoriálně podmíněným onemocněním, na jehož vzniku se významným způsobem podílí vliv zevního prostředí a reakce organismu na toto zevní prostředí. V procesu ochrany buňky před zevními vlivy se uplatňuje skupina metabolických enzymů označovaných jako glutathion S-transferázy (GSTs), katalyzujících konjugaci glutathionu s léky, xenobiotiky, karcinogeny – důležité pro detoxikaci aromatických uhlovodíků (detoxikační enzymy). Izoenzymy GST jsou kódovány skupinou genů a některé z polymorfizmů v těchto genech vedou ke snížení enzymatické aktivity GST, což může vést ke zvýšenému riziku nádorů, včetně KRK (117,118). Výsledky studií zkoumajících vliv polymorfizmů GSTs jsou kontroverzní. Výsledky metaanalýzy polymorfizmů v genech GSTM1, GSTT1, GSTP1 a GSTA1 poukazují na zvýšené riziko rozvoje KRK v bělošské populaci pouze v souvislosti s polymorfizmy v izoformách GSTM1 a GSTT1 (119). Role GSTs izoenzymů byla studována na populaci českých pacientů s KRK v rámci velké multicentrické studie (120). Cílem naší studie bylo zjistit dopad polymorfizmů nejdůležitějších izoenzymů rodiny GSTs na vznik KRK „*Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central-European population*“ (121) (viz Příloha 7.1.7.). Metodou PCR jsme zkoumali význam polymorfizmů GSTs u 197 pacientů s KRK a 218 kontrol. Neprokázali jsme žádnou významnou asociaci polymorfizmů v těchto genech s KRK, s výjimkou GSTP1, u kterého jsme prokázali pro genotyp Ile105Val snížené riziko vzniku KRK ($p = 0,043$). Frekvence polymorfizmů

v naší studii koresponduje s frekvencí v dalších evropských populacích. Z našich dat nevyplývá, že by polymorfizmy v GST genech představovaly významné rizikové faktory pro KRK.

V další studii jsme se zaměřili na efekt polymorfizmů v sekvencích mikroRNA na riziko rozvoje KRK. Jak bylo uvedeno již dříve (kap. 3.1.1.2), mikroRNA mohou v patogenezi KRK hrát roli jak nádorově supresorovou, tak onkogenní (122,123). Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP – single nucleotide polymorphism) existují jak v pri-miRNA, pre-miRNA, tak i v maturovaných miRNA sekvencích (124). Nejčastěji studovanými polymorfizmy u nádorů, kromě nádorů KRK, jsou rs116149913 v případě miR-196-a2, rs895819 u hsa-miR-27a a rs2910164 u miR-146a, a proto jsme se rozhodli provést studii zaměřenou na tyto 3 polymorfizmy a zkoumat jejich vztah k riziku vzniku sporadického KRK v naší populaci „*Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer*“ (125) (viz Příloha 7.1.8.). Srovnávali jsme skupinu 197 pacientů se sporadickým KRK a 212 kontrolních případů bez známek malignity. V naší práci jsme neprokázali žádnou asociaci mezi studovanými polymorfizmy (rs11614913, rs895819, rs2910164) a rizikem vzniku KRK v naší populaci.

Jednou z nejčastěji studovaných mikroRNA u KRK je miR-21. Relativně hodně je známo o účasti miR-21 v procesu kancerogeneze. Cílem naší práce „*Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells*“ (viz Příloha 7.1.9.) bylo srovnání exprese miR-21 v nádorové a nenádorové tkáni KRK a korelace výsledků s klinicko-patologickými charakteristikami u souboru 44 dosud neléčených pacientů s KRK (126). Prokázali jsme signifikantně vyšší expresi miR-21 v nádorové tkáni ($p < 0,001$), rozdíl v expresi miR-21 mezi časným a pokročilým KRK, tj. stadium I vs. II ($p = 0,033$), stadium I vs. IV ($p = 0,021$). To poukazuje na možnosti využití miR-21 při diagnostice metastatického onemocnění z primárního nádoru. Prokázali jsme také korelaci miR-21 s horšími výsledky přežití pacientů s KRK ($p = 0,0341$). Domníváme se, že vysoká exprese miR-21 je spojena s progresí onemocnění a vznikem vzdálených metastáz. Následně jsme sledovali efekt anti-miR-21 na proliferaci nádorových buněk odvozených od KRK, DLD-1. Nepozorovali jsme významný efekt anti-miR-21 na proliferaci nádorových buněk při samostatném podání, ani při kombinaci s cytostatiky (5-fluoruracil, oxaliplatin, SN-38- aktivní metabolit irinotekanu). Tlumení miR-21 ovšem snížilo migrační kapacitu nádorových buněk DLD-1 téměř o 30 % ($p = 0,016$). Domníváme se, že miR-21 není jen slibným prognostickým biomarkerem, ale lze ho využít i jako potenciální terapeutický cíl u KRK. Asociace mezi expresí miRNA a prognózou onemocnění a ORR byla již opakovaně popsána (99,127).

V naší další práci „*Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer*“ jsme se zaměřili na identifikaci a funkční validaci dalších, nových mikroRNA v nádorové tkáni KRK (128) (viz Příloha 7.1.10). Celkově jsme analyzovali 667 miRNA v tkáni KRK a párové nenádorové tkáni a identifikovali jsme 42 miRNA s odlišnou expresí. MiR-215, miR-375,

miR-378, miR-422a a miR-135b byly nejvíce deregulované, a proto jsme je vybrali pro další validaci na nezávislé kohortě 125 klinicky charakterizovaných pacientů s KRK. Z našich výsledků vyplývá, že miR-215, miR-375, miR-378 a miR422a měly signifikantně sníženou expresi v nádorové tkáni, zatímco miR-135b zvýšenou. Úroveň exprese v případě miR-215 a miR-422a korelovala s klinickým stadiem onemocnění. Následně provedené *in vitro* testy prokázaly, že navýšení exprese miR-215 snižuje viabilitu a migraci nádorových buněk a současně zvyšuje množství apoptotických buněk u nádorových linií DLD-1 a HCT-116. Stejně tak zvýšená exprese miR-375 a snížená exprese miR-135b snižuje proliferaci nádorových buněk. Navýšení hladin miR-378, miR-422 a miR-375 inhibuje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Prokázali jsme tak, že miR-378, miR-375, miR-422a a miR-215 plní u KRK funkci nádorového supresoru, zatímco miR-135b je onkogenní. V této práci byla exprese mikroRNA studována na úrovni primárních nádorů KRK.

V naší další práci „*Genome-wide microRNA Expression Profiling in Primary Tumors and Matched Liver Metastasis of Patients with Colorectal Cancer*“ (129) (viz Příloha 7.1.11.) jsme se proto zaměřili na srovnání expresních profilů mikroRNA v primárních nádorech a párových jaterních metastázách u pacientů s KRK. Z celkového počtu 752 mikroRNA testovaných na vzorcích 20 primárních nádorů a párových jaterních metastáz pacientů s KRK jsme našli rozdílnou expresi v případě 33 mikroRNA. Patnáct z nich jsme vybrali k validaci a následně potvrdili významné snížení exprese miR-143, miR-10b, miR-28-5p, a naopak zvýšení exprese v případě miR-122, miR-122* a miR-885-5p v tkáni jaterních metastáz oproti primárnímu nádoru. Předpokládáme, že tyto mikroRNA by mohly být funkčně zapojeny do procesu metastazování u KRK.

4 Pokročilá molekulární diagnostika kolorektálního karcinomu

4.1 Diagnostické biomarkery pro časnou detekci kolorektálního karcinomu

Screening KRK byl v ČR zahájen v roce 2009 (28). Jak vyplývá z dat Národního onkologického registru (NOR), od roku 2010 můžeme pozorovat nárůst nově diagnostikovaných nádorů kolorekta, kdy rozdíl mezi lety 2010 a 2013 představoval nárůst z 21 % na 23 % ve stadiu I, z 23 % na 25 % ve stadiu II, z 24 % na 25 % ve stadiu III a konečně pokles z 25 % na 17 % ve stadiu IV. Dalším krokem bylo zavedení adresného zvaní, a jak vyplývá z výsledků již v průběhu prvního roku, tj. za rok 2014, došlo k nárůstu počtu vyšetřených klientů v rámci cílové populace ve věku nad 50 let z 27 % (2013) na 32 % (2014). Je potřeba si uvědomit, že screeningový program KRK umožňuje i léčbu přednádorových stavů.

Testy vzorků stolice jsou založeny na principu průkazu hemoglobinu ve stolici. Klasické guajakové testy (Haemoccult test) prokazují hem na základě peroxidázové reakce. Nejsou však specifické pro lidský hemoglobin. Nevýhodou testu je nízká citlivost pro záchyt adenomů. Senzitivita testu pro karcinom je 37 % a specificita 97 % (130). Imunochemické testy jsou založeny na průkazu lidského

hemoglobinu ve stolici na základě vazby s monoklonální protilátkou. Kvantitativní testy mají v případě karcinomu senzitivitu 68 % a specificitu 94 % (130,131). Výzkum probíhá také v oblasti testování DNA ve stolici – bodové mutace KRAS, APC, p53, se senzitivitou nad 50 %. RNA markery ve stolici – cyklooxygenáza 2 (COX-2), exprese matrixmetaloproteinázy (MMP-7), jejichž kombinace prokázala senzitivitu v případě KRK u stadia I 77 % a stadia II 93 % (132). Vysokou senzitivitu 94 % pro karcinomy i adenomy se specificitou 98 % představuje metoda stanovující biomarkery CNRIP1, INA, MAL, SNCA, SPG20 (133). Velmi zajímavé výsledky prokázalo testování miR-144, miR-34b/c a miR-148a s prokázanou senzitivitou 74 % a specificitou 87 % (134,135).

Testy vzorků krve pro screeningové účely jsou již dostupné pro klinickou praxi. DNA test Epi proColon 2,0CE je založen na průkazu přítomnosti metylované DNA v séru. Tyto testy prokazují pro karcinom senzitivitu 67 % a specificitu 88 %, což nepřekračuje účinnost imunohistochemických testů na vyšetření stolice (136). Stejně jako ve stolici lze i v krvi stanovit COX-2, MMP-2. Řada těchto testů však nedosahuje deklarovanou efektivitu v praxi. Diagnostika adenomu či časného karcinomu tlustého střeva z periferní krve by byla jistě elegantní metodou. V tomto směru se jeví zajímavé výsledky vyšetření mikroRNA. MiR-17-3p a miR-92 prokazují korelaci mezi zvýšenou hladinou exprese a pozitivním testem okultního krvácení do stolice. Po chirurgické resekci došlo k poklesu exprese těchto mikroRNA, a jak ukázaly další studie, bylo možné na základě vyšetření mikroRNA v krvi odlišit nádor střeva od nádoru žaludku či od zánětu tlustého střeva (137), což poukázalo na velice dobrou specificitu mikroRNA testu pro KRK.

Vlastní příspěvek k problematice

Časná diagnostika KRK je základ úspěšné léčby. Standardní screeningová metoda, kolonoskopie, je invazivní metodou vyžadující nepříjemnou přípravu v podobě dokonalého vyprázdnění střeva. Vyšetření stolice na okultní krvácení je ovlivnitelné řadou faktorů, jako je dieta a jiné onemocnění střeva (zánět, hemoroidy), a nedosahuje potřebné senzitivity a specificity.

Ve studii „*Circulating miR-17-3p, miR-29a, miR-92a and miR-135b in serum: Evidence against their usage as biomarkers in colorectal cancer*“ (viz Příloha 7.1.12.) jsme zkoumali možnost využití dříve popsanych miR-17-3p, miR-29a, miR-92a a miR-135b pro časnou detekci KRK z krevního séra. V rozporu s publikacemi asijských autorů jsme u sledovaných mikroRNA neprokázali u pacientů a zdravých dárců signifikantní rozdíl v jejich hladinách (138).

V naší další práci „*Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer*“ (viz Příloha 7.1.13.) jsme se zaměřili na hledání a validaci mikroRNA v krevním séru pacientů s KRK (139). Analyzovali jsme vzorky od 427 pacientů s KRK a 276 zdravých dárců. Identifikovali jsme 4 mikroRNA k další validaci: miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-142-5p a miR-376c-

3p. Z validace vyplynulo, že diagnostický panel založený na expresi těchto 4 sérových mikroRNA umožnil identifikovat pacienta s KRK se senzitivitou 89 % a specificitou 81 %. Vysoká senzitivita i specificita vyšetření byla zachována i při samostatném vyhodnocení pacientů v časných stádiích KRK (pT1-3pN0M0). Ve studii jsme hodnotili také možnosti prognostického využití sérových mikroRNA, přičemž u miR-23a-3p a miR-376c-3p jsme popsali silný prognostický potenciál nezávislý na klinickém stadiu onemocnění.

4.2 Prognostické biomarkery kolorektálního karcinomu

Prognostické biomarkery jsou biomarkery, které nám pomáhají identifikovat pacienty s vysokým rizikem relapsu onemocnění. Některé z genů, které jsou často mutované u KRK, především geny kódující kinázy zapojené do signální kaskády EGFR, jako jsou RAS nebo BRAF, se ukázaly být také významnými prognostickými faktory. Mutace v onkogenu BRAF představují v současnosti jednu z nejvýznamnějších negativních prognostických biomarkerů u KRK. Nádory nesoucí mutaci BRAF vykazují významně nižší citlivost vůči farmakoterapii a jsou spojeny s kratším přežíváním nemocných (34,36,39,63). Mutace onkogenů RAS (KRAS i NRAS) jsou rovněž negativním prognostickým faktorem, byť méně významným, než jsou mutace BRAF. Významným prognostickým biomarkerem je rovněž MSI statut. Oba prognostické markery MSI a BRAF jsou diskutovány v úvodní kapitole, protože jsou aktuálně plně využívány k individualizaci léčby KRK. Zatímco stanovení MSI je standardem při zvažování adjuvantní chemoterapie na bázi 5-fluorouracilu v případě II. klinického stadia KRK, přítomnost BRAF mutace je silným, negativním prognostickým faktorem u pokročilého KRK.

V posledních letech kontinuálně přibývá publikací o využití mikroRNA v diagnostice nádorů, včetně KRK. Dnes je již zřejmé, že nejsou slibnými diagnostickými biomarkery, ale že budou dobře využitelné rovněž jako biomarkery prognostické. Můžeme predikovat rozsah onemocnění (časné či pokročilé), dobu do relapsu onemocnění a dobu celkového přežití (140). Například zvýšená exprese miR-200c je u KRK spojena s kratším přežíváním pacientů. MiR-21, miR-195 a miR-193a-5p koreluje s klinickým stadiem KRK a pacienti se zvýšenou expresí mají horší prognózu (141,107). Snížená exprese miR-193a-5p koreluje s metastatickým postižením lymfatických uzlin (142) ($p = 0,0060$) a jako nezávislý faktor spojený s nepříznivou prognózou: doba do progresu (DFS) $p = 0,0262$ a celkové přežití (OS) $p = 0,0230$.

4.3 Prediktivní biomarkery v léčbě kolorektálního karcinomu

Standardy léčby vychází ze statistického zpracování výsledků multicentrických klinických studií. I když se v posledních letech výrazně zvýšila efektivita léčby KRK, stále zůstává významná část

pacientů, kteří na standardní léčbu nereagují z důvodů primární rezistence, či po předchozím efektu u nich dochází ke vzniku časně sekundární rezistence. Podmínkou racionální indikace léčby je potom implementace prediktivních biomarkerů umožňujících takovému pacienty identifikovat.

4.3.1 Prediktory léčebné odpovědi na anti-angiogenní léčbu

Nádorová angiogeneze je komplexní proces vedoucí k novotvorbě nádorových cév z cév již existujících. Nejdůležitějším pro-angiogenním faktorem nutným pro zahájení novotvorby cév je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (143). Primárním spouštěčem angiogeneze je hypoxie nádorových buněk, která vede k indukci exprese transkripčního faktoru hypoxii-indukovaného faktoru (HIF)-1 α . Tento transkripční faktor je lokalizován v oblasti buněčného jádra a následně spouští transkripci několika růstových faktorů včetně VEGF, destičkového růstového faktoru (PDGF)- β , bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF), erytroproteinu, angiopoetinu a placentárního růstového faktoru (PlGF). Mezi základní pro-angiogenní faktory nádorové angiogeneze, které máme v současné době možnost léčebně ovlivnit, patří růstové faktory rodiny VEGF: VEGF-A, VEGF-B a PlGF, včetně jejich receptorů VEGFR-1 a VEGFR-2. Nejčastěji a nejdéle v praxi používaným inhibítorem angiogeneze je monoklonální protilátka bevacizumab, která cíleně inhibuje VEGF-A, dále monoklonální protilátka aflibercept cílící nejen na VEGF-A, ale také na VEGF-B a PlGF, a dále řada tyrozin kinázových inhibitorů (TKI) blokujících intracelulární kinázové domény receptorů VEGFR-1 a VEGFR-2 (144).

Pro cílenější indikaci léčby VEGF inhibitory byla zkoumána řada biomarkerů jako potenciálních prediktorů léčebné odpovědi.

Hypertenze je relativně častým vedlejším účinkem léčby protilátkami proti VEGF či TKI. Bylo prokázáno, že VEGF a TKI inhibitory způsobují vazokonstrikci, čímž dochází k nárůstu cévní rezistence a zvýšení krevního tlaku (145). Při analýze efektivity a vedlejších účinků chemoterapie v kombinaci s bevacizumabem se ukazuje u pacientů s časným vznikem rezistence, tj. do 3 měsíců od zahájení léčby, tento faktor jako prediktor pro lepší výsledky celkového přežití (mOS) (146). Podobné výsledky byly prokázány i u léčby nádorů ledvin a plic.

Dalším často zkoumaným prediktorem anti-VEGF terapie je **hladina cirkulujícího VEGF a nádorová exprese VEGF**. Vysoká hladina cirkulujícího VEGF se však ukázala být spíše negativním prognostickým biomarkerem než biomarkerem prediktivním, což se potvrdilo nejen u pacientů s KRK, ale i s dalšími nádory, jako jsou renální karcinom (RCC) či nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC). Ani v případě nádorové exprese VEGF nebyla prokázána korelace mezi hladinou exprese VEGF, trombospondinem a léčebnou odpovědí na chemoterapii v kombinaci s bevacizumabem (citace). Zajímavé výsledky se ukazují při hodnocení závislosti zvýšené **hladiny cirkulujícího PlGF** a léčebné odpovědi na VEGF inhibitory, sledování dynamiky hladin PlGF a také PlGF jako terapeutického cíle

– jako prevence vzniku sekundární rezistence na léčbu VEGF inhibitory (147–149). Nicméně stále není jasné, zda hladina PIGF je prediktivní, či prognostický marker.

Z dalších zkoumaných prediktorů léčebné odpovědi u pacientů s metastatickým KRK nebyla potvrzena možnost predikce na terapii bevacizumabem v kombinaci s chemoterapií na základě stanovení *mikrovaskulární denzity, nádorové exprese TSP2, p53 či přítomnosti mutace onkogenu KRAS* (150,151). Do současné doby nebyl nalezen a prospektivně potvrzen v rámci klinické studie žádný prediktivní biomarker léčebné odpovědi na anti-angiogenní léčbu bevacizumabem či TKI. V rámci klinické studie fáze III (CONFIRM 1,2) byla však prokázána korelace se signifikantně lepšími výsledky léčby vatalanibem (pan-VEGFR inhibitor)/FOLFOX oproti chemoterapii FOLFOX/placebo u pacientů s vyšší plazmatickou hladinou *LDH, VEGFR1 (mRNA), HIF1 α , VEGFR2 (mRNA)* (152).

Rovněž *mikroRNA* hrají významnou roli v regulaci nádorové neovaskularizace. Bylo prokázáno, že miR-107 funguje jako supresor exprese HIF1A a VEGF a miR-145 jako regulátor exprese HIF1 u pacientů s KRK. Trombospondin (TSP1) patří mezi významně anti-angiogenní faktory. Klastri miR-17-92 a miR-194 jsou schopny blokovat TSP1, a tak nepřímo podporovat nádorovou angiogenezi u KRK (153).

4.3.2 Prediktory léčebné odpovědi na anti-EGFR terapii

Signální dráha EGFR hraje důležitou roli v proliferaci nádorových buněk a růstu nádoru, a to nejen v případě KRK, kde je patologicky aktivována u více než 80 % případů. Gen pro EGFR je lokalizovaný na chromozomu 7 a jeho signální dráha má dvě základní větve:

1. KRAS – BRAF – MAPK (mitogen-activated protein kinase). KRAS je členem rodiny onkogenů zahrnující K-RAS, H-RAS, N-RAS regulujících proliferaci a diferenciaci nádorových buněk. Po agonizaci EGFR receptoru dochází k aktivaci jeho intracelulární kinázové domény, dále k aktivaci onkogenu KRAS a BRAF. Signál je dále přenášen pomocí kináz MEK a ERK až do jádra, kde ovlivňuje genovou expresi pro-mitogenních faktorů stimujících proliferaci nádorové buňky (154).
2. PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) – PTEN (tensin homolog) – AKT (protein kinase B). Během stimulace EGFR receptoru dochází rovněž ke stimulaci signalizace PI3K-AKT, která vede k inhibici apoptózy a následně ke zvýšené schopnosti přežívání nádorové buňky (155).

Primární rezistence na EGFR inhibitory u dosud neléčených pacientů je nejčastěji způsobena přítomností některé z aktivačních mutací v onkogenech KRAS (30 %), NRAS (7 %) a BRAF (7 %). Dále 10–15 % pacientů má současně mutace KRAS nebo BRAF a PI3K, 10 % PI3K nebo PTEN, jejichž část má aplikaci HER-2 nebo MET (3–4 %). Léčebná odpověď na EGFR inhibitory

v monoterapii je přibližně 15 %, zatímco v kombinaci s chemoterapií dosahuje léčebná odpověď 50–60 %. Přibližně 12 % případů představují ne-genetické mechanismy rezistence (156).

Sekundární rezistence na EGFR inhibitory je často způsobená *de novo* mutacemi v onkogenech RAS (KRAS, NRAS nebo obou) a popisuje se ve 40 %. V rámci sekundární rezistence se rovněž uplatňují mutace v onkogenu BRAF (okolo 7 %), případně současná mutace RAS a PI3K přibližně ve 12 % případů. U pacientů předléčených EGFR inhibitory narůstá amplifikace HER-2 či MET na 10–12 %. Ne-genetické případy sekundární rezistence představují 12 % případů.

Zatímco primární rezistence k EGFR inhibitorů je nejčastěji podmíněna mutacemi KRAS v exonu 2, při sekundární rezistenci se kromě mutací v exonu 2 objevují mutace i v dalších exonech onkogenu KRAS (156).

Kromě genetických změn se na rezistenci k EGFR inhibitorům podílí i nadprodukce ligandů mikroprostředí, např. amphiregulin, epiregulin, heregulin a transformující růstový faktor (TGF)- α . Pacienti s nadprodukcí amphiregulinu a epiregulinu dosahovali signifikantně lepší léčebné odpovědi při léčbě cetuximabem či panitumumabem, mPFS 8,3 vs. 3,2 měsíce, než pacienti s nízkou expresí těchto ligandů (157), v případě TGF- α byl pozorován opačný trend, tj. nadprodukce byla provázená rezistencí k cetuximabu (158–160). Kromě genetických mutací a exprese ligandů mikroprostředí je dalším prediktorem léčebné odpovědi na EGFR inhibitory také molekulární podtyp KRK. Zatímco nádory wtRAS s epiteliálním fenotypem vykazují dobrou odpověď, KRK s fenotypem mezenchymálním jsou na léčbu cetuximabem rezistentní (161,162).

Mutace v onkogenech RAS byly potvrzeny jako negativní prediktivní faktor pro anti-EGFR léčbu v řadě rozsáhlých multicentrických studií (34,36). Účinnost farmakoterapie založené na anti-EGFR léčbě kombinované s chemoterapií je u nádorů vykazujících mutaci RAS horší než účinnost chemoterapie samotné (34,36). Tato zjištění vedla k tomu, že indikace anti-EGFR protilátek, cetuximabu a panitumumabu, byla u KRK zúžena pouze na pacienty, jejichž nádory (primární nebo metastatické) nesou nemutovanou formu genů RAS. Toto omezení se však nevztahuje na cílenou léčbu anti-VEGF či na multikinázové inhibitory. V současné době je doporučeno před zahájením léčby metastazujícího kolorektálního karcinomu provést molekulární vyšetření mutačního stavu onkogenů RAS (KRAS a NRAS) ve vzorku nádorové tkáně, přičemž toto vyšetření je nezbytné, pokud uvažujeme o použití anti-EGFR terapie. Jestliže primární nádor nebo jeho metastáza vykazují některou z aktivačních mutací v onkogenech KRAS nebo NRAS, nelze anti-EGFR léčbu indikovat. V současné klinické praxi se jedná o rutinně používané markery pro stanovení individuálního léčebného plánu.

Validita stanovení mutací v onkogenu BRAF jako prediktoru léčebné odpovědi na léčbu EGFR inhibitory není zcela jasná. Respektive pro pozdní stadia onemocnění, kde je u chemorezistentních

onemocnění EGFR inhibitor používán většinou v monoterapii, nebyla prokázána efektivita těchto léků v monoterapii při srovnání s BSC (163,164) ani v kombinaci s chemoterapií ve srovnání s chemoterapií samotnou (165). Naopak v první linii léčby jsou rozporuplné informace. Ve studii PRIME srovnávající chemoterapii FOLFOX s panitumumabem či bez něj, byly výsledky u pacientů s wtRAS/wtBRAF mOS 28 vs. 20 měsíců (HR 0,74, p = 0,02), tak u pacientů wtRAS/mtBRAF již jen mOS 10,5 vs. 9,2 měsíců (HR 0,9, p = 0,76) (18). Medián PFS wtRAS/wtBRAF 10,8 vs. 9,2 (HR 0,68, p = 0,002), zatímco u wtRAS/mtBRAF 6,1 vs. 5,4 měsíce (HR 0,58, p = 0,12). Studie OPUS byla s chemoterapií na bázi oxaliplatin (FOLFOX) a celkový počet pacientů s wtKRAS/mtBRAF byl sumárně jen 11, takže výsledky nelze hodnotit. Ve studii CRYSTAL byla v kombinaci s cetuximabem chemoterapie na bázi irinotekanu (FOLFIRI), u pacientů s wtKRAS/mtBRAF nebyl aditivní efekt cetuximabu k chemoterapii FOLFIRI prokázán (HR 0,908). V analýze studií kombinující chemoterapii s cetuximabem, tj. CRYSTAL a OPUS, byl zachován benefit přidání cetuximabu i u pacientů s mutací BRAF, nedosáhl však statistické významnosti. Pro wtRAS/wtBRAF byl mOS 21,1 vs. 24,8 měsíce (HR 0,84, p = 0,048) a pro populaci wtRAS/mtBRAF 9,9 vs. 14,1 měsíce (HR 0,62, p = 0,076) ve prospěch kombinace s cetuximabem (38). Ani v jedné studii nebyly výsledky ve prospěch kombinace chemoterapie (FOLFOX či FOLFIRI) s EGFR inhibitorem (panitumumab či cetuximab) v první linii léčby metastatického wtRAS/mtBRAF KRK statisticky signifikantní. Závěr zpochybňující efektivitu EGFR inhibitorů u pacientů s mtBRAF napříč léčebnými liniemi podpořil i výsledek metaanalýzy (166). Nejvíce efektivní v léčbě mtBRAF metastatického KRK je triplet chemoterapie FOLFOXIRI v kombinaci s bevacizumabem (39), který ve studii TRIBE prokázal u této subpopulace pacientů nejlepší výsledky, mOS 19,1 ku 10,8 měsíců, HR 0,60.

Znalost mutací RAS (KRAS, NRAS) 50–60 % i BRAF 5–8 % u pacientů s metastatickým KRK umožňuje predikovat rezistenci na léčbu EGFR inhibitory. Vzhledem k tomu, že i po vyloučení těchto pacientů z indikace k léčbě EGFR inhibitory nedochází ke 100% léčebné odpovědi u pacientů wtRAS/wtBRAF, hledají se další prediktivní markery.

Další genetické alterace jsou popisovány přímo na úrovni signální dráhy RAS-MEK-ERK. **Amplifikace genu KRAS** se vyskytuje u 1–2 % případů KRK. Amplifikace KRAS je spojena s rezistencí na léčbu EGFR inhibitory (167,168). Na základě analýzy TCGA databáze pro KRK byly prokázány amplifikace NRAS, BRAF, CRAF s velmi nízkou frekvencí pod 1 %, a jejich dopad pro klinickou praxi je dosud nejasný (169).

Bylo prokázáno, že genetická **aberrace tyrozín kinázového receptoru HER-2 (ERBB2) a MET** dokáže přímo aktivovat MEK-ERK kaskádu. Amplifikace ERBB2 byla prokázána u malého počtu pacientů s nádory wtRAS/wtBRAF, které nebyly senzitivní v *in vitro* podmínkách a také při testování citlivosti na cetuximab za použití nádorových xenograftů na myších modelech (170,171). Aktivace HER-2 je rovněž ovlivněna amplifikací HER-3 (ERBB3) a ligandem heregulinem, jehož nadprodukce byla

popsána v souvislosti se sekundární rezistencí na cetuximab (171). V případě tyrozinkinázového receptoru MET byla popsána jeho amplifikace u 2 % případů metastatického KRK, opět byla amplifikace popsána u části wtRAS/wtBRAF nádorů necitlivých na cetuximab (172). Probíhají studie fáze I/II s cílem překonat rezistenci k EGFR inhibitorům u pacientů s MET amplifikací či c-MET overexpresí pomocí c-MET inhibitorů (173). Kombinace panitumumab/MET inhibitor (rilotumumab) oproti panitumumab/placebo prokázaly lepší výsledky jak v parametru ORR 31 % vs. 21 %, tak i mPFS 5,2 vs. 3,7 měsíce a mOS 13,8 vs. 11,6 měsíce (173).

Přítomnost mutace ve 20. exonu PI3KCA je spojena s nižší efektivitou EGFR inhibitorů, nicméně výsledky nejsou dosud dostatečně statisticky průkazné, aby měly odezvu v klinické praxi. Stejně tak je tomu i v případě alterací nádorového supresoru PTEN. Genetické alterace PI3KCA a PTEN se vyskytují u 10–15 % případů, velmi často současně s mutací KRAS či BRAF (174,175).

Amplifikace HER-2 byla popsána s frekvencí 2,7 % u neselektované populace s KRK, ve 13,6 % u wtKRAS a v případě populace rezistentní k léčbě EGFR inhibitory dokonce v 36,4 % případů (105). Klinické studie kombinující léčbu trastuzumabem s chemoterapií u metastatického KRK byly předčasně ukončeny pro neefektivitu (176,178). *In vitro* testy u cetuximab rezistentních nádorů s HER-2 amplifikací umožnily vyzkoušet efektivitu anti-HER-2 v monoterapii či kombinaci a následně potvrdit efektivitu v klinické studii HERACLES (178). Z 914 vyšetřovaných wtKRAS nádorů metastatického kolorektálního karcinomu bylo 48 (5 %) HER-2 pozitivních (IHC 2+/3+, amplifikace HER-2). Pacienti měli vyčerpány možnosti standardní léčby. Zatímco léčba trastuzumabem v monoterapii nebyla účinná, tak kombinace trastuzumab a lapatinib prokázala 30% ORR a 44 % dosáhlo stabilizace onemocnění. Lokalizace HER-2 pozitivních nádorů byla z 85 % (23/27) v oblasti levého tračníku a konečníku. Autoři studie uvádějí, že žádný z pacientů s wtKRAS zařazených do studie, a s amplifikací HER-2, neměl při předchozí léčbě EGFR inhibitorem dosaženu léčebnou odpověď. Hodnotí tedy amplifikaci HER-2 současně jako prediktor rezistence na léčbu EGFR inhibitory u pacientů s wtKRAS (170,171,179).

Aktivace ALK byly prokázány jak u hematologických, tak i solidních nádorů a v dnešní době jsou standardním terapeutickým cílem například u nádorů plic, kde jsou ALK+ nádory léčeny crizotinibem. Přítomnost translokace ALK se u KRK pohybuje v rozmezí od 0,4 do 3 % (180,181). Možnosti ovlivnění ALK+ KRK byly zkoušeny v rámci studie fáze I s pan-Trk, ROS1 a ALK inhibitorem, entrectinibem, u pacientů s CAD-ALK fúzním genem. Stanovení exprese ALK se provádí pomocí imunohistochemie (IHC) a případná translokace je následně potvrzena metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tento fúzní gen byl prokázán u 1 z 487 vyšetřovaných pacientů s KRK. Tento pacient byl následně léčen entrectinibem a dosáhl dlouhodobé léčebné odpovědi. Na Masarykově onkologickém ústavu aktuálně probíhá studie fáze II zaměřená na léčbu ALK pozitivních, jiných než plicních nádorů pomocí ALK inhibitoru, ceritinibu.

Expresse EGFR ligandů epiregulinu (EREG) a amphiregulinu (AREG) se ukazuje být dalším prediktivním markerem léčebné odpovědi na léčbu EGFR inhibitory u wtRAS metastatického KRK. V rámci randomizované studie PICCOLO (160) srovnávající efekt chemoterapie irinotekanem s panitumumabem či bez něj byl u pacientů s wtRAS a vysokou expresí ligandů EREG/AREG mPFS 8,3 vs. 4,4 měsíce (HR 0,38, $p < 0,001$), zatímco u pacientů s nízkou expresí ligandů mPFS 3,2 vs. 4,0 měsíce (HR 0,93). Tyto výsledky podporují i závěry metaanalýzy a dalších autorů (182).

Vlastní přínos k problematice

Výsledky některých subanalýz klinických studií naznačovaly možný prediktivní potenciál mutací onkogenu KRAS rovněž ve vztahu k léčbě bevacizumabem. Tyto studie sice neprokazovaly statisticky signifikantní rozdíl v efektu kombinace chemoterapie/bevacizumab u pacientů s nemutovaným či mutovaným KRAS, nicméně rozdíly byly značné (183). Medián PFS při srovnání chemoterapie IFL/bevacizumabu vs. IFL/placebo pro wtKRAS 13,5 vs. 7,4 měsíců ($p < 0,0001$) a pro mtKRAS 9,3 vs. 5,5 měsíce ($p < 0,0008$), tedy při srovnání mIFL/bevacizumab wtKRAS vs. mtKRAS 13,5 vs. 9,3 měsíce (109). Signifikantní rozdíl byl pouze v dosažení léčebné odpovědi, kde pro kombinaci IFL/bevacizumab byla pro wtKRAS 60 % vs. 37,3 %, ($p = 0,006$) zatímco v případě mtKRAS 43 % vs. 41,2 %. Provedli jsme retrospektivní hodnocení dat v národním registru CORECT a výsledky neprokázaly závislost efektu bevacizumabu v kombinaci s chemoterapií na mutačním stavu onkogenu KRAS. Výsledky naší studie „*Efficacy of bevacizumab and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: broadening KRAS-focused clinical view*“ (184) (viz Příloha 7.1.14.) zásadně ovlivňují strategii léčby metastatického KRK. Všichni pacienti s mtKRAS jsou kandidáty chemoterapie v kombinaci s bevacizumabem či bez něj. Výsledky studie byly paralelně potvrzeny řadou dalších klinických studií.

4.3.3 MikroRNA jako prediktory léčebné odpovědi

Individualizace léčby se bude s přibývajícím množstvím informací o nových molekulárních prediktorech léčebné odpovědi i nadále rozvíjet. Slibnou skupinu prediktivních biomarkerů u KRK představují také mikroRNA. Pomocí mikroRNA byla popsána například možnost predikce léčebné odpovědi na 5-FU: lepší léčebnou odpověď vykazují pacienti se sníženou expresí miR-181b a let-7g (185) a se zvýšenou expresí miR-143 (186). Naopak rezistence k léčbě 5-FU je u pacientů s KRK spojena se zvýšenými hladinami miR-10b (187). Experimentální a klinická data zkoumající souvislost mikroRNA let-7a a onkogenu KRAS ukazují, že pacienti s vysokou hladinou let-7 mohou mít benefit z anti-EGFR terapie i v případě, že jsou nosiči mutace v onkogenu KRAS (188). Pacienti s mtKRAS a wtBRAF byli léčeni ve 3. linii kombinací irinotekan/cetuximab a výsledky léčby u podskupiny s vysokou hladinou let-7 byly signifikantně lepší jak v parametru mPFS (HR 0,88, $p = 0,03$), tak i mOS (HR 0,83, $p = 0,01$). U pacientů s wtKRAS s vysokou hladinou let-7c/miR-125b bylo prokázáno

prodloužení mPFS (7,8 vs. 4,6 měsíce, $p = 0,016$) a stejně tak mOS (16,1 vs. 10,9 měsíce, $p = 0,09$). Naopak u podskupiny pacientů s mtKRAS nebyl prokázán rozdíl u těchto dvou skupin (189).

Vlastní příspěvek k problematice

MikroRNA se ukazují být možnými prediktory léčebné odpovědi také v případě anti-EGFR terapie (190,191,192). Cílem naší studie byla identifikace a validace mikroRNA jako prediktoru doby do progresu (TTP) a léčebné odpovědi na cetuximab a panitumumab u pacientů s metastatickým KRK a wtRAS: „*MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*“ (193) (viz Příloha 7.1.15.). Identifikovali jsme 9 mikroRNA s rozdílnou expresí v tumorech pacientů s wtRAS mKRK s dobrou a špatnou léčebnou odpovědí na léčbu cetuximabem ($p \leq 0,01$). Výsledek jsme následně validovali na dvou nezávislých kohortách pacientů a potvrdili jsme silnou korelaci doby do progresu a hladin exprese miR-31-3p ($0 < 0,001$) a miR-31-5p ($p < 0,001$) u pacientů léčených cetuximabem. U pacientů léčených panitumumabem jsme tuto korelaci nepotvrdili. MiR-31-5p/3p proto představuje slibný prediktivní biomarker na léčbu cetuximabem u wtRAS metastatického KRK. Tento závěr jsme potvrdili i v následující práci „*Efficacy and Toxicity of Panitumumab after Progression on Cetuximab and Predictive Value of MiR-31-5p in Metastatic Wild-type KRAS Colorectal Cancer Patients*“ (194) (viz Příloha 7.1.16.). V rámci národního registru CORECT jsme identifikovali skupinu pacientů, kteří byli léčeni panitumumabem po předchozím selhání léčby cetuximabem, tedy EGFR inhibice po selhání EGFR inhibice. K takové sekvenci EGFR inhibitorů nejsou v současné době žádné podklady a doporučení, a proto jsme se rozhodli tuto podskupinu pacientů analyzovat. Nejdříve jsme potvrdili, že se jedná o pacienty s progresí po předchozí terapii cetuximabem a že důvod změny léčby nebyl jiný, např. toxicita, alergická reakce apod. Finální analýza tak byla provedena na souboru 26 pacientů, u nichž jsme zaznamenali 11 % partiálních odpovědí (PR) a 27 % stabilizací onemocnění (SD). Medián PFS od zahájení léčby panitumumabem byl 2,8 měsíce (95% CI = 1,5–4,0). Současně jsme analyzovali korelaci léčebné odpovědi s hladinami biomarkeru miR-31-5p a potvrdili jsme předchozí zjištění, že zvýšená hladina miR-31-5p v tumoru je spojena s kratším PFS u pacientů léčených cetuximabem (medián PFS 12,3 vs. 4,9 měsíce, $p = 0,038$). Tento vztah jsme opět nepozorovali u pacientů léčených panitumumabem.

Prediktivní význam miR-31-3p byl potvrzen i na větším souboru pacientů s metastatickým KRK, a to v rámci retrospektivní subanalýzy studie FIRE III. Jedná se studii fáze III srovnávající PFS a OS u pacientů s metastatickým, primárně inoperabilním KRK s molekulární charakteristikou wtRAS, léčených chemoterapií FOLFIRI (5-fluorouracil/leukovorin/irinotekan) s bevacizumabem či cetuximabem. Analýza 370 pacientů potvrdila predikci léčebné odpovědi miR-31-3p na léčbu cetuximabem. Medián přežití pacientů s nízkou expresí byl 39,4 měsíce, zatímco s vysokou expresí

20,3 měsíce v případě cetuximabu. V případě bevacizumabu nebyl rozdíl v mediánu těchto dvou skupin statisticky signifikantní. Přežití pacientů, jejichž nádory vykazovaly nízkou expresí miR-31-3p bylo 27,4 měsíce, u těch s vysokou expresí potom 20,1 měsíce (195).

V další práci jsme zkoumali možnost predikce léčebné odpovědi pomocí exprese mikroRNA u pacientů léčených kombinovanou chemoterapií FOLFOX (na bázi 5-fluorouracilu a oxaliplatinu) v kombinaci s bevacizumabem: „*MicroRNAs as outcome predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab in combination with FOLFOX*” (viz příloha 7.1.17.). Na základě expresního profilování mikroRNA jsme identifikovali 67 miRNA s rozdílnou expresí mezi pacienty s dobrou a špatnou odpovědí na terapii na základě RECIST kritérií ($p < 0,05$). Z těchto mikroRNA jsme vybrali 7 pro nezávislou validaci, která potvrdila signifikantně vyšší expresi miR-92b-3p, miR-3156-5p, miR-10a-5p a miR-125-5p ($p < 0,005$) v nádorech pacientů, kteří měli benefit z kombinované léčby FOLFOX/bevacizumab. Identifikovali jsme rovněž 4 miRNA asociované s PFS. Vzhledem k tomu, že studie byla provedena na relativně malém souboru pacientů ($N = 61$), bude potřeba další nezávislá validace pro potvrzení prediktivního potenciálu panelu mikroRNA identifikovaného v naší studii.

4.3.4 Mikrosatelitní nestabilita jako prediktor léčebné odpovědi

Deficientní systém oprav špatného párování bází (deficientní mismatch repair systém, dMMR) se v případě KRK ukazuje být účinným prediktorem léčebné odpovědi na anti-PD-1 monoklonální protilátku pembrolizumab (196). Pacienti s genetickým defektem MMR jsou charakterizováni vysokou frekvencí somatických mutací, které představují neoantigenní cíle mikroprostředí s vysokou koncentrací imunitních checkpointů. Efekt léčby anti-PD-1 protilátkou vede k odblokování imunitní reakce u těchto pacientů, což vedlo k dosažení 57% ORR, zatímco u pacientů s pMRR bylo 0% ORR. V době hodnocení nebylo dosaženo mPFS a mOS u pacientů s dMMR, u pacientů s pMMR byl mPFS 2,3 měsíce a mOS 5,98 měsíce. Aktuálně je tento léčebný koncept zkoušen u pacientů nepředléčených v rámci studie fáze III (KEYNOTE 177) a předléčených u studie fáze II (KEYNOTE 164). Obdobné výsledky byly dosaženy v rámci studie CheckMate-142: nivolumab (NIVO) s či bez ipilimumabu (IPI) a srovnání dMRR (MSI-H) a pMRR (MSS) u populace pacientů s metastatickým KRK po progresi po jedné a vícero liniích léčby. U pacientů s dMRR bylo dosaženo 25,5% ORR, mPFS 17 měsíců při monoterapii NIVO a 33,3% při kombinaci NIVO/IPI, mPFS nebylo dosaženo v době hodnocení. U pacientů s pMRR bylo při monoterapii NIVO dosaženo 0% ORR, mPFS 1,3 měsíce a mOS 3,72 měsíce. Při kombinaci NIVO/IPI bylo dosaženo 10% ORR, mPFS 2,28 měsíce a mOS 11,53 měsíce (197).

Řada studií hodnotila vztah MSI-H a MSS ve vztahu k prognóze a léčebné odpovědi u pacientů s KRK. V rámci metaanalýzy bylo potvrzeno, že MSI je příznivý prognostický marker jak pro délku bezpříznakového přežití (DFS), tak i pro celkové přežití mOS (198). Přínos adjuvantní chemoterapie na bázi 5-FU ve srovnání se samostatnou chirurgickou resekci u pacientů s MSI nebyl potvrzen pro stadium II ani III (32), což se promítá do současných doporučení pro léčbu časných stadií KRK. Výsledky retrospektivního hodnocení efektu chemoterapie na bázi 5-FU samotného, či moderní kombinace na bázi irinotekanu nebo oxaliplatinu v kombinaci s 5-FU a bevacizumabem znovu potvrdily rozdíly mezi MSI-H a MSS i pro metastatický KRK (199). Pacienti s MSI-H měli srovnatelný mOS na léčbě monoterapií 5-FU jako na kombinaci irinotekanu v kombinaci s 5-FU bez či s bevacizumabem v první linii léčby metastatického KRK mOS 18 vs. 17,2 vs. 13,8 měsíce. Většího efektu dosáhli pacienti léčení kombinací s oxaliplatinou mOS 24,2 měsíce. Při hodnocení podskupiny pacientů pouze s wtBRAF nebyl benefit kombinované léčby oproti monoterapii s 5-FU v případě MSI nádorů signifikantní (HR 0,93, $p = 0,83$). U pacientů s MSS však byl jednoznačný benefit pro kombinovanou léčbu na bázi irinotekanu či oxaliplatinu HR 0,54 ($p < 0,001$).

5 Závěr

KRK patří mezi nejčastější nádory mužů i žen v naší populaci. Časná diagnostika nádorů, včetně KRK, významným způsobem ovlivňuje prognózu pacienta stejně jako náklady na léčbu. Individualizace léčby založená na zohlednění histopatologického nálezu, klinického stadia onemocnění, celkového stavu pacienta a dalších ukazatelů se běžně používá v klinické praxi. U KRK se při terapeutickém plánování významně uplatňují i molekulární biomarkery, v současné době především mutační stav onkogenů RAS a BRAF anebo stanovení mikrosatelitní nestability. V budoucnu lze očekávat implementaci nových molekulárních biomarkerů, které nám umožní nejen časnou neinvazivní diagnostiku KRK, ale také vyšší míru individualizace léčby pro pacienty s pokročilými stadii onemocnění.

6 Reference

7 Citovaná literatura

1. IBA. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. *www.svod.cz*. [Online]. [Citace: 03. 11 2016.]
2. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, Bouvier AM, Simon T, Allez M, Brixi H, Gornet JM, Altwegg R, Beau P, Duclos B, Bourreille A, Faivre J, Peyrin-Biroulet L, Fléjou JF, Carrat F a Group., CESAME Study. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;145(1):166–175.
3. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(4):789–799.
2. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, Bouvier AM, Simon T, Allez M, Brixi H, Gornet JM, Altwegg R, Beau P, Duclos B, Bourreille A, Faivre J, Peyrin-Biroulet L, Fléjou JF, Carrat F a Group., CESAME Study. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;145(1):166–175.
3. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(4):789–799.
4. Liu L, Zhuang W, Wang RQ, Mukherjee R, Xiao SM, Chen Z, Wu XT, Zhou Y, Zhang HY. Is dietary fat associated with the risk of colorectal cancer? A meta-analysis of 13 prospective cohort studies. *Eur J Nutr*. 2011;50(3):173–184.
5. Alexander DD, Weed DL, Cushing CA, Lowe KA. Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2011;20(4):293–307.
6. Cheng J, Chen Y, Wang X, Wang J, Yan Z, Gong G, Li G, Li C. Meta-analysis of prospective cohort studies of cigarette smoking and the incidence of colon and rectal cancers. *Eur J Cancer Prev*. 2015;24(1):6–15.
7. De Bruijn KM, Arends LR, Hansen BE, Leeflang S, Ruiter R, van Eijck CH. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg*. 2013;100(11):1421–1429.
8. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009;125(1):171–180.
9. Keum N, Greenwood DC, Lee DH, Kim R, Aune D, Ju W2, Hu FB, Giovannucci EL. Adult weight gain and adiposity-related cancers: a dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3):pii:dju428.

10. Ralston RA, Truby H, Palermo CE, Walker KZ. Colorectal cancer and nonfermented milk, solid cheese, and fermented milk consumption: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(9):1167–1179.
11. Yu XF, Zou J, Dong J. Fish consumption and risk of gastrointestinal cancers: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol*. 2014;20(41):15398–15412.
12. Chan AT1, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005;294(8):914–923.
13. Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sørensen HT. Low-Dose Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Colorectal Cancer Risk: A Population-Based, Case-Control Study. *Ann Intern Med*. 2015;163(5):347–355.
14. Singh S, Singh PP, Murad MH, Singh H, Samadder NJ. Prevalence, risk factors, and outcomes of interval colorectal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(9):1375–1389.
15. Cooper GS, Xu F, Barnholtz Sloan JS, Schluchter MD, Koroukian SM. Prevalence and predictors of interval colorectal cancers in medicare beneficiaries. *Cancer*. 2012;118(12):3044–3052.
16. Kaminski MF, Regula J, Kraszewska E, Polkowski M, Wojciechowska U, Didkowska J, Zwierko M, Rupinski M, Nowacki MP, Butruk E. Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(19):1795–803.
17. Laghi A, Neri E, Regge D. Editorial on the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) guideline on clinical indications for CT colonography in the colorectal cancer diagnosis. *Radiol Med*. Nov 2015;120(11):1021-1023.
18. Floriani I, Torri V, Rulli E, Garavaglia D, Compagnoni A, Salvolini L, Giovagnoni A. Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Magn Reson Imaging*. 2010;31(1):19–31.
19. Llamas-Elvira JM, Rodríguez-Fernández A, Gutiérrez-Sáinz J, Gomez-Rio M, Bellon-Guardia M, Ramos-Font C, Rebollo-Aguirre AC, Cabello-García D, Ferrón-Orihuela A. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in the preoperative staging of colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34(6):859–67.
20. Bartolotta TV, Taibbi A, Midiri M, La Grutta L, De Maria M, Lagalla R. Characterisation of focal liver lesions undetermined at grey-scale US: contrast-enhanced US versus 64-row MDCT and MRI with liver-specific contrast agent. *Radiol Med*. 2010;115(5):714–731.
21. Tan E, Gouvas N, Nicholls RJ, Ziprin P, Xynos E, Tekkis PP. Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. *Surg Oncol*. 2009;18(1):15–24.
22. Petersen RK, Hess S, Alavi A, Høilund-Carlsen PF. Clinical impact of FDG-PET/CT on colorectal cancer staging and treatment strategy. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;4(5):471-482. eCollection 2014.

23. (<http://www.uzis.cz/publikace/tnm-klasifikace-zhoubnych-novotvaru-7-vydani-original-2011>), [Online], [Citace: 03.11 2016.]
24. Suchánek. CRC screening in the Czech Republic and its new population-based design. www.crcprevention.eu/res/file/presentations2015/suchanek.pdf . www.crcprevention.eu. [Online] IBA, 2015. [Citace: 03. 11 2016.]
25. Kysela P, Kala Z. Nákladová efektivita v chirurgické onkologii. *Postgraduální medicína*. 2011;8:1212-4184.
26. Farmakoekonomika onkologické péče. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0027024&tab=prices>. *SÚKL*. [Online] Státní ústav pro kontrolu léčiv [Citace: 03. 11 2016.]
27. <http://www.linkos.cz/informace-pro-praxi/modra-kniha/41-farmakoekonomika-onkologicke-pece/>. ČOS. [Online] ČOS, 2016. [Citace: 19. 9 2016.]
28. kolorektum.cz. www.kolorektum.cz. [Online] IBA, 2014. [Citace: 19. 9 2016.]
29. Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370(9604):2020–2029.
30. Wu X, Zhang J, He X, Wang C, Lian L, Liu H, Wang J, Lan P. Postoperative adjuvant chemotherapy for stage II colorectal cancer: a systematic review of 12 randomized controlled trials. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(3):646–656.
31. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247–257.
32. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri V, Ribic C, Grothey A, Moore M, Zaniboni A, Seitz JF, Sinicrope F, Gallinger S. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219–3226.
33. Kim JE, Hong YS, Kim HJ, Kim KP, Lee JL, Park SJ, Lim SB, Park IJ, Kim CW, Yoon YS, Yu CS, Kim JC, Hoon KJ, Kim TW. Defective Mismatch Repair Status was not Associated with DFS and OS in Stage II Colon Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(Suppl 3):S630–637.
34. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Tian Y, Xu F. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. Jul 2014;25(7):1346–1355.

35. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, Beier F, Stroh C, Rougier P, van Krieken JH, Ciardiello F. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):692–700.
36. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, Lenz HJ, Heinemann V, Klinkhardt U, Beier F, Duecker K, van Krieken JH, Tejpar S. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2015;51(10):1243–1252.
37. Douillard JY1, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wiezorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023-1034.
38. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, Celik I, Köhne CH. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. Jul 2012;48(10):1466–1475.
39. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, Mezi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, Tonini G, Carlomagno C, Allegrini G, Chiara S, D'Amico M, Granetto C, Cazzaniga M, Boni L, Fontanini G, Falcone A. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. Oct 2015;16(13):1306–1315.
40. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A & Arnold D. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*. 2013;24(6):64–72.
41. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247–257.
42. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, Kim GP, Yothers G, Allegra C, Moore MJ, Gallinger S, Sargent DJ. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):863–875.
43. Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, Bosman F, Roth AD. Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the puzzle. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):841–844.
44. Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Ann Oncol*. 2015;26(1):126–132.
45. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(19):3109–3116.

46. André T, de Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, Scriver A, Hickish T, Tabernero J, Van Laethem JL, Banzi M, Maartense E, Shmueli E, Carlsson GU, Scheithauer W, Papamichael D, Möehler M, Landolfi S, Demetter P, Colote S. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4176–4187.
47. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, Wolmark N. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol*. 2011;29(28):3768–3774.
48. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H 3rd, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kröning H, Maroun J, Marschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schüller J, Seitz JF, Stabuc B, T. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(26):2696-2704.
49. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, Fields AL, Mayer RJ. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3456–3461.
50. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Topham C, Tabernero J, André T, Sobrero AF, Mini E, Greil R, Di Costanzo F, Collette L, Cisar L, Zhang X, Khayat D, Bokemeyer C, Roth AD, Cunningham D. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol*. 2009;27(19):3117–3125.
51. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, Atkins JN, Seay TE, Fehrenbacher L, Goldberg RM, O'Reilly S, Chu L, Azar CA, Lopa S, Wolmark N. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol*. 2011;29(1):11–16.
52. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, Cunningham D, Cartwright TH, Hecht JR, Rivera F, Im SA, Bodoky G, Salazar R, Maindrault-Goebel F, Shacham-Shmueli E, Bajetta E, Makrutzki M, Shang A, André T, Hoff PM. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(12):1225–1233.
53. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, Smyrk TC, Sinicrope FA, Chan E, Gill S, Kahlenberg MS, Shields AF, Quesenberry JT, Webb TA, Farr GH Jr, Pockaj BA, Grothey A, Goldberg RM. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2012;307(13):1383–1393.
54. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, Thaler J, Bridgewater J, Petersen LN, Blons H, Collette L, Van Cutsem E, Rougier P, Salazar R, Bedenne L, Emile JF, Laurent-Puig P, Lepage C a Investigators, PETACC-8 Study. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):862–873.
55. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Mauer M, Tanis E, Van Cutsem E,

- Scheithauer W, Gruenberger T a Trac, EORTC Gastro-Intestinal. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(12):1208–1205.
56. Primrose J, Falk S, Finch-Jones M, Valle J, O'Reilly D, Siriwardena A, Hornbuckle J, Peterson M, Rees M, Iveson T, Hickish T, Butler R, Stanton L, Dixon E, Little L, Bowers M, Pugh S, Garden OJ, Cunningham D, Maughan T, Bridgewater J. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(6):601–611.
57. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* Aug 2000;18(16):2938–2947.
58. Douillard JY a Group., V-303 Study. Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer. *Oncology.* 2000;14(12):51–55.
59. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, et. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):4866–4875.
60. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229–237.
61. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Saltz L. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(12):2006–2012.
62. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol.* Oct 2007;25(30):4779–4786.
63. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G a O, Gruppo Oncologico Nord. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nor. *J Clin Oncol.* 2007;25(13):1670–1676.
64. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335–2342.

65. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Rittweger K, Gilberg F, Saltz L. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *Br J Cancer*. 2011;105(1):58–64.
66. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB 3rd a E3200., Eastern Cooperative Oncology Group Study. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1539–1544.
67. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, von Moos R, Viéitez JM, Bouché O, Borg C, Steffens CC, Alonso-Orduña V, Schlichting C, Reyes-Rivera I, Bendahmane B, André T, Kubicka S a Investigators., ML18147 Study. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):29–37.
68. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Taberero J, Yoshino T, Lenz HJ, Goldberg RM, Sargent DJ, Cihon F, Cupit L, Wagner A, Laurent D a Group., CORRECT Study. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9863): 303–312.
69. Taberero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, Ciuleanu TE, Portnoy DC, Van Cutsem E, Grothey A, Prausová J, Garcia-Alfonso P, Yamazaki K, Clingan PR, Lonardi S, Kim TW, Simms L, Chang SC, Nasroulah F a Investigat, RAISE Study. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):499-508.
70. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Ducreux M, Falcone A, Grothey A, Gruenberger T, Haustermans K, Heinemann V., ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. Aug 2016;27(8):1386–1422.
71. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2011–2019.
72. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, André T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner KS, Rong A, Gansert J. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4706–4713.

73. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(4):337–345.
74. Price TJ, Peeters M, Kim TW, Li J, Cascinu S, Ruff P, Suresh AS, Thomas A, Tjulandin S, Zhang K, Murugappan S, Sidhu R. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2014;1(6):569–579.
75. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D, Chiara S, Carlomagno C, Boni C, Allegrini G, Boni L, Falcone A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(17):1609–1618.
76. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, Heintges T, Lerchenmüller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Stauch M, Scheithauer W, Hielscher J, Scholz M, Müller S, Link H, Niederle N, Rost A. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1065–1075.
77. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, Yu H, Oliner KS, Go WY. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal. *J Clin Oncol.* 2014;32(21):2240–2247.
78. Venook A, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocent Fi, Mahoney M, O’Nei N, Shaw J, Polite B, Hochster H, Goldberg R, Mayer R, Schilsky R, Bertagnolli M, Blanke C, for the ALLIANCE and SWOG. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of FOLFIRI or FOLFOX with Bevacizumab or Cetuximab for patients w/ KRAS wild type untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum. *J Clin Oncol.* 2015:LBA3.
79. Kocáková I, Vyzula R, Špelda S, Demlová R, Kocák I, Karásek P, Vetchá H, Kiss I. Chemoterapie raltitrexed a oxaliplatinu ve druhé linii léčby metastického kolorektálního karcinomu předlčeného kombinací fluorouracil/leukovorin ±irinotekan. *Klin Onkol.* 2003;16(6):265–271.
80. Gravalos C, Salut A, García-Girón C, García-Carbonero R, León AI, Sevilla I, Maurel J, Esteban B, García-Rico E, Murias A, Cortés-Funes H. A randomized phase II study to compare oxaliplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOX4) versus oxaliplatin plus raltitrexed (TOMOX) as first-line chemotherapy for advanced colorectal cancer. *Clin Transl Oncol.* 2012;14(8):606–612.
81. Cascinu S, Graziano F, Ferraù F, Catalano V, Massacesi C, Santini D, Silva RR, Barni S, Zaniboni A, Battelli N, Siena S, Giordani P, Mari D, Baldelli AM, Antognoli S, Maisano R, Priolo D, Pessi MA, Tonini G, Rota S, Labianca R. Raltitrexed plus oxaliplatin (TOMOX) as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. A phase II study of the Italian Group for the Study of Gastrointestinal Tract Carcinomas (GISCAD). *Annals of Oncology.* 2002;13(5):716–720.
82. Kiss I, Bortlicek Z, Melichar B, Poprach A, Halamkova J, Vyzula R, Dusek L, Buchler T. Efficacy and toxicity of bevacizumab on combination with chemotherapy in different lines of treatment for metastatic colorectal carcinoma. *Anticancer Research.* 2014;34(2):949–954.

83. Buchler T, Pavlik T, Melichar B, Bortlicek Z, Usiakova Z, Dusek L, Kiss I, Kohoutek M, Benesova V, Vyzula R, Abrahamova J, Obermannova R. Bevacizumab with 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin versus bevacizumab with capecitabine and oxaliplatin for metastatic colorectal carcinoma: results of a large registry-based cohort analysis. *BMC Cancer*. 2014;7(14):323.
84. Hirt S, Borg C, Bertaut A, Bouche O, Adenis A, Deplanque G, Francois E, Conroy T, Ghiringhelli F, Guetz G, Seitz JF, Artru P, Stanbury T, Marc G, Bennouna DJ. Bevacizumab or cetuximab plus chemotherapy after progression with bevacizumab plus chemotherapy in patients with wtKRAS metastatic colorectal cancer: A randomized phase II study (Prodige 18 – Accord 22). *J Clin Oncol*. 2016;34(suppl.):abstract 3514.
85. Cutsem E, Sobrero AF, Siena S, Falcone F, Ychou M, Humblet Y, Bouche O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Tabernero J, Yoshino T, Lenz HJ, Goldberg RM, Sargent DJ, Cihon F, Wagner A, Laurent D, Grothey A, and on behalf of CORRECT Investigator. Phase III CORRECT trial of regorafenib in metastatic colorectal cancer (mCRC). ASCO. *J Clin Oncol*. 2012; abstr. 3502.
86. Kopeckova K, Buchler T, Bortlicek Z, Hejduk K, Chloupkova R, Melichar B, Pokorna P, Tomasek J, Linke Z, Petruzelka L, Kiss I, Prausova J. Regorafenib in the Real-Life Clinical Practice: Data from the Czech Registry. *Target Oncol*. 2016 [Epub ahead of print]. [Citováno 14. Sep 2016].
87. Benson AB 3rd, Kiss I, Bridgewater J, Eskens FA, Sasse C, Vossen S, Chen J, Van Sant C, Ball HA, Keating A, Krivoshik A. BATON-CRC: A Phase II Randomized Trial Comparing Tivozanib Plus mFOLFOX6 with Bevacizumab Plus mFOLFOX6 in Stage IV Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016 [Epub ahead of print]. [Citováno 11. Jul 2016].
88. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9(4):138–141
89. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci*. Mar 2015;60(3):762–772.
90. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(9):1423–1431.
91. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449–2460.
92. Farkas SA, Vymetalkova V, Vodickova L, Vodicka P, Nilsson TK. DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/ β -catenin signaling pathway genes. *Epigenomics*. 2014;6(2):179–191.
93. Minoo P. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Front Oncol*. 2013;3(1-4):266.
94. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1989;339(18):1277–1284.
95. O'Brien MJ, Zhao Q, Yang S. Colorectal serrated pathway cancers and precursors. *Histopathology*. 2015;66(1):49–65.
96. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009(8):102.

97. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. Nov 2015;21(11):1350–1356.
98. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
99. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007;72(5-6):397–402.
100. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008;68(14):5795–5802.
101. Liu L, Chen L, Xu Y, Li R, Du X. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400(2):236–240.
102. Nie J, Liu L, Zheng W, Chen L, Wu X, Xu Y, Du X, Han W. MicroRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2. *Carcinogenesis*. 2012;33(1):220–225.
103. Boominathan L. The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):613–639.
104. Wang H, Wu J, Meng X, Ying X, Zuo Y, Liu R, Pan Z, Kang T, Huang W. MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):1033–1042.
105. Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Kuwano H, Mori M. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2011;38(5):1437–1443.
106. Dews M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, Furth E, Enders GH, El-Deiry W, Schelter JM, Cleary MA, Thomas-Tikhonenko A. The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res*. 2010;70(20):8233–8246.
107. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*. 2013;62(3): 367–386.
108. Ganesh S, Sier CF, Heerding MM, Griffioen G, Lamers CB, Verspaget HW. Urokinase receptor and colorectal cancer survival. *Lancet*. 1994;344(8919):401–402.
109. Verspaget HW, Sier CF, Ganesh S, Griffioen G, Lamers CB. Prognostic value of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1995;31A(7-8):1105–1109.
110. Suzuki S, Hayashi Y, Wang Y, Nakamura T, Morita Y, Kawasaki K, Ohta K, Aoyama N, Kim SR, Itoh H, Kuroda Y, Doe WF. Urokinase type plasminogen activator receptor expression in colorectal neoplasms. *Gut*. 1998;43(6):798–805.

111. Ganesh S, Sier CF, Griffioen G, Vloedgraven HJ, de Boer A, Welvaart K, van de Velde CJ, van Krieken JH, Verheijen JH, Lamers CB, et al. Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1994;54(15):4065–4071.
112. de Bruin PA, Griffioen G, Verspaget HW, Verheijen JH, Lamers CB. Plasminogen activators and tumor development in the human colon: activity levels in normal mucosa, adenomatous polyps, and adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1987;47(17):4654–4657.
113. Halamkova J, Kiss I, Pavlovsky Z, Tomasek J, Jarkovsky J, Cech Z, Tucek S, Hanakova L, Moulis M, Zavrelouva J, Man M, Benda P, Robek O, Kala Z, Penka M. Clinical significance of the plasminogen activator system in relation to grade of tumor and treatment response in colorectal carcinoma patients. *Neoplasma.* 2011;58(2):377–385.
114. Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, Schleef RR, Ginsburg D. Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation. *N Engl J Med.* 1992;327(24):1729–1733.
115. Hill SA, Shaughnessy SG, Joshua P, Ribau J, Austin RC, Podor TJ. Differentiation mechanism targeting type 1 plasminogen activator inhibitor and vitronectin into the storage granules of a human megakaryocytic cell line. *Blood* 1996;87(12):2061–5073.
116. Halamková J, Kiss I, Pavlovsky Z, Tomasek J, Jarkovsky J, Čech Z, Tuček Š, Hanáková L, Moulis M, Zavřelová J, Man M, Benda P, Robek O, Kala Z, Penka M. Clinical impact of PAI 1 4G/5G gene polymorphism in colorectal carcinoma. *Neoplasma.* 2013(60):151–159.
117. Conaway CC, Yang YM, Chung FL. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr Drug Metab.* Jun 2002;3(3):233–255.
118. Yang Y, Yan H, Li Y, Yang ST, Zhang X. Isothiocyanates from Broccolini seeds induce apoptosis in human colon cancer cells: proteomic and bioinformatic analyses. *Pharmazie.* 2011;66(5):382–390.
119. Economopoulos KP, Sergentanis TN. STM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2010:1617–1631.
120. Hlavata I, Vrana D, Smerhovsky Z, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P, Novotny J, Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. Association between exposure-relevant polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 and risk of colorectal cancer in a Czech population. *Oncol Rep.* 2010;25(5):1347–1353.
121. Hezova R, Bienertova-Vasku, Sachlova M, Brezkova V, Vasku A, Svoboda M, Radová L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central-European population. *Eur J Med Res.* 2012(17):17.
122. Chin LJ, Slack FJ. A truth serum for cancer – microRNAs have major potential as cancer biomarkers. *Cell Res.* 2008;18(10):983–984.
123. Bonfrate L, Altomare DF, Di Lena M, Travaglio E, Rotelli MT, De Luca A, Portincasa P. MicroRNA in colorectal cancer: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2013;22(3):311–320.

124. Slaby O. *MikroRNA v onkologii. Jednonukleotidové polymorfizmy*. Praha: Galén, 2012:12-14.
125. Hezova, R., Kovarikova, A., Bienertova-Vasku, J., Sachlova, M., Redova, M., Vasku, A., Svoboda, M., Radova, L., Kiss, I., Vyzula, R., Slaby, O. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(22):2827–2831.
126. Faltejskova P, Besse A, Sevcikova S, Kubiczkova L, Svoboda M, Smarda J, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27(11):1401–1408.
127. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 2008;299(4):425–436.
128. Faltejskova P1, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, Radova L, Fabian P, Slaba K, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 2012;16(11):2655–2666.
129. Vychytilova-Faltejskova P, Pesta M, Radova L, Liska V, Daum O, Kala Z, Svoboda M, Kiss I, Slaby O. Genome-wide microRNA Expression Profiling in Primary Tumors and Matched Liver Metastasis of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016;13(4):311–316.
130. Allison JE, Tekawa IS, Ransom LJ, Adrain AL. A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*. 1996;334(3):155–159.
131. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, Vilkin A, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Leshno M, Niv Y. A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*. 2007;146(4):244–255.
132. Takai T, Kanaoka S, Yoshida K, Hamaya Y, Ikuma M, Miura N, Sugimura H, Kajimura M, Hishida A. Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(6):1888–1893.
133. Lind GE, Danielsen SA, Ahlquist T, Merok MA, Andresen K, Skotheim RI, Hektoen M, Rognum TO, Meling GI, Hoff G, Bretthauer M, Thiis-Evensen E, Nesbakken A, Lothe RA. Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. *Mol Cancer*. 2011;10:85.
134. Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, Sileri P, Cretella M, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. *J Gastroenterol*. 011;46(12):1391–1402.
135. Kalimutho M, Di Cecilia S, Del Vecchio Blanco G, Roviello F, Sileri P, Cretella M, Formosa A, Corso G, Marrelli D, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Epigenetically silenced miR-34b/c as a novel faecal-based screening marker for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(11):1770–1778.
136. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*. 2008;54(2):414–423.

137. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58(10):1375–1381.
138. Faltejskova P, Bocanek O, Sachlova M, Svoboda M, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Circulating miR-17-3p, miR-29a, miR-92a and miR-135b in serum: Evidence against their usage as biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2012;12(4):199–204.
139. Vychytilova-Faltejskova P, Radova L, Sachlova M, Kosarova Z, Slaba K, Fabian P, Grolich T, Prochazka V, Kala Z, Svoboda M, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer. *Carcinogenesis*. 2016;37(10):941–950.
140. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights*. 2006;(2):113–121.
141. Wang X, Wang J, Ma H, Zhang J, Zhou X. Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2012;29(2):919–927.
142. Zhang P, Ji DB, Han HB, Shi YF, Du CZ, Gu J. Downregulation of miR-193a-5p correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(34):12241–12248.
143. Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, DeRemer DL, Somanath PR. Anti-angiogenic therapy for cancer: An update. *Pharmacotherapy*. 2012;32(12):1095–1111.
144. Tarallo V, De Falco S. The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;64:185–189.
145. Ranpura V, Pulipati B, Chu D, Zhu X, Wu S. Increased risk of high-grade hypertension with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *Am J Hypertens*. May 2010;23(5):460–468.
146. Österlund P, Soveri LM, Isoniemi H, Poussa T, Alanko T, Bono P. Hypertension and overall survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing chemotherapy. *Br J Cancer*. Feb 2011;104(4):599–604.
147. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007;131(3):463–475.
148. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, Sindhvani V, Blaszkowsky LS, Yoon SS, Lahdenranta J, Bhargava P, Meyerhardt J, Clark JW, Kwak EL, Hezel AF, Miksad R, Abrams TA, Enzinger PC, Fuchs CS, Ryan DP, Jain RK. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol*. Jun 2009;27(18):3027–3035.
149. Crane CH, Winter K, Regine WF, Safran H, Rich TA, Curran W, Wolff RA, Willett CG. Phase II study of bevacizumab with concurrent capecitabine and radiation followed by maintenance gemcitabine and bevacizumab for locally advanced pancreatic cancer: Radiation Therapy Oncology Group RTOG 0411. *J Clin Oncol*. 2009;27(25):4096–4102.

150. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001;19(4):1207–1225.
151. Ince WL, Jubb AM, Holden SN, Holmgren EB, Tobin P, Sridhar M, Hurwitz HI, Kabbinavar F, Novotny WF, Hillan KJ, Koeppen H. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(13):981–989.
152. Sobrero AF, Bruzzi P. Vatalanib in advanced colorectal cancer: two studies with identical results. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1938–1940.
153. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006;38(9):1060–1065.
154. Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Sesboüé R, Di Fiore F, Bossut J, Fiant E, Frébourg T, Sabourin JC. Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls. *Mod Pathol.* 2011; 24(8):1090–1100.
155. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;347:21–41.
156. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov.* 2014;4(11):12069–1280.
157. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25(22):3230–3237.
158. Tabernero J, Cervantes A, Rivera F, Martinelli E, Rojo F, von Heydebreck A, Macarulla T, Rodriguez-Braun E, Eugenia Vega-Villegas M, Senger S, Ramos FJ, Roselló S, Celik I, Stroh C, Baselga J, Ciardiello F. Pharmacogenomic and pharmacoproteomic studies of cetuximab in metastatic colorectal cancer: biomarker analysis of a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1181–1189.
159. Hobor S, Van Emburgh BO, Crowley E, Misale S, Di Nicolantonio F, Bardelli A. TGF α and amphiregulin paracrine network promotes resistance to EGFR blockade in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2014;20(24):6429–6438.
160. Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, Jacobs B, Hemmings G, Brown S, Barrett JH, Tejpar S, Quirke P, Seymour MT. Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2016 [Epub ahead of print].
161. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, de Jong JH, de Boer OJ, van Leersum R, Bijlsma MF, Rodermond H, van der Heijden M, van Noesel CJ, Tuynman JB, Dekker E, Markowitz F, Medema JP, Vermeulen L. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med.* 2013;19(5):614–618.

162. Sadanandam A, Wang X, de Sousa E Melo F, Gray JW, Vermeulen L, Hanahan D, Medema JP. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer. *Cell Cycle*. 2014;13(3):353–357.
163. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, Zalcborg JR, Simes J, Moore MJ, Tebbutt NC, Price TJ, Shapiro JD, Pavlakis N, Gibbs P, Van Hazel GA, Lee U, Haq R, Virk S, Tu D, Lorimer IA, NCIC Clinical Trials Group and the A. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer – results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin Cancer Res*. 2014;20:744–753.
164. Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, Humblet Y, Van Laethem J-L, André T, Wiezorek J, Reese D, Patterson SD. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013, 19:1902–1912.
165. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, Lowe C, Seligmann JF, Wadsley J, Maisey N, Chau I, Hill M, Dawson L, Falk S, O'Callaghan A, Benstead K, Chambers P, Oliver A, Marshall H, Napp V, Quirke P. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:749–759.
166. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Sorich MJ. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888–1894.
167. Valtorta E1, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, Dimartino V, Hobor S, Jacobs B, Ercolani C, Lamba S, Scala E, Veronese S, Laurent-Puig P, Siena S, Tejpar S, Mottolese M, Punt CJ, Gambacorta M, Bardelli A, Di Nicolantonio F. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1259–1265.
168. Mekenkamp LJ1, Tol J, Dijkstra JR, de Krijger I, Vink-Börger ME, van Vliet S, Teerenstra S, Kamping E, Verwiel E, Koopman M, Meijer GA, van Krieken JH, Kuiper R, Punt CJ, Nagtegaal ID. Beyond KRAS mutation status: influence of KRAS copy number status and microRNAs on clinical outcome to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:292.
169. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330–331.
170. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Corà D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C, Ribero D, Russolillo N, Muratore A, Massucco P, Pisacane A, Molinaro L, Valtorta E, Sartore-Bianchi A, Risio M, Capussotti L, Gambacorta M,. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatient") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2011;1(6):508–523.
171. Yonesaka K1, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, Ercan D, Rogers A, Roncalli M, Takeda M, Fujisaka Y, Philips J, Shimizu T, Maenishi O, Cho Y, Sun J, Destro A, Taira K, Takeda K, Okabe T, Swanson J, Itoh H, Takada M, Lifshits E, Oku. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med*. 2011;3(99):86–99.

172. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Scala E, Cassingena A, Zecchin D, Apicella M, Migliardi G, Galimi F, Lauricella C, Zanon C, Perera T, Veronese S, Corti G, Amatu A, Gambacorta M, Diaz LA Jr, Sausen M, V. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(6):658–673.
173. Van Cutsem E, Eng C, Nowara E, Swieboda-Sadlej A, Tebbutt NC, Mitchell E, Davidenko I, Stephenson J, Elez E, Prenen H, Deng H, Tang R, McCaffery I, Oliner KS, Chen L, Gansert J, Loh E, Smethurst D, Tabernero J. Randomized phase Ib/II trial of rilotumumab or ganitumab with panitumumab versus panitumumab alone in patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(16):4240–4250.
174. 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, Ma. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753–762.
175. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouché O, Reid J, Stone S, Penault-Llorca F. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5924–5930.
176. Ramanathan RK, Hwang JJ, Zamboni WC, Sinicrope FA, Safran H, Wong MK, Earle M, Brufsky A, Evans T, Troetschel M, Walko C, Day R, Chen HX, Finkelstein S. Low overexpression of HER-2/neu in advanced colorectal cancer limits the usefulness of trastuzumab (Herceptin) and irinotecan as therapy. A phase II trial. *Cancer Invest.* 2004;22(6):858–865.
177. Clarck JW, Niedzwicki D, Hollis D, Mayer R. Phase II trial of 5-fluorouracil (5-FU), leucovorine (LV), oxaliplatin (Ox) and trastuzumab (T) for patients with metastatic colorectal cancer (CRC) refractory to initial therapy. ASCO. *J Clin Oncol.* 2003;abst. 3584.
178. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, Depetris I, Martinelli E, Troiani T, Ciardiello F, Racca P, Bertotti A, Siravegna G, Torri V, Amatu A, Ghezzi S, Marrapese G, Palmeri L, Valtorta E, Cassing. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* Jun 2016;17(6):738–746.
179. Martin V, Landi L, Molinari F, Fountzilas G, Geva R, Riva A, Saletti P, De Dosso S, Spitale A, Tejpar S, Kalogeras KT, Mazzucchelli L, Frattini M, Cappuzzo F. HER2 gene copy number status may influence clinical efficacy to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;108(3):668–675.
180. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, Le AT, Haney J, Schulte N, Chionh F, Hardingham J, Mariadason J, Tebbutt N, Doebele RC, Weickhardt AJ, Varella-Garcia M. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res.* 2014;12(1):111–118.

181. Lin E, Li L, Guan Y, Soriano R, Rivers CS, Mohan S, Pandita A, Tang J, Modrusan Z. Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res.* 2009;7(9):1466–1476.
182. Jing C, Jin YH, You Z, Qiong Q, Jun Z. Prognostic value of amphiregulin and epiregulin mRNA expression in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget.* 2016. [Epub ahead of print].
183. Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist.* 2009;14(1):22–28.
184. Bencsikova B, Bortlicek Z, Halamkova J, Ostrizkova L, Kiss I, Melichar B, Pavlik T, Dusek L, Valik D, Vyzula R, Zdrzilova-Dubská L. Efficacy of bevacizumab and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: broadening KRAS-focused clinical view. *BMC Gastroenterol.* Mar 2015;15:37.
185. Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, Yamamoto M, Ju J. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2006;3(5):317–324.
186. Borralho PM, Kren BT, Castro RE, da Silva IB, Steer CJ, Rodrigues CM. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS J.* 2009;276(22):6689–6700.
187. Nishida N, Yamashita S, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(9):3065–3071.
188. Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N, Catalano V, Loupakis F, Rabitti C, Santini D, Tonini G, Fiorentini G, Rossi D, Falcone A, Magnani M. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. *Oncologist.* 2012;17(6):823–829.
189. Cappuzzo F, Sacconi A, Landi L, Ludovini V, Biagioni F, D'Incecco A, Capodanno A5, Salvini J, Corgna E, Cupini S, Barbara C, Fontanini G, Crinò L, Blandino G. MicroRNA signature in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies. *Clin Colorectal Cancer.* 2014;13(1):37–45.
190. Mlcochova J, Faltejškova P, Nemecek R, Svoboda M, Slaby O. MicroRNAs targeting EGFR signalling pathway in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(10):1615–1624.
191. Manceau G, Imbeaud S, Thiébaud R, Liébaert F, Fontaine K, Rousseau F, Génin B, Le Corre D, Didelot A, Vincent M, Bachet JB, Chibaudel B, Bouché O, Landi B, Bibeau F, Leroy K, Penault-Llorca F, Van Laethem JL, Demetter P, Tejpar S, Rossi S, Mosakhani N. Hsa-miR-31-3p expression is linked to progression-free survival in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(12):3338–3347.
192. Mosakhani N, Lahti L, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundström J, Ristamäki R, Osterlund P, Knuutila S, Sarhadi VK. MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated

chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genet.* 2012;205(11):545–551

193. Mlcochova J, Faltejskova-Vychytilova P, Ferracin M, Zagatti B, Radova L, Svoboda M, Nemecek R, John S, Kiss I, Vyzula R, Negrini M, Slaby O. MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Oncotarget.* Nov 2015;6(36):38695–386704.

194. Kiss I, Mlcochova J, Bortlicek Z, Poprach A, Drabek J, Vychytilova-Faltejskova P, Svoboda M, Buchler T, Batko S, Ryska A, Hajduch M, Slaby O. Efficacy and Toxicity of Panitumumab After Progression on Cetuximab and Predictive Value of MiR-31-5p in Metastatic Wild-type KRAS Colorectal Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2016;36(9):4955–4959.

195. Laurent-Puig P, Grisoni ML, Heinemann V, Bonnetain F, Fontaine K, Vazart C, Decaulne V, Rousseau V, Courtieu B, Liebaert F, Jung A, Neureiter D, Thiébaud R, Stintzing S. MiR 31 3p as a predictive biomarker of cetuximab efficacy effect in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients enrolled in FIRE-3 study. Chicago: ASCO, 2016. *J Clin Oncol.* 2016; 34(suppl):abstr. 3516.

196. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Lubner BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Huebner T, Hruban RH. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509–2520.

197. Overmann MJ, et al. Nivolumab ± ipilimumab in treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): CheckMate-142 interim results. Chicago: ASCO, 2016. *J Clin Oncol* 2016; 34(suppl):abstr. 3501.

198. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer.* 2010;46(15):2788–2798.

199. Shulman K, Barnett-Griness O, Friedman V, Stephen GB. Observational data outcomes of chemotherapy backbone for MSI – high metastatic colorectal cancer in molecular epidemiology of colorectal cancer in Israel. *Annals of Oncology.* 2016;27(Suppl 2):ii126-ii127.

8 Seznam zkratek

APC	adenomatous polyposis coli
AREG	amphiregulin
BRAF	homolog B1 virového onkogenu v-raf odvozeného od myšního sarkomu
BSC	symptomatická terapie (best supportive care)
CAE	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CEUS	kontrastní ultrazvukové vyšetření (contrast-enhanced ultrasound)
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	chromozomální instabilita
CMR	MR kolonoskopie
CNRIP1	cannabinoid receptor interacting protein 1
COX-2	cyklooxygenáza 2
CT	výpočetní tomografie (computed tomography)
CTC	CT kolonoskopie
dMMR	deficientní mismatch repair systém
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ESMO	Evropská onkologická společnost
ERBB2	receptor pro epidermální růstový faktor 2 (HER-2)
EREG	epiregulin
ERK	kinázy regulované extracelulárním signálem
EUS	endosonografie (endoscopic ultrasound)
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FDG	fluorodeoxyglukóza
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FLOX	bolusový režim fluorouracil, leukovorin a oxaliplatinu
FUFA	bolusový režim fluorouracilu a leukovorinu
GIT	gastrointestinální trakt
GSTA	Glutathion S-transferáza A
GSTP	Glutathion S-transferáza P
GSTT	Glutathion S-transferáza T
GSTs	glutathion S-transferázy
HDG	dysplazie vysokého stupně (high-grade dysplazie)
HIF1 α	hypoxií indukovaný faktor 1 α
HNPCC	hereditární forma kolorektálního karcinomu
IBD	idiopatický zánět tlustého střeva
IFL	bolusový režim fluorouracil, leukovorin, irinotekan
IHC	imunohistochemie
INA	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha
KRAS	lidský homolog virového onkogenu v-Ki-ras2 izolovaného z krysího Kirsten sarkomu
KRK	kolorektální karcinom
LDG	dysplazie nízkého stupně (low-grade dysplazie)
LDH	laktát dehydrogenza
LS	Lynchův syndrom
MAL	T-lymphocyte maturation associated protein
MAPK	mitogen aktivovaná protein-kináza
MEK	mitogen aktivovaná protein-kináza kináza 1
MET	mesenchymal-epithelial transition factor
MGMT	O6-metylguanin-DNA-metyltransferáza
MLH	mutL homolog
MMR	mismatch repair
MSH	mutS homolog
MSI	mikrosatelitní instabilita
MSS	mikrosatelitní stabilita

MR	magnetická rezonance
NRAS	homolog virového onkogenu RAS
ORR	objektivní míra odpovědi (objective response rate)
PAI	inhibitor aktivátorů plazminogenu
PAS	system aktivátorů plazminogenu
PET	pozitronová emisní tomografie
PI3D-AKT	signální dráha?
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KCA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PMS	postmeiotic segregation increased
pMMR	proficientní mismatch repair systém
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAF	rapid accelerated fibrosarcoma
RAS	onkogen RAS
RR	relativní riziko
SCNA	somatické alterace na úrovni počtu genových kopií
SD	stabilizace onemocnění
SMAD	lidský homolog genu DPP u Drosophila melanogaster
SPG20	spastic paraplegia-20
SSA	sessilní serrated adenom
TGF	transformující růstový faktor
TOKS	test okultního krvácení do stolice
TRUS	transrektální endosonografie (transrectal ultrasonography)
TSA	tradiční serrated adenom
TSP	trombospondin
UICC	Union for International Cancer Control
uPA	urokinázový plazminogenný aktivátor
uPAR	urokináza a její receptor
UTZ	ultrazvuk
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor

9 Seznam příloh

9.1 Kolorektální karcinom

9.2 Ostatní