

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie

**Vliv analgezie na přítomnost cirkulujících
nádorových buněk u pacientů s kolorektálním
karcinomem**

Diplomová práce

Autor:
Studijní program:
Studijní obor:
Typ studia:
Vedoucí práce:

Bc. Hanuš Slavík
Chemie
Bioorganická chemie
Prezenční
MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně za použití citované literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 7. května 2014

.....

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl především poděkovat MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za odborné vedení, předané vědomosti a rady při vypracování diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Andree Prokopové a Mgr. Michaele Sedláčkové za pomoc při práci v laboratoři a cenné rady. Za podporu a pomoc rovněž děkuji své rodině, přátelům a spolužákům.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu IGA UP LF 2014_19.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Hanuš Slavík

Název práce: Vliv analgezie na přítomnost cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, UPOL

Školitel: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt:

Cirkulující nádorové buňky (CTC) mohou vytvořit metastáze, které jsou zodpovědné za 90 % úmrtí u pacientů postižených rakovinou. CTC se mohou nacházet v krevním řečišti či kostní dřeni a jsou hlavní příčinou recidivy onemocnění po chirurgické resekci primárního nádoru. Přítomnost CTC se jeví jako významný prognostický a prediktivní faktor, který je možné sledovat molekulárně-biologickými metodami jako např. PCR. Rovněž byl nalezen vztah mezi pooperační recidivou a anestezií nebo analgezií použitou po či v průběhu zákroku. Analgezie a anestezie mohou ovlivnit hladiny CTC díky svým imunomodulačním vlastnostem. V této práci byl zkoumán vliv morfinu a piritramidu na skupině 121 pacientů s kolorektálním karcinomem. CTC byly detekovány metodou real-time PCR ve vzorcích periferní krve a kostní dřeni pomocí markerů CEA a CK20. Poté byly porovnány hladiny CTC s použitou technikou analgezie a přežitím bez progresu a celkovým přežitím. Hlavním cílem byla optimalizace analgetické techniky tak, abychom snížili riziko možné recidivy. Měsíc po zákroku analgezie morfinem obvykle způsobila nárůst hladin CTC. V případě morfinu se rovněž zkracovala doba přežití bez progresu onemocnění. Piritramid se tedy jeví jako vhodnější analgetikum na rozdíl od morfinu, který negativně ovlivňuje pooperační prognózu u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Klíčová slova: Kolorektální karcinom, CTC, PCR, analgezie, morfin, piritramid

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Hanuš Slavík

Title: Influence of analgesia on circulating tumor cells in patients with colorectal carcinoma

Type of thesis: Master's

Department: Department of organic chemistry, Faculty of Science, UPOL

Advisor: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract:

Circulating tumor cells (CTC) can create metastases which are responsible for 90 % causes of deaths at patients with a cancer. CTC are located in a blood stream or bone marrow and they are most common cause of cancer recurrence after surgical resection of the primary tumor. Presence of CTC became an important prognostic and predictive factor which is possible to study by molecular methods such as PCR. A relationship between disease recurrence and analgesics or anesthetics used during or after surgery was also found. Analgesia and anesthesia can affect amount of CTC because of their immunomodulatory effects. Influence of morphine and piritramide was studied in 121 colorectal carcinoma patients in this study. CTC were detected in peripheral blood and bone marrow samples with using PCR for epithelial genes as markers (CEA and CK20). Afterward, the relationship between CTC presence, type of analgesia and disease-free or overall survival was evaluated. The main objective was to optimize analgesic techniques after surgery according to decreasing risk of cancer recurrence. One month after surgery, morphine-based analgesia usually induced higher level of CTC. Disease-free survival of patients was also shorter in case of morphine. Piritramide seems to be better analgesic technique than morphine which negatively influences prognosis of patients with colorectal carcinoma after surgery.

Keywords: Colorectal carcinoma, CTC, PCR, analgesia, morphine, piritramide

Number of pages: 57

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Obsah

Cíle práce.....	7
Teoretická část.....	8
1. Úvod.....	8
2. Stavba a funkce tlustého střeva.....	10
3. Kolorektální karcinom.....	12
3.1. Molekulárně-genetické aspekty.....	12
3.1.1. Vrozené syndromy s vysokým výskytem kolorektálních nádorů.....	14
3.2. Klinické aspekty a diagnostika kolorektálního karcinomu.....	15
3.3. Terapie.....	19
4. Cirkulující nádorové buňky.....	22
4.1. Metody detekce CTC.....	23
4.2. Vliv analgetik a anestetik na CTC.....	25
5. Polymerázová řetězová reakce.....	28
5.1. Režim RT-qPCR v reálném čase.....	29
Experimentální část.....	32
1. Pacienti a metody.....	32
1.1. Izolace celkové RNA.....	34
1.2. Reverzní transkripce.....	35
1.3. Provedení real-time PCR.....	36
1.4. Použité statistické metody.....	38
1.5. Použitý materiál a přístroje.....	38
2. Výsledky.....	39
Diskuse.....	45
Závěr.....	47
Seznam použité literatury.....	48
Seznam použitých zkratk.....	55

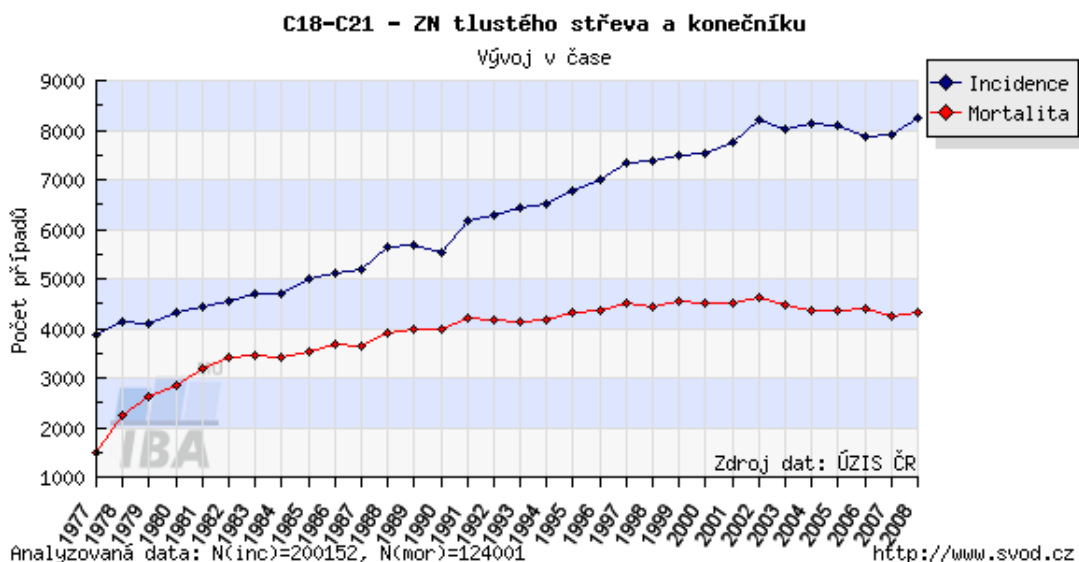
Cíle práce

1. Vyšetřit vzorky periferní krve, krve z nádorů a kostní dřeně pomocí metody RT-qPCR na přítomnost cirkulujících nádorových buněk u pacientů, kteří podstoupili radikální chirurgickou resekci primárního nádoru kolorekta.
2. Zjistit, zdali měla pooperační analgezie vliv na přítomnost cirkulujících nádorových buněk.
3. Zhodnotit, jestli měla pooperační analgezie vliv i na celkové přežití a přežití bez progresu po odstranění primárního tumoru. Provéřit souvislosti mezi přežitím pacientů, použitou analgezií a hladinami cirkulujících nádorových buněk.

Teoretická část

1. Úvod

Kolorektální karcinom dnes patří k civilizačním nemocem rozvinutých zemí převážně v západní Evropě, severní Americe a také již v Austrálii a Japonsku. Jedna z nejvyšších incidencí tohoto nádorového onemocnění je však v České republice, kde jeví stále vzestupný trend (obr.1) a ročně je zde nově diagnostikováno asi u 8000 osob¹. Celkově patří kolorektální karcinom mezi nejčastěji se vyskytující zhoubné nádory a tvoří z nich asi 10 % všech diagnostikovaných malignit. Vedle karcinomu kolorekta se mezi 3 nejčastěji vyskytující nádory řadí karcinom plic a prsu (za předpokladu, že nepočítáme kožní nádory). Incidence kolorektálního karcinomu je vyšší po 50. roce života a je častější u mužů než u žen. Jak napovídá geografická distribuce, mezi typické rizikové faktory patří vyšší příjem tuků a červeného masa, nadměrná konzumace alkoholu, nadváha a nedostatek fyzické aktivity^{2,3}. Samotnému vývoji karcinomu však předcházejí genetické změny buněk a tkání, které mohou být dány dědičně, a následné dysplastické změny.



Obr.1: Graf incidence a mortality kolorektálního karcinomu v České republice od roku 1977 do roku 2008

Nejčastěji se vyskytující malignity v tlustém střevě a konečníku jsou adenokarcinomy (90-95 % případů)⁴, které mohou v pozdějších fázích metastazovat skrze lymfatické cévy a žíly do jater nebo plic². K hodnocení stádia onemocnění se

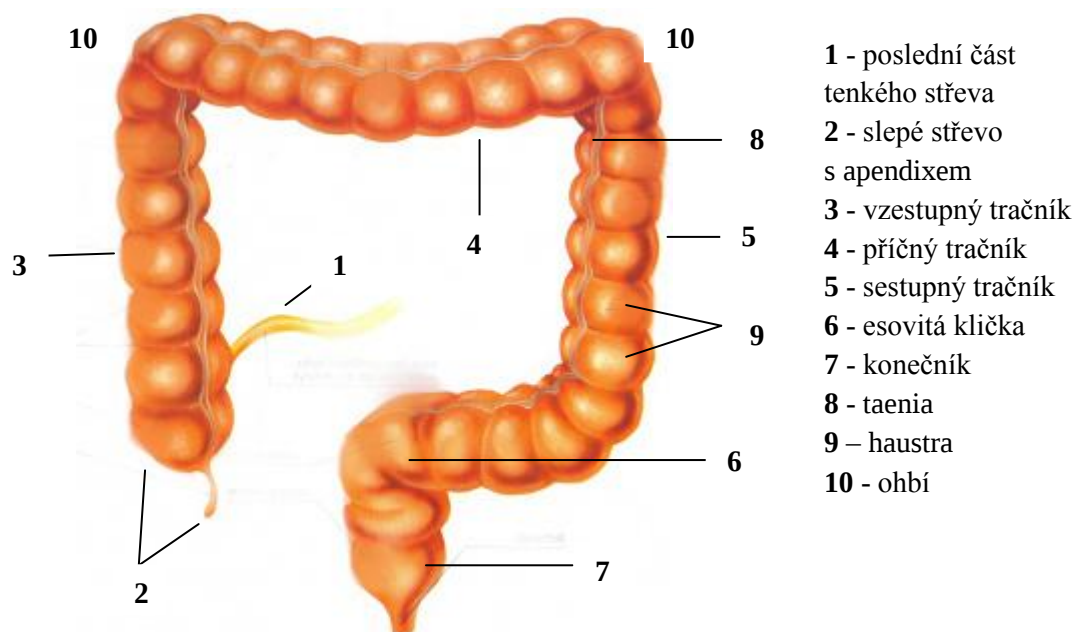
používá např. Dukesova klasifikace, která hodnotí hloubku invaze a penetrace nádoru ve střevě na stádia A až D, kdy stádia A a B jsou méně pokročilá a nádory lze zcela odstranit chirurgickým zákrokem a stádia C a D jsou pokročilá a před chirurgickým zákrokem a někdy i po něm se uplatňuje radioterapie a chemoterapie. V pokročilejších stádiích onemocnění je však obvykle terapeutický záměr pouze paliativní. Další možností hodnocení stádia onemocnění je tzv. TNM systém (tumor, node, metastasis), který rovněž hodnotí nádor z hlediska prostupu jednotlivými vrstvami střevní stěny, je však daleko podrobnější^{4,5}.

Vzniku samotného adenokarcinomu předchází hromadění genetických a morfologických změn v epitelu střevní sliznice. Nejprve se objevují iniciační lokální genetické odchylky v určitých místech, které jsou označovány jako „field defect“ a v nich se začnou objevovat tzv. ložiska aberantních krypt². Z epitelu těchto aberantních krypt mohou vyrůst benigní polypy (malé výrůstky sliznice), které se svou strukturou a cytologickými vlastnostmi liší od okolní tkáně. Prozatím se jedná o benigní, tedy nezhoubné nádorové útvary zvané adenomy. Dochází však ke kumulaci cytologických a genetických změn a dysplazii zasažené tkáně, tedy k nadměrné proliferaci. Adenom patří k nejčastějším stádiím prekancerózní léze, protože v této fázi hrozí riziko maligního zvratu. Adenomy se rozlišují podle svých morfologických vlastností a stupně dysplazie, např. v tzv. tubulárních adenomech je riziko kancerizace nízké, avšak u tzv. vilózních adenomů je tomu naopak. Většina takto vzniklých nádorů se nejčastěji nachází v oblasti rektosigmoidea, což je část tlustého střeva mezi esovitou kličkou a konečníkem. Jednotlivé nádory se pak vyskytují samostatně na různých místech tračníku a i přes společný původ v polypózním adenomu je jejich pozdější vzhled a růst rozdílný^{2,3}.

Typickým prekancerózním stavem je tedy přítomnost polypů ve střevě, které lze odhalit kolonoskopickým vyšetřením. Polypy se v některých případech mohou projevit nálezem krve ve stolici². Mezi nejčastější genetické změny, které se objevují u adenomů, které podlehnou karcinogenezi, patří delece K-ras, mutace genu APC a p53³. Tyto genetické změny nevznikají vždy sporadicky, ale v některých případech jsou důsledkem genetického onemocnění, pro které je typické vyšší riziko maligní transformace. Mezi nejtypičtější onemocnění patří například familiární adenomatózní polypóza (FAP), Lynchův syndrom nebo juvenilní polypóza⁶.

2. Stavba a funkce tlustého střeva

Tlusté střevo (intestinum crassum) je poslední částí trávicí trubice o délce 1,2 – 1,5 m a šířce 7,5 – 4 cm. Z tenkého střeva (intestinum tenue) se do tlustého střeva dostává kašovitá až tekutá hmota zvaná chymus. Postupným průchodem tlustým střevem se z chymu vstřebává voda a elektrolyty a vzniká stolice, která je pak odstraněna análním otvorem. Na dekompozici střevního obsahu se podílí kvasné a hnilobné procesy zprostředkované mikroorganismy, jež jsou součástí stálé mikroflóry. Tlusté střevo je částečně průsvitný tmavě-šedý orgán, jehož stěna se skládá ze čtyř vrstev. První vrstvu (z vnitřní strany) tvoří sliznice, která na rozdíl od tenkého střeva nenese klky a je pokryta jednovrstevným cylindrickým epitelem. Sliznici tvoří několik typů buněk produkujících hlen, který formuje stolici, a další sekrety jako např. enteroglukagon nebo tzv. substanci P, důležitou pro pohyb střeva. Součástí sliznice je také slizniční vazivo obsahující lymfatické uzlíky. Druhou vrstvu střevní stěny tvoří řídké podslizniční vazivo. Ve třetí vrstvě se nachází svalovina, která je místy zesílena kvůli regulaci pasáže střevem. Čtvrtou vrstvou je tzv. serosa tlustého střeva sloužící jako vnější povlak. Z hlediska vnější stavby se tlusté střevo skládá ze tří základních částí. První částí je slepé střevo (intestinum caecum) s červovitým výběžkem (appendix vermiformis). Hlavní částí tlustého střeva je tračník (colon) s typickými ohbí a skládá se z vzestupné, příčné a sestupné části, která je zakončena esovitou kličkou. Posledním úsekem je konečník (rektum), který navenek vyúsťuje v anální otvor (Obr.2)⁷.



Obr.2: Schematický popis tlustého střeva , zdroj obrázku: www.latinsky.estranky.cz

Na povrchu tlustého střeva jsou patrné tzv. taenie, které se nacházejí na každém z tračníků. Všechny tři taenie sbíhají k apendixu a tvoří podélnou vrstvu svaloviny a na přechodu esovité kličky a konečníku vytvářejí souvislý plášť. Tahem taenieí se vytváří vypouklá místa tzv. haustra, jejichž lokace a velikost se v čase mění, což je projevem svalové činnosti. Momentální vzhled je pak označován jako hausterace⁷.

3. Kolorektální karcinom

Jak již bylo naznačeno v úvodu, jedná se o onemocnění s postupným průběhem, u kterého může trvat 10-35 let než dojde k samotnému malignímu zvratu⁸. Výhodou tedy je, že tomuto onemocnění lze snadno předcházet, protože adenomy vyrůstající ze střevního epitelu je možné dobře detekovat a odstranit při kolonoskopii³. Pokud ovšem nejsou tyto zhruba 1 cm velké polypy odstraněny, může dojít k transformaci na zhoubný adenokarcinom, který vykazuje typické znaky přítomnosti nádorových buněk (neomezený replikační potenciál, ztráta schopnosti reagovat na vnější signály a podněty, genetická nestabilita, vyvolání angiogeneze atd.) a začne nekontrolovatelně růst⁸. Vzniklý tumor poté prorůstá dalšími vrstvami střevní stěny k hladké svalovině, odkud se dostane do kontaktu s oběhovou soustavou, do které se uvolňují z primárního nádoru volné buňky. Tyto cirkulující nádorové buňky se pak mohou usadit v jiné části těla a vytvořit tzv. sekundární nádor neboli metastázi^{2,8}. Některé důležité aspekty tohoto zhoubného onemocnění jsou popsány v následujících podkapitolách.

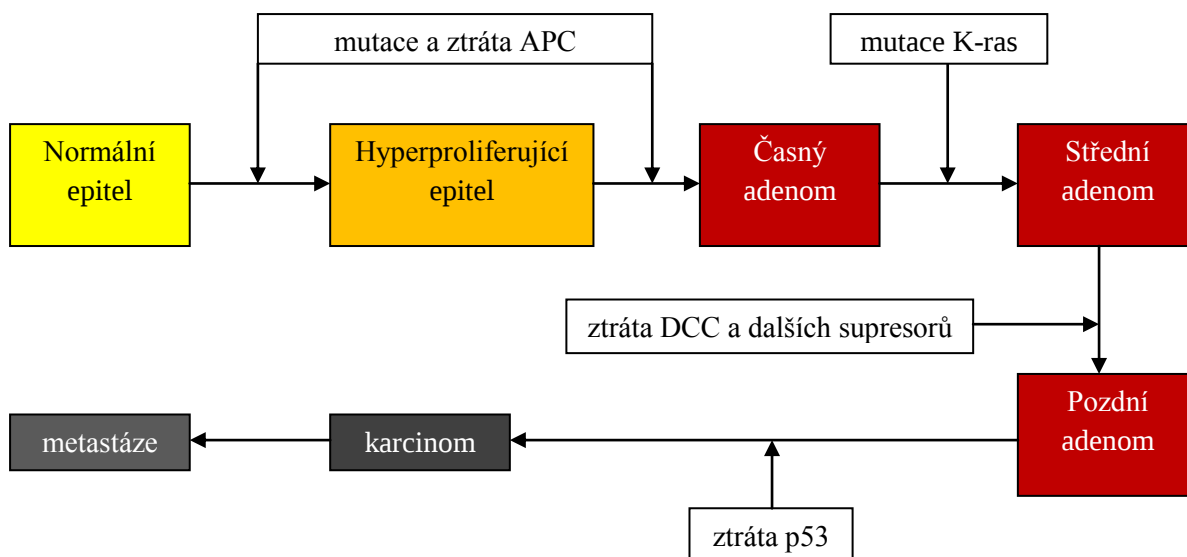
3.1. Molekulárně-genetické aspekty

Nádorové onemocnění může vzniknout sporadicky nebo hereditárně (asi 5-6 % případů) na základě mutací nebo ztráty určitých genů⁶. K maligní transformaci nejčastěji vedou abnormality v tumor-supresorových genech a protoonkogenech, které bývají bodovými mutacemi, chromozomálními translokacemi či amplifikací DNA aktivovány na onkogeny. U sporadických forem onemocnění dochází ke změnám obou těchto tříd genů a mutovány jsou pouze somatické buňky ve vznikajícím karcinomu. Hereditárním formám předchází zárodečná mutace, která je pak přítomna ve všech buňkách organismu, ale protoonkogeny mutovány nejsou. Tento typ karcinomu obvykle vzniká autozomálně dominantním přenosem syndromu, jehož vedlejším produktem je vyšší riziko vzniku nádoru v místě fenotypového projevu (FAP, Lynchův syndrom). U obou forem je pro vznik nádoru nutná ztráta heterozygosity (LOH)^{2,9}. Některé typické mutace přítomné v adenokarcinomech jsou shrnuty v tab.1^{2,8,10}.

Tabulka genetických abnormalit u kolorektálního karcinomu				
Gen	Třída	Funkce genového produktu	Chromozom	Přítomnost v tumorech (%)
APC	supresor	diferenciace intestinálních epitelových buněk	5q	> 60
DCC	supresor	adhezní transmembránový protein	18q	70
β-catenin	onkogen	vazebný partner APC	3p	5 – 10
p53	supresor	stěžejní kontrola genového poškození	17p	60
K-ras	onkogen	receptorová tyrosin-kinasa	12q	40
TGF β, rec. 2	supresor	receptor pro růstový faktor	3p	10

Tab.1: Mutované geny přítomné v kolorektálních karcinomech

Jedna nebo malé množství náhodných chyb by ještě neiniciovaly karcinogenezi. Jedná se o postupný sled událostí na úrovni genomu popsáné tzv. Vogelsteinovým modelem (Obr.3^{2,8}), kde iniciační mutace vede ke zvýšené proliferaci a následné klonální expanzi buněk, ve kterých dochází k další kumulaci genetických změn¹¹. Nejčastější iniciační událostí u kolorektálního karcinomu je mutace genu APC, která je typická pro FAP, ale také pro sporadicky vznikající adenomy a karcinomy, kde je přítomna u více než 2/3 případů⁹. Nejčastěji přítomné onkogeny jsou ras-onkogeny. Nejzávažnější jsou mutace p53, protože tento gen má hlavní kontrolní význam v buněčném cyklu a i malá změna vede ke ztrátě řádné funkce^{2,9}. Dalšími příklady jsou inaktivace genů důležitých pro „mismatch repair“ mechanismy opravy poškozené DNA, konkrétně se jedná o geny MSH 2 a MLH 1, které jsou mutovány u Lynchova syndromu v jedné alele. Pokud dojde k somatické mutaci i ve druhé alele, dojde k mikrosatelitní instabilitě a neoplastické transformaci⁹. Mikrosatelitní instabilita (MSI) je typickým projevem ztráty těchto genů a dochází k hromadění somatických mutací na citlivých úsecích DNA. Dalšími mutovanými geny s tímto projevem jsou např. TGF β, podílející se na inhibici růstu a indukci apoptózy v epitelu střevní sliznice, nebo MSH6^{6,9,11}.



Obr.3: Schéma Vogelsteinova modelu genových defektů v kolorektální kancerogenezi

3.1.1. Vrozené syndromy s vysokým výskytem kolorektálních nádorů

FAP: Jedná se o syndrom se zárodečnou autozomálně dominantní mutací APC genu. Fenotypovým projevem je pak tvorba stovek až tisíců adenomů v tlustém střevě^{6,12}. K manifestaci onemocnění dochází zhruba v období dospívání a rozvoj adenokarcinomů je téměř 100 % ve věku 40-50 let. Maligní transformaci lze předcházet na základě rodinné anamnézy a následnou analýzou DNA lze zjistit, jestli je skutečně příslušný gen mutován. V případě pozitivního nálezu je nutné provádět častá kolonoskopická vyšetření kvůli odhalení a odstranění vzniklých adenomů. Bohužel množství polypů obvykle bývá tak vysoké, že jediným účinným profylaktickým řešením je totální kolektomie pomocí ileo-análního spojení. V případě FAP se mohou adenomy objevovat i v jiných orgánech, avšak riziko maligního zvratu je zde menší. U všech kolorektálních karcinomů předchází FAP asi v 1 % případů^{12,13}.

Lynchův syndrom: Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) je rovněž autozomálně dominantním onemocněním, kde dojde k přenosu mutací zodpovědných za „mismatch repair“ genů (MMR geny)¹⁴. Důsledkem je pak MSI a asi 80 % pravděpodobnost vzniku kolorektálního karcinomu v průběhu života. Tento syndrom je příčinou asi 3 % všech kolorektálních karcinomů a v jeho důsledku mohou rovněž vznikat nádory tenkého střeva, endometria, žaludku nebo močového traktu⁶. Nejčastěji poškozené geny jsou MLH 1, MSH 2, MSH 6 nebo PMS 2¹⁴. Rozvoj metod identifikace těchto mutací a určení MSI je v diagnostice tohoto syndromu velmi

důležitý vzhledem k faktu, že u pacientů s Lynchovým syndromem se může vyvinout karcinom i několikrát po sobě^{2,6}.

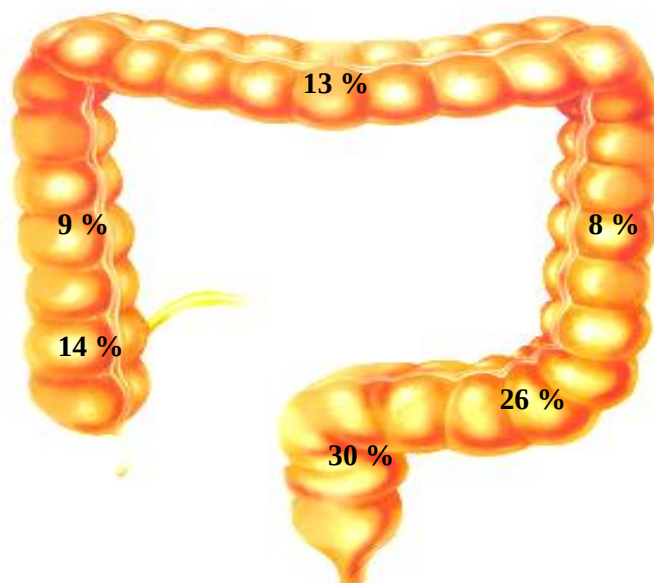
Peutzův-Jeghersův syndrom: Jedná se o onemocnění s autozomálně dominantní dědičností vázanou na chromozom 19, kde je mutován gen STK 11¹⁵. Je asi 10x vzácnější než FAP a také se projevuje přítomností polypů, v tomto případě v celém gastrointestinálním traktu¹². Polypy jsou spíše hemartomy než adenomy a projevují se krvácením do střevní sliznice a bolestmi v dutině břišní. Vedlejším projevem onemocnění je melaninová pigmentace v okolí dutiny ústní i na jiných místech. Kromě kolorektálních nádorů je zde vyšší riziko malignit prsu, slinivky břišní, děložního čípku nebo varlat. Léčba a profylaxe spočívá v endoskopické polypektomii, popřípadě v náročnějších operacích zažívacího traktu podle míry poškození hemartomy. Další sledování pacienta se provádí pomocí pravidelných kolonoskopických vyšetření^{12,15}.

Mezi další podobná polypózní onemocnění s autozomálně dominantní dědičností patří např. juvenilní polypóza. Mezi polypózní onemocnění patří i vzácně se vyskytující a nehereditární syndrom Cronkhiteův-Canadaové¹².

3.2. Klinické aspekty a diagnostika kolorektálního karcinomu

V dnešní době je hlavním cílem klinické praxe časně odhalení a odstranění polypů pomocí endoskopických metod ještě před maligním zvratem. S věkem incidence adenomů přibývá, zvláště pak po 50. roce života se adenomy vyskytují v populaci přibližně v 25 % případů, do 60. roku života to pak bývá 30-40 %. Důvodem k časnému vyšetření je věk, rodinná anamnéza nebo zdravotní komplikace spojené se zažívacími obtížemi. V případě pozitivního nálezu a po odstranění adenomů je pak nutné pravidelné sledování pacienta v rozmezí 1-3 let v závislosti na okolnostech. V případě pozitivního nálezu se pak zvyšuje pravděpodobnost i pozdějšího výskytu polypů. Podle velikosti, histologické struktury a stupně dysplazie lze hodnotit také riziko maligního zvratu. Čím je polyp větší, tím je riziko vyšší, např. adenom o velikosti více než 2 cm má 40 % pravděpodobnost, že již obsahuje karcinom. Z histologického hlediska jsou nejnebezpečnější tzv. vilózní polypy, které bývají přisedlé, sytě červené a nerovné. V případě, že adenom již obsahuje maligní komponentu, je často nutná chirurgická resekce dané části střeva, což také závisí na míře invaze do okolní tkáně. Některé

karcinomy mohou vzniknout tzv. „de novo“, což je typické hlavně pro některé hereditární formy onemocnění (Lynchův syndrom)^{2,3}. Tyto karcinomy vznikají z plochých adenomů, které se vyznačují pouze lehce vystouplou nebo vkleslou částí sliznice a rozvoj onemocnění bývá rychlejší. Jsou tedy namísto častější endoskopická vyšetření a pozornější sledování těchto pacientů a jejich rodinných příslušníků. Problémem polypů v tlustém střevě jsou jejich nenápadné a často velmi nespecifické klinické projevy, nejčastěji však bývají asymptomatické a jsou objeveny náhodně při vyšetření, které bylo provedeno za jiným účelem. Některé větší polypy se mohou projevovat přítomností krve ve stolici, změnami defekačních zvyklostí či nespecifickými bolestmi břicha. V případě již rozvíjejícího se karcinomu se tyto příznaky mohou stupňovat nebo se objevit teprve v tomto stádiu. Jakmile nastane invaze do okolních tkání, mohou se objevit bolesti, případně některé specifické příznaky podle lokace, časté jsou problémy s močovými cestami, do kterých tumor začne zasahovat. Vzácně nastávají systémové obtíže jako únava, slabosti, nechutenství a váhový úbytek, jejichž příčinou je mimo jiné anémie. Podle anatomické lokalizace nádoru se mohou projevit specifické příznaky jako křeče po jídle nebo změny v konzistenci a množství stolice^{2,3,4}. Jako nejčastější lokalizace nádorů se jeví rektosigmoideální oblast, celková anatomická distribuce onemocnění je pak shrnuta na obr.4, kde je zobrazen výsledek studie, která byla provedena v letech 1990-1994 v Praze na 240 náhodně vybraných pacientech s kolorektálním karcinomem².



Obr.4: Schéma anatomické distribuce u kolorektálních karcinomů, zdroj obrázku: www.latinsky.estranky.cz

Vzniklý karcinom je polyploidní nesymetricky rostoucí útvar kulatého tvaru v počátečních fázích. Typický adenokarcinom lze dělit podle makroskopického vzhledu na exofytický, ulcerózní, infiltrativní nebo anulární a tyto jednotlivé typy skýtají rozdílné prognózy a projevy jako je např. míra perforace². Mezi další typy nádorů, které se mohou objevit v tlustém střevě, patří lymfomy, sarkomy nebo karcinoidy⁴. K hodnocení stádia vývoje onemocnění se užívá tzv. Dukesova klasifikace nebo TNM systém, které hodnotí míru invaze nádoru do okolní tkáně a tedy i možnost tvorby metastáz^{4,5}. Cirkulující nádorové buňky lze pomocí molekulárně-genetických metod prokázat podle typických změn v RNA, DNA a na chromozomech, kdy v pokročilých stádiích je nakumulováno velké množství změn a dokonce i aberace celých ramének¹⁶.

Endoskopické techniky: Kolonoskopie je primární screeningovou metodou v našich zeměpisných šířkách a základní indikací k tomuto vyšetření je pozitivní test na okultní krvácení – tzv. Haemmocult test (TOKS). Předpokladem úspěšně provedené koloskopie je příprava pacienta před samotným vyšetřením, kdy je nutná příslušná dieta a vysazení některých medikamentů a doplňků stravy. Samozřejmostí je úplné vyprázdnění střevního obsahu pomocí perorální laváže, která se provádí příjmem velkého množství izosmolárních elektrolytových roztoků s polyethylenglykolem v den před vyšetřením^{2,3}. Koloskopie je stále rozvíjející metodou, u které je cílem dosáhnout co možná nejvyššího optického rozlišení, čemuž také napomáhají techniky jako tetováž či chromodiagnostika. Tetováž je prováděna pomocí injektoru a zanechává trvalé zbarvení na střevní sliznici, tato technika se užívá k označení míst pro chirurgický zákrok nebo ložisek s maligním potenciálem, kde už byly polypy odstraněny. U chromodiagnostiky jsou aplikována barviva jako metylenová modř nebo indigokarmín, které následně odliší normální sliznici od abnormální^{2,17}. Dalším přínosem koloskopie je i její terapeutické využití, jelikož nalezené polypy je možné v mnoha případech odstranit už při samotném vyšetření rovnou při jejich nález, což je výhodné jak ekonomicky, tak pro pacienta, který nemusí podstupovat další nepříjemný zákrok¹⁷. Polypy jsou tedy odstraněny pomocí tzv. endoskopické polypektomie s použitím polypektomické kličky nabité vysokofrekvenčním proudem. Novější metody skýtají i možnosti použití např. laseru². Mezi další, ale už méně používané metody se užívá endoskopická ultrasonografie, která je ekonomicky daleko náročnější a umožňuje přesnější diagnostiku kolorektálních karcinomů^{2,3}.

Zobrazovací techniky: Používají se ke stagingu většinou již rozvinutého nádorového onemocnění a základní metodou byla irigografie. Před vyšetřením touto metodou je nutné úplné vyprázdnění tračníku a nejčastěji dvojkontrastní barvení (baryova suspenze a insuflace vzduchem). Takto bylo možné zkoumat umístění, morfologii a míru invaze nádorů a dalších lézí. Nevýhodou byla nemožnost přesně odlišit nádor benigní od maligního a dnes je již irigografie vytlačena CT kolonografií. Tato metoda umožňuje trojrozměrné zobrazení střevní stěny a je schopna zachytit i abnormality pod jejím povrchem. Počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR) přispívají k hodnocení prostupu nádoru vedlejšími tkáněmi, lymfatickými uzlinami a umožňují detekci metastáz. CT a MR jsou vhodné pro předoperační vyšetření a přesnější staging onemocnění^{18,19}. Endorektální sonografie je důležitou metodou pro staging a přesnou TNM klasifikaci malignit rekta¹⁹.

Genomické biomarkery: Současný trend v diagnostice nádorových onemocnění vede k bližší genetické specifikaci, protože kolorektální karcinom je z tohoto hlediska značně heterogenním onemocněním. Identifikací patřičných biomarkerů lze předpovědět prognózu a odpověď na léčbu. Snahou je individualizace v léčebných strategiích u jednotlivých případů, což je výhodné jak z ekonomických důvodů, tak pro pacienta, kterému bude vybrána terapie tak, aby z ní měl skutečně užitek. Například pacienti s nefunkčním „mismatch repair“ systémem nemají z terapie 5-fluorouracilem žádný prospěch⁹. Dnes se již rutinně vyšetřuje gen K-ras, kdy pacienti s mutací v tomto genu neodpovídají na biologickou léčbu pomocí inhibitorů EGFR^{10,11}. Většina těchto metod je však stále ve fázi výzkumu a provádí se pomocí technik genového a expresního profilování za použití mikročipových technologií (microarray) a nověji pomocí sekvenování (NGS). Mezi další slibné markery patří delece na 18q, pro kterou typická vysoká pravděpodobnost recidivy onemocnění nebo polymorfismus UGT1 A1 * 28¹⁰.

Biochemické markery: Obvykle se jedná pouze o orientační a nespecifické testy, které mají za úkol odhalit recidivu onemocnění nebo hrubý monitoring po operacích nebo chemoterapii. Běžně, se používá sérologický marker CEA, což je karcino-embryonální antigen (glykoprotein) a CA 19-9. Zvýšená koncentrace CEA může predikovat tvorbu jaterních metastáz a lze testovat i jeho přítomnost ve stolici¹⁷. Tento test je však nespecifický a nekvantifikovatelný a nemá význam pro screening kolorektálních karcinomů. Celkově tyto metody nezaznamenávají pokrok a lze je

nahradit kvalitně provedenou koloskopií a histologickými metodami po odběru tkáně v průběhu operace nebo polypektomie^{3,19}.

3.3. Terapie

Jedinou definitivní kurativní metodou terapie těchto malignit je chirurgická radikální resekce nádoru a přilehlé části tlustého střeva^{4,5}. Chirurgický výkon je uskutečnitelný zhruba u 60 % pacientů s karcinomem tračníku a zhruba u 35 % pacientů s nádory rekta v závislosti na zdravotním stavu pacienta a možnosti technického provedení². Úspěšnost zákroku je pak závislá na věku pacienta a stádiu onemocnění, kdy čím je stádium pokročilejší, tím vyšší je pravděpodobnost recidivy. Při vysoké míře invaze nádoru a tvorbě metastáz je chirurgický zákrok pouze paliativním řešením⁵. Pokud nelze operovat, je na místě chemoterapie, radioterapie, popř. jejich kombinace, čehož se využívá k regresi a devitalizaci nádoru, aby se stal operabilním²⁰. Samotná chirurgická léčba je účinná pouze v časných stádiích. Chemoterapie a radioterapie se rovněž využívají po chirurgickém zákroku ke snížení rizika recidivy eliminací zbylých nádorových buněk^{5,20,21}.

Výhodou radioterapeutických metod je v dnešní době již možnost přesného zacílení ozařování, avšak její účinnost je po operaci nižší, jelikož nejvyšší efektivity dosahuje při dostatečné oxygenaci, která je v tomto případě nižší². Při paliativním záměru může ozařování zastavit krvácení a poskytuje úlevu od bolesti²⁰.

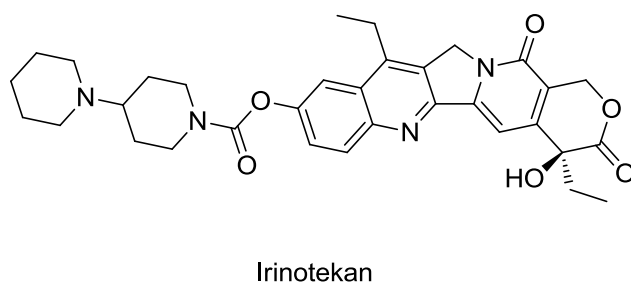
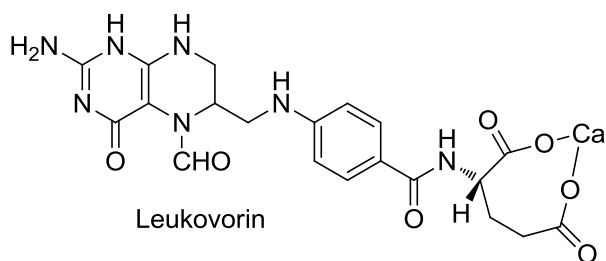
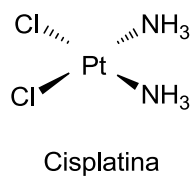
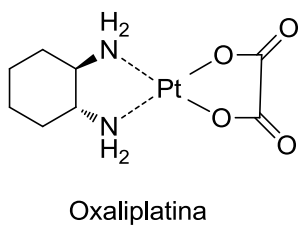
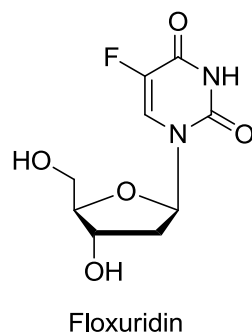
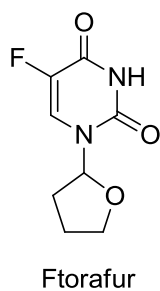
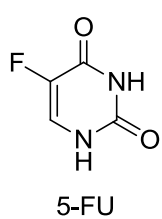
Chemoterapeutické režimy nejčastěji zahrnují fluoropyrimidiny, ze kterých se nejčastěji používá 5-fluorouracil (5-FU), který se však rychle metabolizuje a asi 20 % je vylučováno močí²². Přesto je 5-FU považován za nejúčinnější cytostatikum v léčbě kolorektálního karcinomu. Většina jiných látek nedosahuje dobrých výsledků, protože kolorektální karcinom je poměrně chemorezistentní. Buňky těchto nádorů totiž exprimují větší množství P-glykoproteinu (gen *mdr-1*), který je zodpovědný za vylučování cizorodých látek z buňky. Mezi další fluoropyrimidiny patří např. prekurzor 5-FU ftorafur (tegafur) nebo floxuridin, který je absorbován jaterními buňkami více než 5-FU a užívá se tedy k léčbě jaterních metastáz. 5-FU je často podáván v kombinaci s dalšími léčivými, které mohou zvýšit účinek. Jednou z možností je perorální podávání leukovorinu, který má však vysokou toxicitu projevující se průjmy a proto je někdy

nutné terapeutickou strategii změnit. Další možností je inhibitor topoizomerázy I irinotekan, který je sice rovněž značně toxický, ale nepodléhá rezistenci. Stejně tak oxaliplatin, která je také použitelná pro terapii těchto nádorů a má nižší toxicitu než ostatní cytostatika obsahující platinu. Do chemoterapeutických režimů se přidává i samotný uracil (přípravek UFT) a další látky^{2,5,22}. Chemické struktury diskutovaných chemoterapeutik jsou uvedeny na obr.5⁵.

U každého pacienta je třeba zvolit optimální a individualizovaný přístup a dávkování, což často vyžaduje úpravy vzhledem k nežádoucím účinkům a přínosu zvolené terapie. Terapeutické režimy je také nutné volit podle skutečnosti, zda je záměr adjuvantní, kurativní nebo paliativní.

V současné době se zavádí cílená biologická léčba pomocí monoklonálních protilátek, které jsou účinné v pokročilých stádiích onemocnění a léčbě jaterních metastáz. Úplné vyléčení v těchto fázích onemocnění však doposud stále není možné. Mezi používané protilátky patří bevacizumab působící jako inhibitor angiogeneze na receptory VEGFR a cetuximab, který inhibuje receptor EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor). Tyto protilátky jsou kombinovány s běžnou chemoterapií či radioterapií a není možné je použít ve všech případech^{10,22} (např. viz. kap. 3.2.).

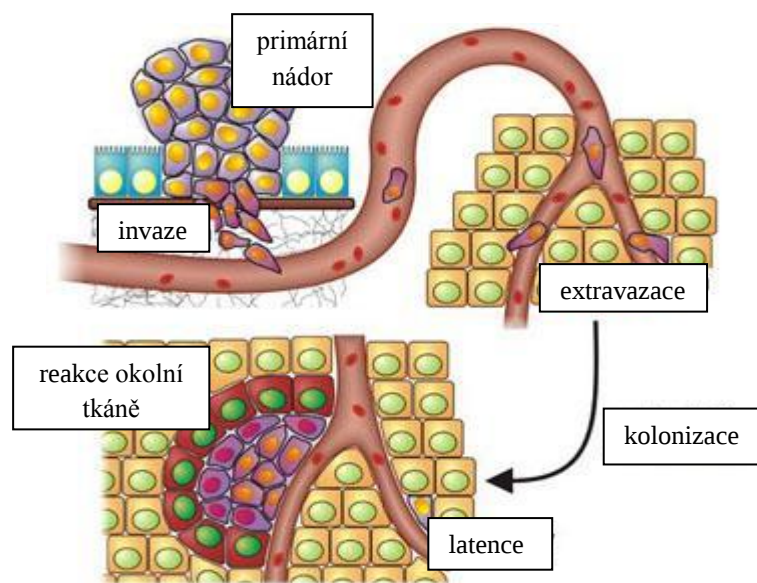
Mezi další potencionální možnosti terapie patří hypertermie, která je založena na předpokladu, že nádorové buňky jsou citlivější na zvýšenou teplotu než somatické^{2,10}. Dále pak fotodynamická terapie, kde nádorová tkáň absorbuje syntetické porfyrinové deriváty. Porfyriny mají vysokou afinitu k nádorovým buňkám a po jejich absorpci je tkáň endoskopicky ozářena červeným světlem. Po ozáření dojde k fotochemické reakci s porfyrinovým makrocyklem, při které vzniká reaktivní forma kyslíku destrující enzymatické systémy uvnitř buněk²³. Z pohledu moderní vědy je často diskutována i genová terapie, která však zatím není proveditelná z technických i etických důvodů²⁴.



Obr.5: Chemické struktury některých běžně užívaných cytostatik

4. Cirkulující nádorové buňky (CTC)

Tvorba metastáz, za kterou jsou CTC zodpovědné, je příčinou asi 90 % úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním²⁵. Proces metastazování je v podstatě velice nevýhodný, jelikož koncentrace CTC v periferní krvi bývá okolo 1 CTC / 10^5 - 10^7 normálních jednojaderných buněk²⁶. Navíc jen okolo 0,01 % z nich je schopno vytvořit makrometastázu²⁵. CTC se pohybují v lymfě nebo v krvi samostatně nebo ve shlucích a vzhledem k jejich nízké koncentraci nejsou detekovatelné běžnými vyšetřovacími metodami. Proces tvorby sekundárního nádoru z CTC je shrnut na obr.6²⁵ a před rozvojem metastázy se nejprve vytvoří tzv. mikrometastáze, která vzniká adhezí kumulací několika izolovaných buněk a jejich shluků na cévní stěně. Při dostatečném počtu buněk teprve začne mikrometastáze proliferovat, prorůstat do tkáně a nakonec vyvolávat angiogenezi a vzniká makrometastáze. Nejčastěji tak dochází skrz periferní krevní řečiště a kostní dřeň, popř. jiné hematopoetické orgány. Pro každý typ nádorového onemocnění jsou typické lokace tvorby sekundárních nádorů, což je způsobeno afinitou CTC k určitému prostředí¹⁶.



Obr.6: Schéma vzniku metastázy, kde nejprve dojde k invazi CTC do cév, poté k extravazaci do vzdálené tkáně, kolonizaci a tvorbě klidového stádia, které později začne proliferovat a chovat se jako maligní tumor

V současné době se rozvíjí metody detekce CTC založené na citlivých technikách jako RT-qPCR nebo imunocytochemie. Přítomnost CTC se jeví jako závažný prognostický marker^{16,26}. Asi u 30 % pacientů s kolorektálním karcinomem,

kteří prodělali radikální kurativní resekci, je prokázána recidiva onemocnění²⁷. Testy na přítomnost CTC by mohly pomoci k indikaci adjuvantní terapie po chirurgickém zákroku nebo k odhalení výskytu mikrometastáz. Jelikož CTC a mikrometastázy jeví rezistenci vůči běžným cytostatikům, protože u nich nedochází zatím k proliferaci, mohla by identifikace CTC pomoci ke zvážení nasazení biologické léčby, která je v tomto případě účinnější^{16,26}.

Bohužel, v současné době u nás stále neexistuje žádná metodika používaná v rutinní klinické praxi. Stále se hledají vhodné biomarkery a metodiky detekce, jelikož biologie CTC ještě stále není dostatečně prozkoumaná²⁶. Některé běžné metody jsou diskutovány v následující podkapitole.

4.1. Metody detekce CTC

Jako výchozí biologický materiál pro detekci CTC se využívají vzorky periferní krve nebo kostní dřeně. Vzhledem k malému zastoupení CTC jsou na místě pouze velice citlivé metody, jejichž užití předchází nutná izolace a zkoncentrování CTC. K tomuto účelu se používají metody imunomagnetické separace, centrifugace s hustotním gradientem a filtrační techniky²⁸. Jednou ze základních technik následné detekce jsou imunochemické metody. Buňky jsou identifikovány na základě interakce jejich proteinových struktur se specifickými barevně značenými protilátkami, po čemž následuje mikroskopická detekce. Mezi rozšířené biomarkery v imunodetekci patří např. cytokeratiny (CK), jedná se o epitelárně specifické markery^{16,26}. V nádorových buňkách však může dojít ke ztrátám exprese těchto genů, což může vést k falešně negativním výsledkům. Imunodetekce však umožňuje značení více protilátkami najednou, proto je možné jednotlivé markery kombinovat v rámci jednoho experimentu²⁸. Dalším slibným markerem se jeví přítomnost adhezních epitelárních molekul (EpCAM), jejichž exprese je obecně v nádorových buňkách zvýšená. Množství exprimovaných EpCAM je však často variabilní, v případě epitiliálně-mesenchymální tranzice dokonce nulové²⁹. Další výhodou imunodetekce je zachování morfologické struktury buněk a možnost jejich dalšího podrobného zkoumání. Za nevýhody lze považovat subjektivní mikroskopické vyhodnocení a časová náročnost^{26,28}. Další imunologické techniky využívající již zmíněné nebo podobné markery jsou metody kombinované s průtokovou cytometrií nebo skýtají využití mikročipových technologií²⁶. V současné době byla již jedna

z cytometrických technik schválena úřadem FDA a jedná se o tzv. CellSearchTM systém, který se používá pro monitoring hladin CTC u pacientů s rakovinou prostaty, prsu a tlustého střeva³⁰. Jedná se o polo-automatizovanou metodu využívající kombinaci imunomagnetického značení a separace, kde následuje detekce pomocí automatické fluorescenční mikroskopie. Tato technika je velice specifická, senzitivní, dobře kvantifikovatelná a málo náročná na provedení, ale pořizovací cena zařízení je velmi vysoká^{26,30}. Další cytometrickou technikou jsou CTC čipy s daleko lepšími detekčními limity, než umožňují ostatní metody, nejsou však zatím komerčně dostupné^{26,28}. Cytometrických technik je ještě celá řada, dále stojí za zmínku např. laserová skenovací cytometrie nebo FAST, která nevyžaduje předchozí zakoncentrování CTC²⁶.

Zajímavá je také např. metoda EPISPOT, kde dochází k imunoanalýze buněk v kultuře³¹. Buňky jsou identifikovány na základě sekrece specifických proteinů, ale přestože se jedná o velice senzitivní metodu, pokud není dostatečné množství exprimovaných proteinů sekretováno, buňky nelze identifikovat^{28,31}. Tato metoda rovněž nabízí možnost proteomického profilování buněk, což by mohlo být využitelné v prediktivní a prognostické diagnostice²⁸.

Druhou alternativou detekce CTC je reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce, obvykle prováděná v reálném čase (RT-qPCR). Je zde zkoumána exprese jednotlivých genů na úrovni RNA (zvláště pak mRNA), která je pomocí reverzní transkripce převedena na cDNA. V následné polymerázové řetězové reakci jsou pak specifické úseky exponenciálně amplifikovány, za předpokladu jejich přítomnosti. Výhodou je tedy velmi nízká detekční hranice a vysoká specifita. Další výhodou je možnost rychlého provedení a možnost zpracování velkého množství vzorků v poměrně krátkém čase. Při použití režimu real-time je také možná snadná kvantifikace. Nevýhodou RT-qPCR je ztráta buněčných struktur a možné vyhodnocení pouze na základě přítomnosti daného úseku nukleových kyselin. Jako typické makery pro detekci CTC byly použity opět cytokeratiny, již dříve diskutovaný CEA nebo telomeráza (hTERT). Navíc lze PCR provádět v tzv. multiplexním režimu, kdy lze amplifikovat více sekvencí najednou za použití dalších dvojic specifických primerů, což je výhodné jak z časových a finančních důvodů, tak z hlediska reprodukovatelnosti. Je tedy možné paralelně sledovat více markerů v rámci jednoho experimentu^{26,27, 28}.

Hlavními cíli v použití metod pro detekci a charakterizaci CTC je lepší pochopení biologie tvorby metastáz a studium různých faktorů, které mají vliv na přítomnost CTC. V onkologické praxi by bylo možné na základě individuálních dat zvážit vhodnost adjuvantní terapie, popř. dále zhodnotit, zdali má požadovaný účinek. Ve výzkumu pak tyto metody mohou přispět k hodnocení účinnosti terapeutických režimů a monitoringu pacientů v reálném čase.

4.2. Vliv analgetik a anestetik na CTC

Bylo prokázáno, že anestetické a analgetické techniky mají vliv na pooperační recidivu nádorových onemocnění³²⁻³⁵. Látky používané k anestezii a analgezií totiž různými mechanismy působí na buňky imunitního systému, které se podílejí na eradikaci CTC v organismu. Jak již bylo dříve zmíněno, jen malá část CTC je schopna vytvořit metastázi, což je částečně způsobeno aktivitou imunitního systému. Primární obranu proti nádorovým buňkám tvoří NK buňky („natural killer“), T-lymfocyty a dendritické buňky³⁶. Po operačním výkonu stoupá pravděpodobnost tvorby sekundárních nádorů z důvodu zvýšené koncentrace a možné aktivity CTC³⁶⁻³⁸. Je to způsobeno rozsevem nádorových buněk při manipulaci s nádorem, postoperativním narušením buněčné imunity a vyššími hladinami angiogenních faktorů v krvi³⁶. Po operaci tak nádorové buňky snáze uniknou imunitnímu systému, což je také způsobeno jejich změnou ve výbavě povrchovými antigeny a produkcí imunosupresivních molekul^{16,37}. Imunosupresivní charakter nádorových buněk byl pozorován např. u nádorů zažívacího traktu a plic, které způsobovaly snížené hladiny NK buněk³⁷. Správně zvolenými metodami anestezie při operačním výkonu a pooperační analgezie by tedy mohly v budoucnu vést k profylaxi recidivy nádorových onemocnění.

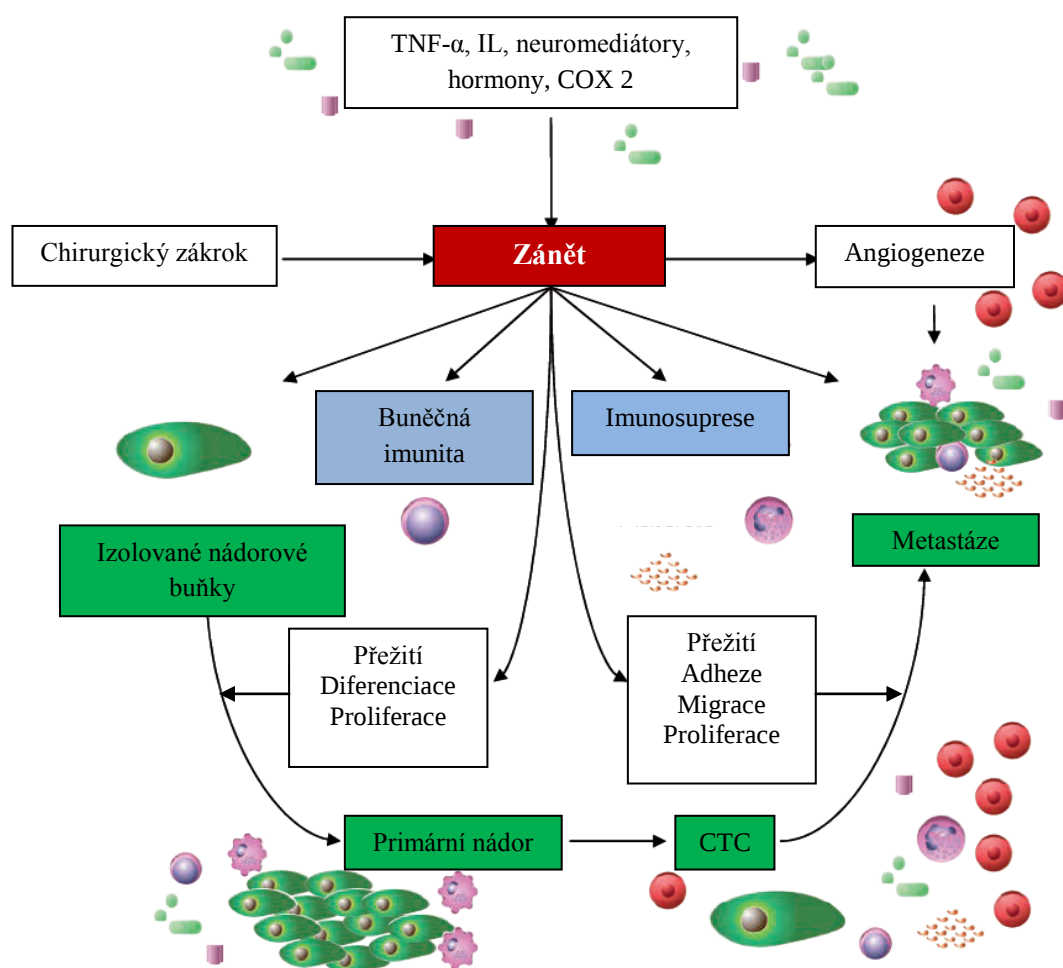
Z hlediska celkového mechanismu účinku na imunitní systém a CTC je zde hlavní role tvorby zánětlivé reakce organismu. Chirurgický zákrok tuto reakci podporuje a ta pak může vyvolat růst nádorů změnou charakteru prostředí a únik buněk do krevního řečiště³⁶⁻³⁸. Na procesu rozsevu se mohou podílet i trombocyty svými adhezními vlastnostmi nebo produkcí mediátorů imunitních reakcí. Mediátory podílející se na tvorbě zánětu jsou např. cytokiny jako TNF- α nebo IL1- β , ale také hormony a neuromediátory, což jsou v tomto případě kortizol, adrenalin a noradrenalin. Dále zánět podporuje tvorbu angiogenních faktorů, proliferaci a přežití buněk, což jsou v podstatě

podmínky nutné k vytvoření metastáze. Anestetika mohou ovlivňovat mnohé z těchto procesů a nesteroidní protizánětlivé látky mohou působit na všechny tyto faktory a ovlivnit tak další průběh nemoci u onkologických pacientů. Hlavním cílem těchto látek jsou však COX (cyklooxygenázy). COX-2 bývá nadexprimována v buňkách adenokarcinomů, což vede ke zvýšené sekreci prostaglandinu PGE2 stimulující proliferaci, inhibici apoptózy, angiogenezi a produkci mutagenů. Nesteroidní antiflogistika tak inhibují syntézu PGE2. Změny v hladinách některých mediátorů pak upravují množství NK buněk a modifikují funkci pomocných T-lymfocytů³⁸. Jednotlivé souvislosti jsou pak shrnuty na obr.7³⁸.

Například ketamin, thiopental a jiná starší nestabilní anestetika mohou zvyšovat metastazování kvůli nepřímému ovlivňování aktivity NK buněk³⁶. Inhalační anestetika obecně inhibují proliferaci nádorových buněk a mohou vyvolávat apoptózu, nicméně také negativně ovlivňují cytotoxicitu NK buněk³⁷. Sevofluran, užívaný jako inhalační anestetikum, v *in vitro* studiích vyvolával apoptózu v lidských T-lymfocytech. Jako vhodné celkové anestetikum se jeví propofol, přestože jeho imunomodulační efekt zatím není dostatečně prozkoumán, bylo prokázáno, že je schopen zabránit invazi CTC³⁶. Propofol byl také v několika studiích testován v kombinaci s jinými analgetiky a anestetiky, např. v kombinaci s remifentanylem vykazoval pozitivní vliv na aktivaci a diferenciaci T-lymfocytů³⁷. Některá lokální anestetika jako např. lidokain mají antiproliferační účinek na nádorové buňky, rovněž u nich byl pozorován vliv na metylaci DNA a reaktivaci tumor supresorových genů³⁶. Zajímavá je také schopnost lidokainu a tetrakainu inhibovat kinesiny, které jsou v buňkách součástí funkční cytoskeletální výbavy, jejich narušení by v CTC vedlo ke ztrátě adhezních a agregačních vlastností, což snižuje pravděpodobnost vytvoření metastáze³⁷. Některé látky působící na alfa-adrenergní receptory také projevují zajímavé imunomodulační vlastnosti, např. clonidin (α_2) v *in vitro* i *in vivo* studiích působil na aktivitu NK buněk³⁶. Působení na buňky imunitního systému je také diskutováno u opioidních látek, které jsou hojně používány v onkologické praxi při pooperačních a chronických bolestech. U opioidů zatím nebyla provedena žádná specifická studie zaměřená na jejich vliv na CTC a imunitní systém člověka a proto se touto tematikou zabývá experimentální a diskusní část této práce³⁶⁻³⁸. Z dlouhodobých epidemiologických studií vyplývá, že látky působící jako inhibitory COX, např. nesteroidní antirevmatika jako ibuprofen či celecoxib, při častém užívání snižují riziko onemocnění kolorektálním

karcinomem o 20 %³⁶. Epidurální analgezie údajně snižuje o 60 % riziko recidivy po chirurgickém odstranění adenokarcinomu prostaty³⁷.

Mezi další imunomodulační faktory, které je třeba zohlednit v období chirurgického zákroku, patří např. krevní transfuze³⁹. Přísun cizorodých leukocytů totiž pozměňuje stávající aktivitu lymfocytů, což vede k častější recidivě onemocnění. Rovněž byl pozorován vliv hypotermie, která snižuje aktivitu leukocytů³⁶. Špatný psychický stav pacienta a stres má nepříznivý vliv, jelikož aktivita některých neuromediátorů spouští signální dráhy vedoucí k vyšší invazi a malignitě. I samotná kontrola bolesti vlivem analgetik zvyšuje schopnost organismu zabránit tvorbě metastáz. U zvířecích modelů bylo prokázáno, že bolest vyvolává deficit NK buněk a podporuje schopnost primárních nádorů produkovat metastáze³⁷.



Obr.7: Souvislosti mezi imunitním systémem a recidivou nádorového onemocnění, kde buněčná imunita (NK buňky, dendritické buňky, T-lymfocyty) a imunosuprese (neutrofilové, krevní destičky, makrofágové) mohou zabránit faktorům uvedeným pod nimi za pomoci vhodného stimulu (např. analgetika či anestetika)

5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tato metoda byla vyvinuta v roce 1983 Kary Mullisem, který za tento objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Jedná se o amplifikaci krátkého specifického úseku DNA pomocí termostabilní DNA dependentní DNA-polymerázy. Enzym rozpozná požadovaný úsek pomocí specifického páru primerů (reverse a forward), které nasednou na základě komplementarity bází na začátek a konec dané sekvence. Primery jsou krátké oligonukleotidové sekvence o obvyklé délce 17-28 bp, které by měly vykazovat co možná nejmenší vzájemnou a vnitřní komplementaritu, vzájemně podobnou teplotu tání nad 50° C a splňovat určité typické podmínky pro zastoupení a umístění jednotlivých bází⁴⁰. Nejčastěji se používá polymeráza původně izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která je označována jako *Taq*. Další složkou reakční směsi jsou hořečnaté ionty (Mg^{2+}), které jsou dodávány ve formě chloridu či síranu hořečnatého a slouží jako kofaktor pro *Taq*. Dále je nutná přítomnost všech deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) jako substrát pro *Taq*^{40,41}. Jelikož pro správnou funkci a aktivitu většiny enzymů je nutná určitá hodnota pH a iontová síla, přidává se do roztoku pufr, popř. další soli či jiné složky, které mohou upravovat aktivitu *Taq*. Samotná reakce pak probíhá ve třech krocích a provádí se v termocyklerech. V prvním kroku se směs zahřívá na teplotu 94-96° C, čímž dojde k denaturaci z dvouvláknové DNA na jednovláknovou, rozrušením vodíkových můstků. Druhým krokem je snížení teploty nejčastěji na 50-60° C, kdy na denaturovanou DNA dosednou primery, tento krok je označován jako annealing a je v celém procesu nejkritičtější. U posledního kroku dochází k tzv. elongaci, kdy při teplotě 65-75° C *Taq* syntetizuje chybějící vlákno molekul DNA. Tyto kroky jsou pak neustále opakovány v daném pořadí asi ve 20-40 cyklech, kdy se v ideálním případě v každém kroku zdvojnásobí počet molekul DNA, respektive pouze požadovaného úseku. Zdárný průběh a rychlost PCR lze ovlivnit hlavně kvalitou a koncentrací jednotlivých složek a správně zvolenou annealingovou teplotou⁴⁰. Obvykle asi po 30 cyklech reakce ustává, jelikož jsou spotřebovány dNTP, což je označováno jako fáze plateau. Tato metoda je rychlá, specifická a citlivá a klade nízké nároky na množství a čistotu výchozí DNA⁸. Po konvenční PCR se následně provádí detekce nejčastěji na gelu pomocí elektroforetických metod. Dnes již existují mnohé modifikace, které umožňují i snadnou kvantifikaci (qPCR) nebo současnou analýzu syntetizovaného produktu v reálném čase (real-time PCR)⁴².

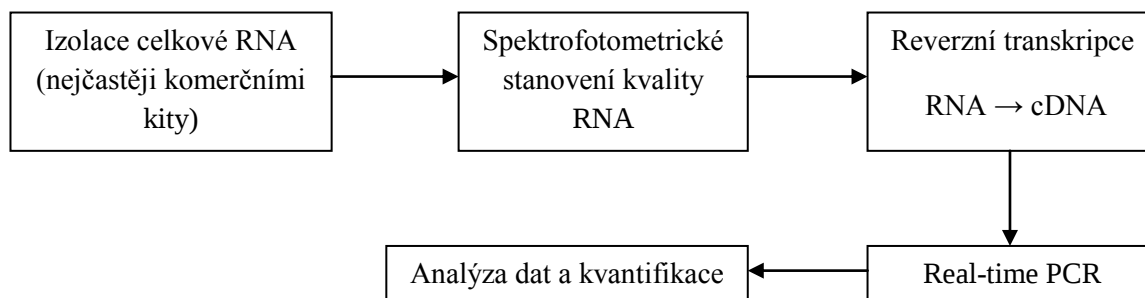
5.1. Režim RT-qPCR v reálném čase

Spojení procesů reverzní transkripce a následné real-time PCR je dnes již běžnou součástí biomedicínského výzkumu a molekulární diagnostiky⁴³. Umožňuje studovat a kvantifikovat genovou expresi na úrovni RNA s velmi malým množstvím výchozího materiálu⁴¹. Jedná se o poměrně časově nenáročný postup s malým množstvím kroků a vysokou senzitivitou a specifitou^{41,43}. Současný trend této metody spěje k využití ve studiu transkriptomů a stagingu nádorových a jiných onemocnění a případnou detekci patogenů v biologickém materiálu⁴³. Dále budou popsány jednotlivé kroky a principy této techniky.

Reverzní transkripce: Pomocí RNA-dependentní DNA-polymerázy je výchozí RNA převedena na cDNA, za tímto účelem se využívají reverzní transkriptázy izolované z retrovirů. Příkladem může být reverzní transkriptáza z viru ptačí myeloblastozy, ale využívají se i jiné. Dále je v reakční směsi nutná přítomnost primerů, kde se využívají buď specifické mRNA primery, náhodné hexamery poskytující vyšší výtěžky nebo oligo-dT primery. Jelikož molekuly RNA bývají značně nestabilní a všudypřítomné RNázy by mohly jejich strukturu narušit, přidávají se do směsi inhibitory těchto enzymů, např. RNAsin. Samozřejmě jsou opět všechny dNTP a vhodný pufr. Samotná reakce se pak provádí při zvýšených teplotách podle použité reverzní transkriptázy po dobu asi jedné hodiny. V rámci celého experimentu lze RT provést v jednom kroku, kdy je v jednom termocykleru následně rovnou uskutečněna i PCR, což je výhodné z časového hlediska. Při dvou-krokovém provedení je možné syntetizovanou cDNA uschovat pro více i zcela odlišných experimentů^{40,41}.

Real-time PCR: V principu probíhá samotná reakce za stejných podmínek jako konvenční PCR, rozdíl je v detekci reakčních produktů. Do reakční směsi se navíc přidává fluorescenční sonda nebo barvivo, které emitují záření po interakci se vznikající DNA. Termocyklery pro real-time PCR obsahují detektor fluorescenčního signálu umožňující snímání v několika barevných kanálech, které se vybírají podle emitovaného záření použité sondy. Jako zdroj záření pro excitaci fluoroforů dané sondy se užívá LED dioda, jejíž záření je zacíleno na vzorky skrz systém čoček. Tímto způsobem dochází k měření fluorescence po každém PCR cyklu a v ideálním případě je intenzita emitovaného záření přímo úměrná množství DNA. Data jsou ihned převedena do počítače a tak dochází k současně k syntéze i analýze v reálném čase⁴³. Naměřená

data lze rovnou softwarově vyhodnotit a kvantifikovat. Sled celého procesu u této metody je pak shrnut na obr.8⁴².



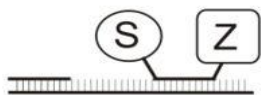
Obr.8: Schéma postupného sledu událostí u RT-qPCR

Fluorescenční detekce propůjčuje této metodě vysokou citlivost a principiálně existuje několik typů používaných barviv. Nejlevnější a nejméně specifickým řešením je použití látky SYBR Green, která se váže do malého žlábků dvoušroubovice DNA⁴². Toto interkalační barvivo se váže na DNA v průběhu annealingu a elongace, při denaturaci je vždy odštěpeno. Po navázání emituje silné záření úměrné počtu navázaných molekul, míra fluorescence je tedy závislá i na délce amplikonu. Jelikož se SYBR Green váže obecně na veškerou dvouvláknovou DNA, mohou být výsledná data zkreslena signálem nspecifických produktů nebo primerů, které vytvořily dimery. Tento interkalátor je však možné použít pro jakoukoli qPCR reakci, ale není vhodný pro multiplexní režimy^{43,44}.

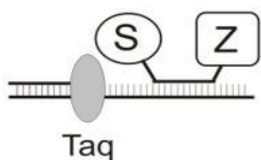
Sofistikovanější princip skýtají sekvenčně specifické fluorescenční próby s různými mechanismy aktivace fluorescence. Mezi nejznámější patří tzv. TaqMan próby, které se skládají ze třech částí. Uprostřed je specifická sekvence DNA o velikosti primeru, která je komplementární s částí sekvence požadovaného amplikonu⁴³. Na 5' konci tohoto řetězce je kovalentně navázán fluorofor a na 3' konci jeho zhášec. V tomto uspořádání pohlcuje zhášec záření emitované fluoroforem. Próba je při annealingu navázána svou specifickou sekvencí a díky 5'-3' exonukleázové aktivitě *Taq* je při elongaci celá navázaná sekvence próby hydrolyzována na jednotlivé dNTP a fluorofor je tedy oddělen od blízkosti zhášeče^{43,44}. Fluorofor je tedy volně obsažen v reakční směsi a emituje záření, které je přímo úměrné počtu molekul požadovaného amplikonu, kdy na jednu molekulu DNA připadá jedna molekula fluoroforu. Jako fluorofor se často používá např. fluorescein (FAM) a zhášec rhodamin (TAMRA), existuje však spousta dalších látek a důležitá je i volba jejich kombinace. Tyto próby jsou vhodné i pro

multiplexní režimy, ale je třeba vybrat vhodné páry fluorofor-zhášec s co možná nejmenšími překryvy spekter. Širší výběr barviv pak umožňují v poslední době oblíbené BHQ sondy obsahující zhášec zabraňující přirozené autofluorescenci, čímž zvyšují citlivost a překryv spekter mezi nimi fluoroforem⁴³. Kromě TaqMan prób, jejichž hydrolytický princip je shrnut na obr.9, existují i sondy založené na hybridizační principu (LUX, molekulární majáky)⁴⁴.

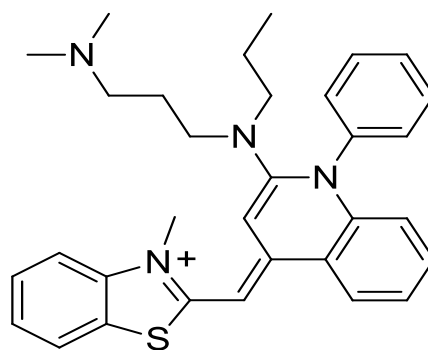
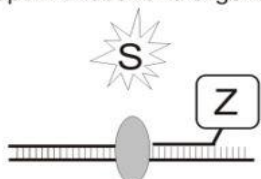
Dosednutí primeru a značeného oligonukleotidu



Syntéza nového řetězce



Štěpení značeného oligonukleotidu



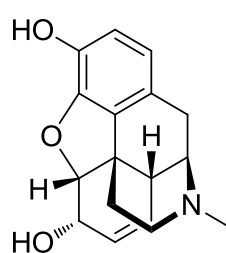
SYBR Green

Obr.9: Schéma principu TaqMan próby (vlevo, zdroj obrázku: www.wikiskripta.eu, autor: MUDr. Martin Vejražka, PhD.), kde „S“ označuje fluorofor a „Z“ zhášec, a chemická struktura interkalátoru SYBR Green (vpravo)

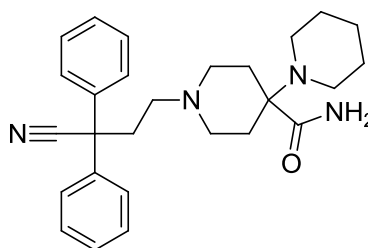
Experimentální část

1. Pacienti a metody

Studie byla provedena na vzorku 121 pacientů s kolorektálním karcinomem ve stádiu I-III, kteří prodělali radikální chirurgickou resekci v letech 2003-2007. Pacientům byl proveden odběr periferní žilní krve a kostní dřeně po uvedení do anestezie před začátkem operace a následně pak měsíc po zákroku. Rovněž byly v průběhu operace získány vzorky krve přímo z nádoru. Vzorky byly testovány na přítomnost CTC metodou real-time RT-qPCR za použití markerů CEA a CK20. Pooperační bolest byla tlumena do doby dalšího odběru vzorků u 82 pacientů piritramidem a u zbylých 39 morfinem. Také byla zaznamenávána data o pacientech jako např. pohlaví, věk, BMI, anestetická data nebo intenzita bolesti v průběhu 5 dní po operaci (tab.2). Pacientům byla před operací podána inhalační anestetika v podobě oxidu dusného v kombinaci se sevofluranem nebo isofluranem. Thiopental byl nejčastěji použit pro úvod do anestezie a sufentanil jako analgetikum v průběhu operace. Po operaci byla podávána analgezie nejčastěji parenterálně, v podobě morfinu nebo piritramidu na pacientovo požádání. Cílem bylo zjistit, jestli má některé z těchto dvou opioidních analgetik vliv na hladiny CTC v porovnání s analýzou přežití do relapsu onemocnění (RFS) a celkového přežití (OS).



morfin



piritramid

Obr.10: Chemické struktury použitých silných opioidních analgetik

V následujících podkapitolách jsou uvedeny laboratorní postupy vedoucí k určení CTC pozitivitu či negativitu u jednotlivých patientských vzorků na základě markerů CEA a CK 20.

Tab.2.: Klinická charakteristika pacientů ve studii, vysvětlivky: ASA (systém hodnotící celkový zdravotní stav pacienta od 1 do 6), HN (hypertenzní nemoc), NA (bez výsledku), VAS (systém hodnotící míru bolesti na škále od 1 do 10),* (p<0,05), ** (p<0,01)

		Klinické stádium			Analgezie		
		1	2	3	Piritramid	Morfin	Celkem
	(n)	33	49	39	82	39	121
Pohlaví	(ženy/muži)	16/17	20/29	17/22	36/46	17/22	53/68
Medián věku v době diagnózy	(roky) (25%-75% kvantily)	64 (59;73)	69 (63;75)	71 (56,5;74)	70 (63;75)	64 (55;72)	** 68 (60;75)
OS	medián follow-up (roky)	6,43	5,79	5,7	5,52	5,31	5,98
	medián OS (roky)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RFS	medián follow-up (roky)	6,55	5,79	3,13	5,41	4,62	5,14
	medián RFS (roky)	NA	NA	3,65	NA	NA	NA
Diabetes	ano/celkem (%)	3/33 (9,1)	7/49 (14,3)	3/39 (7,7)	7/82 (8,5)	6/39 (15,4)	13/121 (10,74)
HN	ano/celkem (%)	17/33 (51,5)	32/49 (65,3)	19/39 (48,7)	49/82 (59,8)	19/39 (48,7)	68/121 (56,20)
Stádium (n)	1	33	NA	NA	20	13	33
	2	NA	49	NA	39	10	49
	3	NA	NA	39	23	16	39
	4	NA	NA	NA	0	0	0
ASA (n)	1	6	3	3	6	6	12
	2	18	26	27	47	24	71
	3	9	20	8	29	8	37
	4	0	0	1	0	1	1
VAS (5 dní průměrně)	medián (25%-75% kvantily)	2,4 (1,5 - 2,7)	2,3 (1,8 - 2,6)	2,5 (2 - 3,2)	2,4 (2 - 2,8)	2,45 (1,8 - 3)	2,4 (1,9 - 2,9)
Doba trvání operace (minuty)	medián (25%-75% kvantily)	180 (160 - 220)	180 (170 - 220)	180 (160 - 200)	183 (176 - 220)	180 (145 - 215)	* 180 (160 - 220)

1.1. Izolace celkové RNA

Vzorky krví a kostních dření byly uchovány a dodány v lyzovaném stavu zbaveném erytrocytů. Izolace a purifikace RNA byla provedena fenol-chloroformovou metodou pomocí TRI reagentu (směs fenolu a thiokyanátu guanidinu) s následnou precipitací isopropanolem a 75 % etanolem. Čistota a koncentrace vyizolované RNA byla spektrofotometricky stanovena na přístroji Nanodrop ND 1000. Dále je shrnut celý postup:

- 1) Nejprve byl termoblok vyhřát na 60 °C a centrifuga vychlazená na 4 °C.
- 2) Na ledu byly rozmrazeny vzorky TRI lyzátů po dobu 15 min a poté byly silně zvortexovány.
- 3) Vzorky TRI lyzátů v 1,7 ml zkumavkách byly ponechány po dobu 5 min při pokojové teplotě, aby mohla proběhnout kompletní disociace nukleoproteinů. Dále bylo ke vzorkům přidáno 200 µl chloroformu a poté byly silně zvortexovány (cca 30 sec) a ponechány po dobu 10 min při pokojové teplotě.
- 4) Vzorky byly centrifugovány 15 min při 12 000g a 4 °C (separace fází), v mezičase byly připraveny a popsány 1,7 ml zkumavky.
- 5) Vrchní vodná fáze obsahující RNA byla přenesena do čistých zkumavek (pipetování probíhalo po částech, aby nebyly nerozvířeny jednotlivé fáze), obvykle bylo odebráno celkem 400 - 500 µl vodné fáze.
- 6) Ke vzorkům bylo přidáno stejné množství isopropanolu, jako bylo vodné fáze, tedy 400 - 500 µl a krátkým opakovaným protřepáním (2x - 4x) byly promíchány obě vrstvy tak, aby nezůstal mléčný prstenec.
- 7) Vzorky byly ponechány 5 min při pokojové teplotě, aby proběhla precipitace RNA.
- 8) Následovala 10 min centrifugace při 12 000 g a 4 °C (na dně zkumavky se utvořila bílá popř. průhledná RNA peletka).
- 9) Supernatant byl opatrně odstraněn a RNA peleta omyta 1,5 ml 75% ethanolu, následným převrácením zkumavky byla peletka odlepena.
- 10) Zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 min při 12 000 g a 4 °C.
- 11) Supernatant byl odstraněn a peleta sušena na vzduchu ve flow-boxu po dobu cca 3-10 min tak, aby neuschla úplně a zprůhledněla.
- 12) K RNA peletě bylo přidáno cca 20 µl DEPC vody (15 - 50 µl podle velikosti peletky) a roztok byl několikrát propipetován.

- 13) Rozpuštění RNA bylo urychleno zahřátím vzorků na 60 °C po dobu 10 min, poté byly vzorky ochlazeny na ledové tříšti.
- 14) Pro UV/VIS stanovení čistoty a koncentrace izolované RNA byl odebrán alikvot (cca 1,4 µl do 0,2 ml zkumavky) a na čočku přístroje NanoDrop ND 1000 byly postupně napipetovány po 1 µl a měřeny voda, blank (použitý pufr) a poté jednotlivé vzorky. Po měření byly vždy kapky odsáty a čočka i raménko přístroje očištěny buničinou.

Za dostatečně čistý vzorek byl považován takový, který vykazoval $A_{260}/A_{280} \geq 1,8 - 2,1$ a z hodnot koncentrací bylo spočítáno množství RNA, které bylo potřeba pro reverzní transkripci. Připravené vzorky byly uchovávány při teplotě okolo -75 °C.

1.2. Reverzní transkripce

Před začátkem práce byly výchozí reagenty a vzorky RNA z předchozích postupů rozmrazeny, zvortexovány a stočeny. Jen reverzní transkriptáza byla přidávána rovnou z mrazáku a před prací lehce zvortexována a stočena. V následujících osmi krocích je shrnut celý postup:

- 1) Reverzní transkripce byla prováděna ze 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl.
- 2) 0,2 ml zkumavky byly umístěny do vychlazené destičky, popsány a po spočítání objemů do nich byly pipetovány reagenty v pořadí „voda-RNA-hexamery“ (množství RNA odpovídající 3 µg RNA, 0,3 µg hexamerů a voda do objemu 19,5 µl). Směsi byly krátce zvortexovány a stočeny.
- 3) Zkumavky byly inkubovány v termocykleru s vyhřívaným víčkem při 70 °C po dobu 5 min. Poté byly rychle zchlazeny na ledu po dobu cca 1 min.
- 4) V mezičase byl připraven MasterMix. Množství na jeden vzorek pro transkripci: 3 µg RNA ve 30 µl, 6 µl 5x RT pufru, 3 µl 10 mM dNTP a 30 U RNAsinu. Celá směs byla jen lehce zvortexována a stočena.
- 5) Ke zchlazenému vzorku RNA s hexamery a vodou bylo přidáno 9,75 µl MasterMixu, směs byla promíchána a ponechána při pokojové teplotě po dobu 5 min ve flowboxu (5 min začíná přidáním MasterMixu k prvnímu vzorku).

- 6) Ke vzorku RNA s MasterMixem bylo přidáno 150 U reverzní transkriptázy, směs byla krátce vortexována, stočena a ponechána po dobu 10 min při pokojové teplotě ve flowboxu.
- 7) Zkumavky byly rovnoměrně naskládány do termocykléru a inkubovány s vyhříváním víčkem při 42 °C po dobu 60 min, poté při 70 °C po dobu 10 min.
- 8) Vzorky byly zchlazeny na ledu, popsány, krátce stočeny a uloženy do mrazicího boxu při -20 °C.

1.3. Provedení real-time PCR

Reakce byly prováděny ve 25 µl objemu a na začátku byla *Taq* aktivována zahřátím na 96 °C po dobu 15 minut. V obou případech byly použity dva různé primery i specifická TaqMan próba. Reakce probíhaly v 50-ti cyklech s následujícími teplotními profily:

CEA: denaturace.: 95°C – 15 s, anealing.: 65°C – 15 s

CK20: denaturace.: 95°C – 15 s, anealing.: 60°C – 15 s

Tab.3: Složení reakčních směsí

	Taq	MgCl ₂	PCR pufr	dNTP	cDNA	Próba	Fw-prim.	Rev-prim.
CK20	1U	3mM	10x	200µl	100ng	200nM	400nM	400nM
CEA	1U	3mM	10x	200µl	100ng	200nM	300nM	600nM

Před přípravou reakčních směsí byly reagenty rozmrazeny, zvortexovány a stočeny. Nejprve byl připraven MasterMix, do kterého byly napipetovány jednotlivé složky uvedené v tab.3 kromě cDNA. *Taq* byla pipetována nakonec přímo z mrazáku a nebyla rozmrazena předem. Do MasterMixu byla doplněna DEPC voda tak, aby jednotlivé reakce vycházely na objem 24 µl. MasterMix byl po zvortexování a stočení rozpipetován po 24 µl do 0,1 ml zkumavek umístěných do chladicí destičky. Následně byl do zkumavek přidán 1 µl cDNA, což byly vzorky, pozitivní kontrola z nádorové tkáně, specifické standardy a jako negativní kontrola 1 µl DEPC vody. Poté byly zkumavky umístěny do real-time termocykléru a byl spuštěn příslušný program.

Tab.4: Charakteristika použitých primerů a próby

Oligonukleotid	Sekvence	Zhášeč-fluorofor	Produkt
CEA Fw	5' - taagtgttgaccacagcgaccc - 3'		179 bp
CEA Rev	5' - gttcccatcaatcagccaagaa - 3'		
CEA próba	5' - atgcctctatggcccagacgaccc - 3'	BHQ1 - HEX	
CK20 Fw	5' - cgacttgaacaggaaattgcta - 3'		148 bp
CK20 Rev	5' - tgccatccactacttcttgc - 3'		
CK20 próba	5' - accgccgccttctggaagga - 3'	BHQ1 - HEX	

Za použití softwaru Rotor-Gene 6 byla vyhodnocena míra exprese daných genů na základě standardní křivky s hodnotou efektivity nad 0,85 a korelačním koeficientem nad 0,9. Výsledek byl hodnocen v počtech kopií na μg RNA (kop/ μg) jako pozitivní či negativní na základě standardních cut-off hodnot a hodnot šedé zóny. Cut-off hodnoty byly získány vyšetřením zdravých dárců krve. Vzorek byl hodnocen jako pozitivní, pokud jeho hodnoty přesahovaly cut-off a šedou zónu.

Tab.5: Kritéria pro hodnocení vzorku

Marker	Hodnota	Krev (kop/ μg)	Kostní dřeň (kop/ μg)
CEA	Cut-off	200	350
	Šedá zóna	190 - 210	306 - 394
CK20	Cut-off	5 000	2 000
	Šedá zóna	4 306 - 5 694	-

Pokud se výsledek nachází v šedé zóně, je experiment opakován, protože neposkytuje relevantní informace. Genová exprese je označena jako nízká a tedy nesvědčí o přítomnosti CTC, když se hodnoty pohybují pod spodní hranicí šedé zóny. V případě, že se výsledek nachází nad horní hranicí šedé zóny, jsou ve vzorku přítomny CTC a dosahuje-li výsledná hodnota jednoho násobku cut-off hodnoty, jedná se o zvýšenou expresi daného markeru. Pokud je výsledek vyšší než jeden násobek cut-off hodnoty, je míra exprese ve vzorku označena jako vysoká.

1.4. Použité statistické metody

Výsledná data byla porovnána s typem použité analgezie, RFS, OS a relevantními klinickými a demografickými daty. Mann-Whitneyův pořadový test byl použit k porovnání hladin CTC mezi PA a MA. Pearsonův chí-kvadrát test byl použit k verifikaci nezávislosti přítomnosti CTC a použité anestezie a analgezie. Coxova regresní analýza proporcionálních rizik byla použita k posouzení vlivu CTC negativity či pozitivitu a klinicko-patologických dat na RFS a OS. K vizualizaci RFS byly použity Kaplan-Meierovy křivky přežití (long-rank). Veškeré testy byly oboustranné s hladinou významnosti $p < 0,05$ a byly provedeny ve freewarové aplikaci R.

1.5. Použitý materiál a přístroje

TRI reagent (Molecular Research Center), Isopropanol, Chloroform a Ethanol (Sigma nebo Serva), DEPC Treated Water (Ambion), zkumavky typu Eppendorf 1,7 ml, 2 ml, špičky, buničina, Random primers (Promega), RNAsin ribonuclease inhibitor (Promega), Deoxyribonucleotide triphosphates (Promega), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 0,2 ml Thermo-Tube (ABgene), ep Dualfilter T.I.P.S. (Eppendorf), specifické primery a TaqMan sondy (Generi-Biotech), Thermo-Start DNA Polymerase (ABgene), 0,1 ml Tubes & Caps (Corbett-Research).

Laminární box (BioAir), Kombinovaná chladnička (Gorenje), Vortex (Scientific Industries), Minicentrifuga (Eppendorf), chlazená centrifuga (Hermle), termoblok (Eppendorf), vortex (Genie), Nanodrop ND 1000 (Nanodrop), Thermal Cycler PTC 100 (MJR), PCR box skleněný, Laminární box (Thermo Scientific), Mrazicí box (Gorenje), Kombinovaná chladnička (Liebherr), Vortex (Labnet), Minicentrifuga (Eppendorf), Real-time PCR termocyklér (Corbett-Research).



Obr.11: Rotor s PCR zkumavkami u použitého termocykleru (vlevo, zdroj obrázku: www.jcu.edu.au) a spektrofotometr Nanodrop ND 1000 (vpravo, zdroj obrázku: openwetware.org)

2. Výsledky

Získaná data CTC positivity či negativity ve studovaných kompartmentech (periferní krev, krev z nádoru a kostní dřeň) na základě použitých markerů jsou uvedena v tab.6 na straně 41. Data jsou srovnána s použitou technikou analgezie a klinickým stádiem. Výsledky byly statisticky zpracovány za použití softwaru R v porovnání s RFS, OS a dalšími klinickými charakteristikami pacientů.

Dále byla provedena statistická Coxova regresní analýza odhadu rizika zahrnující klinická data pacientů v porovnání s přítomností CTC v jednotlivých kompartmentech z hlediska obou markerů. Výsledky jsou uvedeny v tab.7 na straně 42 a zahrnuty v následujících křivkách přežití. Kaplan-Meierovy křivky přežití byly využity pro vizualizaci RFS pacientů, kteří byli rozřazeni do skupin podle použité analgezie a expresního statusu, a jsou demonstrovány ve zbylých obrázcích.

Z hlediska doplňujících klinických charakteristik bylo pokročilejší stádium onemocnění nezávisle negativním prognostickým faktorem z hlediska RFS a OS. Ve skupině s piritramidovou analgezií byl věk pacientů vyšší ($p<0,004$) a také byla delší doba trvání operace ($p<0,046$). Věk měl však vliv pouze na OS. Naopak žádný významný vliv na RFS a OS neměly parametry jako BMI, ASA status nebo výskyt jiného onemocnění. Měsíc po operaci byly u pacientů s morfinovou analgezií pozorovány vyšší hladiny CK20 v krvi ($p<0,045$) i kostní dřeni ($p<0,065$). Stejně tak bylo větší množství pacientů v této skupině vyhodnoceno jako CK20 pozitivní ve vzorcích periferní krve ($p<0,048$) nebo jako pozitivní v případě alespoň jednoho kompartmentu ($p<0,026$). Rovněž větší množství pacientů s morfinovou analgezií mělo pozitivní alespoň jeden z obou markerů v periferní krvi ($p<0,033$) i kostní dřeni ($p<0,064$). Morfinová analgezie výrazně zkracovala RFS i u pacientů s CTC negativitou, avšak kratší OS nebylo prokazatelně pozorováno. I z hlediska ostatních klinických charakteristik (věk, pohlaví) se morfinová analgezie jeví jako nezávisle negativní prognostický faktor pro RFS jak pro pacienty s CTC negativitou, tak pozitivitou. Konkrétně pak bylo kratší RFS pozorováno u pacientů s CEA negativitou ($p<0,013$) a negativitou v obou markerech ($p<0,019$) ve vzorcích krve z nádoru. Stejně tak u vzorků kostní dřene před operací s CEA negativitou ($p<0,038$) a negativitou v obou markerech ($p<0,02$) v době operace a ve vzorcích periferní krve s CEA negativitou měsíc po zákroku ($p<0,035$). Hraniční výsledky byly pozorovány ve

skupině s CEA negativitou ($p < 0,061$) a negativitou v obou markerech ($p < 0,1$) v periferní krvi v době před zákrokem. Morfinová analgezie tedy byla nezávislým (po uvážení věku, pohlaví a stádia onemocnění) negativním prognostickým faktorem pro většinu CTC pozitivních i negativních skupin pacientů v různých kompartmentech.

Měsíc po chirurgickém zákroku byly pozorovány změny v hladinách CTC jak v periferní krvi, tak kostní dřeni. Zásadní rozdíly byly v kratší RFS u pacientů v CTC negativních skupinách měsíc po zákroku, kterým byl podán morfin. V CTC pozitivních skupinách nebyl zaznamenán mezi oběma typy analgezie tak markantní rozdíl. V této skupině však bylo méně pacientů a analgezie už zřejmě při větším množství CTC neovlivnila jejich eradikaci imunitním systémem nebo při velmi vysokých hladinách CTC již vliv morfinu nebyl zaznamenán. Na rozdíl od ostatních kompartmentů, analgezie morfinem zkracovala RFS u pacientů s CTC pozitivní i negativní krví z nádorů, což naznačuje, že morfin negativně ovlivňuje prognózu i u pacientů s vysokými hladinami CTC. Tato skutečnost však mohla být zkreslena poměrně malým množstvím pacientů s CTC pozitivní krví z nádoru.

Celkově je jasné zřejmé, že morfin, na rozdíl od piritramidu, významně zvyšuje hladiny CTC a snižuje RFS po chirurgické resekci primárního tumoru u pacientů s kolorektálním karcinomem ve stádiu I-III.

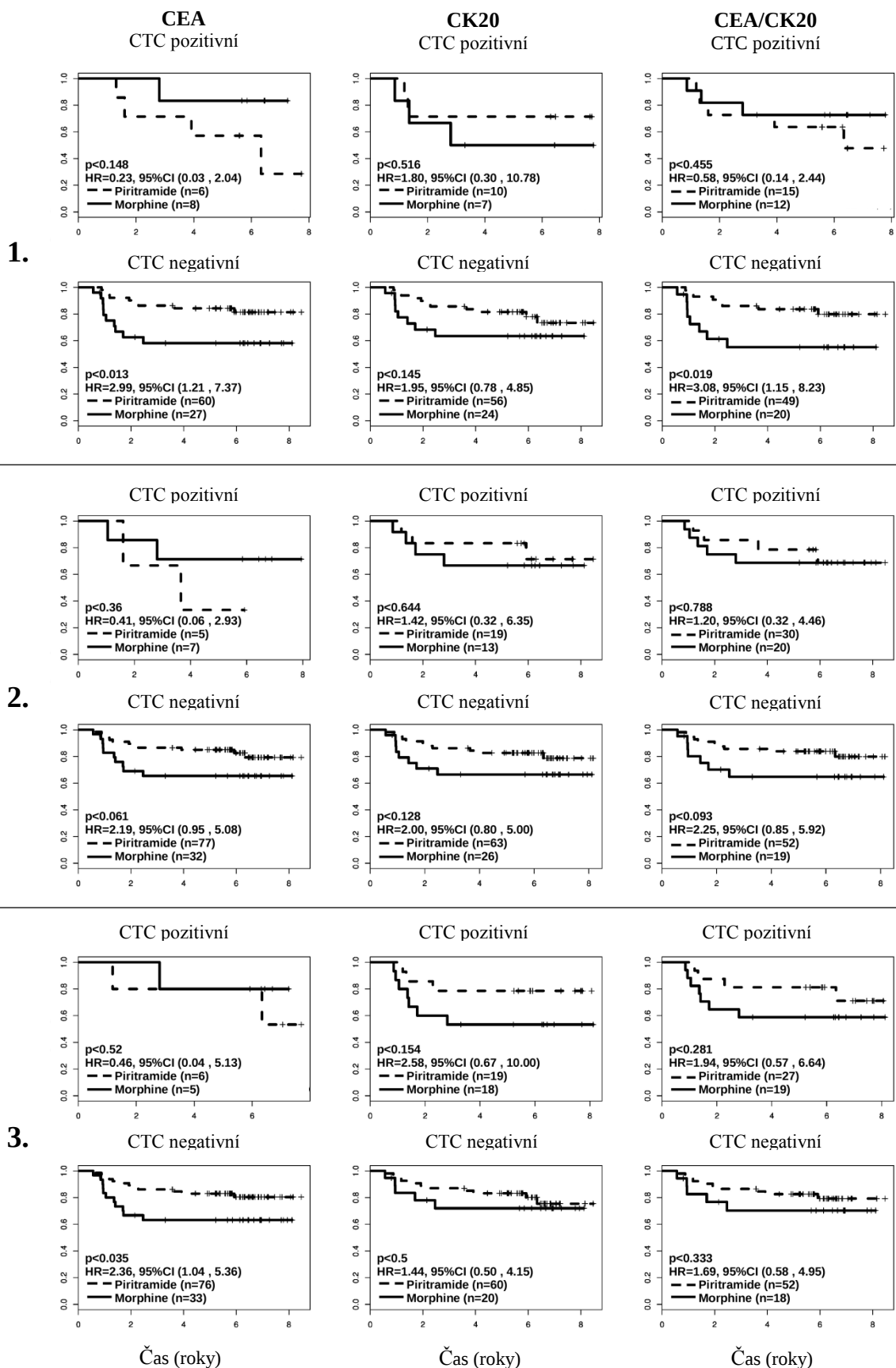
Tab.6: Porovnání výskytu CTC (vyhodnoceno na základě markerů CEA a CK20) s klinickým stádiem a použitou analgezií, (N - počet)

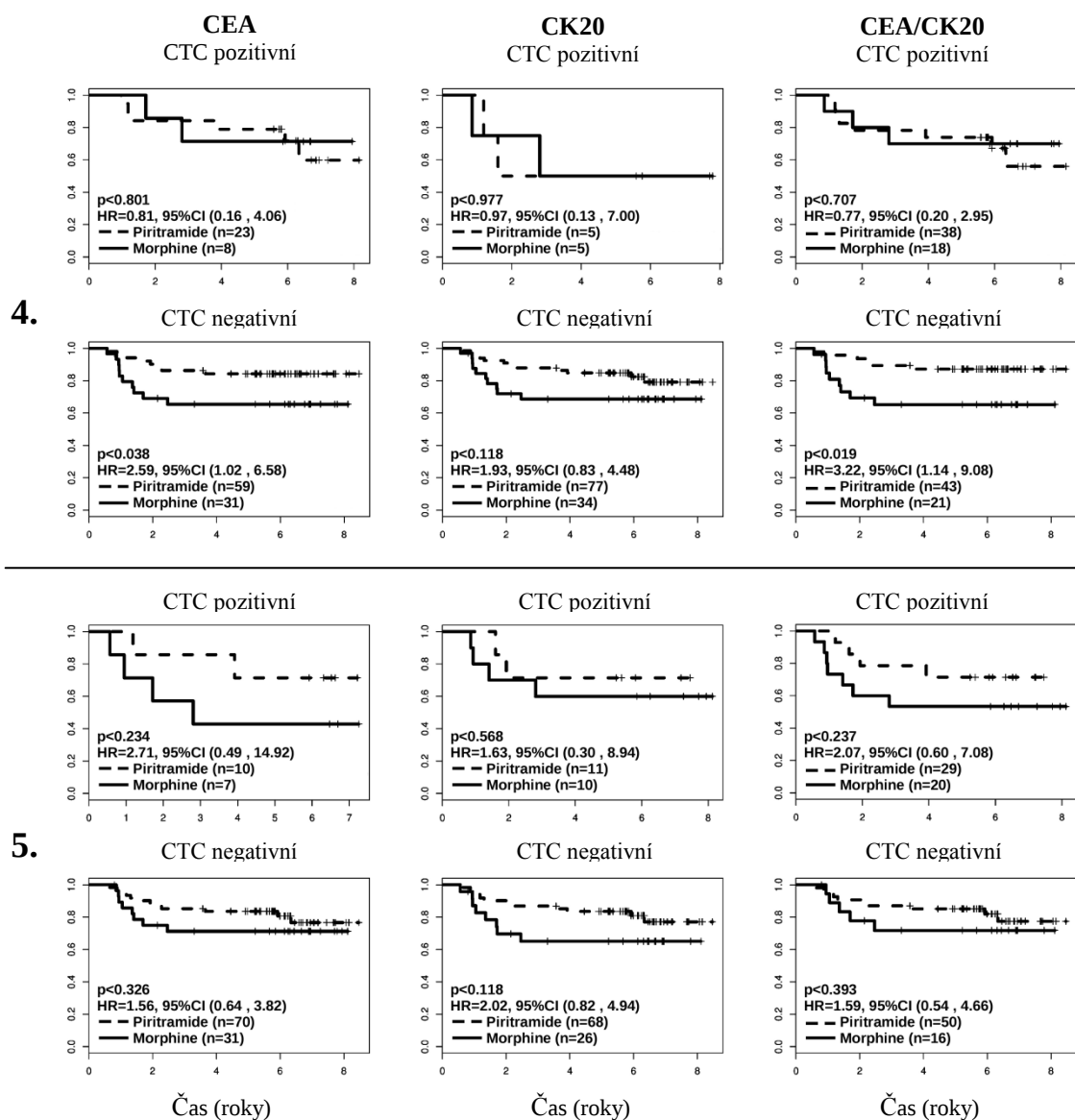
			CTC pozitivní						p-hodnota Piriramid vs. Morfin	celková hodnota CTC (kop/ug)						p-hodnota Piriramid vs. Morfin	Stádium 1		Stádium 2		Stádium 3		P- hodnota Stádia
			Všichni pacienti		Piriramid		Morfin			celková hodnota CTC (kop/ug)							Stádium 1		Stádium 2		Stádium 3		
			N	%	N	%	N	%		Všichni pacienti		Piriramid		Morfin			N	%	N	%	N	%	
			celkem	121		82		39			Medián	25 % - 75%	Medián	25 % - 75%	Medián		25 % - 75%	33		49		39	
CEA	Krev z nádoru	negativní	87	86,14%	60	90,91%	27	77,14%	0,57	58	25 - 125	55	25 - 115	60	20 - 175	0,65	25	92,59%	36	87,80%	26	78,79%	0,282
		pozitivní	14	13,86%	6	9,09%	8	22,86%									2	7,41%	5	12,20%	7	21,21%	
	Periferní krev v době operace	negativní	109	90,08%	77	93,90%	32	82,05%	0,087	64	20 - 120	55	18.5 - 105	85	32.5 - 140	0,0611	28	84,85%	49	100,00%	32	82,05%	0,00994
		pozitivní	12	9,92%	5	6,10%	7	17,95%									5	15,15%	0	0,00%	7	17,95%	
	Periferní krev měsíc po operaci	negativní	109	90,83%	76	92,68%	33	86,84%	0,489	44	15 - 100	42.5	15 - 95	46.5	16.25 - 108.8	0,861	26	81,25%	47	95,92%	36	92,31%	0,076
		pozitivní	11	9,17%	6	7,32%	5	13,16%									6	18,75%	2	4,08%	3	7,69%	
	Kostní dřeň v době operace	negativní	90	74,38%	59	71,95%	31	79,49%	0,506	180	95 - 360	190	101.2 - 390.2	165	67.5 - 328.5	0,289	26	78,79%	36	73,47%	28	71,79%	0,781
		pozitivní	31	25,62%	23	28,05%	8	20,51%									7	21,21%	13	26,53%	11	28,21%	
Kostní dřeň měsíc po operaci	negativní	101	85,59%	70	87,50%	31	81,58%	0,565	120	60 - 254.5	110	59.5 - 196.2	145	86.25 - 283.8	0,363	27	84,38%	42	89,36%	32	82,05%	0,614	
	pozitivní	17	14,41%	10	12,50%	7	18,42%									5	15,63%	5	10,64%	7	17,95%		
CK20	Krev z nádoru	negativní	80	82,47%	56	84,85%	24	77,42%	0,541	1880	765 - 3825	1890	727.5 - 3701	1790	916 - 4615	0,757	21	80,77%	35	89,74%	24	75,00%	0,257
		pozitivní	17	17,53%	10	15,15%	7	22,58%									5	19,23%	4	10,26%	8	25,00%	
	Periferní krev v době operace	negativní	89	73,55%	63	76,83%	26	66,67%	0,335	2645	1200 - 5175	2500	999 - 4608	3275	1338 - 5952	0,222	23	69,70%	38	77,55%	28	71,79%	0,699
		pozitivní	32	26,45%	19	23,17%	13	33,33%									10	30,30%	11	22,45%	11	28,21%	
	Periferní krev měsíc po operaci	negativní	80	69,57%	60	75,95%	20	55,56%	0,0471	2730	1123 - 5490	2260	937.5 - 4985	3882	1840 - 8164	0,0449	12	41,38%	41	87,23%	27	69,23%	0,000135
		pozitivní	35	30,43%	19	24,05%	16	44,44%									17	58,62%	6	12,77%	12	30,77%	
	Kostní dřeň v době operace	negativní	111	91,74%	77	93,90%	34	87,18%	0,367	335	0 - 797	355	0 - 798.8	320	0 - 758.5	0,39	31	93,94%	46	93,88%	34	87,18%	0,455
		pozitivní	10	8,26%	5	6,10%	5	12,82%									2	6,06%	3	6,12%	5	12,82%	
	Kostní dřeň měsíc po operaci	negativní	94	81,74%	68	86,08%	26	72,22%	0,128	690	267.5 - 1535	664	15 - 1172	962.5	323.8 - 2451	0,0645	20	68,97%	45	95,74%	29	74,36%	0,00459
		pozitivní	21	18,26%	11	13,92%	10	27,78%									9	31,03%	2	4,26%	10	25,64%	
CEA/CK20	Krev z nádoru	negativní	69	71,88%	49	76,56%	20	62,50%	0,229	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19	73,08%	30	78,95%	20	62,50%	0,3088
		alespoň 1 pozitivní	27	28,13%	15	23,44%	12	37,50%									7	26,92%	8	21,05%	12	37,50%	
	Periferní krev v době operace	negativní	82	67,77%	60	73,17%	22	56,41%	0,102	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	20	60,61%	38	77,55%	24	61,54%	0,1641
		alespoň 1 pozitivní	39	32,23%	22	26,83%	17	43,59%									13	39,39%	11	22,45%	15	38,46%	
	Periferní krev měsíc po operaci	negativní	77	66,38%	58	73,42%	19	51,35%	0,03285	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11	36,67%	40	85,11%	26	66,67%	6.589e-05
		alespoň 1 pozitivní	39	33,62%	21	26,58%	18	48,65%									19	63,33%	7	14,89%	13	33,33%	
	Kostní dřeň v době operace	negativní	82	67,77%	55	67,07%	27	69,23%	0,9767	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25	75,76%	33	67,35%	24	61,54%	0,4358
		alespoň 1 pozitivní	39	32,23%	27	32,93%	12	30,77%									8	24,24%	16	32,65%	15	38,46%	
	Kostní dřeň měsíc po operaci	negativní	82	71,30%	61	77,22%	21	58,33%	0,0638	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	18	62,07%	41	87,23%	23	58,97%	0,006959
		alespoň 1 pozitivní	33	28,70%	18	22,78%	15	41,67%									11	37,93%	6	12,77%	16	41,03%	

Tab.7: Coxova regresní analýza zahrnující věk, pohlaví, stádium, typ analgezie a testované kompartmenty, HR označuje odhad rizika

			HR	95% CI		p	Model
Krev z nádoru	CEA	Morfin vs. Piritramid	3,01496	1,06961	8,4984	0,036866	0,000861
	CK20	Morfin vs. Piritramid	3,236486	1,17584	8,9084	0,022995	0,000373
	CEA/CK20	Morfin vs. Piritramid	3,26506	1,159252	9,1961	0,025113	0,000462
Periferní krev v době operace	CEA	Morfin vs. Piritramid	1,810772	0,71605	4,5791	0,20971	0,000386
	CK20	Morfin vs. Piritramid	2,061052	0,8014	5,3006	0,13346	0,000287
	CEA/CK20	Morfin vs. Piritramid	2,231418	0,851653	5,8465	0,102423	0,000741
Periferní krev měsíc po operaci	CEA	Morfin vs. Piritramid	1,776401	0,706583	4,466	0,22187	0,000378
	CK20	Morfin vs. Piritramid	1,550752	0,584588	4,1137	0,37808	0,000716
	CEA/CK20	Morfin vs. Piritramid	1,738719	0,680402	4,4432	0,24787	0,000351
Kostní dřeň v době operace	CEA	Morfin vs. Piritramid	1,835751	0,742797	4,5369	0,18822	0,000895
	CK20	Morfin vs. Piritramid	1,81073	0,72327	4,5332	0,20478	0,000827
	CEA/CK20	Morfin vs. Piritramid	1,82852	0,741501	4,5091	0,19002	0,000292
Kostní dřeň měsíc po operaci	CEA	Morfin vs. Piritramid	1,719235	0,689492	4,2869	0,24507	0,000853
	CK20	Morfin vs. Piritramid	2,315642	0,866292	6,1898	0,094162	0,000473
	CEA/CK20	Morfin vs. Piritramid	1,615448	0,624962	4,1757	0,32225	0,00082

Na straně 43 a 44 jsou uvedeny některé vybrané křivky přežití z hlediska RFS, na kterých je tedy sledovanou událostí relaps onemocnění. Na každé křivce je srovnáno RFS pacientů s morfinovou a piritramidovou analgezií. V každém grafu má daný počet pacientů společný sledovaný kompartment a CTC status z hlediska daného markeru. Podíl pacientů je vyjádřen na ose „y“ a čas na ose „x“, kde pacienti byli sledováni po dobu osmi let.





Obr.12: Křivky RFS u jednotlivých skupin pacientů v rámci sledovaných kompartmentů: 1. krev z nádorů, 2. Periferní krev v době operace, 3. Periferní krev měsíc po operaci, 4. Kostní dřeň v době operace, 5. Kostní dřeň měsíc po operaci

Diskuze

Je zřejmé, že pooperační období je klíčové pro šíření CTC u mnoha typů nádorových onemocnění a bylo jasně prokázáno, že následná přítomnost CTC je negativním prognostickým faktorem pro recidivu onemocnění⁴⁵⁻⁴⁹. Bohužel, doposud nebyla provedena žádná studie, která by se zabývala působením pooperační analgezie na hladiny CTC. Rovněž nebyl prozatím studován vliv morfinu, v porovnání s jinými opioidními analgetiky, na recidivu onemocnění v klinických podmínkách. Opioidní analgetika byla zkoumána pouze z hlediska působení na již vytvořenou metastázi, avšak výsledky byly často protichůdné^{33-35,50-54}. V této studii byl zkoumán vliv opioidů použitých jako pooperační analgezie u pacientů, kteří podstoupili radikální chirurgickou resekci kolorektálního karcinomu ve stádiu I-III. Měsíc po chirurgickém výkonu a tedy i po aplikaci analgetik byly hladiny CTC v krvi a kostní dřeni stanovovány metodou real-time RT-qPCR za použití markerů CEA a CK20. Hlavním cílem bylo srovnání analgezie morfinem a piritramidem v působení na CTC, přežití a recidivu onemocnění při záznamu komplexních klinických dat, což nikdy v minulosti provedeno nebylo. Z výsledných dat vyplývá, že morfinová analgezie má negativní vliv jak na přítomnost CTC, tak výrazně zkracuje RFS. Ve všech studovaných kompartmentech vykazovala morfinová analgezie zkrácení RFS u CTC negativních skupin pacientů. Nicméně žádné výrazné změny nebyly pozorovány u CTC pozitivních pacientů. To však může být způsobeno malým množstvím subjektů v této skupině a také skutečností, že imunitní systém je schopen eliminovat pouze omezené množství CTC. U pacientů s původně velmi vysokými hladinami CTC již nebyl pozorován další vliv morfinu, jelikož další změny již nebyly detekovatelné. Naproti tomu u zcela nedetekovaných CTC neměl již morfin další negativní vliv, protože imunitní systém mohl tak malé množství CTC eliminovat i přes negativní stimul morfinem. Bez ohledu na hladiny CTC v krvi z nádoru, zkracovala analgezie morfinem RFS. Analýza celkového přežití nebyla dostatečná kvůli vysokému věku některých pacientů a případné adjuvantní terapii, která by v případě CTC pozitivních pacientů, jichž bylo málo, výsledky značně zkreslovala. Navíc, vzhledem ke zmíněným faktům, nebylo možné zaznamenat přesnou příčinu úmrtí.

Fakt, že vliv morfinu je na rozdíl od piritramidu jednoznačně negativní, může být vysvětlen rozdílným mechanismem účinku na imunitní systém. Přímé

imunomodulační účinky již byly v případě morfinu zdokumentovány^{55,56}. Účinky piritramidu jsou pravděpodobně pouze nepřímé a bylo zdokumentováno jeho působení na lidské buněčné linie, kde ovlivňoval produkci reaktivních forem kyslíku^{57,58}. Pokud takto ovlivňuje i buňky imunitního systému, je možné, že tímto způsobem zlepšuje jejich schopnost eliminovat nádorové buňky. Piritramid také zlepšoval pohyb leukocytů, kdy např. v kombinaci s fentanylem zajišťoval sofistikovanější zacílení leukocytů s β -endorfinem do postiženého místa u pacientů po chirurgickém zákroku⁵⁹.

Kvůli retrospektivnímu charakteru celé studie nebyla možná standardizace v určitých klinických aspektech. Nejednotnost byla v premedikacích, infuzích či transfuzích a neopioidní analgezií. Nicméně, ve všech případech byl použit sufentanyl a jednotná inhalační anestezie. Co však jistě mohlo ovlivnit výsledky, byl pokročilejší věk a delší doba trvání chirurgického zákroku ve skupinách s piritramidovou analgezií. Delší expozice inhalačními anestetiky totiž může negativně ovlivnit přirozenou obranu organismu proti tvorbě metastáz³².

Přítomnost markerů pro CTC sice ještě nutně nesvědčí o vytvoření makroskopické metastáze, avšak sledování jejich hladin může významně přispět ke zlepšení výsledků v onkologické praxi. Lze tak hodnotit terapeutické přístupy a optimalizovat strategie, které by mohly částečně zvrátit recidivu onemocnění v pooperačním období⁶⁰. V našem případě bylo jasně prokázáno, že pooperační morfinová analgezie negativně ovlivňuje hladiny CTC a zkracuje RFS u pacientů s kolorektálním karcinomem ve stádiu I-III, kteří podstoupili chirurgickou resekci primárního tumoru. Je možné, že by morfinová analgezie mohla rovněž ovlivňovat i celkové přežití, ověření by však vyžadovalo dlouhodobější studii s větším počtem subjektů. Podobné studie jsou do budoucna jistě nutné, rovněž pro zhodnocení dalších faktorů před operací, v jejím průběhu i po ní. Působení dalších analgetik a anestetik používaných v onkologické praxi by bylo namístě klinicky ověřit z hlediska ovlivnění CTC a recidivy nádorových onemocnění.

V případě prospektivní studie bude namístě využít moderní metody pro přímou detekci a charakterizaci CTC, kde tuto možnost poskytuje např. již diskutovaný CellSearch system. Tato metoda poskytuje dobré výsledky v detekci a možnosti dalšího studia CTC u nádorů kolorekta, prostaty a prsu. Alternativou by mohl být tzv. AdnaTest využívající RT-qPCR, který se používá k detekci CTC u nádorů prsu³⁰.

Závěr

Předložená diplomová práce se zaměřuje na problematiku recidivy onemocnění u kolorektálního karcinomu z hlediska cirkulujících nádorových buněk, jejichž hladiny lze ovlivnit analgetickými metodami. Ovlivnění relapsu, doby přežití a celkové prognózy analgetiky či anestetiky již bylo diskutováno v jiných studiích, ale ne z hlediska přítomnosti volných nádorových buněk v různých kompartmentech a v takto širokém klinickém rozsahu. Práce tradičně obsahuje dvě stěžejní sekce, teoretickou a experimentální. Teoretická část je rozdělena do pěti hlavních kapitol a v první polovině je důraz kladen na obecnou a klinickou charakteristiku kolorektálního karcinomu. Zbytek teoretické části se pak zaměřuje na konkrétní problematiku řešenou v této práci, tedy detekci nádorových buněk a jejich možné ovlivnění skrze imunitní systém pomocí analgetik a anestetik. Rovněž je stručně nastíněna metoda RT-qPCR, která byla k detekci nádorových buněk použita v experimentální části a byla tak klíčová pro uskutečnění dané studie. V experimentální části je pak popsán sled molekulárně-biologických metod, které vedly k detekci cirkulujících nádorových buněk ve vzorcích krve a kostní dřeně. Cílem bylo určit CTC status metodou RT-qPCR za použití markerů epiteliálních genů CEA a CK20 v daných kompartmentech u pacientů podstupující chirurgickou resekci kolorektálního karcinomu ve stádiu I-III. Byly porovnávány hladiny CTC před zákrokem a měsíc po něm a srovnávány s použitou pooperační analgezií a přežitím pacientů. Ze získaných dat, která jsou shrnuta ve druhé části experimentální sekce, jasně vyplývá negativní účinek morfinu a pozitivní účinek piritramidu jak na hladinu CTC, tak na RFS. Rovněž byla zahrnuta další doprovodná klinická data. Všechny vytyčené cíle tedy byly splněny, avšak nebyla provedena analýza OS, čemuž bránily faktory jako vyšší věk pacientů a malá šance na přesné určení úmrtí. Z provedené dlouhodobé studie vyplývá, že piritramid je vhodnější pro použití v onkologické pooperační praxi a správně zvolená analgezie může ovlivnit recidivu onemocnění a hladiny CTC. Další studium vlivu analgetik a anestetik na prognózu pacientů s nádorovým onemocněním by tedy mohlo být přínosné.

Seznam použité literatury

1. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice < www.svod.cz > (přečteno dne 3.5. 2014)
2. Jablonská M. a kol. (2000) Kolorektální karcinom – časná diagnóza a prevence. Grada Publishing, Praha
3. Holubec L. a kol. (2004) Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby. Grada Publishing, Praha
4. Kubecová M. a kol. (2011) Onkologie. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Radioterapeutická a onkologická klinika 3. LF a FNKV
5. Klener P. (1996) Protinádorová chemoterapie. Galén, Praha
6. Migliore L., Migheli F., Spisni R., Coppédé F. (2011) Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Hindawi Publishing Corporation
7. Čihák R. (1988) Anatomie 2. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha
8. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th Edition. Garland Science, New York
9. Kanthan R., Senger J.-L., Kanthan S. Ch. (2012) Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. Pathology Research International, Hindawi Publishing Corporation
10. Česká onkologická společnost ČLS JEP < www.linkos.cz > (přečteno dne 10.3. 2014)
11. Coppédé F., Lopomo A., Spisni R., Migliore L. (2014) Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology, 20(4), 943-956
12. Falt P., Fojtík P., Kliment M. (2009) Gastrointestinální polypózní syndromy. Interní medicína pro praxi, 11(12), 558–560

13. Half E., Bercovich D., Rozen P. (2009) Familial adenomatous polyposis. Orphanet Journal of Rare Diseases, BioMed Central
14. Win A. K., Lindor N. M., Young J. P., Macrae F. A., Young G. P., Williamson E., Parry S., Goldblatt J., Lipton L., Winship I., Leggett B., Tucker K. M., Giles G. G., Buchanan D. D., Clendenning M., Rosty Ch., Arnold J., Levine A. J., Haile R. W., Gallinger S., Le Marchand L., Newcomb P. A., Hopper J. L., Jenkins M. A. (2012) Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in Lynch Syndrome. Journal of the National Cancer Institute, 104(18), 1363-1372
15. Kopacova M., Tacheci I., Rejchrt S., Bures J. (2009) Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. World Journal of Gastroenterology, 15(43), 5397-5408
16. Pantel K., Cote F. J., Fodstat Q. (1999) Detection and clinical importance of micrometastatic disease. Journal of the National Cancer Institute, 91(13), 1113-1120
17. Holubec L., Liška V., Topolčan O., Fínek J., Třeška V. (2008) Následná péče u nemocných s metastatickým postižením kolorektálního karcinomu do jater. Onkologie, 2(4), 226-228
18. Andrašina T., Válek V., Kiss I., Neumann A. (2011) Zobrazovací metody v diagnostice a léčbě kolorektálního karcinomu včetně intervenčních metod. Onkologie, 5(5), 266-269
19. Vysloužil K. (2005) Komplexní léčba nádorů rektu. Grada Publishing, Praha
20. Agranovich A., Berthelet E. (2000) Radiotherapy for colorectal cancer. The British Columbia Medical Journal, 42(3), 139-141
21. Tomášek J., Halámková J. (2013) Systémová protinádorová léčba kolorektálního karcinomu. Onkologie, 7 (4), 188-189
22. Fínek J. (2008) Biologická léčba kolorektálního karcinomu. Interní medicína 10(2), 54-57

23. Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O., Hahn S. M., Hamblin M. R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B. C., Golab J. (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250-281
24. Sanquis pro odborníky < www.sanquis.cz > (přečteno dne 7.4. 2014)
25. NCCR molecular oncology < www.nccr-oncology.ch > (přečteno dne 16.3. 2014)
26. Torino F., Bonmassar E., Bonmassar L., De Vecchis L., Barnabei A., Zuppi C., Capoluongo E., Aquino A. (2013) Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer Treatment Reviews*, 39(7), 759-772
27. Wang J. Y., Wu Ch. H., Lu Ch. L., Hsieh J. S., Wu D. Ch., Huang S. Y., Lin S. R. (2006) Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World Journal of Surgery*, 30(6), 1007-1013
28. Alix-Panabières C., Riethdorf S., Pantel K. (2008) Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clinical Cancer Research* 14(16), 5013-5021
29. Sieuwerts A. M., Kraan J., Bolt J., Spoel P., Elstrodt F., Schutte M., Martens J. W. M., Gratama J. W., Sleijfer S., Foekens J. A. (2009) Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *Journal of The National Cancer Institute*, 101(1), 61-66
30. Müller V., Riethdorf S., Rack B., Janni W., Fasching P. A., Solomayer E., Aktas B., Bauer S. K., Pantel K., Fehm T. (2012) Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Research*, 14(4), R118
31. Alix-Panabières C. (2012) EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results in Cancer Research*, 195(1), 69-76
32. Snyder G. L., Greenberg S. (2010) Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *British Journal of Anaesthesia*, 105(2), 106-115

33. Christopherson R., James K. E., Tableman M., Marshall P., Johnson F. E. (2008) Long-term survival after colon cancer surgery: a variation associated with choice of anesthesia. *Anesthesia & Analgesia*, 107(1), 325-332
34. Gottschalk A., Ford J. G., Regelin C. C., You J., Mascha E. J., Sessler D. I., Durieux M. E., Nemergut E. C. (2010) Association between epidural analgesia and cancer recurrence after colorectal cancer surgery. *Anesthesiology*, 113(1), 27-34
35. Biki B., Mascha E., Moriarty D. C., Fitzpatrick J. M., Sessler D. I., Buggy D. J. (2008) Anesthetic technique for radical prostatectomy surgery affects cancer recurrence: a retrospective analysis. *Anesthesiology*, 109(2), 180-187
36. Heaney Á., Buggy D. J. (2012) Can anaesthetic and analgesic techniques affect cancer recurrence or metastasis? *British Journal of Anaesthesia*, 109(S1), i17-i28
37. Fodale V., D'Arrigo M. G., Triolo S., Mondello S., La Torre D. (2014) Anesthetic techniques and cancer recurrence after surgery. *The Scientific World Journal*, Hindawi Publishing Corporation
38. Forget P., Coulie P. G., Retsky M., Demicheli R., Machiels J. P., De Kock M. (2013) Is there a rationale for anesthesiologist's role against cancer recurrence? *Acta Anaesthesiologica Belgica*, 64(1), 15-24
39. Ismail H., Hiller J. (2012) Cancer recurrence, peri-operative interventions and anaesthesia: review of current evidence. *Sri Lankan Journal of Anaesthesiology*, 20(2), 68-72
40. Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžicková V., Koptíková J. (2005) *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno
41. Bustin S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193
42. Dudová S., Hájek R. (2008) Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohačetného myelomu. *Klinická onkologie*, 21(1), 220-222

43. Van Guilder H. D., Vrana K. E., Freeman W. M. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619-626
44. Wong M. L., Medrano J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75-85
45. Uen Y. H., Lin S. R., Wu D. Ch., Su Y. Ch., Wu J. Y., Cheng T. L., Chi Ch. W., Wang J. Y. (2007) Prognostic significance of multiple molecular markers for patients with stage II colorectal cancer undergoing curative resection. *Annals of Surgery*, 264(6), 1040-1046
46. Uen Y. H., Lu C.Y., Tsai H. L., Yu F. J., Huang M. Y., Cheng T. L., Lin S. R., Wang J. Y. (2008) Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Annals of Surgical Oncology*, 15(8), 2120-2128
47. Cristofanilli M., Budd G. T., Ellis M. J., Stopeck A., Matera J., Miller M. C., Reuben J. M., Doyle G. V., Allard W. J., Terstappen L. W., Hayes D. F. (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(8), 781-791
48. Hoshimoto S., Shingai T., Morton D. L., Kuo C., Faries M. B., Chong K., Elashoff D., Wang H. J., Elashoff R. M., Hoon D. S. (2012) Association between circulating tumor cells and prognosis in patients with stage III melanoma with sentinel lymph node metastasis in a phase III international multicenter trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30(31), 3819-3826
49. Pierga J. Y., Hajage D., Bachelot T., Delaloge S., Brain E., Campone M., Diéras V., Rolland E., Mignot L., Mathiot C., Bidard F. C. (2012) High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 23(3), 618-624
50. Gottschalk A., Brodner G., Van Aken H. K., Ellger B., Althaus S., Schulze H. J. (2012) Can regional anaesthesia for lymph-node dissection improve the prognosis in malignant melanoma? *British Journal of Anaesthesia*, 109(2), 253-259

51. Gupta A., Björnsson A., Fredriksson M., Hallböök O., Eintrei C. (2011) Reduction in mortality after epidural anaesthesia and analgesia in patients undergoing rectal but not colonic cancer surgery: a retrospective analysis of data from 655 patients in central Sweden. *British Journal of Anaesthesia*, 107(2), 164-170
52. Day A., Smith R., Jourdan I., Fawcett W., Scott M., Rockall T. (2012) Retrospective analysis of the effect of postoperative analgesia on survival in patients after laparoscopic resection of colorectal cancer. *British Journal of Anaesthesia*, 109(2), 185-190
53. Forget P., Tombal B., Scholtès J. L., Nzimbala J., Meulders C., Legrand C., Van Cangh P., Cosyns J. P., De Kock M. (2011) Do intraoperative analgesics influence oncological outcomes after radical prostatectomy for prostate cancer? *European Journal of Anaesthesiology*, 28(12), 830-835
54. Scavonetto F., Yeoh T. Y., Umbreit E. C., Weingarten T. N., Gettman M. T., Frank I., Boorjian S. A., Karnes R. J., Schroeder D. R., Rangel L. J., Hanson A. C., Hofer R. E., Sessler D. I., Sprung J. (2013) Association between neuraxial analgesia, cancer progression, and mortality after radical prostatectomy. *British Journal of Anaesthesia*
55. Sacerdote P., Bianchi M., Gaspani L., Manfredi B., Maucione A., Terno G., Ammatuna M., Panerai A. E. (2000) The effects of tramadol and morphine on immune responses and pain after surgery in cancer patients. *Anesthesia & Analgesia*, 90(6), 1411-1414
56. Yeager M. P., Colacchio T. A., Yu C. T., Hildebrandt L., Howell A.L., Weiss J., Guyre P. M. (1995) Morphine inhibits spontaneous and cytokine-enhanced natural killer cell cytotoxicity in volunteers. *Anesthesiology*, 83(3), 500-508
57. Koch T., Widera A., Bartsch K., Schulz S., Brandenburg L. O., Wundrack N., Beyer A., Grecksch G., Höllt V. (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular Pharmacology*, 67(1), 280-287
58. Koch T., Seifert A., Wu D. F., Rankovic M., Kraus J., Börner C., Brandenburg L. O., Schröder H., Höllt V. (2009) μ -opioid receptor-stimulated synthesis of reactive oxygen species is mediated via phospholipase D2. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1288-1296

59. Heurich M., Mousa S. A., Lenzner M., Morciniec P., Kopf A., Welte M., Stein C. (2007) Influence of pain treatment by epidural fentanyl and bupivacaine on homing of opioid-containing leukocytes to surgical wounds. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(5), 544-552
60. Cohen S. J., Punt C. J. A., Iannotti N., Saidman B. H., Sabbath K. D., Gabrail N. Y., Picus J., Morse M., Mitchell E., Miller M. C., Doyle G. V., Tissing H., Terstappen L. W. M. M., Meropol N. J. (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(19), 3213-3221

Seznam použitých zkratk

5-FU - 5-fluorouracil

APC - jeden ze supresorových genů ("adenomatous polyposis coli")

ASA - americká společnost anesteziologická

BHQ - fluorescenční zhášec zabraňující autofluorescenci ("black hole quencher")

BMI - index tělesné hmotnosti ("body mass index")

bp - počet párů bazí ("base pairs")

CA 19-9 - diagnostický marker ("carbohydrate antigen")

cDNA - genomická deoxyribonukleová kyselina ("complementary deoxyribonucleic acid")

CEA - karcinoembryonální antigen

CK - cytokeratiny

COX - cyklooxygenázy

CT - počítačová tomografie ("computed tomography")

CTC - cirkulující nádorové buňky ("circulating tumor cells")

DCC - jeden ze supresorových genů ("deleted in colorectal carcinoma")

DEPC - nescifický inhibitor RNáz k ošetření vody ("diethyl pyrocarbonate")

RFS - přežití bez příznaků onemocnění ("relapse-free survival")

DNA - deoxyribonukleová kyselina ("deoxyribonucleic acid")

dNTP - deoxyribonukleosidtrifosfát

EGFR - receptor pro růstový faktor ("epidermal growth factor receptor")

EpCAM - povrchový glykoprotein exprimovaný v nádorových buňkách ("epithelial cell adhesion molecule")

EPISPOT - metoda pro detekci cirkulujících nádorových buněk ("epithelial immunospot")

FAM - komerční fluorescenční barvivo ("fluorescein amidite")

FAST - cytometrická metoda pro detekci cirkulujících nádorových buněk ("fibroproteic array scanning technology")

FDA - americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv ("Food and Drug Administration")

Fw - 5' - 3' primer ("forward primer")

HEX - hexachlorofluorescein

HN - hypertenzní nemoc

HNPCC - Lynchův syndrom ("hereditary nonpolyposis colorectal cancer")

HR - odhad rizika ("hazard ratio")

HT test - test na okultní krvácení ("Haemoccult test")

hTERT - lidská telomeráza ("human telomerase reverse transcriptase")

IL1- β - interleukin 1 beta

K-ras - jeden z onkogenů ("Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog")

LED - polovodičový světelný zdroj ("light-emitting diode")

LOH - ztráta heterozygoty ("loss of heterozygosity")

LUX - fluorescenční primery ("light upon extension")

mdr-1 - gen produkující P-glykoprotein ("multidrug resistance protein 1")

MLH 1 - gen pro mismatch repair ("mutL homolog 1")

MMR - "mismatch repair" geny

MR - magnetická rezonance

mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina

MSH - typ genů pro mismatch repair ("mutS homolog")

MSI - mikrosatelitní instabilita

NA - bez výsledku/odpovědi ("no answer")

NGS - nová generace sekvenování

NK buňky - druh lymfocytů ("natural killer cells")

OS - celkové přežití ("overall survival")

p53 - protein 53 (jeho molekulová hmotnost činí 53 kDa)

PCR - polymerázová řetězová reakce ("polymerase chain reaction")

PGE2 - prostaglandin E2

PMS - geny mutované u HNPCC ("postmeiotic segregation increased")

Rev - 3' - 5' primer ("reverse primer")

RNA - ribonukleová kyselina ("ribonucleic acid")

RT - reverzní transkripce (míněno *in vitro*)

STK11 - serin/threonin-protein kináza 11

TAMRA - komerční fluorescenční zlášeč ("tetramethylrhodamine")

Taq - DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*

TGF β - růstový faktor ("transforming growth factor beta")

TNF- α - gen produkující cytokiny ("tumor necrosis factor alpha")

TNM - systém pro klasifikaci stádia nádorového onemocnění ("tumor, node, metastasis")

TOKS - test okultního krvácení do stolice

UFT - kombinovaný léčivý přípravek obsahující "uracil, 5-FU a tegafur"

UGT1 A1 - glukuronosyltransferáza 1, polypeptid A1

VAS - systém hodnotící míru bolesti ("visual analog scale")

VEGFR - receptor pro růstový faktor ("vascular endothelial growth factor receptor")