

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Filip Pazdírek

Predikce terapeutické odpovědi na neoadjuvantní léčbu u nádorů rekta.

Prediction of therapeutic response to neoadjuvant therapy in rectal tumors.

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jiří Hoch, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 1. 10. 2020

MUDr. Filip Pazdírek

.....

Identifikační záznam

Pazdírek, Filip. *Predikce terapeutické odpovědi na neoadjuvantní léčbu u nádorů rekta.* [Prediction of therapeutic response to neoadjuvant therapy in rectal tumors]. Praha, 2020. 60 s., Disertační práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Chirurgická klinika 2. LF a FN Motol. Školitel prof. MUDr. Jiří Hoch CSc.

Obsah

Abstrakt	5
1. Úvod	7
2. Literární přehled dané problematiky	9
2.1 Incidence	9
2.2 Epidemiologie	10
2.3 Genetika CRC	12
2.4 Klinické projevy CRC	18
2.5 Diagnóza a staging onemocnění	18
2.6 Léčba lokoregionálního onemocnění	20
2.6.1 Chirurgická léčba	20
2.6.2 Histopatologické zhodnocení resektátu	25
2.6.3 Onkologická léčba	27
2.6.4 Watch and Wait, neoperační management – NOM	35
3.0 Predikce léčebné odpovědi na chemoradioterapii u nádorů rekta	37
3.1 Klinické markery	37
3.2 Radiologické markery	38
3.3 Molekulární markery	40
3.4 Imunologické markery	43
3.5 Genetické markery	43
3.6 Volné nádorové elementy	45
4. Vymezení cílů práce	48
5. Metodika	49
6. Výsledky	53
7. Diskuze	57
8. Závěr	60
9. Literatura	61

Abstrakt

Úvod: Léčba lokálně pokročilého karcinomu rekta (LARC) je multimodální. Její součástí je neoadjuvantní radiochemoterapie (NCHRT), která snižuje riziko lokální recidivy. Tato léčba je však doprovázena také vedlejšími účinky. Proto se hledají prediktivní markery umožňující identifikovat skupinu pacientů neodpovídající na léčbu, a tím je uchránit od nepříznivých účinků této léčby. S tímto cílem byly vyšetřeny somatické mutace karcinomu rekta a dále monitorována cirkulující nádorová DNA (ctDNA) jako potenciální biomarker založený na tekuté biopsii. Zkoumali jsme plazmatické změny ctDNA během prvních dnů NCHRT a jejich vztah k časné odpovědi nádoru na léčbu a k celkovému přežití nemocných.

Metodika a soubor: Soubor zahrnoval 36 pacientů s LARC (klinické stadium II nebo III) podstupujících NCHRT před chirurgickou léčbou. Před zahájením léčby byly vyšetřeny somatické mutace v biopsiích tkáně odebraných během endoskopického vyšetření. CtDNA byla extrahována ze vzorků plazmy pacientů před terapií a na konci prvního týdne léčby. Abychom optimalizovali náklady na testování, využili jsme dvoustupňový přístup, při kterém byla nejprve použita finančně dostupná metoda, a to detekce za pomoci denaturační kapilární elektroforézy, po které následovalo vyšetření původně negativních vzorků vysoce citlivým testem BEAMING. CtDNA byla následně korelována s klinickými parametry, včetně stupně regrese nádoru (TRG), stádia TNM a přežití nemocných.

Výsledky: Somatickou mutaci jsme detekovali u 33 z 36 pacientů (91,7 %). 7 pacientů (7/33, 21,2 %) mělo před zahájením léčby přítomnou ctDNA. Tyto nálezy nebyly dostatečné k rozhodnutí vynechat u detekovaných pacientů NCHRT. V dlouhodobém intervalu pozitivita ctDNA před léčbou snížila přežití bez nemoci (DFS) a celkové přežití (OS) v průměru o 1,47, respektive 1,41 roku ($p = 0,015$ a $p = 0,010$). U všech pacientů byla ctDNA do konce prvního týdne NCHRT významně snížena nebo zcela eliminována z plazmy, bohužel bez korelace s některým z klinických parametrů.

Závěr: CtDNA byla bez rozdílu snížena či eliminována z oběhu všech pacientů, proto dynamika změn během prvního týdne NCHRT není vhodná k predikci časné léčebné odpovědi u nádoru rekta. Předléčebná pozitivita ctDNA představovala statisticky významný negativní prognostický biomarker pro celkové přežití pacientů. Přesto obecný princip rychlé eliminace ctDNA během počátečních dnů NCHRT je pozoruhodný a měl by být dále studován.

Klíčová slova: nádor rekta, neoadjuvantní chemoradioterapie, cirkulující nádorová ctDNA, predikce, prognóza, odpověď, léčba, biomarker

Abstract

Introduction: The treatment of locally advanced rectal cancer (LARC) is multimodal. It includes neoadjuvant radiochemotherapy (NCHRT), which reduces the risk of local recurrence. However, this treatment is also accompanied by side effects. Accordingly, there is an unmet need to identify predictive markers allowing to identify non-responders to avoid its adverse effects. We monitored circulating tumor DNA (ctDNA) as a potential liquid biopsy-based biomarker. We have investigated ctDNA changes plasma during the early days of NCHRT and its relationship to the immediate tumor response as well as overall patients survival.

Methods and Patients: The studied cohort included 36 LARC patients (stage II or III) undergoing NCHRT with subsequent surgical treatment. We have detected somatic mutations in tissue biopsies taken during endoscopic examination prior to the therapy. CtDNA was extracted from patient plasma samples prior to therapy and at the end of the first week. In order to optimize the analytical costs of liquid-biopsy testing, we have utilized a two-level approach in which first a low-cost detection method of denaturing capillary electrophoresis was used followed by examination of initially negative samples by a high-sensitivity BEAMING assay. The ctDNA was related to clinical parameters including tumor regression grade (TRG), TNM staging and patient survival.

Results: We have detected a somatic mutation in 33 out of 36 patients (91.7 %). Seven patients (7/33, 21.2 %) had ctDNA present prior to therapy. These findings were not sufficient to decide not to administer NCHRT to detected patients. The ctDNA positivity before treatment reduced post-operative disease-free survival and overall survival by an average of 1.47 and 1.41 years, respectively ($p = 0.015$, and $p = 0.010$). In all patients, ctDNA was strongly reduced or completely eliminated from plasma by the end of the first week of NCHRT, with no correlation to any of the parameters analyzed.

Conclusions: As ctDNA was reduced indiscriminately from the circulation of all patients, therefore the dynamics during the first week of NCHRT is not suitable for predicting the immediate therapeutic response in rectal cancer. The baseline ctDNA presence represented a statistically significant negative prognostic biomarker for the overall patient survival. However, the general effect of rapid ctDNA disappearance apparently occurring during the initial days of NCHRT is noteworthy and should further be studied.

Keywords: rectal cancer, neoadjuvant chemoradiotherapy, circulating tumor ctDNA, prediction, prognosis, response, therapy, biomarker

1. Úvod

Současná léčba nádorů rekta je multimodální. Pouze u časných nádorů je postupem volby operace jako jediná léčebná modalita. Pacienti s lokálně pokročilým nádorem klinického stádia II a III jsou před operací indikováni k neoadjuvantní léčbě spočívající v kombinaci zevního ozáření a konkomitantní systémové chemoterapie (NCHRT). V Poslední době se objevuje i tzv. totální neoadjuvantní terapie, zahrnující chemoterapii s následnou chemoradioterapií před chirurgickou intervencí [1].

Hlavním pozdním onkologickým rizikem léčby karcinomu rekta jsou recidivy. Cílem neoadjuvantní léčby je eliminovat recidivy lokální. NCHRT nevede ke zlepšení celkového přežití nemocných (OS), nevede ani ke zvýšení počtu svěrače záchovných výkonů. NCHRT signifikantně zhoršuje pooperační funkční výsledky.

Neoadjuvantní léčba je zatížena nežádoucími účinky, zejména postradiačním poškozením pánve končící fibrózou, poruchou funkce análního svěrače, inkontinencí a sexuálními dysfunkcemi. NCHRT zvyšuje riziko pooperačních komplikací a prohlubuje projevy LARS (Low Anterior Resection Syndrome).

Neoadjuvantní radiochemoterapii lze aplikovat v tzv. krátkém nebo dlouhém režimu. Jen po dlouhém režimu a odstupu lze očekávat patrnou léčebnou odpověď, která se individuálně liší. U části nemocných dojde účinkem NCHRT ke kompletnímu vymizení nádoru, u další skupiny k částečné regresi, vyjádřené zmenšením nádoru, zmenšením počtu uzlin v mezorektu nebo jejich vymizením. Pacienti s kompletní léčebnou odpovědí mají vynikající prognózu. Téměř 90 % pacientů je v remisi po 5 letech od operace [2]. U těchto pacientů je možné volit za přísně stanovených kritérií neoperační postup a nemocné jen sledovat (Watch and Wait). Naopak až u 40 % pacientů zůstane stav léčbou neovlivněn. Přesto jsou i tito nemocní vystaveni všem rizikům, která z neoadjuvantní léčby vyplývají. Jsou zatíženi odkladem operace, ačkoliv z neoadjuvantní léčby neprofitují. U těchto tzv. nonresponderů by bylo vhodnější předoperační léčbu modifikovat či zcela vynechat a tím eliminovat její nežádoucí účinky.

Proto se hledají prediktivní markery, které by umožnily identifikovat skupinu nemocných s dobrou odpovědí na léčbu a na druhé straně skupinu nemocných s odpovědí minimální. Tím by bylo možné omezit nežádoucí účinky léčby u neprofitujících pacientů, ale také snížit neefektivně vynaložené finanční prostředky na léčbu. Optimálně by tyto markery měly být prokázány před zahájením nebo časně po zahájení NCHRT. Stanovení těchto markerů by mělo být finančně i časově přijatelné.

Žádný z těchto dosud zkoumaných markerů zatím není dostatečně spolehlivý. V posledních letech se zkoumá význam volné nádorové DNA (ctDNA) přítomné v krevním oběhu při nádorových onemocněních. CtDNA je do krevního oběhu uvolňována z nádoru. Množství uvolněné ctDNA závisí na typu a pokročilosti nádoru.

Během NCHRT dochází k poškození nádorových buněk a k uvolnění jejich DNA do krevního oběhu. Množství uvolněné DNA během NCHRT by mělo postupně klesat v korelaci se stupněm poškození nádoru během onkologické léčby. CtDNA lze detekovat a potencionálně ji využít k predikci léčebné odpovědi na NCHRT.

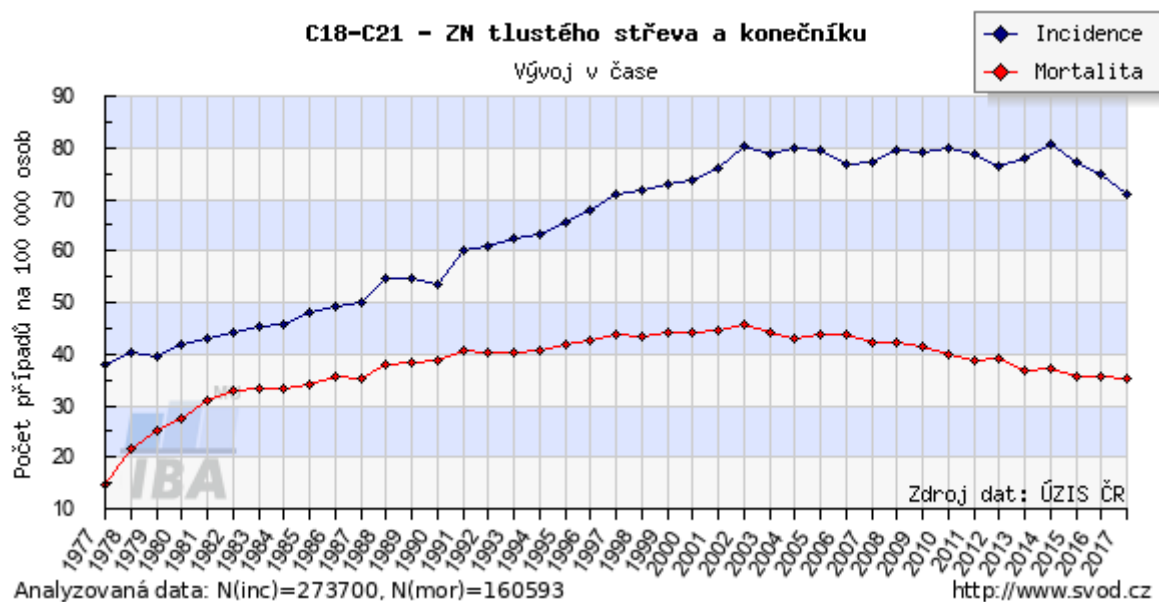
2. Literární přehled dané problematiky

2.1 Incidence

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově mezi nejčastější malignity. V České republice incidence CRC dosahuje 70 na 100 000 obyvatel. To znamená, že ročně je v ČR nově diagnostikováno okolo 7 000 pacientů s CRC. Přibližně polovina onemocnění je stále diagnostikována ve stádiu pokročilé choroby. Mortalita na onemocnění v posledních letech mírně klesá, díky časnější diagnostice a efektivnější léčbě (Graf 1).

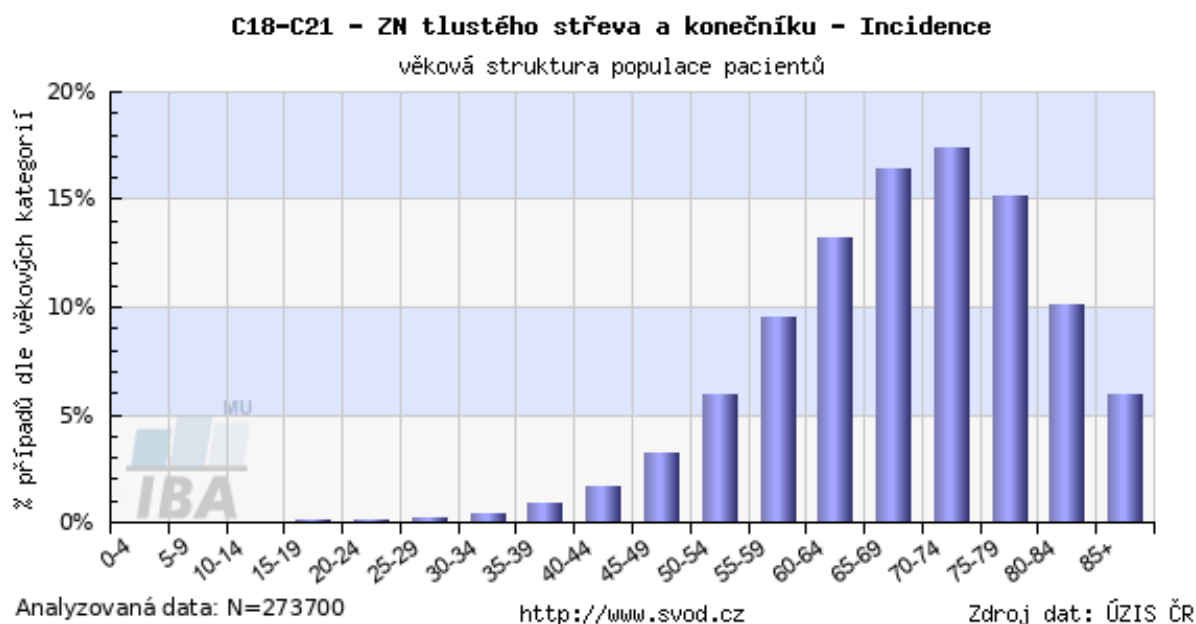
Graf 1 Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) pro kolorektální karcinom v celé populaci.

Zdroj www.svod.cz.



Věkový medián stanovení diagnózy je 70 let, ale onemocnění přibývá i u mladších pacientů (Graf 2).

Graf 2 Věková struktura pacientů s CRC



Nádory rekta tvoří 30 % těchto malignit. Pacienti s nádory rekta bývají mladší a jsou mezi nimi zastoupeni častěji muži.

2.2 Epidemiologie

Na rozvoj CRC má vliv jak zevní prostředí, tak i genetická predispozice pacienta.

Zvýšená spotřeba alkoholu, kouření, zvýšený příjem červeného masa a uzenin, obezita, DM 2. typu a nespecifický střevní zánět jsou prokazatelně rizikové faktory rozvoje kolorektálního karcinomu. Velmi důležité jsou protektivní faktory, které působí proti rozvoji CRC. Jsou to zejména zvýšená fyzická aktivita, zvýšený příjem vlákniny, mléka, kalcia a česneku. Také nesteroidní antiflogistika (NSAID) a vitamin D mají protektivní vliv. Právě účinek NSAID se dá vysvětlit jejich protizánětlivým působením, resp. inhibicí cyklooxygenázy ve sliznici tlustého střeva.

Metaanalýza publikovaná v roce 2011 ukázala, že příjem etanolu mezi 12,6 až 49,9 g denně je spojen s 21 % zvýšeným rizikem a denní příjem rovný nebo větší 50 g etanolu denně s 52%

zvýšeným rizikem vzniku kolorektálního karcinomu [3]. Mechanismus účinku alkoholu v karcinogenezi není plně objasněn, ale předpokládá se, že karcinogenní proces zahrnuje působení alkoholu na syntézu folátu. Alkohol je v tlustém střevě mikrobiálně metabolizován na acetaldehyd, který degraduje folát. Protože folát je nutný pro syntézu a opravu DNA, deficiencie folátu může vést k rozpadu chromozomů a poškození DNA, které může přispět ke karcinogenezi.

Metaanalýza zaměřená na vliv kouření při rozvoji CRC jednoznačně prokázala, že kouření je spojeno s 18 % vyšším rizikem u kuřáků ve srovnání s nekuřáky. Je zajímavé, že toto platí ještě výrazněji u nádorů rekta ve srovnání s nádory kolon [4].

U červeného masa a uzenin se předpokládá karcinogenní vliv nitrosaminů vznikajících zejména při nevhodné tepelné úpravě masa.

Dalšími rizikovými faktory pro vznik kolorektálního karcinomu jsou obezita, zejména viscerální typ, DM 2. typu a nespecifický střevní zánět [5, 6].

Hyperinsulinémie vede ke zvýšené proliferaci buněk a redukci apoptózy [7]. Vzhledem k přítomné insulinorezistenci obézních má hyperinsulinémie pravděpodobně vliv na vznik CRC. Experimentální důkazy z minulých let zdůrazňují úlohu střevní mikroflóry při rozvoji zánětlivých a maligních gastrointestinálních onemocnění [8]. Analýzy prokázaly, že skladba mikrobů osidlujících tlusté střevo u CRC je jiná než u zdravých jedinců. Určité mikrobiální typy (*Fusobacterium* spp.) mohou navodit ve sliznici tlustého střeva diskretní zánět. Toto chronické prozánětlivé prostředí se pak může podílet na vzniku CRC podobně jako u IBD.

Ukázalo se také, že určité mikroby (*Enterococcus faecalis*) jsou schopny produkci vlastních toxinů přímo poškozovat DNA sliznice tračníku. Pokud dojde ke změně poměrů a nárůstu těchto specifických kmenů ve střevní mikroflóře, může to být jedním z mechanismů vedoucí k rozvoji CRC.

Dále je zkoumána souvislost mezi výskytem určitých metabolitů ve stolici a rozvojem kolorektálního karcinomu. Některé z těchto metabolitů vznikají ve střevě účinkem střevní mikroflóry. Ukazuje se, že pro kolorektální karcinom je typický zvýšený výskyt sekundárních žlučových kyselin a určitých metabolitů hemoglobinu ve stolici [9]. Také některé fosfolipidy a produkty oxygenace cholesterolu jsou ve zvýšené míře nalézány u pacientů s CRC. Snížené hladiny steroidních hormonů u mužů jsou spojovány s rizikem rozvoje CRC. Možné mechanismy, kterým steroidní hormony snižují riziko rozvoje CRC, jsou spojeny s jejich úlohou v prevenci nežádoucích účinků indukovaných obezitou [10]. Další látkou s protektivním vlivem na rozvoj CRC je prostaglandin E2. Mechanismus účinků spočívá pravděpodobně v jeho protizánětlivém účinku inhibicí cyklooxygenázy. S využitím moderních diagnostických

metod lze velmi přesně určit množství těchto látek ve stolici. Jejich zastoupení je jiné u zdravých pacientů a u pacientů s CRC [11].

2.3 Genetika CRC

CRC vzniká postupnou akumulací genetických mutací a epigenetických změn, které vedou k přeměně normální sliznice tlustého střeva v nádorovou tkáň. Pochopení molekulárních pochodů při vzniku CRC je důležité, protože může napomoci identifikovat faktory, které přispívají k rozvoji onemocnění, jeho progresi, ale také určují odpověď na protinádorovou léčbu. Většina CRC (zhruba 90%) má sporadický charakter, kdy k prvotním genetickým poruchám dochází v důsledku působení vnějších vlivů (nejčastěji chemických karcinogenů z potravy), vzácněji jsou diagnostikovány formy hereditární, kdy ke vzniku dochází v důsledku mutace zárodečné (10 %).

Sporadický CRC vzniká postupnou akumulací mutací v rozmezí 10-15 let. Většina těchto adenokarcinomů vzniká sekvencí adenom-karcinom. Přibližně z 10 % adenomů vznikne během 10 let karcinom. Podkladem těchto změn je nejčastěji CIN (chromozomální instabilita). Sekvence změn nejčastěji začíná inaktivací *APC* genu, následnou aktivací *KRAS* (proto)onkogenu a mutací genu *TP53*. Vyšší riziko rozvoje CRC mají též pacienti s idiopatickým střevním zánětem (IBD), kde chronické zánětlivé pochody sliznice tlustého střeva zvyšují riziko vzniku mutace vedoucí k CRC. V tomto případě je však uvedená posloupnost mutací z dodnes ne zcela známého důvodu opačná a mutace *TP53* jsou pozorovány v zánětlivé tkáni IBD pacientů již v časných stádiích. Další riziko vzniku CRC představují serátní adenomy (pilovité adenomy, serrated adenoma). CRC u serátních adenomů vzniká nejčastěji časnou mutací v *KRAS* a *BRAF* genech, typicky i v kombinaci s nadměrnou metylací.

Hereditární formy CRC vznikají na podkladě zárodečné mutace, která je v naprosté většině případů získaná od některého z rodičů, ve výjimečných případech může být „*de novo*“, neboli nově vzniklá na úrovni zárodku. Tyto formy nejčastěji zahrnují familiární adenomatózní polypózu (FAP), atenuovanou formu FAP (aFAP), hereditární nepolypózní formu CRC (HNPCC, Lynchův syndrom), *MYH* asociovanou polypózu a polypózní syndromy.

FAP je autozomálně dominantní onemocnění, které je způsobeno vrozenou mutací v *APC* genu. U 5–30 % pacientů s FAP není mutace v *APC* genu identifikována a u těchto nemocných, byla zjištěna mutace v *MYH* genu. FAP představuje celkem 1 % ze všech CRC a je charakteristická výskytem velkého počtu polypů (stovky až tisíce) v druhé dekádě života s prakticky 100 % rizikem malignizace. Z tohoto důvodu je u těchto pacientů doporučena časná kolektomie s ileopouch-anální anastomózou (IPAA). Součástí syndromu jsou rovněž extraintestinální

projevy jako kožní léze, osteomy, desmoidy a extraintestinální nádorová onemocnění. Atenuovaná forma FAP je typická menším počtem polypů, pozdější manifestací a také menší frekvencí extraintestinálních příznaků.

U **hereditární nepolypózní formy CRC** nacházíme vrozenou mutaci v tzv. genech kontrolujících chybně spárované báze (DNA mismatch repair genes – MMR). Mutací v MMR dochází k hromadění replikačních chyb, které nejsou následně opraveny a dochází k vyšší pravděpodobnosti vzniku CRC (mikrosatelitní instabilita, MSI). HNPCC je nejčastější forma vrozeného CRC (2–3 %). MSI nalézáme u 90 % HNPCC a u 10 % sporadického kolorektálního karcinomu. Pacienti s HNPCC jsou zpravidla nižšího věku s vyšším rizikem vzniku synchronních a extraintestinálních nádorů (ovarium, endometrium, žaludek, pankreas).

MYH-asociovaná polypóza je autozomálně recesivně dědičné onemocnění zapříčiněné mutací v *MYH* genech, která vzniká poškozením báze excizní reparace (BER). Klinickým projev je podobný jako u FAP, ale není u něj prokázána mutace v *APC* genu. Klinická manifestace je mezi 40 až 60 rokem, nemá extraintestinální projevy. Riziko vzniku karcinomu je okolo 80 %.

Hamartogenní polypózní syndromy zahrnují Peutz-Jaeghersův syndrom (PJS), juvenilní polypózní syndrom (JPS).

PJS je velmi vzácná autosomálně dominantní genetická porucha, charakterizovaná výskytem hamartomových polypů v gastrointestinálním traktu, nejčastěji v tenkém střevě. Nejcharakterističtějšími extraintestinálními projevy jsou mukokutánní léze způsobující záněty, hyperpigmentace v ústech, na ruce a na nohou, které se obvykle vyskytují v kojeneckém věku a ustupují v pozdním dospívání. Pacienti s PJS mají zárodečnou mutaci serin threonin kinázy 11 (STK-11) tumor supresorového genu. Dospělí s PJS mají nejen vysoké riziko vzniku gastrointestinálního karcinomu, ale i rakoviny jiné než gastrointestinální, zejména rakoviny prsu.

JPS je rovněž autozomálně dominantní syndrom s výskytem četných juvenilních polypů GIT, které jsou spojené s vyšším rizikem vzniku nádorů pankreatu.

SPS (serrated polyposis syndrome) dříve známý jako syndrom hyperplastické polypózy, je poměrně vzácný syndrom charakterizovaný výskytem serátních (pilovitých) adenomů v tlustém střevě. Dříve byly všechny hyperplastické polypy považovány za zcela benigní léze až do roku 1996, kdy Torlakovic a Snover prokázali histologické rozdíly mezi polypy v SPS a sporadickými hyperplastickými polypy.

Historicky byly identifikovány tři specifické mechanismy genetických změn, tzv. molekulární cesty vzniku kolorektálního karcinomu. Nejčastější mechanismem jsou mutace DNA vedoucí ke ztrátě alel tumor-supresorových genů vedoucí k jevu označovanému jako **chromozomální**

nestability (chromosomal instability, CIN). Druhým častým jevem je hromadění poruch DNA v důsledku nesprávně fungujícího systému oprav. Tento jev je navenek pozorovatelný detekcí nesprávného počtu opakujících se sekvencí v nekódujících oblastech DNA (tzv. mikrosatelitů), a je proto označován jako **mikrosatelitní nestabilita (microsatellite instability, MSI).** Konečně poslední mechanismus vzniku CRC je založen na **aberantní hypermetylaci promotorových oblastí genů** (CpG island methylator phenotype, **CIMP**), která může ve svém důsledku vést jak k projevům ztráty funkce tumor-supresorů (CIN), tak k mikrosatelitové nestabilitě (MSI).

Chromozomální instabilita (CIN)

CIN se spojuje se vznikem CRC v cca 65–70 % případů. Charakterizuje ji nadbytek kopií nebo ztráta úseků DNA či celých částí chromozomů nebo jejich oblastí, které se podílejí na patogenezi CRC. Důsledkem CIN je aneuploidie (chybný počet chromozomů), chromozomální amplifikace (zmnožení DNA) či LOH (ztráta jedné alely daného lokusu). Příznačně jsou takto postiženy oblasti tumor supresorových genů *APC*, *TP53*, *DCC*.

Mikrosatelitní instabilita (MSI)

Mikrosatelity jsou krátké sekvence opakujících se nukleotidů, které se nacházejí v nekódujících oblastech genomu a jsou náchylné k chybám při DNA replikaci. Přestože chyby vzniklé v mikrosatelitních úsecích nemají na fungování buňky žádný funkční dopad, detekce (ne)správného počtu mikrosatelitů slouží jako ideální nástroj pro odhalení nesprávně fungujícího systému DNA oprav v buňce. Ačkoliv tedy MSI tedy není důvodem vzniku CRC, je jednoznačným průkazem poruchy oprav nesprávného párování DNA bází (mismatch-repair, MMR), jehož projevem je hromadění DNA mutací v buňce vedoucí k maligní konverzi CRC. Na funkci MMR systému se podílí řada genů, nejčastěji jsou to geny *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH3*, *PMS1* a *Exo1*. MSI se vyskytuje u cca 15% CRC sporadických forem CRC a nejčastěji k ní dochází v důsledku mutace některého z MMR genů, případně methylace jeho promotoru. Vzhledem k potenciálním rozdílům v prognóze pacientů je v patogenezi rozlišován CRC s vysokým a nízkým projevem – tzv. MSI-high a MSI-low [13,17].

Zárodečné mutace MMR genů jsou příčinou hereditární formy CRC (Lynchův syndrom, HNPCC).

Metylace CpG ostrůvků - CIMP

CpG metylace je genetická změna, která nevede ke změně DNA sekvence, ale ovlivňuje promotorovou oblast daného genu, a tím ovlivní jeho expresi. Geny, které jsou ovlivněny hypermetylací promotorové oblasti, jsou především *APC*, *MCC*, *MLH1*, *MGMT* a další. Tumory s CIMP bývají spojeny s přítomností *BRAF* mutace a MSI. CIMP je příčinou asi 15–20 % sporadického CRC. Vyskytuje se častěji u žen, starších pacientů a u kuřáků. Špatně diferencované a mucinózní tumory vycházejí nejčastěji ze serátních adenomů pravého tračníku [19,20].

Jedním z dalších důležitých reparačních genů, který je v patogenezi CRC metylován, je *MGMT* (O6-metylguanin DNA metyltransferáza). Ztráta funkce *MGMT* proteinu je téměř výhradně spojena s CpG metylací. Funkcí tohoto DNA reparačního enzymu je ochraňovat buňky před působením exogenních karcinogenů. Metylací promotorové oblasti genu *MGMT* lze nalézt až ve 40 % CRC, nejčastěji v serátních adenomech.

Mutace v tumor supresorových genech

APC gen je tumor supresorový gen lokalizovaný na dlouhém raménku 5. chromozomu (5q21). Podílí se nejenom na vzniku sporadického CRC, ale rovněž hraje významnou roli v patogenezi hereditárních forem CRC, konkrétně při vzniku FAP.

APC gen má důležitou roli v proliferaci, diferenciaci, migraci, apoptóze a také v řízení buněčného cyklu. Mutace v *APC* genu se vyskytuje u časných stadií nádoru a zpravidla se jedná o bodové mutace či LOH. K manifestaci mutace *APC* je důležité, aby dle Knudsonovy hypotézy dvou nezávislých úderů byly mutovány obě dvě alely tohoto genu, což vede ke ztrátě jeho tumor supresivního účinku. Výsledkem je zkrácený *APC* protein, který částečně ztrácí svou funkci. Za fyziologických podmínek *APC* gen tvoří protein, který se podílí na destrukci β -kateninu, proteinu koordinujícího buněčnou adhezi a genovou transkripci. Při mutaci *APC* dochází ke snížení degradace β -kateninu a následně k jeho hromadění. Nahromaděný β -katenin vstupuje do jádra, váže se na jaderné receptory a indukuje transkripci mnoha genů vč. cyklinu D1, c-myc a CRD-BP. Důsledkem mutace *APC* je nejenom nekontrolovatelná proliferace a růst buňky, ale rovněž i indukce apoptózy.

TP53 je tumor supresorový gen, lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozomu (17p13.1). Základní funkcí *TP53* je regulace buněčného cyklu (zastavení cyklu a možnost zahájení opravy DNA), apoptózy a buněčného metabolismu. V případě poškození DNA *TP53* koordinuje opravu DNA, a pokud ji nelze opravit, navodí apoptózu buňky. *TP53* je nejčastěji postiženým genem v mutogenezi mnoha nádorových onemocnění. Mutace bývá nalézána až u 50 % všech

nádorů. Je známo celkem 2 314 mutací *TP53*, které jsou buď aktivační nebo inaktivační. Stejně jako u *APC* genu, tak i u *TP53* je k funkčnímu projevu nutná mutace obou alel.

Mutace v onkogenech

KRAS gen patří do rodiny protoonkogenů (*HRAS*, *NRAS*) a je mutován (nejčastěji exon 2 a 3) u 30–60 % pacientů se sporadickým CRC. S mutací *KRAS* u familiární formy se lze setkat jen zřídka. Z hlediska posloupnosti jeho mutaci předchází mutace *APC* genu. Různé mutace *KRAS* genu mohou mít odlišné důsledky. *KRAS* je membránový protein, který hraje roli v buněčné signalizaci ovlivňující buněčný růst, přežití, diferenciaci, proliferaci a v řadě dalších buněčných dějů. Konkrétně *KRAS* a *BRAF* jsou součástí RAS/RAF/MAPK signální dráhy. Mutovaný protein si zachovává aktivní formu a tím má stimulační efekt na proliferaci a růst buňky. *KRAS* je aktivován přes *EGFR* receptor, který je během mutagenese CRC častokrát více exprimován a po jeho stimulaci dochází k aktivaci *KRAS*.

Informace, zda pacient je u pacienta přítomna mutace v *KRAS*, je důležitá pro léčbu monoklonálními protilátkami proti EGFR proteinu. Mutované geny mají aktivační konformaci a stále mohou stimulovat buněčnou proliferaci i přesto, že EGFR receptor je inhibován monoklonální protilátkou. Důsledkem je snížená odpověď na biologickou léčbu. I přes nepřítomnost mutace v *KRAS* či *BRAF* není léčba monoklonálními protilátkami v 100 % úspěšná. Byla identifikována další signální dráha, která hraje roli v patogenezi CRC, a to PI3K dráha. *PIK3CA* gen je mutován u více než 25 % pacientů s CRC. Při této mutaci dochází k aktivaci signální dráhy, která v konečném důsledku vede k inhibici apoptózy.

Ztráta heterozygoty (LOH)

LOH byla popsána Knudsonem a je dalším mechanismem, který může vést ke vzniku CRC. Nejčastěji dochází k LOH na 18q chromozomu. Na 5q chromozomu se jedná o ztrátu alely pro *APC* gen, zatímco na 17p chromozomu se jedná o ztrátu alely pro *TP53*.

DCC gen je zodpovědný zejména za expresi DCC transmembránového proteinu. Téměř 70 % CRC má přítomnou LOH genu DCC. Kromě LOH DCC se v patogenezi uplatňují i jiné somatické mutace, např. bodová mutace či delece DCC. DCC je tumor supresorový gen, limituje progresi tumoru navozením apoptózy. Jeho funkcí je blokovat růst buňky.

SMAD geny

Dalšími geny, které jsou lokalizovány na 18. chromozomu a mohou se podílet na patogenezi CRC, jsou SMAD2 a SMAD4. Jejich produktem jsou proteiny, které mají široké spektrum účinku jako řízení buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy, migrace a tvorby extracelulární mezibuněčné hmoty.

MikroRNA

MikroRNA (**miRNA**) může v patogenezi CRC hrát roli jak tumor supresivní, tak i proto-onkogenní. Role miRNA je dána typem tkáně a charakterem genu, který reguluje. Funkcí miRNA je regulace genové exprese, která probíhá několika možnými způsoby. Jedním ze způsobů je interakce s mRNA, kde dojde k navození degradace mRNA nebo inhibice translace. MiRNA se podílí na řízení buněčného cyklu, metabolismu a vývoji buňky.

Mutace v DNA mismatch repair genech (MMR) vedoucí k MSI

MMR je systém, který opravuje chybné párování bazí při replikaci genetické informace, zjednodušeně opravuje chyby, které nejsou rozpoznány aktivitou DNA polymerázy během replikace. V patogenezi CRC dochází vlivem mutace v MMR genech nejčastěji ke vzniku tzv. MSI. K tomu, aby byl MMR gen vyřazen z funkce, je zapotřebí mutace v obou alelách genu. Proto se MMR geny chovají jako tumor supresorové geny. Mikrosatelity jsou krátké opakující se nukleotidové sekvence umístěné po celém genomu. Jsou náchylné na chyby způsobené během replikace. Právě MMR systém má za úkol takové chyby opravovat a zabránit tak vzniku MSI. Mutace v MMR systému mohou být vrozené i získané. Právě vrozené mutace v MMR systému jsou klíčem ke vzniku HNPCC. Získané mutace (delece, inserce či epigenetické změny (metylace) v MMR jsou odpovědné za vznik cca 15–20 % sporadických kolorektálních karcinomů.

2.4 Klinické projevy CRC

Velmi časně formy CRC jsou většinou klinicky němé, ale mohou být zachyceny v rámci screeningu (test na okultní krvácení, kolonoskopické vyšetření).

Klinické příznaky vychází jak z přítomnosti krvácení z nádoru do stolice, tak ze známek obstrukce lumen tlustého střeva. Při pokročilém onemocnění dochází k úbytku na váze a dostavuje se celková slabost nemocných.

Typickým příznakem pro kolorektální a zejména rektální karcinom je změna defekačního stereotypu. Pacienti, kteří měli řídkší stolici, mají náhle zácpu a obráceně.

Nádory pravé poloviny způsobují mikroskopické krvácení a sekundárně tím hypochromní mikrocytární anémii. Nádory levé poloviny způsobují častěji obstrukci tlustého střeva, enterorrhagii a bolesti. Nádory rekta se klinicky manifestují rektochézií a rektálním syndromem (časté nucení na stolici s odchodem malého množství stolice). Pokud se jedná o stenozující nádory rekta, pacienti si stěžují na stužkovitou stolici.

2.5 Diagnóza a staging onemocnění

Za nádory rekta se považují tumory do 15 cm od anu. Diagnóza se stanoví na základě vyšetření per rectum, endoskopického vyšetření a odběru biopsie. Součástí stagingového vyšetření je CT hrudníku, břicha a MRI malé pánve, vyšetří se hladina onkomarkerů CEA (karcinoembryonální antigen) a CA 19-9.

V indikovaných případech je možné doplnit PET CT vyšetření (pozitronová emisní tomografie). K vyloučení synchronních nádorů je požadována totální koloskopie do céka, v případě stenozujících nádorů virtuální CT kolografie, případně doplnění kompletní koloskopie do 6 měsíců od operace. Pro lokální staging nádorů rekta je důležité endosonografické vyšetření rekta, které je citlivé zejména u časných lézí. Naopak u lokálně pokročilých nádorů rekta je přínosnější magnetická rezonance (MRI). MRI dovolí přesné určení T, N, posouzení cirkumferenčního okraje (CRM) resp. mezorektální fascie (MRF) a nověji i extramurální venózní invazi (EMVI).

K určení přesného klinického stádia nemoci se používá TNM klasifikace, aktuálně 8. vydání (Tab. 1).

Tab. 1 Karcinom tlustého střeva a konečníku, TNM klasifikace, rozdělení do klinických stádií

Zdroj www.uzis.cz

Stadium 0	Tis	N0	M0	Tlusté střevo a konečník T1 submukóza T2 muscularis propria T3 subseróza, perikolická / perirektální tkáň T4a viscerální peritoneum T4b jiné orgány nebo struktury N1a 1 regionální N1b 2–3 regionální N1c satelit(y) bez regionálních uzlin N2a 4–6 regionálních N2b 7 a více regionálních M1a 1 orgán M1b > 1 orgán, peritoneum
Stadium I	T1, T2	N0	M0	
Stadium II	T3, T4	N0	M0	
Stadium IIA	T3	N0	M0	
Stadium IIB	T4a	N0	M0	
Stadium IIC	T4b	N0	M0	
Stadium III	jakékoliv T	N1, N2	M0	
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0	
	T1	N2a	M0	
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	M0	
	T2, T3	N2a	M0	
	T1, T2	N2b	M0	
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0	
	T3, T4a	N2b	M0	
	T4b	N1, N2	M0	
Stadium IVA	jakékoliv T	jakékoliv N	M1a	
Stadium IVB	jakékoliv T	jakékoliv N	M1b	

Vysoce kvalitní MRI dovoluje i subklasifikaci T3 karcinomu rekta (Tab. 2).

Tab. 2 TNM klasifikace, subklasifikace T3 dle hloubky invaze nádoru přes muscularis propria [12]

	Hloubka invaze přesahující muscularis propria v mm
T3a	< 1
T3b	1–5
T3c	6–15
T3d	> 15

Posouzení spádových lymfatických uzlin bývá obtížné. Za pozitivitu se pokládají lymfatické uzliny zvětšené nad 10 mm.

Na základě těchto vyšetření se stanoví klinické stadium onemocnění a podle něj způsob léčby. Pacient má být prezentován na společném multioborovém semináři k potvrzení způsobu léčby a celého léčebného protokolu.

Předkládaná práce je primárně zaměřena na predikci terapeutické odpovědi u karcinomu rekta a proto je další část zaměřena výhradně na problematiku tohoto nádorového onemocnění.

2.6 Léčba lokoregionálního onemocnění

Léčba lokálně pokročilého karcinomu rekta je multimodální, sestávající se z onkologické a chirurgické léčby. Pacienty s časnými lézemi nepřesahující submukózu je možné léčit jen lokální excizí. U pacientů s lézemi zasahující muscularis propria je doporučeno provést radikální operaci, resekci nádoru a totální excizi mezorekta. Pacienti s nádory stádia T3/4N0-2 mají před operací podstoupit neoadjuvantní onkologickou léčbu. Nemocní s nestenozujícím generalizovaným nádorem jsou primárně indikováni k systémové léčbě.

2.6.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba je nejdůležitější součástí multimodální léčby karcinomu rekta a během posledních 100 let zaznamenala obrovský pokrok. Ten vyplývá především z lepšího pochopení embryologie, anatomie a patofyziologie a implementace těchto poznatků do chirurgické praxe. Základem se stalo fyziologické operování a respektování embryonálních vrstev. Chirurgická léčba nádorů rekta v současné době zahrnuje spektrum postupů od radikálních operací až po mimiinvasivní a lokální výkony. Moderní zobrazovací vyšetření, zejména MR poskytuje přesnou informaci o rozsahu onemocnění a umožňuje mnohem lépe plánovat i chirurgickou léčbu. Bez ohledu na provedený typ operace je kladen důraz na šetrné a fyziologické operování, zachování radikality a snahu o provedení kontinentní operace se zachováním svěrače.

Zpočátku byly operace pro nádory rekta zatíženy vysokou mírou lokální rekurence.

V roce 1907 provedl Miles amputaci rekta současně s odstraněním spádových lymfatických uzlin. Rozsahem operace a provedenou lymfadenektomií se tím podařilo snížit výskyt lokální recidivy. Přesto celkové pooperační výsledky nebyly pro vysokou morbiditu způsobenou především infekcí příliš povzbudivé. To se zlepšilo zavedením ATB do chirurgické praxe a zdokonalením perioperační péče. Po válce v 50. letech Dixon popularizoval nízkou přední resekci rekta, postup zachovávající svěračový komplex [13]. Přes všechny zavedené techniky bylo riziko lokální rekurence stále vysoké a dosahovalo až 40 %. V roce 1982 publikoval Heald koncept totální mesorektální excize (TME) [14]. Jeho práce vyšla z poznatků embryologie s respektem k fyziologickým vrstvám a zůstala podstatou operační techniky do současnosti. Heald doporučil kompletně odstranit nejen rektum s nádorem, ale i mezorektum, tzn. tukovou tkáň s cévami a lymfatickými uzlinami uloženou hlavně za rektum. Na povrchu je mezorektum

kryté mezorektální fascií, která ho odděluje od presakrální fascie. Právě kompletní uvolnění mezorekta preparací mezi těmito dvěma fasciemi zachová celistvost mezorekta a šetří hypogastrické nervy a sakrální cévy uložené pod presakrální fascií. Jedná se o preparaci v tzv. “holy plane”. Zavedení tohoto postupu snížilo lokální rekurenci o polovinu. Dalším pokrokem bylo zdokonalení histopatologického hodnocení resektátu podrobně popisující celistvost mezorektální excize [15]; to představuje pro chirurga důležitou zpětnovazebnou informaci.

V následujících letech pokračoval vývoj zaváděním miniinvazivních přístupů.

Operační rektoskop a transanální endoskopická mikrochirurgie (TEM) a endoskopie dovolily provádění lokálních výkonů a resekcí časných lézí transanálním přístupem. S rozvojem endoskopických technik a laparoskopické chirurgie se minimalizovalo tkáňové poškození a zkrátila pooperační rekonvalescence. V posledních letech je na vzestupu robotická chirurgie umožňující lepší vizualizaci a přinášející pro chirurga komfortnější ovládání. Zejména velmi dobrá vizualizace umožňuje chirurgovi preparaci v embryonální vrstvě i v obtížně přístupné oblasti pánve.

V současnosti je v chirurgické léčbě pro nádory rekta užívána celá škála těchto technik.

U časných lézí cT1N0 G1/G2 je možné endoskopické odstranění či odstranění pomocí TEM. Výjimku tvoří léze zasahující do hlubší submukózy (sm3, Haggit 3), léze s nízkým stupněm diferenciacie, vaskulární a lymfatickou invazí. Zde je zvýšené riziko postižení lymfatických uzlin. U těchto nádorů je doporučena radikální operace s excizí mezorekta.

U nádorů cT1-2TN0 se doporučuje nízká přední resekcce rekta včetně totální excize mezorekta (TME). Distální resekční okraj by měl být 10 mm pod nádorem a CRM více než 1 mm. U nádorů lokalizovaných v horní třetině rekta je možná parciální excize mezorekta, kdy distální resekční okraj mezorekta by měl být 50 mm po nádorem. Rizikovou skupinou jsou pacienti EMVI (extramurální venózní invaze) pozitivní, u kterých je doporučena totální mezorektální excize.

Pacienti s nádory cT3/4N0-2 a také nemocní s EMVI +, CRM (cirkumferenční resekční okraj) ≤ 1 mm by měli podstoupit předoperační chemoradioterapii. Její hlavní smysl spočívá ve snížení rizika lokální rekurence onemocnění. Pacienti se známkami extramurální venózní invaze na MRI mají výrazně zvýšené riziko lokální i vzdálené rekurence onemocnění [16]. Podobně nemocní s CRM ≤ 1 mm.

Diskutuje se, jak postupovat u pacientů s nádory T3a/b horní a střední a u nádorů s pozitivními uzlinami N1 horní třetiny rekta.

U pacientů s T3a/b je 5leté přežití bez nemoci signifikantně vyšší než u pacientů s T3c/d, tito pacienti mají mnohem nižší riziko lokální rekurence [17-19]. Průkaz uzlinového postižení

mezorekta je problematický a hodnocení pozitivních uzlin na zobrazovacích vyšetřeních obtížné [20]. Navíc při kompletním odstranění mezorektální tkáně jsou také odstraněny tyto uzliny a riziko lokální rekurence je minimální [21]. Předoperační chemoradioterapie proto nenabízí těmto nemocným benefit a je otázkou, zda ji mají podstupovat.

U nádorů v distální třetině rekta zasahujících vnitřní svěrač je možná intersfinkterická resekce se zachováním zevního svěračového komplexu. V případě, že je zevní svěrač infiltrován, pak je nutné provést abdominoperineální amputaci rekta. V případě infiltrace levátorů je doporučena extralevátorová amputace rekta. Důležité je dodržení negativního distálního resekcčního okraje i negativního CRM.

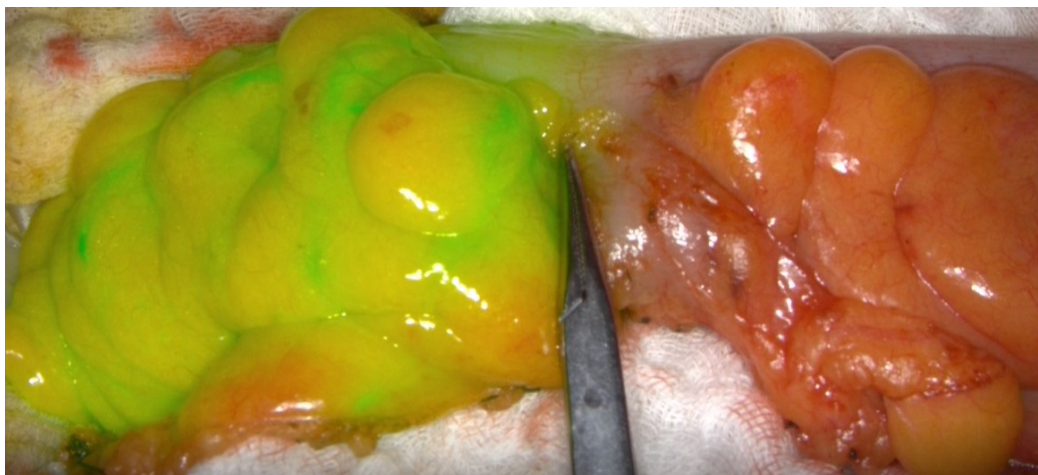
Dosažení R0 resekce je nutné i za cenu multiviscerální resekce. Pokud to není možné, je na místě systémová onkologická léčba.

V současnosti lze výkon provést otevřenou konvenční operací, laparoskopicky či roboticky. Onkochirurgické výsledky jsou srovnatelné. Zdá se, že funkční výsledky mohou být lepší po roboticky asistovaných výkonech. Výběr operační modalit závisí na chirurgovi a jeho zkušenosti s danou technikou, pokročilostí nádoru, anatomickými poměry či předcházejícím chirurgickým výkonem a také na vybavení pracoviště.

Komplikace chirurgické léčby

Nejvýznamnější pooperační komplikací po resekcii rekta je porucha hojení (leak) anastomózy se značnou morbiditou a mortalitou. Leak anastomózy se vyskytuje až u 20 % operovaných. Rizikové faktory pro rozvoj leaku jsou mužské pohlaví (úzká pánev), vysoký věk, nízko v pánvi uložená anastomóza, maligní onemocnění, vysoké skóre ASA, dlouhá doba operace, akutní operace, perioperační ztráta krve, podání transfúze a zejména předoperační radioterapie [22]. Nejčastěji se anastomotický leak dělí do 3 stupňů [23]. Stupeň A nevyžaduje žádnou terapeutickou intervenci. Stupeň B zahrnuje aktivní intervenci bez laparotomie, zahrnující podání antibiotik a transanální drenáž či drenáž malé pánve zavedenou rentgenologicky. Pokud je nutná laparotomie, je leak klasifikován jako stupeň C. Možné je založení derivační ileostomie a eventuálně lokální ošetření pomocí endosponge (VAC – vacuum assisted closure) či zrušení anastomózy se založením terminální kolostomie.

Pro snížení pooperačních komplikací v anastomóze je možná kontrola perfúze anastomózy pomocí indocyaninové zeleně (Obr. 1) [24].



Obr.1 Kontrola perfúze anastomózy pomocí indocyaninové zeleně, pinzetou označena resekční linie, žluto-zeleně zbarvená část preparátu je dobře perfundována, zvýrazněny jsou cévy, neperfundovaná část je bez zvýraznění

Porucha hojení anastomózy a následná fibróza v malé pánvi přispívá k rozvoji pozdních funkčních komplikací [25].

Chirurgická léčba přináší i funkční komplikace. Jedná se zejména o inkontinenci stolice, potíže s vyprazdňováním, časté nucení na stolicí. Také tyto obtíže patří pod pojem LARS (low anterior resection syndrome). Dalšími pozdními komplikacemi jsou problémy urologické a sexuální dysfunkce.

LARS se vyskytuje v nějaké formě až u 80 % pacientů po resekcích rekta [26]. Přes 40 % pacientů, kteří postoupili nízkou přední resekci, trpí nějakou formou inkontinence. Prokázalo se, že předoperační onkologická léčba zvyšuje riziko inkontinence ve srovnání s chirurgickou léčbou samotnou [27, 28].

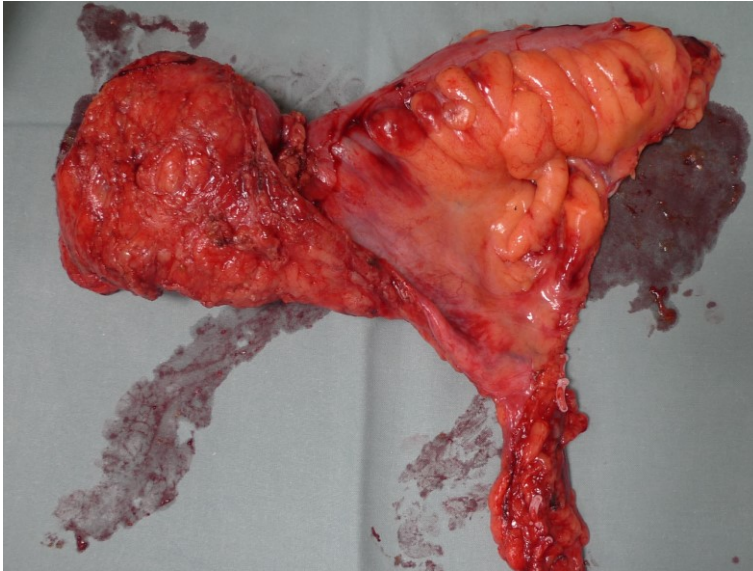
Muži si stěžují na problémy s erekcí, ženy trpí častěji inkontinencí moče.

Je nutné ale podotknout, že v práci Contina et al. dosahovala u mužů před zahájením léčby erektilní dysfunkce 66 % a sexuálně inaktivních žen bylo až 70 % [27, 29]. Prevalence sexuální dysfunkce po komplexní léčbě rakoviny rekta koreluje negativně s věkem, neoadjuvantní chemoradioterapií, typem chirurgického výkonu (parciální resekce rekta přináší lepší funkční výsledky) a ASA skórem [27].

Souhrnně lze konstatovat, že předoperační onkologická léčba zhoršuje pooperační funkční výsledky, zejména co se týče kontinence stolice, moči a sexuální dysfunkce. Podrobně je situace popsána v kapitole onkologické léčby.

2.6.2 Histopatologické zhodnocení resektátu

Standardně se resektát po operaci rozprostře na podložce (Obr. 2) a fixuje ve formolu a předá ke zhodnocení patologovi.



Obr. 2 Resektát rekta, kompletní excize mezorekta

Zlomem v histopatologickém vyšetření nádorů rekta byla práce Quirkeho, který prokázal, že inkompletnost mezorektální excize má vliv na lokální rekurenci onemocnění a současně navrhl postup hodnocení celistvosti mezorektální excize [15].

V současnosti standardní vyšetření resektátu pro nádory rekta zahrnuje určení T a N stadia. Musí být vyšetřeno minimálně 12 lymfatických uzlin. Má být zhodnocen proximální, distální a cirkumferenční resekční okraj (ten by měl být dokumentován v milimetrech) a grading nádoru. Měla by být vyšetřena extranodální nádorová deponata, perineurální invaze (PNI), extramurální venózní invaze (EMVI). U pacientů po chemoradioterapii se hodnotí stupeň regrese nádoru (TRG), nejčastěji dle Dworaka. Celistvost mezorekta je hodnocena třemi stupni, od situace, kdy je mezorektum odstraněno kompletně bez porušení až po třetí stupeň, kdy je tkáň mezorekta, lacerovaná, inkompletní. Zejména kvalita mezorektální excize je kvalitativním parametrem chirurgické práce a rozhoduje o prognóze nemocných. Horší výsledky kvality TME jsou častěji u lokálně pokročilých nádorů, tumorů do vzdálenosti 8 cm od anu, u pacientů vyššího věku a na pracovištích s nízkým počtem operací. Důležité je také zhodnocení cirkumferenčního resekčního okraje, který musí být bez nádoru a větší než 1 mm.

Další specifické dělení je určeno pro T1 nádory. T1 nádory mohou být klasifikovány v případě pendulujících lézí dle Haggitta, v případě přisedlých lézí dle Kuda. Toto dělení je důležité pro

léčebnou strategii. Léze nezasahující stopku polypu a povrchové léze je možné odstranit endoskopickou resekci či pomocí transanální endoskopické mikrochirurgie (TEM). Výjimku tvoří nízká diferenciace nádoru, vaskulární invaze VI (VI) a lymfatická invaze (LI). Pro tyto léze je doporučena radikální operace včetně lymfadenektomie. Důležité je odstranění léze vcelku a její správná orientace na podložce pro přesné zhodnocení patologem.

TRG (tumor regression grade)

Účinkem radioterapie na nádorovou tkáň dochází k její nekróze a nahrazení fibrózou. Bylo vypracováno několik skórovacích systémů popisující podíl zastoupení této fibrózy v nádoru, respektive popisující úbytek nádorové hmoty na úkor fibrózy. Stupeň regrese nádoru lze určit histopatologicky. Nejvíce užívaný je systém podle Dworaka/Rödela a podle Mandarda [30-32]. Pokud patolog v resekátu nenalezne nádor, jedná se o kompletní patologickou odpověď (pCR). Podrobně je klasifikace uvedena v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3 Stupeň regrese nádoru (tumor regression grade, TRG), srovnání skórovacích systémů, regrese nádoru, podíl nádorových buněk, zastoupení fibrózy

Dworak	Rödel	Mandard
0 žádná regrese	0 žádná regrese	1 kompletní regrese
1 převážně nádor se zastoupením fibrózy	1 regrese < 25 % nádorové hmoty	2 fibróza s hlukou nádorových buněk
2 převážně fibróza s rozptýlenými nádorovými buňkami	2 regrese 25-50 % nádorové hmoty	3 fibróza a nádorové buňky s převahou fibrózy
3 ojedinelé nádorové buňky ve fibróze	3 regrese > 50 % nádorové hmoty	4 fibróza a nádorové buňky s převahou nádorových buněk
4 nejsou patrné viabilní nádorové buňky	4 kompletní regrese	5 žádná regrese

Důležitým zjištěním je, že TRG koreluje s celkovým přežitím nemocných (OS), ale i s dobou bez nemoci (DFS, disease free survival). OS i DFS plynule stoupá s mírou histopatologické regrese nádoru [31, 33, 34]. Kim et al. zjišťoval, zda některý z používaných systémů hodnocení regrese má lepší výsledky v predikci OS než ostatní, ale neprokázal signifikantní rozdíly [35].

2.6.3 Onkologická léčba

Součástí onkologické léčby u nádorů rekta je radioterapie a chemoterapie.

Radioterapie

Radioterapie (RT) je součástí multimodální léčby, u nádorů rekta se podílí na snížení počtu lokálních recidiv.

Podle polohy zdroje záření se radioterapie dělí na zevní/externí radioterapii (ERT) a brachyradioterapii (BRT). V minimalizaci negativního dopadu radioterapie na okolní zdravé tkáně se ozařovaný objem individuálně přizpůsobuje nepravidelnému tvaru cílového objemu – tzv. konformní radioterapie. Pokud je dalším upravením intenzity svazku záření snížena toxicita, jedná se o radioterapii s modulovanou intenzitou (IMRT).

U některých nádorů kůže, děložního hrdla a spinocelulárních nádorů anu se RT užívá jako hlavní léčebná modalita a její dávka je 60-80 Gy.

RT může být také součástí komplexní léčby, jako je tomu u lokálně pokročilého nádoru rekta. Pokud se RT podává před operací, jedná se o neoadjuvatní radioterapii, pokud až po operaci, jedná se o adjuvantní radioterapii. Radioterapie se může kombinovat se současným podáním chemoterapie, která zvyšuje její účinek (konkomitantní chemoradioterapie).

Jednotkou dávky záření je gray (Gy, J/kg). Gy udává absorbovanou energii záření v joulech na kg hmotnosti.

Celková dávka radioterapie je rozdělena do dílčích dávek – frakcí. Nádorové tkáně mají horší schopnost regenerace oproti tkáním zdravým. Frakcionace umožňuje regeneraci a snižuje radiační poškození okolních zdravých tkání. Nejčastěji se používá standartní frakcionace s dávkou 1.8-2 Gy/frakci, 5 frakcí týdně.

Nežádoucí účinky radioterapie

Nežádoucí účinky radioterapie se dělí na systémové a místní a na akutní a pozdní.

Akutní postradiační poškození se v některé formě vykytuje u všech nemocných. Chronické změny se vyskytují až u poloviny nemocných [36].

Systémové účinky se objevují při ozařování větších objemů. Řadí se k nim únava, nechutenství, nevolnost a hematologická toxicita. Lokální změny jsou omezeny na ozařovanou oblast.

Biologický účinek záření probíhá ve 4 stádiích. Ve fyzikálním stádiu dochází k excitaci atomů. Ve fyzikálně-chemickém stádiu vznikají volné kyslíkové radikály, které pak v chemickém stádiu poškozují molekuly, zejména DNA. Dochází k jednoduchým či dvojitým zlomům DNA. V biologickém stádiu je buňkou rozpoznáno poškození DNA a následuje pokus o její reparaci.

Pokud je poškození příliš velké, nastává programová buněčná smrt – apoptóza. Rychle proliferující a málo diferencované buňky jsou citlivější na radiční poškození než buňky neproliferující a diferencované. Kyslíkové radikály vznikající při RT jsou zodpovědné za poškození tkání. Tkáně, které mají nedostatek kyslíku, jsou radiorezistentní.

Radiace má krátkodobý a dlouhodobý účinek na tkáň. Krátkodobý účinek se projevuje po prvním týdnu a přetrvává do 2 týdnů od ukončení léčby. Dále následuje stádium subakutní trvající do 3 měsíců. Pozdní nežádoucí účinky se objevují po 3 měsících od ukončení léčby a mohou přetrvávat roky. Při radiaci dochází nejdříve k poklesu mitotického dělení a nekróze buněk sliznice. V případě ozařování nádorů rekta je převážně postižena kůže, tenké střevo, rektum a močový měchýř. Klinickým projevem může být dermatitida a průjem v důsledku poškození buněk střevního epitelu. Pacienti si stěžují na nauzeu, zvracení, případně bolesti břicha, nucení na stolicí, bolesti při defekaci. Při vyšších dávkách radiace se může vytvořit vřed, píštěl, vzácně perforace střeva. Průjmy mohou být s příměsí krve. Současně nemocní mají dysurické, polakisurické obtíže, přítomnost krve v moči. Tyto příznaky jsou projevem postradiační cystitidy.

Pozdním účinkem radiace je rozvoj fibrózy, porucha mikrocirkulace a neovaskularizace. Fibróza může vytvořit stenózy a adheze a způsobit střevní neprůchodnost. V rektu lze najít nově vytvořené teleangiektázie vedoucí k recidivujícímu krvácení. Fibróza v oblasti análního svěračového komplexu vede k problémům s kontinencí stolice. V neposlední řadě dochází k ovlivnění sexuálních funkcí. Ozáření může vést ke sterilitě. K uvedeným komplikacím také přispívá toxické poškození nervů při současně podané chemoterapii.

Zatímco akutní obtíže odezní s ukončením radiace, chronické následky jsou nevratné, obtížně léčitelné a ovlivňují pacienta po zbytek jeho života.

Anorektální dysfunkce zahrnuje inkontinenci pro plyn, tekutou či formovanou stolicí, obtíže spojené s evakuací rekta, zvýšenou frekvencí stolic a průjem.

V roce 1998 bylo publikováno dotazníkové šetření srovnávající 84 pacientů předoperačně ozařovaných a následně operovaných, s 87 pacienty léčených jen operací [37]. Více než 4 stolice denně byly pozorovány u 20 % ozářených pacientů ve srovnání s 8 % neozářenými pacienty. Inkontinence řídké stolice byla pozorována u 50 % ozářených pacientů a 24 % neozářených, inkontinence pevné stolice u 14 % ozářených a u 3 % neozářených pacientů. Problémy s vyprazdňováním byly přítomné u 52 % ozařovaných pacientů a u 36 % léčených pouze chirurgicky. Všechny rozdíly byly statisticky významné.

Ve studii Stockholm I a II bylo 14 let sledováno 23 pacientů s předoperačním ozařováním a 43 pacientů bez ozáření. Tato studie prokázala inkontinenci stolice u 57 % a špinění u 38 %

ozařovaných pacientů. U neozařených pacientů byla fekální inkontinence přítomna u 26 % a špinění u 16 % pacientů [38].

Podobně studie Dutch TME trial v 5letém sledování hodnotila obtíže s vyprazdňováním. Inkontinence byla pozorována u 62 % ozářených pacientů a u 38 % neozařených. Ozáření pacienti měli vyšší frekvenci stolic než neozaření (3.69 vs 3.02 stolice) a byli méně spokojeni se střevní funkcí [39].

V několika studiích bylo pozorováno zvýšené **riziko obstrukce tenkého střeva** u ozařovaných pacientů ve srovnání s pacienty, kteří byli jen operováni. V pětiletém sledování stockholmských studií byla frekvence obstrukce tenkého střeva u ozařovaných pacientů 13 % a u pacientů bez ozařování 8,5 % [40].

V jiné práci při 13letém sledování, 9 % ozařovaných pacientů rozvinulo pozdní obstrukci tenkého střeva, ve srovnání se 4 % pacientů, kteří byli jen operováni [28].

Pozdní **močové dysfunkce** zahrnují inkontinenci, retenci, dysurii a polakisurii. Jsou vyjádřeny v mnohem menší míře než anorektální dysfunkce [38]. Některé práce však vliv na pozdní močovou dysfunkci nepotvrdily [41].

Radioterapie má také vliv na **sexuální funkce**. V dánské studii byl hodnocen vliv ozáření na sexuální funkce. Studie sledovala sexuálně aktivní pacienty před zahájením léčby po dobu 24 měsíců od ukončení léčby. U mužů podstupujících radioterapii bylo sexuálně aktivních na konci sledování 67 %, ve skupině neozařovaných to bylo 76 %. Větší rozdíl byl pozorován u žen, kdy v ozařované skupině bylo na konci sledování 72 % sexuálně aktivních pacientek, ve skupině neozařované 90 %. Muži měli problémy s erekcí a ejakulací, u ženy dyspareunie ani snížená vaginální sekrece pozorována nebyla.

Nutné je zmínit riziko **vzniku sekundárních malignit** následkem radioterapie, které je okolo 1 % a vzniká po 8 letech od ukončení léčby.

Bergisson et al. mimo jiné zjišťovala vliv radioterapie na rozvoj sekundárních malignit u pacientů léčených pro lokálně pokročilý karcinom rekta [42]. Pacienty sledovala po dobu 14 let. Sekundární malignita se objevila u 9.5 % pacientů po radioterapii, ale jen u 4.3 % pacientů, kteří byli jen operováni. Nejčastěji se jednalo o gynekologické malignity a o nádory prostaty. Pokud se hodnotí vliv radioterapie **na kvalitu života**, zjistí se, že největší stížností nemocných byla anorektální dysfunkce. Ozařovaní pacienti si stěžovali na sníženou kvalitu života ve 30 %, neozařovaní pacienti jen v 10 % [37].

Chemoterapie

Chemoterapií se v onkologii rozumí podávání léků s cytotoxickým účinkem s cílem poškodit nádorovou DNA. Podle mechanismu účinku neboli dle způsobu, jakým poškozují nukleové kyseliny, je lze rozdělit do několika skupin. V předoperační léčbě u nádorů rekta potencují účinek radioterapie. Nejčastěji používanou látkou v této indikaci je 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU je antimetabolit, inhibuje thymidilátsyntetázu. Mezi jeho nežádoucí účinky patří mukositida způsobená poškozením epitelu zažívacího traktu, hematotoxicita, dermatotoxicita (hand-foot syndrom) a průjem. Hand-foot syndrom jsou kožní změny především na dlaních a chodidlech. Projevují se sníženou citlivostí, bolestí, zarudnutím nebo otokem, méně často v těžším stupni až olupováním či mokváním kůže. 5-FU je látka určená pro intravenózní podání, existuje ale forma určená pro perorální podání. Touto látkou je Capecitabin - neúčinná léková forma, která se v organismu metabolizuje na aktivní 5-FU. Studie srovnávající účinek 5-FU a capecitabinu při neoadjuvantní chemoradioterapii u nádorů rekta prokázala lepší 5leté přežití a nižší výskyt lokální rekurence ve prospěch capecitabinu [43].

Předoperační chemoradioterapie

Pacienti s lokálně pokročilým nádorem rekta klinického stádia II a III jsou indikováni k neoadjuvantní onkologické léčbě, která se skládá z ozařování a současného podání chemoterapie.

Pacienti s nádorem cT3/4, N0/1, EMVI + a nádory ve vzdálenosti menší než 1 mm od mezorektální fascie by měli podstoupit předoperační NCHRT. Její účel spočívá ve snížení rizika lokální rekurence onemocnění. NCHRT nezvyšuje počet svěřače záchovných výkonů a nemá vliv na celkové přežití pacientů [44]. Zavedení techniky totální excize mezorekta a předoperační radiochemoterapie snížilo lokální rekurenci onemocnění pod 10 % [45].

Účinek NCHRT je u nádorů vzdálených více než 12 cm od análního okraje nižší, proto její zařazení do léčebného plánu je v tomto případě sporné. [46]. Diskutabilní je neoadjuvantní radioterapie zejména u pacientů s nádory T3a/b proximální a střední třetiny rekta a u nádorů s pozitivními lymfatickými uzlinami N1.

Předoperační NCHRT ve srovnání s pooperační NCHRT vede k nižšímu počtu lokálních recidiv a nižšímu výskytu akutních toxických komplikací. Rozdíly v celkovém přežití nemocných, výskytu vzdálené rekurence a ve výskytu pozdních komplikací nebyly pozorovány [47].

NCHRT je možné podle doporučení provést ve dvou modalitách [46]. Prvou je SCPRT (krátká předoperační radioterapie) s doporučenou dávkou 25 Gy, 5 Gy na frakci, následovaná operací

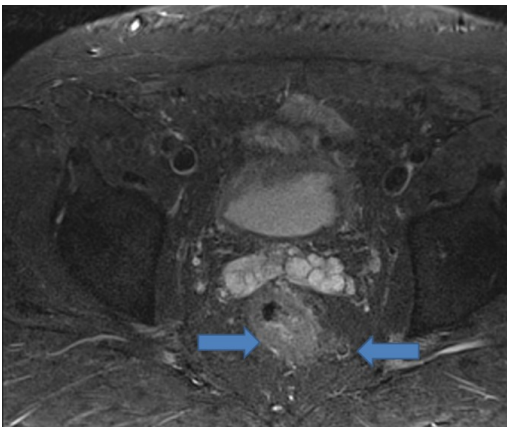
do 10 dnů od začátku radioterapie. Možný je i odklad operace o minimálně 6 týdnů přinášející srovnatelné onkologické výsledky, ale nižší počet pooperačních komplikací.

Druhou variantou je „dlouhá“ chemoradioterapie (NCHRT) s doporučenou dávkou 45-50 Gy v 25-28 frakcích s úvodním boostech 5.4 Gy. NCHRT je doplněna současným podáním 5-fluorouracilu nebo perorálního capecitabinu. Současné podání chemoterapie zvyšuje účinek radioterapie [48]. Operace se provede 6-12 týdnů po ukončení léčby. NCHRT přináší lepší výsledky oproti SCPRT zejména u situací, kdy je ohrožen CRM.

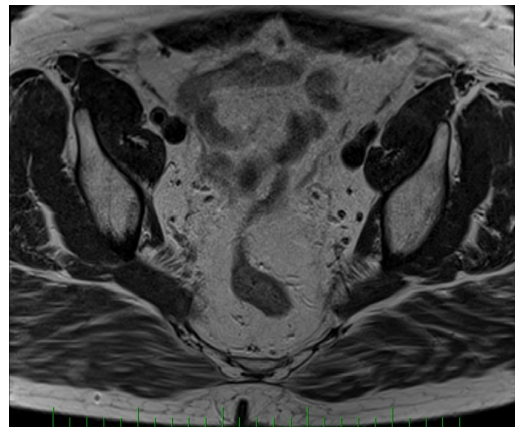
Souhrnně lze konstatovat, předoperační RT či NCHRT snižuje výskyt lokální rekurence, ale ke zlepšení OS nevede. Nevede ani ke zvýšení počtu svěrače záchovných výkonů. NCHRT signifikantně zhoršuje pooperační funkční výsledky.

Odpověď na předoperační léčbu je různá, od kompletní regrese nádoru v tkáni po situaci, kdy nádor je léčbou nezměněn (Obr. 3, 4).

A.

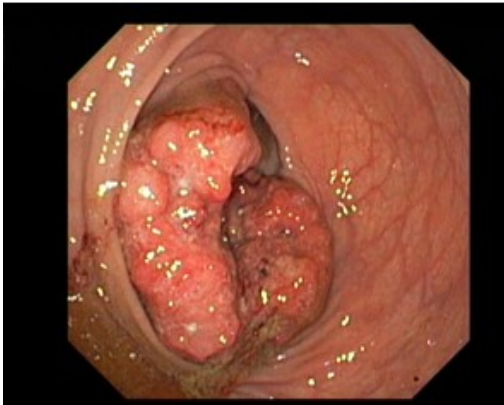


B.



Obr. 3 MR nádoru rekta (T3, N1) před (A) a po (B) léčbě. Šipky ukazují nádor a zvětšenou lymfatickou uzlinu. Po léčbě není přítomen nádor ani lymfatické uzliny (úplná klinická odpověď nádoru)

A.



B.



Obr. 4 Příklad kompletní léčebné odpovědi na NCHRT u pacienta s nádorem rekta. Endoskopický obraz nádoru před NCHRT (A), kompletní patologická odpověď, v resekátu nádor není patrný (B).

Lze pozorovat zmenšení nádoru (downsizing) i snížení klinického stádia nemoci (downstaging). Pro prognózu nemocných je ale podstatné výchozí klinické stádium nemoci před léčbou, které koreluje s OS.

Hodnotit terapeutickou odpověď na NCHRT je možné po jejím ukončení pomocí MR nebo po operaci na základě histopatologického vyšetření (TRG).

Kompletní patologickou odpověď lze nalézt až u 30 % pacientů. Naopak až u 40 % nemocných je účinek NCHRT minimální a ač z léčby nemají prospěch, je tato skupina také zatížena nežádoucími účinky této léčby. Účinek NCHRT roste v čase, nejlepší výsledky dosahuje mezi 6-12 týdnem po jejím ukončení. V této době se také najde nejvyšší počet pCR.

Restaging po neoadjuvantní chemoradioterapii

Restaging má být proveden 6 týdnů po ukončení NCHRT. Pacient má podstoupit kontrolní klinické vyšetření včetně vyšetření per rectum (digital rectal examination - DRE), endoskopické vyšetření a MR. Pokud současně při indagačním, endoskopickém a MR vyšetření není patrný nádor, jedná se o kompletní klinickou odpověď (cCR).

Kompletní klinická odpověď není v plné korelaci s kompletní patologickou odpovědí, existuje riziko mikroskopické reziduální nemoci. Toto riziko je nízké, jak je uvedeno podrobně dále.

Pomocí MR lze určit nejen downstaging a downsizing nádoru, ale i stupeň regrese nádoru poměrným zastoupením fibrózy a viabilní nádorové tkáně [49].

V případě prokázané cCR je možné pacientovi nabídnout konzervativní přístup (watch and wait). Pro určitou selektovanou skupinu pacientů přináší tento postup benefit (zejména

zachování svěrače, nižší výskyt stomií) bez limitace celkového přežití ve srovnání se standardně léčenými pacienty. Čím pokročilejší tumor rekta je, tím je šance na dosažení kompletní remise nižší. Vzhledem k tomu, že je to přístup zatím nový, je nutné pacienta podrobně informovat o rizicích tohoto postupu, zejména o zvýšeném riziku lokální recidivy.

Hodnocení klinické remise pomocí MR po proběhlé NCHRT může být obtížné pro přítomnost postradiačních změn. U malé části pacientů popíše patolog pCR, přestože MR vykazovalo reziduální nádor [50]. Přesnost vyšetření per rectum a endoskopického vyšetření v hodnocení cCR dosahuje 88 %, zatímco úspěšnost MR jen 79 %. Doporučuje se proto užít MR s perfuzí a diffusion-weighted imaging (DWI). Kombinací vyšetření per rectum, endoskopického vyšetření a MR lze dosáhnout úspěšnosti až 98 %.

Pooperační onkologická léčba

U pacientů klinického stádia III a rizikových pacientů stádia II podstupující předoperační RT či NCHRT je doporučena adjuvantní chemoterapie. U pacientů, kteří nepodstoupili NCHRT, je postup podobný, přesto vliv adjuvantní léčby na OS a DFS je nižší než o nádorů kolon.

Dále by měla být adjuvantní léčba užita u pacientů s neočekávanými nepříznivými histopatologickými rysy po primární operaci, to jsou pozitivní CRM, perforace v oblasti nádoru nebo neúplná mezorektální excize. Doporučeným chemoterapeutikem je fluoropyrimidin samostatně či v kombinaci s oxaliplatinou.

Celkové přežití pacientů s CRC

Celkové přežití pacientů s CRC je závislé zejména na klinickém stádiu nemoci. Přežití v jednotlivých stádiích dle TNM a věku nemocných ukazuje tabulka (Tab. 4).

Tab. 4 Roční a 5leté přežití na CRC v jednotlivých klinických stádiích, rozdělení na mladší a starší pacienty [12]

věk	stadium	n	1leté		5leté	
			přežití %	95% CI	přežití %	95% CI
20-64	I	26,341	98.3	98.1, 98.5	95.2	94.7, 95.6
	IIA	21,680	98.2	97.9, 98.4	89.6	89.0, 90.2
	IIB	4,169	90.7	89.7, 91.6	67.6	65.8, 69.4
	IIIA	4,433	98.2	97.7, 98.6	91.3	90.0, 92.4
	IIIB	17,945	96.1	95.8, 96.4	76.9	76.0, 77.7
	IIIC	11,853	93.5	93.0, 94.0	61.8	60.7, 62.8
	IV	30,669	64.7	64.1, 65.2	14.2	13.7, 14.7
≥65	I	33,848	92.5	92.1, 92.9	89.1	88.3, 89.8
	IIA	33,564	91.9	91.5, 92.3	84.4	83.5, 85.1
	IIB	5,972	75.9	74.6, 77.1	55.0	53.0, 56.9
	IIIA	3,872	92.2	91.0, 93.2	85.1	82.8, 87.1
	IIIB	20,198	85.6	85.0, 86.1	64.6	63.6, 65.7
	IIIC	11,376	77.4	76.5, 78.2	45.5	44.2, 46.8
	IV	30,246	39.1	38.5, 39.7	7.4	7.0, 7.8

2.6.4 Watch and Wait, neoperační management – NOM

Kompletní patologické odpovědi dosáhne po neoadjuvantní chemoradioterapii 10-25 % pacientů. Tato skupina pacientů má výbornou prognózu. Téměř 90 % pacientů je v remisi po 5 letech od operace [2]. Čím pokročilejší tumor rekta je, tím je šance na dosažení kompletní remise nižší a riziko recidivy (regrow) větší.

Byla provedena řada studií s cílem zvýšit procento kompletních patologických odpovědí a tím dosáhnout lepší prognózy pacientů. Jediné dvě cesty vedoucí k tomuto cíli jsou zvýšení dávky předoperační radioterapie a prodloužení intervalu mezi ukončením radioterapie a operací. Intenzifikace chemoterapeutického režimu přidáním oxaliplatinu či biologické léčby pouze zvýšila toxicitu léčby při stejném výskytu pCR.

U části pacientů nelze nádor po NCHRT detekovat klinicky, endoskopicky ani zobrazovacími vyšetřeními. Jedná se o kompletní klinickou odpověď (cCR). U těchto nemocných se nabízí, jak zmíněno, operaci neprovádět a pacienty jen sledovat.

V roce 2004 byla publikována první studie, ve které selektovaná skupina pacientů s kompletní klinickou odpovědí po NCHRT nebyla operována a nemocní byli jen sledováni (watch and wait) [51]. Výsledky byly velmi povzbudivé. Publikovaná data z roku 2014 zahrnují 183 pacientů s nízko lokalizovaným karcinomem rekta (do 7 cm od análního okraje) ve stadiu T2-4 N0-2 M0. S odstupem 8 týdnů od ukončení NCHRT dosáhlo 49 % pacientů cCR (negativní hladina CEA, negativní nález při vyšetření per rectum, při rektoskopickém a MR vyšetření). Tito pacienti byli dále jen sledováni. V průběhu 5 let došlo k recidivě u 31 % pacientů. U více než poloviny z nich se tato recidiva prokázala během prvního roku sledování. I přesto, že došlo k recidivě, podařilo se u většiny těchto pacientů nádor radikálně chirurgicky odstranit. U pacientů bez recidivy byl výskyt vzdálených metastáz v 5 letech od začátku léčby 13 % a u pacientů s lokální recidivou 18 %. Tento rozdíl nebyl vzhledem k malým počtům pacientů signifikantní. Nebyl zaznamenán rozdíl v celkovém přežití mezi oběma skupinami. [52].

Tento přístup byl podroben značné kritice, ale s delším časovým odstupem a po zhodnocení většího množství pacientů různými autory lze shrnout, že pro určitou selektovanou skupinu pacientů přináší watch and wait postup benefit. Tento benefit spočívá zejména ve zlepšení kvality života, ve větším počtu kontinentních pacientů a nižším počtu stomií. Celkové přežití těchto nemocných ve srovnání se standardně léčenými pacienty je shodné [53].

Pacienty je nutné pečlivě sledovat, neboť výskyt lokální recidivy dosahuje v průběhu 5 let od diagnózy okolo 30 %.

V evropských doporučeních ESMO pro léčbu karcinomu rekta z roku 2013 je tento postup zmíněn jako léčebná možnost u pacientů s kompletní klinickou odpovědí u adenokarcinomu

distálního rekta (cT1-2, cT3a,b N0) a také pro ostatní pacienty s vysokým rizikem perioperačních komplikací.

V hodnocení kompletní klinické odpovědi je zásadní normální nález při vyšetření per rectum, normální nález na rektoskopii, nezvýšené hodnoty onkomarkeru CEA a normalizace nálezu na MR pánve. Na MR je důležité srovnání primárního tumoru a případné lymfadenopatie před léčbou a po léčbě, doplněné i zhodnocením perfúze a DWI [54].

Některé studie naznačují přínos PET/CT v hodnocení odpovědi na NCHRT u nádorů rekta, ale standardně se nepoužívá [55].

V pravidelné dispenzarizaci by mělo být prováděno vyšetření per rectum, endoskopické vyšetření, MRI rekta, hladina CEA. K vyloučení systémového relapsu má být prováděno CT hrudníku, břicha a pánve. Součástí dispenzarizace by mělo být statistické hodnocení výskytu lokální recidivy a OS a přežití bez nemoci (DFS) u tohoto nestandardního postupu ve srovnání se skupinou nemocných, kteří byli operováni a u nichž byla prokázána kompletní patologická remise.

3. Predikce léčebné odpovědi na chemoradioterapii u nádorů rekta

Kompletní patologickou odpověď lze nalézt až u 30 % pacientů. Až 40 % pacientů, u kterých je terapeutická odpověď na NCHRT minimální, je zbytečně vystaveno nežádoucím účinkům této léčby.

Proto se hledají se specifické markery s jejichž pomocí by bylo možné předpovědět efekt předoperační chemoradioterapie u nádorů rekta. Tyto markery je možné stanovit před zahájením, v průběhu či po ukončení NCHRT. Z pohledu predikce terapeutické odpovědi je nejvhodnější stanovení těchto markerů před zahájením či v úvodu NCHRT. Na základě literární rešerše je možné markery dělit na klinické, radiologické, molekulární (bílkovinné povahy), imunologické, genetické a na volné nádorové elementy [56].

3.1 Klinické markery

Velikost tumoru, lokalizace nádoru – vzdálenost od análního okraje, diferenciací nádoru

Řada prací sledovala, zda samotná velikost nádoru, stupeň jeho diferenciací, T a N stádium mohou být prognostickým markerem odpovědi na NCHRT u nádorů rekta. Některé práce ukázaly, že pCR byla častěji asociována s malou velikostí nádoru, jeho dobrou diferenciací nádoru, časným T a N [57, 58]. Tyto výsledky nebyly potvrzeny ve všech studiích [59].

Co se týká lokalizace, nádory střední a distální třetiny mají lepší odpověď na NCHRT než nádory proximální třetiny [60, 61]. Také nádory dobře diferencované mají lepší klinickou odpověď na předoperační léčbu [62].

Zajímavá je práce Bustamante-Lopeze et al., který zjišťoval, zda počet uzlin v resektátu u pacientů podstupující NCHRT je rozdílný. Překvapivě zjistil, že pacienti s počtem uzlin < 12 mají signifikantně vyšší zastoupení pCR ($p = 0.004$) [63].

V rozsáhlé retrospektivní práci Lorimer et al. analyzoval soubor 27,532 pacientů z 1179 nemocnic [64]. Zjistil, že pravděpodobnost dosažení pCR byla nezávisle spojena s časnějším stanovením diagnózy, ženským pohlavím, nižším T a N stádiem, prodlužujícím se intervalem mezi ukončením chemoradioterapie a operací a také léčbou v instituci s vyšším objemem pacientů.

Anémie

Hypoxie nádoru je asociována s rezistencí k radioterapii [65]. Oxygenace tumoru závisí na jeho cévním zásobením, mikrocirkulaci a v neposlední řadě na množství hemoglobinu v krvi. Velká část pacientů s nádorovým onemocněním trpí anémií. Anémie je způsobena vlivem nádoru či léčby samotné. Ukazuje se, že anémie je negativní prognostický faktor u nádorů hlavy a krku, plic, nádorů děložního čípku a nádorů jícnu. Podobně i u nádorů rekta může mít anémie negativní vliv na léčebnou odpověď, lokální rekurenci a OS [66]. Práce Lee H. et al. ukázala, že anemičtí pacienti (hemoglobin méně než 90 mg/l) s lokálně pokročilým nádorem rekta podstupující NCHRT dosáhli v menším procentu patologické kompletní odpovědi (pCR) než pacienti bez anémie ($p = 0,012$). Pacienti s anémií před zahájením léčby měli horší 3letou lokální kontrolu než pacienti bez anémie. Multivariační analýzou se prokázalo, že anémie před léčbou ($p = 0,035$), T stádium nádoru a uzlinové postižení ($p = 0,020$ a $0,032$) byly nezávislé prognostické faktory pro lokální kontrolu onemocnění [67]. Clarke T. et al. souvislost mezi předléčebnou hladinou hemoglobinu a pCR neprokázal [68].

3.2 Radiologické markery

Magnetická rezonance je rutinně užívána pro předoperační staging nádorů rekta. Určení T a N stadia může být využito k predikci, jak je uvedeno výše. Měření objemu nádoru neukázalo souvislost s pCR [69]. Naopak lepší výsledky přineslo srovnání intenzity signálu nádoru. Pacienti s TRG 1 měli vyšší předoperační intenzitu signálu nádoru než pacienti s TRG 2,3. Ovšem bez rozdílu signálu byl skupina pacientů TRG 1 a 4 [70]. MR s použitím kontrastní látky a dynamická MR (DWI) zohledňují lépe perfuzi nádoru a hustotu buněk, reflektují lépe biologii nádoru, potenciálně by proto mohly být užity k predikci. Zejména okrsky nádoru se špatnou perfúzí a známkami hypoxie mohou být rezistentní k účinku NCHRT [65].

Při MR s použitím kontrastní látky je možné stanovit perfúzní index (PI), zohledňující mikrocirkulaci v nádoru. Vysoký perfúzní index (PI) značí hypoxii v nádoru a může předpovídat špatnou odpověď na NCHRT. DeVries prokázal, že hodnota PI byla signifikantně zvýšena ve skupině responderů ve srovnání se skupinou nonresponderů [71]. Bohužel se neukázalo, že nízký PI předpovídá pCR [71-73].

Dalším důležitým parametrem určeným při MR(DWI) je ADC (apparent diffusion coefficient). Popisuje stupeň mobility protonů volných molekul vody. U nekrotické tkáně dochází k rychlé difúzi protonů molekul vody vzhledem porušené membránové integritě, ADC je proto vysoké. Naproti tomu tkáně s vysokou hustotou buněk vykazují nízké ADC.

DWI byla zkoumána řadou autorů s protichůdnými výsledky. V již zmíněné práci DeVriese se prokázalo, že ve skupině nonresponderů byla vyšší hladina ADC ($p < 0.001$) [71]. Labrecht et al. ukázal slibná data u 22 pacientů. Nízké předléčebné ADC bylo asociováno s vyšším počtem pCR ($p 0.003$) [74]. Naproti tomu Barbaro et al. zjistil, že nízké předléčebné ADC bylo spojeno se špatnou odpovědí na NCHRT [75]. Elmi et al. zjistil, že vyšší předléčebné ADC korespondovalo s odpovědí na léčbu se sensitivitou 75 % a specifitou 48 % [76]. Výsledky jsou tedy rozporuplné.

Důležité je postavení MR po ukončení chemoradioterapie a zhodnocení případné regrese nádoru. Nejlepší výsledky jsou dosahovány při zobrazení minimálně 6 týdnů od ukončení NCHRT. V práci Maasové et al. bylo vyšetřeno 50 pacientů 6-8 týdnů po ukončení NCHRT. Bylo provedeno klinické vyšetření (DRE), endoskopické vyšetření a MR (T2W, DWI). 34 % pacientů dosáhlo pCR. Samotné MR mělo úspěšnost 79 % v predikci pCR, v kombinaci s klinickým vyšetřením a endoskopií tato úspěšnost vzrostla na 98 % [50]. V následující práci úspěšnost predikce samotné MR přesáhla 90 % [77].

Pomocí MR lze určit i stupeň regrese nádoru poměrným zastoupením fibrózy a viabilní nádorové tkáně [45]. Tyto výsledky korelují s histopatologicky zjištěnou regresí (TRG).

FDG PET/CT není standardně používáno k určení předoperačního stagingu u nádorů rekta.

Předléčebné využití PET CT k predikci NCHRT přineslo rozporuplné výsledky. K určení míry vysycení nádoru FDG (fluoro-D-glukózou) při PET/CT slouží hodnota SUV (standartized uptake value) rep. SUVmax. Jsou práce zaměřené na sledování závislosti SUV a pCR, bohužel bez statistické významnosti. Goldberg et al. sledovala, zda hodnoty SUV před léčbou a po prvním týdnu NCHRT mohou predikovat pCR. Zjistila, že pokles SUVmax byl výraznější u responderů [78]. Práce Kim et al. byla podobně koncipovaná, s tím rozdílem, že kontrolní PET CT bylo provedeno 5-6 týdnů po ukončení NCHRT. Hodnota SUVmax zjištěná při druhém vyšetření byla ve skupině responderů nižší [79]. Martoni et al. prokázal, že hodnoty SUV pod 27 před léčbou predikují pCR s vysokou senzitivitou, ale velmi nízkou specifitou (10.6 %) [80].

3.3 Molekulární markery

Molekulární predikce je založena na hledání specifických markerů převážně bílkovinné povahy přítomných v krevní plazmě nebo přímo v tkáni nádoru. Tyto markery souvisejí s buněčnou regulací, opravou DNA, se vznikem a progresí nádorového onemocnění a molekulárními mechanismy odpovědnými za radiochemosensitivitu nádoru.

Karcinoembryogenní antigen (CEA) je membránový glykoprotein, který je tvořen v epiteliálních buňkách během fetálního vývoje. Ovlivňuje buněčnou adhezi, ale jeho kompletní funkce není známa. Má nepřímý imunosupresivní vliv na T-lymfocyty. Poločas v organismu je 7 až 14 dní, fyziologická sérová hladina je do 3 µg/ml, u kuřáků je mírně zvýšena do 5 µg/ml. Patologicky může být zvýšen u cirhózy jater a zánětu zažívacího traktu. Jeho senzitivita u kolorektálního karcinomu dosahuje 71 %, ovšem toto platí jen pro pokročilé a metastatické nádory, u časných stádií je senzitivita menší než 25 %. CEA není tedy možné užít jako marker diagnostický, ale pouze jako marker určený ke sledování progresu onkologického onemocnění. Byla provedena celá řada studií hledající vztah mezi předléčebnou hladinou CEA a výsledkem předoperační radiochemoterapie.

Velká retrospektivní práce analyzovala soubor 530 pacientů s nádorem rekta podstupující NCHRT. Pacienti byli ozáření celkovou dávkou 50.4 Gy a současně jim byl podán 5-FU, následně byli operováni. Celkově 20 % pacientů dosáhlo pCR. Průměrná předléčebná hladina CEA u nekuřáků s pCR byla 2,9 ng/ml, u těch u kteří pCR nedosáhli, byla předléčebná hladina 8.3 ng/ml. Zajímavé na této práci je fakt, že jen u 57 % pacientů zahrnutých do analýzy byla k dispozici hladina CEA [81]. Podobně rozsáhlá studie z MD Anderson Cancer centra prokázala, že předléčebné hladiny CEA > 2.5 ng/ml jsou asociovány se signifikantně nižším počtem pCR [61]. Soubor 323 pacientů z Číny ukázal, že předléčebná hladina CEA ≤ 5 ng/ml byla nezávislým prediktorem zvyšující šanci dosažení pCR [82]. S podobným závěrem skončily i práce dalších autorů [83-85]. Byla také zkoumána změna hladiny CEA před a po ukončení NCHRT. Zejména nízká hladina CEA, respektive její pokles po ukončení NCHRT, by mohl značit dobrou odpověď na NCHRT [86].

Proti těmto povzbudivým výsledkům stojí práce Kalady et al. [59], kterému se na souboru 242 pacientů nepodařilo prokázat souvislost mezi předléčebnou hladinou CEA a pCR. Jediné, co mělo pozitivní vliv na dosažení pCR, byla doba od operace delší než 8 týdnů. Také Clarke et al. neprokázal korelaci mezi předléčebnou hladinou CEA a pCR [68].

Přesto se zdá, že zvýšené předléčebné hladiny CEA mohou negativně souviset s léčebnou odpovědí na chemoradioterapii u nádorů rekta.

Thymidilát syntáza (TS) je enzym podílející se na metabolismu thymidinu. Při jeho inhibici dochází k hromadění určitých metabolických produktů a tím k poškození DNA. Účinek 5-FU je zprostředkován vazbou na TS. 5-FU účinkuje jako antimetabolit a ireverzibilně inhibuje TS. Vysoká exprese TS u CRC je spojena s 5-FU rezistencí. TS může být vyšetřena na úrovni proteinu pomocí imunohistochemie nebo na úrovni RNA pomocí reverzní transkriptázy. Současně se vyšetřuje genový polymorfismus TS.

V práci Jakoba et al. nízká předléčebná exprese genu TS v tkáni nádoru svědčila o dobré léčebné odpovědi, navíc společně s Ki-67 měla pozitivní predikci v dosažení pCR [87]. Práce Negriho et al. to nepotvrdila [88]. Ani výzkum TS polymorfismu nepřinesl lepší výsledky [89].

EGFR je transmembránový protein patřící do rodiny tyrozinkinázových receptorů pro růstové faktory (HER). Po navázání ligandu na extracelulární doménu receptoru dochází k autofosforylaci intracelulárních tyrozinkinázových zbytků, což vede k aktivaci signální kaskády zahrnující dráhy RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT a STAT/AKT, významné pro vývoj a progresi nádorových onemocnění. Dráha vedoucí z RAS (KRAS) k MAPK se účastní regulace buněčného cyklu, genové transkripce a buněčného dělení. Dráha PI3K/AKT reguluje signály ovlivňující přežití buňky a signály zabraňující apoptóze. Receptor EGFR aktivuje i dráhu STAT/AKT, která působí na transkripci genů účastnících se procesu přežívání buněk.

Autoprotilátky cílené proti EGFR receptoru hrají důležitou roli v terapii metastazujícího kolorektálního karcinomu. Zařazení těchto látek do neoadjuvantní chemoradioterapie může přinést příznivý efekt. Zatím jsou výsledky nejednoznačné. Některé práce ukázaly, že nízká exprese EGFR vede k dobré léčebné odpovědi, jiné práce ukázaly pravý opak. Výzkum polymorfismu EGFR přinesl také rozporuplné výsledky [89-91]. Vyšetření *KRAS* mutace je již zavedeno v klinické praxi při cílení onkologické léčby u metastatického CRC. Její využití k predikci pCR se nepotvrdilo [92, 93].

Survivin

Survivin je malá molekula, která se podílí na regulaci buněčného cyklu a inhibici apoptózy a je exprimována během embryogeneze a také četných nádorových onemocnění.

Jeho exprese v nádoru koreluje s agresivnějším fenotypem tumoru a chemoterapeutickou rezistencí [94].

U nádorů rekta byl zkoumán vliv exprese survivinu na chemoradioterapii a byly zjištěny kontroverzní výsledky. Terzi et al. nenalezla korelaci mezi expresí survivinu a odpovědí na předoperační chemoradioterapii a prognózu [94]. Kim et al. naopak zjistil, že vysoká

imunohistochemická exprese survivinu v biopsii nádoru před léčbou byla spojena s menší odpovědí na předoperační chemoradioterapii u lokálně pokročilých nádorů rekta [95].

Cyklooxygenáza

Cyklooxygenáza (COX) je tvořena dvěma isoformami (COX1,2) podílejících se na metabolické konverzi kyseliny arachidonové na prostaglandiny, včetně prostaglandinu E2, který je jedním z hlavních mediátorů zánětu a angiogeneze. COX2 může inhibovat apoptózu, podporovat angiogenezi a modulaci buněčné diferenciaci a zvyšovat agresivitu nádoru a jeho metastazující potenciál [96].

Výzkum COX v predikci léčebné odpovědi na NCHRT u lokálně pokročilého nádoru rekta přinesl bohužel protichůdné výsledky [97, 98].

P53

Protein p53 je transkripční faktor, který kromě jiných funkcí předchází tvorbě nádorů, a proto působí jako nádorový supresor. Protein p53 reguluje expresi mnohých genů, které mohou kontrolovat růst buněk, apoptózu (programovanou buněčnou smrt), opravu DNA, stárnutí buněčných populací a angiogenezi (růst nových cév). P53 vyhledává na DNA poškozená místa a pokud takové najde, spustí transkripci genu p21, který zastaví dělení buňky, dokud není poškozené místo reparováno. Pokud to nelze, buňka spustí programovanou buněčnou smrt. Funkce proteinu p53 je regulována řadou mechanismů, mimo jiné oxidativním stresem, osmotickým šokem, zvýšenou teplotou, poškozením buněčných membrán, poškozením DNA a dalšími. Inaktivace p53 je důležitá v rozvoji kolorektálního karcinomu. P53 hraje také důležitou roli v účinku NCHRT na nádor, proto byla jeho úloha intenzivně zkoumána. Nádorové buňky nemající mutaci p53 (wild type) jsou chemoradiosensitivní, zatímco ty s mutací jsou rezistentní. Je možný imunohistochemický průkaz proteinu p53 ve tkáni nádoru či přímé vyšetření genu *TP53*. Důležité je stanovení, zda se jedná o nemutovanou či mutovanou formu.

Některé práce potvrzené metaanalýzou publikovanou Chenem v roce 2012 naznačují, že wild typ p53 (nemutovaný gen nebo snížená exprese p53 proteinu) je asociován s dobrou odpovědí na NCHRT [99-101]. V dalších pracích se to nepotvrdilo [90, 102].

3.4 Imunologické markery

Lymfocyty hrají důležitou roli jak v imunologické odpovědi organismu na nádor, tak také zprostředkovávají účinek NCHRT. Vzhledem k tomu, že pokles T lymfocytů v experimentu u myši zhoršoval účinek radiace [103], jsou zkoumány jak počty lymfocytů v periferní krvi, tak i v nádoru. Vyšší zastoupení CD8⁺ lymfocytů v nádoru ukázalo jako nezávislý prognostický faktor dosažení pCR po NCHRT [104].

Zastoupení lymfocytů v periferní krvi je vyšší u pacientů s pCR [105]. V práci Tada et al. se potvrdilo, že předléčebné počty cirkulujících lymfocytů jsou u pacientů s dobrou odpovědí na NCHRT vyšší než ve skupině s minimální odpovědí. Dále, že v podílu těchto lymfocytů převažují T a Th lymfocyty na úkor B lymfocytů. Hladiny T a B lymfocytů během chemoradioterapie klesají [106]. Podobné výsledky se ukázaly i u nádorů dělohy, děložního čípku, prsou a nasofaryngu. Vyšší předléčebný počet lymfocytů měl příznivý vliv na prognózu nemocných. Ne všichni autoři došli ke shodným výsledkům [68].

Co není jasné, je vztah mezi cirkulujícími a tumor infiltrujícími lymfocyty (TIL). Milne et al. ukázal, že hladina cirkulujících lymfocytů nekoreluje počtem TIL u nádoru vaječníku. Přesto, cirkulující lymfocyty i TIL příznivě korelují s prognózou nemocných, ale nezávisle na sobě [107].

3.5 Genetické markery

Chromosomální aberace

Získání či ztráta části chromozomu může vést ke změně v onkogenech a tumor supresorových genech, které jsou důležité za rozvoj a progresi kolorektálního karcinomu. Když Chen et al. [108] zkoumal chromosomální aberace, našel méně získaných regionů a specifickou ztrátu regionu 12p13.31 u pacientů s pCR. Analýzou tohoto regionu bylo nalezeno 8 genů související s odpovědí nádoru na léčbu.

Mutace a metylace v nádorové tkáni

První práce na detekci somatických mutací v tumor supresorových genech a onkogenech naznačují, že k predikci odpovědi NCHRT by mohlo být použito vyhodnocení stavu mutace genu *TP53* v nádoru. Metaanalýza publikovaná Chenem v roce 2012 potvrdila představu, že divoký typ *TP53* je spojen s lepší odpovědí na léčbu, ostatní však tuto hypotézu nepotvrdili [60]. Sun et al zkoumali přítomnost mutace *KRAS* a *MGMT* (promotor methylace) u pacientů s CRC. U pacientů s minimální odpovědí došlo k poklesu počtu mutací *KRAS* v nádorové tkáni

po ukončení NCHRT. Naproti tomu ve skupině respondentů byla zjištěn vyšší počet mutací *MGMT* před zahájením léčby [62].

SNPs (single nucleotide polymorphism)

SNP jsou zděděné genetické varianty, které indikují obecnou predispozici organismu k nádorovým procesům a také predispozici k reakci na danou léčbu, např. schopnost opravovat DNA v souvislosti s radiačně-chemoterapeutickým poškozením buněk.

Spindler et al. zkoumal „single nucleotide polymorphism“ u TS, EGFR, Sp1-216 a jeho souvislost s pCR. TS 2/2 genotyp a heterozygot *EGFR* A61G genu predikoval cPR s vysokou úspěšností [109]. Ostatní autoři již tak úspěšní nebyli [110].

Profilování genové exprese

Mikroarray technika se užívá v predikci a individualizaci onkologické léčby u rakoviny prsu (Oncotype DX, MammaPrint). Podobně se hledají geny, podle kterých by bylo možné určit predikci účinku NCHRT u nádorů rekta.

Tyto skupiny genů zahrnují DNA repair geny, geny regulující apoptózu a signální dráhy pro růst buněk. Ghadimi et al. prokázal signifikantně rozdílnou expresi u 54 genů ve skupině responderů a nonresponderů. Prediktivní hodnota tohoto testu byla 84 %, sensitivita 78 % a specifita 86 % [111].

Podobně Rimkus et al. identifikoval soubor 42 genů spojených s predikcí k pCR se sensitivitou 71 % a specifitou 86 % [112].

Korejská skupina identifikovala na souboru 31 pacientů 95 genů predikujících pCR. Přesnost této predikce byla 84 %.

Brettingham-Moore provedla mikroarray analýzu na skupině 51 pacientů. Pokusila se ověřit panel genů použitých k predikci Ghadimim, Rimkusem a Kimem. Nepodařilo se jí ale prokázat koleraci v expresi těchto genů a predikci léčebné odpovědi [113].

Podobně jako analýza DNA byla provedena i analýza genové exprese RNA resp. microRNA(miRNA). Rozdílná exprese 53 miRNA byla nalezena u responderů vs. nonresponderů. Největší rozdíl byl zjištěn u 14 miRNA. miRNA-622 a miRNA-630 ukázala 100 % sensitivitu a specifitu v předpovědi pCR [114]. Autoři se domnívají, že miRNA ovlivňuje geny podílející se na opravě buněk poškozených radioterapií. U miRNA-630 bylo již dříve prokázáno, že negativně ovlivňuje schopnost reparace DNA buněk poškozených oxaliplatinou a to konkrétně u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Naopak Ma et al. identifikovala miRNA 622 jako marker radioresistence. Kheirelseid et al. extrahoval miRNA

z 12 parafinových bločků u nádorů rekta. Zjistil, že miRNA-16, 590, 153 predikují pCR se 100 % přesností. Toto je velmi perspektivní technika, vzhledem k dobré dostupnosti parafinových bločků, bohužel zatím nebyla testována na širší kohortě a žádný z těchto testů nebyl proveden u karcinomu rekta.

Lopes-Ramos et al identifikovali 27 rozdílně exprimovaných genů mezi pacienty s pCR a pacienty se špatnou odpovědí na NCHRT. Predikce založená na těchto genech dosahovala přesnosti 81,8 % pouze u této konkrétní skupiny pacientů, u jiné nefungovala. Tyto výsledky naznačují, že v současné době dostupné prediktivní soubory genů jsou vysoce závislé na souboru vzorků, ze kterého jsou odvozeny a jejich přesnost není lepší než současné zobrazovací metody a klinické parametry používané k hodnocení odpovědi na NCHRT [70].

Spontánní apoptóza

Míra spontánní apoptózy byla zkoumána jako marker radiosensitivity. Několik studií prokázalo souvislost mezi přítomností spontánní apoptózy v předléčebných biopsiích nádoru a následně vyšším výskytem pCR účinkem NCHRT [115, 116]. Naproti tomu Mc Dowell a Tannapfel neprokázali souvislost mezi spontánní apoptózou a pCR [117, 118].

3.6 Volné nádorové elementy

CTC cirkulující nádorové buňky

Z nádoru jsou do krevního oběhu uvolňovány buňky. Nádorové buňky je pak možné detekovat v periferní krvi i v kostní dřeni. Předpokládá se, že přítomnost CTC je spojená se schopností nádoru zakládat metastázy a tím s horší prognózou. U nemetastazující rakoviny prsu má průkaz CTC prognostickou hodnotu. Pacientky s přítomností CTC před léčbou mají horší prognózu, která je navíc negativně spojená s počtem cirkulujících nádorových buněk [119]. Zařazením neoadjuvantní chemoterapie do léčby pacientek s nemetastazujícími nádory prsu HER2 negativními, ale s pozitivitou CTC, nevedlo k eliminaci cirkulujících nádorových buněk [120]. U nádorů prostaty je vymizení CTC po 13 týdnu léčby spojeno s dobrou prognózou a má lepší výpovědní hodnotu než pokles PSA.

U kolorektálního karcinomu je situace taková, že přibližně 20-30 % pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem má více než jednu CTC v 7.5 ml periferní krve. Přítomnost CTC v krvi je pak spojena u těchto nemocných s horším OS [121].

Magni et al. sledovala množství CTC na začátku a v průběhu multimodální léčby lokálně pokročilého karcinomu rekta. Zjistila, že 18.9 % pacientů mělo alespoň jednu CTC na začátku

léčby. Během NCHRT došlo k poklesu CTC. Neprokázala vztah mezi přítomností CTC a T, N stadiem. Zjistila, že u pacientů s dobrou odpovědí na NCHRT došlo k poklesu počtu CTC po ukončení neoadjuvantní léčby. Samotná přítomnost CTC na začátku léčby nebyla statisticky prognostickým faktorem [122].

Podobně Sun et al. vyšetřoval množství CTC u lokálně pokročilého karcinomu rekta. U pacientů s dobrou odpovědí na NCHRT množství CTC signifikantně pokleslo po ukončení NCHRT. Respondeři měli větší množství CTC v periferní krvi před zahájením léčby a menší množství CTC po ukončení NCHRT než nonrespondeři [123].

Troncarelli et al. kromě stanovení CTC u nich vyšetřili kinetiku a expresi TS a RAD23B proteinu. Soubor tvořilo 30 pacientů. Hladiny CTC byly stanoveny před a po ukončení NCHRT. U většiny pacientů se hladiny CTC během léčby snížily. Žádný z pacientů, kteří dosáhli pCR, nevykazoval expresi TS a RAD23B proteinu v CTC [57].

Volná nádorová DNA, ctDNA

V roce 1948 se prokázalo, že v krvi se nachází volná, cirkulující DNA – cfDNA. CfDNA se uvolňuje do krevního oběhu z nekrotických buněk a buněk podléhajících apoptóze. Není vyloučena ani aktivní sekrece DNA buňkou [124]. Fragmenty cfDNA uvolněné do krevního oběhu mají délku 150-200 bp [125]. Zdrojem cfDNA nejsou jen nádorové buňky, ale také rozpadající se buňky vlastní. Termín ctDNA označuje cirkulující nádorovou DNA, která je do krve uvolněna z tkáně nádoru.

V krvi zdravých lidí nalézáme cfDNA průměrně v koncentraci 13 ng/ml, u pacientů s nádory v koncentraci 180 ng/l. Zbytky mrtvých buněk s jejich DNA je eliminována z krve buňkami imunitního systému např. makrofágy. Poločas eliminace cfDNA je několik hodin. Množství detekovatelné ctDNA závisí na pokročilosti nádorového onemocnění a na typu nádoru. CtDNA může pocházet jak z primárního nádoru, tak i z metastázy, obsahuje DNA identickou s nádorovou DNA. Podíl ctDNA na celkové cfDNA může představovat u nemetastazujícího CRC méně než 1 %. U metastazujícího onemocnění ctDNA může převažovat.

Protože ctDNA představuje pouze velmi malý podíl cfDNA, jsou pro detekci nutné vysoce citlivé a spolehlivé metody, zejména pokud se jedná o monitorování časného onemocnění, kdy podíl ctDNA může být často nižší než 0,01 % [126]. Počáteční pokusy o detekci byly založeny na metodách využívající polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Citlivost samotné PCR je relativně malá. S příchodem digitální PCR se citlivost výrazně zvýšila.

Techniky založené na digitální PCR jsou považovány za vysoce citlivé a zahrnují kapilární digitální PCR (ddPCR) a PCR s pomocí BEAMingu. Některé testy založené na digitální PCR

jsou schopné detekovat 1 mutantní alelu na pozadí 100 000 divokých fragmentů DNA [127]. Digitální PCR je omezena na detekci jednotlivých nukleotidových změn, což vyžaduje znalosti mutací přítomných v nádoru. Kromě toho počet mutací, které lze současně vyhodnotit, je omezen.

Techniky založené na sekvenování příští generace (NGS) umožňují analýzu větších cílových oblastí, panelů s více geny. Pro většinu těchto technologií se však doporučuje větší množství vstupní DNA než pro digitální PCR.

Teoreticky možné je tedy možné využít ctDNA jako marker diagnostický, marker reziduální nemoci, marker prognostický i jako marker časné rekurence onemocnění [128]. Bylo by i možné cílení onkologické léčby na základě genetického profilu nádoru, jež by byl stanoven pouhým odběrem krevní plazmy, např. mutace *KRAS*, resp. změna mutace během léčby.

V současnosti je diagnóza nádorového onemocnění určena biopsií nádoru. V této tkáni je pak možné stanovit příslušné mutace. Odběr tkáňové biopsie je pro pacienta zatěžující.

Ukázalo se navíc, že mutační profil nádoru je heterogenní, různé okrsky nádoru mohou obsahovat buňky s různými typy mutací. Vlastní tkáňová biopsie odebraná z jednoho místa nemusí tuto heterogenitu obsahovat. CtDNA lépe odráží heterogenitu nádoru a mohla by nahradit tkáňovou biopsii, jedná se o tekutou biopsii (liquid biopsy). Problémem je nízká koncentrace ctDNA u časných forem nádorového onemocnění a také, že některé mutace se vyskytují i u nenádorových onemocnění.

CtDNA je možné prokazovat ze séra, z krevní plazmy i z moči. V séru se nachází zvýšené hladiny cirkulující volné DNA, které jsou pravděpodobně výsledkem kontaminace DNA uvolněné z bílých krvinek. Plazma je proto pro analýzu ctDNA vhodnější [129].

Pokud má chemoterapie dobrou léčebnou odpověď, množství ctDNA klesá, v opačném případě nikoliv [130-132].

Pokud se porovnájí hladiny ctDNA a CTC zjistíme, že spolu nekorelují. V již zmíněné práci Bettogowda et al. nebyli žádní pacienti, u kterých byly přítomné CTC, ale u nichž by chyběla ctDNA. Avšak v případech, kdy byla detekována ctDNA (13 z 16, 81 %) nebyly detekovatelné CTC. Ve třech případech byly detekovány hladiny CTC i ctDNA. Průměrný počet mutantních fragmentů v plazmě byl > 50krát vyšší v případě ctDNA než analogické hladiny v CTC [96].

4. Vymezení cílů práce, stanovení hypotéz

Až u 30 % pacientů podstupující předoperační NCHRT nastává kompletní patologická odpověď, tzn. situace, kdy již není nádor v resektátu prokázán. Tito nemocní pak mají velmi dobrou prognózu. Naopak u 40 % pacientů je odpověď na léčbu minimální. Tito nonrespondeři z neoadjuvantní léčby neprofitují a jsou zbytečně vystaveni nežádoucím účinkům této léčby. NCHRT navíc významně zhoršuje pooperační funkční výsledky, zejména co se týká kontinence stolice, moči a sexuální dysfunkce. Nabízí se proto, aby tato skupina nemocných NCHRT nepodstupovala a byla přímo operována.

Proto se hledají prediktivní markery, podle kterých by bylo možné odlišit respondery a nonrespondery. Z výše uvedeného je zřejmé, že žádný z doposud zkoumaných markerů není dostatečně spolehlivý.

Mezi nově zkoumané markery patří volná nádorová DNA (ctDNA).

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda jsme schopni na základě hladin ctDNA v krevním séru nemocných predikovat terapeutickou odpověď na NCHRT u nádorů rekta. Přesněji, zda existuje korelace mezi hladinami ctDNA v séru nemocných před zahájením a v průběhu chemoradioterapie a histopatologickým stupněm regrese nádoru a výsledným TNM stagingem. Pokud by tato korelace existovala, dovolovala by rozdělit pacienty na respondery a nonrespondery a modifikovat u každé skupiny multimodální léčbu. Dalším cílem bylo také zjistit, zda přítomnost ctDNA v séru nemocných má vliv na jejich přežití.

5. Metodika

Do prospektivní studie bylo zařazeno 36 pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta v období od 2013 do 2017. Soubor tvořilo 27 mužů a 9 žen s průměrným věkem 64,1 roku. Charakteristika souboru je uvedena v (Tab. 5).

Protokol studie byl schválen etickou komisí a pacienti účast ve studii potvrdili podpisem informovaného souhlasu.

U každého pacienta bylo provedeno koloskopické vyšetření a nádor byl histologicky verifikován. Předoperační staging onemocnění byl stanoven na základě vyšetření zobrazovacími technikami (CT, MR). Následně byl v rámci jednání mezioborového týmu určen přesný protokol léčby.

Nádorová tkáň (obvykle tři vzorky získané bioptickými kleštěmi) odebrané během počáteční endoskopie před onkologickou léčbou byly okamžitě zmrazeny na -30°C a odeslány do laboratoře ke genetickému testování. Následně byly nádorové tkáně vyšetřeny na přítomnost nejběžnějších mutací dříve pozorovaných u CRC (zahrnujících *KRAS* / MIM # 190070 /, *TP53* / MIM # 191170 /, *APC* / MIM # 611731 /, *PIK3CA* / MIM # 171834 /, *BRAF* / MIM # 164757 / a *CTNNB1* / MIM # 166806 /). Plazma byla získána centrifugací ze vzorků krve odebraných před a během NCHRT.

Všichni pacienti podstoupili neoadjuvantní chemoradioterapii skládající se z 50.4 Gy radiace a konkomitantního podání Xelody (capecitabin) v celkové dávce 825 mg/m^2 . Ozáření bylo provedeno formou 25 frakcí s úvodním boostem 5.4 Gy. Po ukončení prvního týdne NCHRT byl proveden kontrolní odběr na přítomnost ctDNA v séru. Za 6 týdnů po ukončení NCHRT bylo provedeno kontrolní MR pánve. V odstupu 8-10 týdnů po ukončení NCHRT všichni pacienti podstoupili operaci. Resekát byl podrobně histopatologicky zhodnocen patologem, byl určen pTNM nádoru a také vyšetřena histopatologická regrese nádoru po proběhlé NCHRT.

Pacienti byli sledováni po dobu nejméně 3 let po operaci. V pravidelných intervalech bylo prováděno standardní vyšetření nádorových markerů, kolonoskopie a zobrazení pomocí počítačové tomografie (CT).

Tab. 5 Charakteristika souboru pacientů. V tabulce je uveden věk, pohlaví pacientů a klinické stádium nemoci

<u>Pacient</u>	<u>Pohlaví</u>	<u>Věk</u>	<u>Stádium</u>
1	M	68	2
2	M	63	2
3	M	73	3
4	M	74	2
5	F	73	3
6	M	64	3
7	M	62	3
8	F	36	3
9	F	61	3
10	M	70	3
11	M	64	2
12	M	79	2
13	F	59	2
14	M	61	3
15	M	62	2
16	M	53	3
17	M	79	2
18	M	64	2
19	M	72	3
20	F	30	3
21	F	64	3
22	M	60	3
23	F	74	3
24	M	63	3
25	M	74	3
26	F	66	2
27	M	52	3
28	M	64	2
29	M	83	3
30	M	74	3
31	M	62	3
32	F	63	3
33	M	58	3
34	M	58	3
35	M	63	3
36	M	62	3

Vyšetření mutaci, stanovení ctDNA

Extrakce DNA z nádorové tkáně a plazmy byla prováděna pomocí standardních postupů. K extrakci ze vzorků tkáně byla použita sada GenElute™ pro savčí genomovou DNA Miniprep (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Extrakce ctDNA ze vzorků krevní plazmy byla provedena pomocí soupravy NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Düren, Německo), objem zpracované plazmy byl 600 µl, což poskytlo typicky mezi 5 a 50 ng cfDNA na vzorek stanovenou fluorometrem Qubit 2.0 (Life Technologies, Camarillo, CA).

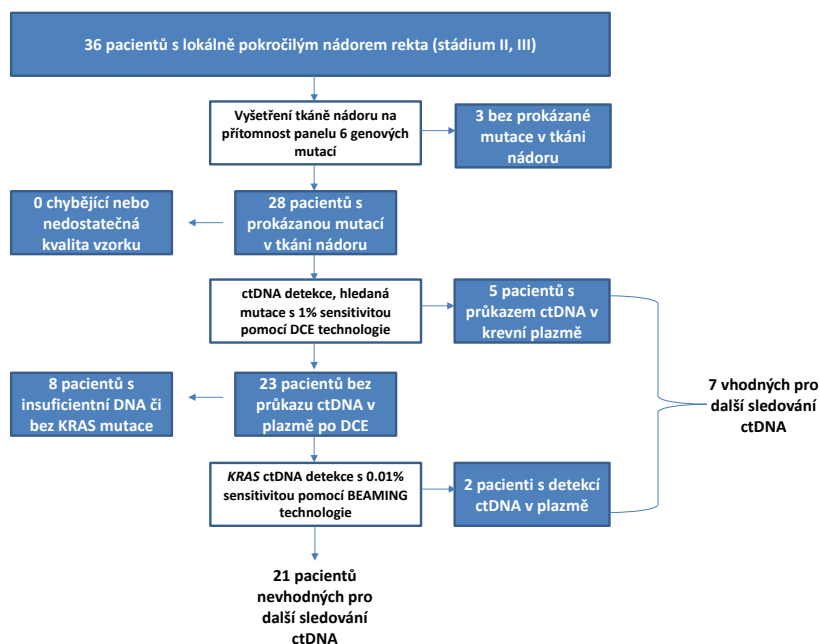
Podobně jako v jiných pracích [130-132] byla mutační analýza vzorků tkání zaměřena na panel vybraných onkogenů s nejvyšším podílem somatických mutací u nádoru rekta podle mezinárodní „databáze COSMIC“ (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Tento panel zahrnoval hotspoty v *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* a *CTNNB1*, stejně jako vybrané oblasti tumor supresorových genů *APC* (mutační klastrová oblast) a *TP53* (exony 5–8). Mutační analýzy byly prováděny metodou denaturační kapilární elektroforézy (DCE) s využitím dříve popsáných experimentálních parametrů (Obr. 5) [133-136].



Obr. 5 Záznam z analýzy pomocí denaturační kapilární elektroforézy. PCR produkt bez mutace - wildtype (A), PCR produkt s mutací - mutant (B)

Somatické mutace detekované ve vzorcích tkáně byly následně vyšetřeny ve vzorcích cfDNA získaných z plazmy. Genetické testování bylo provedeno pomocí dvou samostatných metod, jak bude dále diskutováno. Podskupina vzorků, u kterých nebyla metodou DCE ctDNA prokázána [137], byla následně znovu testována pomocí „BEAMING assay“ s vysokým rozlišením [138] zaměřeným na detekci *KRAS*-specifické ctDNA. Vyšetření bylo provedeno externí smluvní laboratoří (Oddělení patologie, Jesseniova lékařská fakulta Univerzity Komenského v Martině, Slovensko).

Podrobnosti víceúrovňového přístupu k testování ctDNA jsou uvedeny na (Obr. 6) a dále podrobně v sekci Diskuse.



Obr. 6 Víceúrovňový algoritmus kaskádového testování pro hodnocení cirkulující nádorové DNA (ctDNA) zahrnující standardní přístupy [denaturující kapilární elektroforéza (DCE)] a vysoce citlivý (BEAMING *) přístup. * Technologie BEAMING byla provedena pomocí experimentálního nastavení na sadě archivovaných vzorků ctDNA. Toto nastavení výzkumu se liší od protokolů používaných při pravidelném testování s certifikací IVD-CE.

Statistické metody

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí jazyka R pro statistické výpočty a grafiku [139]. Vzájemné vztahy mezi přežitím nemocných a dalšími prediktory, jako je přítomnost ctDNA před a během NCHRT, byly analyzovány pomocí Coxova modelu proporcionálního rizika a t-testů a vyneseny pomocí boxplots a Kaplan-Meierových křivek. Výstupy s hodnotami $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

6. Výsledky

Léčebná odpověď na NCHRT určená pomocí TRG skóre je uvedena v (Tab. 6).

Tab. 6 Klinické stádium nemoci, TNM staging před zahájením NCHRT (TNM I) a 6 týdnů po jejím ukončení (TNM II), tumor regression grade (TRG), prokázané mutace, přítomnost ctDNA v plazmě před zahájením léčby

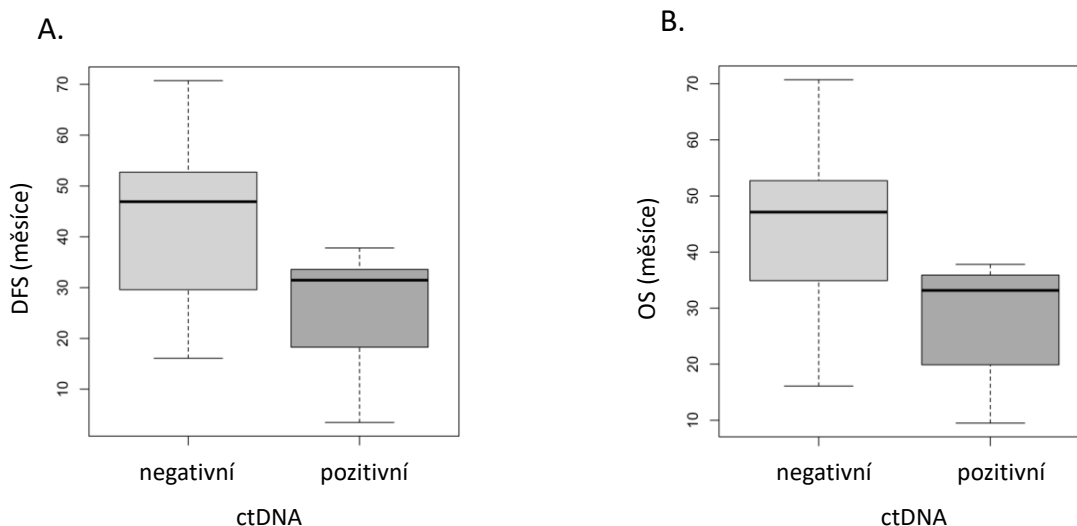
Pacient	Stádium	TNM I			TNM II			TRG	Mutace	ctDNA
1	2	3	0	0	3	0	0	2	<i>TP53</i>	0
2	2	3	0	0	0	0	0	4	<i>KRAS</i>	0
3	3	3	1	0	3	2a	0	2	<i>KRAS+APC</i>	0
4	2	3	0	0	3	2a	0	1	<i>KRAS</i>	0
5	3	3	1	0	2	0	0	2	<i>PIK3CA</i>	0
6	3	4	1	0	3	1c	0	1	<i>APC</i>	0
7	3	3	1	0	3	2b	0	2	<i>TP53+APC</i>	0
8	3	3	1	0	2	0	0	2	<i>APC</i>	0
9	3	3	1	0	0	0	0	4	<i>TP53</i>	0
10	3	3	1	0	2	0	0	2	<i>KRAS+PIK3CA</i>	0
11	2	3	0	0	2	0	0	3	0	0
12	2	3	0	0	3	1a	0	2	<i>TP53</i>	0
13	2	3	0	0	3	0	0	1	<i>KRAS+TP53</i>	0
14	3	3	1	0	3	2a	0	1	<i>KRAS+TP53</i>	x
15	2	3	0	0	3	0	0	2	<i>TP53/PIK3CA</i>	0
16	3	3	1	0	3	1a	0	2	<i>APC</i>	0
17	2	3	0	0	2	0	0	2	<i>KRAS</i>	0
18	2	3	1	0	3	1a	0	2	<i>TP53</i>	0
19	3	2	1	0	2	2b	0	2	<i>BRAF/TP53</i>	0
20	3	1	1	0	1	1b	0	1	<i>KRAS/TP53</i>	x
21	3	2	1	0	1	0	0	2	<i>KRAS/APC</i>	0
22	3	3	1	0	3	0	0	2	0	0
23	3	3	1	0	3	2b	0	1	<i>KRAS</i>	0
24	3	3	1	0	1	0	0	2	<i>TP53</i>	0
25	3	3	1	0	1	0	0	2	<i>KRAS</i>	x
26	2	4	0	0	2	0	0	1	<i>KRAS</i>	x
27	3	3	1	0	2	0	0	1	<i>KRAS/APC</i>	x
28	2	3	0	0	2	1c	0	3	<i>KRAS</i>	x
29	3	3	1	0	3	2a	0	2	<i>KRAS</i>	x
30	3	3	2	0	3	0	0	1	<i>KRAS</i>	0
31	3	3	2	0	3	2	0	1	<i>TP53</i>	0
32	3	3	1	0	0	0	0	4	<i>APC</i>	0
33	3	3	1	0	2	0	0	2	<i>KRAS</i>	0
34	3	3	0	0	3	0	0	2	<i>KRAS</i>	0
35	3	3	1	0	2	1	0	1	<i>KRAS</i>	0
36	3	3	1	0	3	0	0	2	0	0

Příznivá odpověď na léčbu (TRG skóre 3 nebo 4) byla pozorována u pěti pacientů (5/36, 13,9 %), zatímco u 11 pacientů (11/36, 30,5 %) byla léčebná odpověď velmi malá nebo žádná (TRG skóre 0 nebo 1). Při hodnocení účinku NCHRT ve vztahu ke stadiu onemocnění vykazovali někteří pacienti posun směrem k nižšímu TNM stadiu (Tab 6).

Z biopsií nádorové tkáně jsme před zahájením léčby detekovali somatické mutace u 33 z 36 pacientů (91,7 %). Nejčastěji jsme prokázali mutaci *KRAS* nebo *TP53* samostatně či s jiným typem mutace. Nebyl zjištěn žádný vztah mezi přítomností specifické mutace (nebo mutační kombinace) v nádorové tkáni a léčebnou odpovědí na NCHRT hodnocenou pomocí TRG nebo TNM stagingu (Tab 6).

Pomocí kombinace analytické metody s nízkým a vysokým rozlišením byla ctDNA detekována ve vzorcích plazmy u sedmi pacientů před zahájením NCHRT (7/33, 21,2 %). Přítomnost ctDNA před zahájením léčby měla prognostický vliv. Zatímco celková pravděpodobnost tříletého přežití byla u všech pacientů 86,7 %, v podskupině ctDNA negativních pacientů bylo celkové tříleté přežití 91,2 %, ale v podskupině pacientů ctDNA pozitivních to bylo 71,4 %.

Při porovnání obou skupin pacientů s pozitivní a negativní ctDNA byla pozitivita ctDNA před zahájením NCHRT významně spojena se signifikantně kratším DFS i OS (Obr. 7).

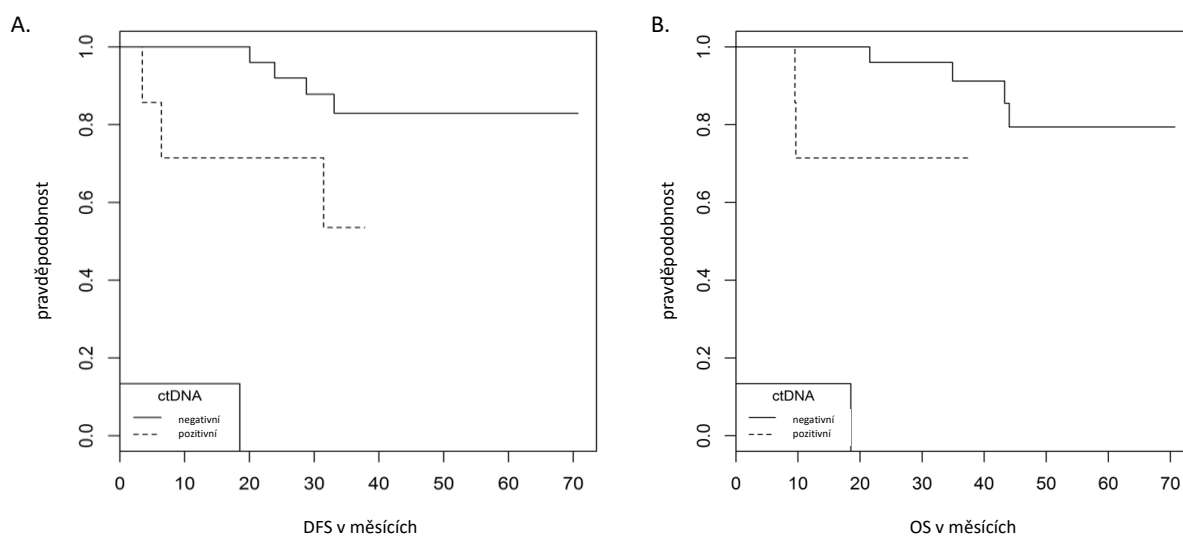


Obr. 7 Vliv předléčebné pozitivivity ctDNA na dobu bez nemoci, DFS (A) a celkové přežití, OS (B), boxplot, doba v měsících.

DFS i OS bylo u těchto pacientů kratší průměrně o 1,47, respektive 1,41 roku [$t(\text{DFS}) = 2,95$, $df(\text{DFS}) = 9,88$, $p(\text{DFS}) = 0,015$ a $t(\text{OS}) = 3,15$, $df(\text{OS}) = 10,31$, $p(\text{OS}) = 0,010$].

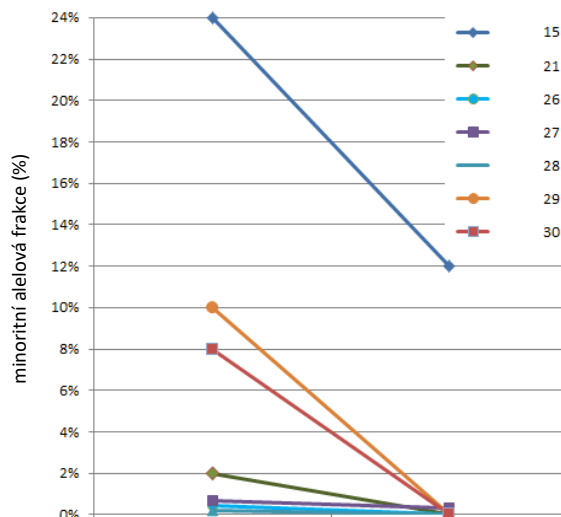
Pravděpodobnost přežití v závislosti na ctDNA je také dokumentována Kaplan-Meierovou analýzou (Obr. 8). Rozdíl je statisticky významný ($p = 0,05$ resp. $p = 0,01$)

Obr. 8 Pravděpodobnost DFS (A) a OS (B) v závislosti na pozitivitě ctDNA před zahájením NCHRT, Kaplan-Meier graf, doba v měsících, $p = 0,05$ resp. $p = 0,01$



Časná dynamika hladin ctDNA odhalila zajímavý jev, jak ukazuje (Obr. 6).

Obr. 6 Dynamika hladin ctDNA během prvního týdne NRCT. Množství ctDNA je prezentováno jako procento fragmentů DNA nesoucích nádorově specifickou mutaci detekovaných v plazmě (označeno jako minoritní alelová frakce, minor allele fraction, MAF). Znázornění pacienti č. 15, 21, 26, 27, 28, 29 a 30.



CtDNA byla během prvního týdne NCHRT bez rozdílu eliminována nebo významně snížena z krevního oběhu u všech pacientů. Neprokázali jsme žádnou souvislost mezi změnou hladin ctDNA (před a během NCHRT) a léčebnou odpovědí na NCHRT hodnocenou pomocí TRG.

7. Diskuse

V této studii jsme se zaměřili na predikci terapeutického účinku NCHRT u nádoru rekta pomocí stanovení hladiny ctDNA.

V literatuře je několik prací zkoumající souvislost mezi přítomností cfDNA/ctDNA a predikcí léčebné odpovědi na NCHRT u nádorů rekta.

Zitta et al. stanovil hladinu cirkulující DNA u lokálně pokročilého karcinomu rekta (LARC) před léčbou, po ukončení NCHRT a po operaci [140]. Soubor rozdělil na nonrespondery a respondery. Medián hladiny předléčebné cfDNA byl 4.2 ng/ml, po ukončení NCHRT 1 ng/ml a po operaci 4.1 ng/ml. Zjistil, že předléčebné hladiny ctDNA nonresponderů a responderů se neliší. Na konci léčby, ale byla hladina ctDNA vyšší ve skupině nonresponderů. Prakticky u všech pacientů hladina cfDNA poklesla po ukončení NCHRT. Limitem této práce byl malý počet pacientů.

Agostini [141] v roce 2011 publikoval soubor 67 pacientů s LARC. Měřil hladiny cfDNA před, v průběhu a po ukončení NCHRT. Stanovil celkovou koncentraci cfDNA, podíl dlouhých a krátkých fragmentů DNA, tzv. DNA integrity index. Podobně jako Zitta nezjistil korelaci předléčebné hladiny cfDNA a odpovědi na NCHRT. Podařilo se mu prokázat, že u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu byl po ukončení NCHRT DNA integrity index u responderů signifikantně nižší než u nonresponderů.

Suna et. al. již nehledal jen celkovou volnou DNA (cfDNA), ale i konkrétní nádorové mutace v krevní plazmě (ctDNA)[142]. Sun ověřil, že množství cfDNA u pacientů s CRC je signifikantně vyšší než u zdravých jedinců. Dále zjišťoval koncentraci dvou fragmentů DNA (100bp a 400bp) v plazmě před NCHRT a po jejím ukončení. Zjistil, že koncentrace fragmentu 400 bp byla signifikantně nižší po ukončení NCHRT ve skupině responderů.

Carpinetti et al. [143] odběrem tkáně nádoru a následným celogenovým sekvenováním nádorové DNA určil u každého ze 4 pacientů specifické DNA fragmenty. Tyto fragmenty pak hledal v krevní plazmě. Zjistil, že u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu došlo během NCHRT k poklesu ctDNA. Její opětovný vzestup byl spojen s progresí onemocnění a předcházel vzestupu CEA a manifestaci rekurence na zobrazovacích vyšetřeních. Pro velmi malý počet pacientů nelze výsledky korelovat.

Li et al. zjišťoval hladiny ctDNA před a v průběhu NCHRT. Predikce léčebné odpovědi na základě pozitivitu ctDNA v úvodu léčby dosahovala 70 % [144]. Yang na větším souboru pacientů naopak nepotvrdil souvislost mezi předléčebnou hladinou ctDNA a odpovědí na NCHRT u pacientů s nádory rekta [145].

V naší studii jsme předpokládali, že časné změny plazmatických hladin ctDNA v průběhu NCHRT odrážejí účinek léčby a budou tedy využitelné k predikci terapeutické odpovědi. Očekávali jsme, že po vyhodnocení dynamiky plazmatických hladin ctDNA budeme schopni odlišit skupinu pacientů neodpovídající na NCHRT a ušetřit je tak od nežádoucích účinků této léčby. Na základě toho jsme stanovili hladiny ctDNA před zahájením NCHRT a bezprostředně na konci prvního týdne léčby. Také jsme se zaměřili na nalezení potenciálních korelací mezi léčebnou odpovědí na NCHRT a mutacemi v panelu šesti běžně zkoumaných genů.

Z předchozích prací je patrné, že existuje velká variabilita v přítomnosti ctDNA krevní plazmě nemocných. Toto rozmezí je od 15 do 77 % u různých skupin pacientů s LARC a je závislé především na stadiu onemocnění [146]. Abychom snížili vysoké náklady spojené se stanovením ctDNA a umožnili tak finančně efektivní rutinní diagnostický přístup, použili jsme v této práci kaskádový přístup (Obr 1). Prvním krokem bylo stanovení ctDNA pomocí relativně jednoduché a rychlé metody DCE (denaturující kapilární elektroforéza), která vyžadovala pouze malé množství vzorků (600 μ l plazmy). DCE byla schopná odhalit přítomnost ctDNA na > 1% frakce minoritní alely (MAF) za pouhé 2 hodiny [137, 146]. Teprve v případě negativního výsledku jsme provedli stanovení ctDNA pomocí BEAMING metody. BEAMING (beads, emulsion, amplification and magnetics) je modifikace PCR, která vede k navázání amplifikovaného produktu jednotlivých fragmentů ctDNA na magnetické kuličky a jejich následné detekci pomocí průtokové cytometrie. Tento postup vykazuje citlivost až 0,01 % minoritní alelové frakce (MAF). K analýze byla využita zbytková množství archivovaných ctDNA, která byla ponechána z předchozího testování. Vzhledem k specifičnosti BEAMING metody jsme takto byli schopni vyšetřit jen pacienty s nádory, u kterých byla prokázána mutace *KRAS*. Testování pomocí DCE odhalilo pozitivitu ctDNA u pěti pacientů (5/30, 16,7 %), testování pomocí BEAMING odhalilo pozitivitu ctDNA u dalších dvou pacientů (2/4, 50 %). Celkově jsme ctDNA prokázali u 23,3 % (7/30). Vyšší průkaz ctDNA by vyžadoval jiné vysoce citlivé techniky např. vysoce nákladné ultra-hluboké sekvenování nové generace s využitím molekulárních barcodů, přesto náš výsledek je srovnatelný s dříve publikovanými údaji [126].

Na rozdíl od našich očekávání jsme nezaznamenali žádnou prediktivní korelaci mezi hladinami ctDNA a histopatologickou regresí nádoru (TRG) a TNM. Podobně ani žádná ze stanovených mutací neměla prediktivní vztah k TRG a TNM.

Přesto jsme prokázali, že pacienti, u kterých byla vstupně prokázána ctDNA, měli kratší celkové přežití (OS) a kratší dobu bez nemoci (DFS), než pacienti bez přítomnosti ctDNA

v krevní plazmě (Obr. 8). To je v souladu s předchozí prací Tie et al., která uváděla ctDNA jako negativní prognostický faktor pro celkové přežití pacientů [147]. U většiny pacientů pozitivních na ctDNA následné CT či MR vyšetření skutečně odhalilo přítomnost dříve nerozpoznaných mikrometastáz. Pozitivita ctDNA by proto mohla být považována za vodítko pro rozhodnutí související s terapií po chirurgické léčbě [148-151].

Je zajímavé, že u všech pacientů jsme na konci prvního týdne NCHRT pozorovali významné snížení nebo úplnou eliminaci ctDNA v krevní plazmě. Hladiny ctDNA byly bohužel sníženy bez ohledu na případný terapeutický výsledek. Zdá se, že tato jednoznačná rychlá clearance ctDNA po aplikaci chemoradioterapie naznačuje přítomnost obecnějšího jevu, který nesouvisí se skutečnými charakteristikami pacienta nebo specifickou biologií nádoru. Eliminace ctDNA z plazmy je primárně výsledkem enzymatického štěpení [152, 153]. Nedávno bylo zveřejněno, že některé DNA exonukleázy jsou aktivní při opravě DNA a uvolňují se v důsledku radiačního poškození [154]. Lze předpokládat, že taková radiačně indukovaná aktivita exonukleáz by mohla vést k dočasnému vymizení ctDNA po podání onkologické léčby. Většina prací zkoumající ctDNA při onkologické léčbě monitoruje hladiny ctDNA sedmý den či později po zahájení léčby [155-157]. Za účelem objasnění výše uvedených jevů by mělo být monitorování ctDNA prováděno časněji a v ještě kratších časových intervalech od zahájení této léčby. Nedávno byl použit podobný přístup zaměřený na hodnocení ctDNA v moči pro monitorování dynamiky nádorové odpovědi na cílenou protinádorovou léčbu u nemalobuněčného karcinomu plic [158].

Stanovení ctDNA během počáteční fáze NCHRT, tzn. během několika hodin od zahájení léčby a sledování dynamiky hladin ctDNA během následujících dnů by mohlo doložit změny v hladinách ctDNA, jejichž podkladem jsou morfologické změny nádoru a jeho poškození vyplývající z podané multimodální terapie. Podrobné pochopení časování uvolňování a clearance ctDNA v průběhu onkologické léčby může být vodítkem pro využití ctDNA k predikci terapeutické odpovědi na NCHRT u lokálně pokročilého nádoru rekta.

8. Závěry

V práci jsme prokázali, že monitorování časných změn hladin ctDNA u pacientů s lokálně pokročilým nádorem rekta podstupujících NCHRT může být klinicky důležité. Použitím víceúrovňového detekčního přístupu jsme byli schopni sledovat dynamiku ctDNA u 7 pacientů podstupující NCHRT. Prokázali jsme, že přítomnost ctDNA v krevní plazmě nemocných před operací je negativní prognostický faktor pro přežití pacientů a mohla by být využita k cílení adjuvantní onkologické léčby. Pozorovali jsme snížení hladin ctDNA u všech pacientů během počátečního týdne NCHRT, ale bez jakékoliv přímé souvislosti s léčebnou odpovědí hodnocenou pomocí TRG a TNM. Na základě stanovení hladin ctDNA jsme nedokázali předpovědět terapeutickou odpověď na předoperační NCHRT u lokálně pokročilého nádoru rekta.

Naše zjištění, ale mohou otevřít nové cesty k výzkumu mechanismů uvolňování a clearance ctDNA po poškození buněk v důsledku kombinovaných účinků chemoradioterapie a jejich případné využití k predikci a cílení onkologické léčby.

9. Literatura

1. Fokas, E., et al., *Randomized Phase II Trial of Chemoradiotherapy Plus Induction or Consolidation Chemotherapy as Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer: CAO/ARO/AIO-12*. J Clin Oncol, 2019. **37**(34): p. 3212-3222.
2. Maas, M., et al., *Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data*. Lancet Oncol, 2010. **11**(9): p. 835-44.
3. Fedirko, V., et al., *Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies*. Annals of Oncology, 2011. **22**(9): p. 1958-1972.
4. Botteri, E., et al., *Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis*. Jama, 2008. **300**(23): p. 2765-78.
5. Bardou, M., A.N. Barkun, and M. Martel, *Obesity and colorectal cancer*. Gut, 2013. **62**(6): p. 933-47.
6. Marley, A.R. and H. Nan, *Epidemiology of colorectal cancer*. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics, 2016. **7**(3): p. 105-114.
7. Lopez-Morra, H.A., et al., *Sa1444 Does Insulin Influence the Risk of Colon Adenomas and Colorectal Cancer? a Multicenter Look At a Minority Population*. Gastrointestinal Endoscopy, 2014. **79**(5): p. AB214.
8. Brennan, C.A. and W.S. Garrett, *Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer*. Annual review of microbiology, 2016. **70**: p. 395-411.
9. Ajouz, H., D. Mukherji, and A. Shamseddine, *Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer*. World Journal of Surgical Oncology, 2014. **12**: p. 164-164.
10. Lin, J.H., et al., *Association between Sex Hormones and Colorectal Cancer Risk in Men and Women*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2013. **11**(4): p. 419-424.e1.
11. Chetwynd, A.J., et al., *The potential of nanoflow liquid chromatography-nano electrospray ionisation-mass spectrometry for global profiling the faecal metabolome*. Journal of Chromatography A, 2019.
12. Crooke, H., et al., *Estimating 1- and 5-year relative survival trends in colorectal cancer (CRC) in the United States: 2004 to 2014*. Journal of Clinical Oncology, 2018. **36**(4_suppl): p. 587-587.
13. Dixon, C.F., *Anterior Resection for Malignant Lesions of the Upper Part of the Rectum and Lower Part of the Sigmoid*. Ann Surg, 1948. **128**(3): p. 425-42.
14. Heald, R.J., E.M. Husband, and R.D. Ryall, *The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence?* Br J Surg, 1982. **69**(10): p. 613-6.
15. Quirke, P., et al., *LOCAL RECURRENCE OF RECTAL ADENOCARCINOMA DUE TO INADEQUATE SURGICAL RESECTION: Histopathological Study of Lateral Tumour Spread and Surgical Excision*. The Lancet, 1986. **328**(8514): p. 996-999.
16. Bugg, W.G., et al., *The prognostic significance of MRI-detected extramural venous invasion in rectal carcinoma*. Clin Radiol, 2014. **69**(6): p. 619-23.
17. Shin, R., et al., *Depth of mesorectal extension has prognostic significance in patients with T3 rectal cancer*. Dis Colon Rectum, 2012. **55**(12): p. 1220-8.
18. Merkel, S., et al., *The prognostic inhomogeneity in pT3 rectal carcinomas*. Int J Colorectal Dis, 2001. **16**(5): p. 298-304.

19. Zinicola, R., et al., *The degree of extramural spread of T3 rectal cancer: an appeal to the American Joint Committee on Cancer*. *Colorectal Dis*, 2017. **19**(1): p. 8-15.
20. Brown, G., et al., *Morphologic predictors of lymph node status in rectal cancer with use of high-spatial-resolution MR imaging with histopathologic comparison*. *Radiology*, 2003. **227**(2): p. 371-7.
21. Taylor, F.G., et al., *Preoperative high-resolution magnetic resonance imaging can identify good prognosis stage I, II, and III rectal cancer best managed by surgery alone: a prospective, multicenter, European study*. *Ann Surg*, 2011. **253**(4): p. 711-9.
22. Gessler, B., O. Eriksson, and E. Angenete, *Diagnosis, treatment, and consequences of anastomotic leakage in colorectal surgery*. *Int J Colorectal Dis*, 2017. **32**(4): p. 549-556.
23. Rahbari, N.N., et al., *Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: a proposal by the International Study Group of Rectal Cancer*. *Surgery*, 2010. **147**(3): p. 339-51.
24. Martinek, L., et al., *[Intra-operative fluorescence angiography of colorectal anastomotic perfusion: a technical aspects]*. *Rozhl Chir*, 2018. **97**(4): p. 167-171.
25. Ekkarat, P., et al., *Factors determining low anterior resection syndrome after rectal cancer resection: A study in Thai patients*. *Asian Journal of Surgery*, 2016. **39**(4): p. 225-231.
26. Keane, C., et al., *Defining low anterior resection syndrome: a systematic review of the literature*. *Colorectal Dis*, 2017. **19**(8): p. 713-722.
27. Contin, P., et al., *Comparative analysis of late functional outcome following preoperative radiation therapy or chemoradiotherapy and surgery or surgery alone in rectal cancer*. *International Journal of Colorectal Disease*, 2014. **29**(2): p. 165-175.
28. Birgisson, H., et al., *Adverse effects of preoperative radiation therapy for rectal cancer: long-term follow-up of the Swedish Rectal Cancer Trial*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(34): p. 8697-705.
29. van Gijn, W., et al., *Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial*. *The Lancet Oncology*, 2011. **12**(6): p. 575-582.
30. Dworak, O., L. Keilholz, and A. Hoffmann, *Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy*. *Int J Colorectal Dis*, 1997. **12**(1): p. 19-23.
31. Rodel, C., et al., *Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(34): p. 8688-96.
32. Mandard, A.M., et al., *Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations*. *Cancer*, 1994. **73**(11): p. 2680-6.
33. Forster, S., et al., *Differential effects of alpha-catenin on the invasion and radiochemosensitivity of human colorectal cancer cells*. *Int J Oncol*, 2018. **52**(4): p. 1117-1128.
34. Fokas, E., et al., *Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(15): p. 1554-62.
35. Kim, S.H., et al., *What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy?* *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, 2016. **48**(3): p. 998-1009.

36. Birgisson, H., et al., *Late adverse effects of radiation therapy for rectal cancer - a systematic overview*. Acta Oncol, 2007. **46**(4): p. 504-16.
37. Dahlberg, M., et al., *Preoperative irradiation affects functional results after surgery for rectal cancer: results from a randomized study*. Dis Colon Rectum, 1998. **41**(5): p. 543-9; discussion 549-51.
38. Pollack, J., et al., *Long-term effect of preoperative radiation therapy on anorectal function*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(3): p. 345-52.
39. Peeters, K.C., et al., *Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients--a Dutch colorectal cancer group study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 6199-206.
40. Holm, T., et al., *Adjuvant preoperative radiotherapy in patients with rectal carcinoma. Adverse effects during long term follow-up of two randomized trials*. Cancer, 1996. **78**(5): p. 968-76.
41. Frykholm, G.J., B. Glimelius, and L. Pahlman, *Preoperative or postoperative irradiation in adenocarcinoma of the rectum: final treatment results of a randomized trial and an evaluation of late secondary effects*. Dis Colon Rectum, 1993. **36**(6): p. 564-72.
42. Birgisson, H., et al., *Occurrence of second cancers in patients treated with radiotherapy for rectal cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 6126-31.
43. Hofheinz, R.D., et al., *Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(6): p. 579-88.
44. Wong, R.K., et al., *Pre-operative radiotherapy and curative surgery for the management of localized rectal carcinoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(2): p. Cd002102.
45. Pahlman, L., et al., *The Swedish rectal cancer registry*. Br J Surg, 2007. **94**(10): p. 1285-92.
46. Glynne-Jones, R., et al., *Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†*. Annals of Oncology, 2017. **28**(suppl_4): p. iv22-iv40.
47. Song, J.H., et al., *Preoperative chemoradiotherapy versus postoperative chemoradiotherapy for stage II-III resectable rectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Radiat Oncol J, 2017. **35**(3): p. 198-207.
48. McCarthy, K., et al., *Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **12**: p. Cd008368.
49. Rengo, M., et al., *Magnetic resonance tumor regression grade (MR-TRG) to assess pathological complete response following neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(70): p. 114746-114755.
50. Maas, M., et al., *Assessment of Clinical Complete Response After Chemoradiation for Rectal Cancer with Digital Rectal Examination, Endoscopy, and MRI: Selection for Organ-Saving Treatment*. Ann Surg Oncol, 2015. **22**(12): p. 3873-80.
51. Habr-Gama, A., et al., *Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results*. Ann Surg, 2004. **240**(4): p. 711-7; discussion 717-8.
52. Habr-Gama, A., et al., *Local recurrence after complete clinical response and watch and wait in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: impact of salvage therapy on local disease control*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014. **88**(4): p. 822-8.

53. Maas, M., et al., *Wait-and-see policy for clinical complete responders after chemoradiation for rectal cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(35): p. 4633-40.
54. van der Paardt, M.P., et al., *Patients who undergo preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer restaged by using diagnostic MR imaging: a systematic review and meta-analysis*. Radiology, 2013. **269**(1): p. 101-12.
55. Choi, H., et al., *Voxel-based dual-time (18)F-FDG parametric imaging for rectal cancer: differentiation of residual tumor from postchemoradiotherapy changes*. Nuclear Medicine Communications, 2013. **34**(12): p. 1166-1173.
56. Pazdirek, F., et al., *Current possibilities of predicting the therapeutic response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer*. 2020, Gastroent Hepatol. p. 393-403.
57. Garland, M.L., et al., *Clinical tumour size and nodal status predict pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2014. **29**(3): p. 301-7.
58. Qiu, H.Z., et al., *Combination of differentiation and T stage can predict unresponsiveness to neoadjuvant therapy for rectal cancer*. Colorectal Dis, 2011. **13**(12): p. 1353-60.
59. Kalady, M.F., et al., *Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer*. Ann Surg, 2009. **250**(4): p. 582-9.
60. Braendengen, M., et al., *Randomized phase III study comparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in nonresectable rectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(22): p. 3687-94.
61. Das, P., et al., *Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer*. Cancer, 2007. **109**(9): p. 1750-5.
62. Bozkaya, Y., et al., *Clinical predictive factors associated with pathologic complete response in locally advanced rectal cancer*. Journal of Oncological Sciences, 2018. **4**(1): p. 5-10.
63. Bustamante-Lopez, L.A., et al., *Pathologic complete response implies a fewer number of lymph nodes in specimen of rectal cancer patients treated by neoadjuvant therapy and total mesorectal excision*. Int J Surg, 2018. **56**: p. 283-287.
64. Lorimer, P.D., et al., *Pathologic Complete Response Rates After Neoadjuvant Treatment in Rectal Cancer: An Analysis of the National Cancer Database*. Annals of Surgical Oncology, 2017. **24**(8): p. 2095-2103.
65. Vaupel, P., O. Thews, and M. Hoekel, *Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia*. Med Oncol, 2001. **18**(4): p. 243-59.
66. Box, B., et al., *Neoadjuvant therapy for rectal cancer: improved tumor response, local recurrence, and overall survival in nonanemic patients*. Dis Colon Rectum, 2005. **48**(6): p. 1153-60.
67. Lee, H., et al., *Negative impact of pretreatment anemia on local control after neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery for rectal cancer*. Radiat Oncol J, 2012. **30**(3): p. 117-23.
68. Clarke, T.L., et al., *Predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer with serum biomarkers*. Ann R Coll Surg Engl, 2017. **99**(5): p. 373-377.
69. Hötker, A.M., et al., *Multiparametric MRI in the assessment of response of rectal cancer to neoadjuvant chemoradiotherapy: A comparison of morphological, volumetric and functional MRI parameters*. Eur Radiol, 2016. **26**(12): p. 4303-4312.

70. Kluza, E., et al., *T2 weighted signal intensity evolution may predict pathological complete response after treatment for rectal cancer*. Eur Radiol, 2013. **23**(1): p. 253-61.
71. DeVries, A.F., et al., *Tumor microcirculation and diffusion predict therapy outcome for primary rectal carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **56**(4): p. 958-65.
72. Devries, A.F., et al., *Tumor microcirculation evaluated by dynamic magnetic resonance imaging predicts therapy outcome for primary rectal carcinoma*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2513-6.
73. Kremser, C., et al., *Dynamic T(1) mapping predicts outcome of chemoradiation therapy in primary rectal carcinoma: sequence implementation and data analysis*. J Magn Reson Imaging, 2007. **26**(3): p. 662-71.
74. Lambrecht, M., et al., *Value of diffusion-weighted magnetic resonance imaging for prediction and early assessment of response to neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer: preliminary results*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **82**(2): p. 863-70.
75. Barbaro, B., et al., *Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in monitoring rectal cancer response to neoadjuvant chemoradiotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **83**(2): p. 594-9.
76. Elmi, A., et al., *Apparent diffusion coefficient as a non-invasive predictor of treatment response and recurrence in locally advanced rectal cancer*. Clin Radiol, 2013. **68**(10): p. e524-31.
77. Lambregts, D.M., et al., *MRI and Diffusion-weighted MRI Volumetry for Identification of Complete Tumor Responders After Preoperative Chemoradiotherapy in Patients With Rectal Cancer: A Bi-institutional Validation Study*. Ann Surg, 2015. **262**(6): p. 1034-9.
78. Goldberg, N., et al., *Early prediction of histopathological response of rectal tumors after one week of preoperative radiochemotherapy using (18) F-FDG PET-CT imaging. A prospective clinical study*. Radiation Oncology (London, England), 2012. **7**: p. 124-124.
79. Kim, J.W., et al., *Predictive value of (18)FDG PET-CT for tumour response in patients with locally advanced rectal cancer treated by preoperative chemoradiotherapy*. Int J Colorectal Dis, 2013. **28**(9): p. 1217-24.
80. Martoni, A.A., et al., *Prospective study on the FDG-PET/CT predictive and prognostic values in patients treated with neoadjuvant chemoradiation therapy and radical surgery for locally advanced rectal cancer*. Ann Oncol, 2011. **22**(3): p. 650-6.
81. Wallin, U., et al., *CEA - a predictor for pathologic complete response after neoadjuvant therapy for rectal cancer*. Dis Colon Rectum, 2013. **56**(7): p. 859-68.
82. Zeng, W.G., et al., *Clinical parameters predicting pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer*. Chin J Cancer, 2015. **34**(10): p. 468-74.
83. Moreno Garcia, V., et al., *Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(7): p. 741-8.
84. Moureau-Zabotto, L., et al., *Predictive factors of tumor response after neoadjuvant chemoradiation for locally advanced rectal cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. **80**(2): p. 483-91.
85. Wang, L., et al., *Prognostic value of pretreatment level of carcinoembryonic antigen on tumour downstaging and early occurring metastasis in locally advanced rectal*

- cancer following neoadjuvant radiotherapy (30 Gy in 10 fractions)*. *Colorectal Dis*, 2014. **16**(1): p. 33-9.
86. Kleiman, A., et al., *Normalization of CEA Levels Post-Neoadjuvant Therapy is a Strong Predictor of Pathologic Complete Response in Rectal Cancer*. *J Gastrointest Surg*, 2015. **19**(6): p. 1106-12.
 87. Jakob, C., et al., *Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(7): p. 1060-6.
 88. Negri, F.V., et al., *Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy*. *British Journal of Cancer*, 2008. **98**(1): p. 143-147.
 89. Spolverato, G., et al., *Predictive factors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy*. *Cancers (Basel)*, 2011. **3**(2): p. 2176-94.
 90. Kudrimoti, M., et al., *Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers*. *J Ky Med Assoc*, 2007. **105**(1): p. 18-22.
 91. Bengala, C., et al., *Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(7): p. 1019-24.
 92. Grimminger, P.P., et al., *Biomarkers for cetuximab-based neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(10): p. 3469-77.
 93. Garcia-Aguilar, J., et al., *Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer*. *Ann Surg*, 2011. **254**(3): p. 486-92; discussion 492-3.
 94. Garg, H., et al., *Survivin: a unique target for tumor therapy*. *Cancer Cell Int*, 2016. **16**: p. 49.
 95. Kim, K., et al., *High survivin expression as a predictor of poor response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 2011. **26**(8): p. 1019-23.
 96. Bettgowda, C., et al., *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra24.
 97. Shinto, E., et al., *Pretreatment CD133 and cyclooxygenase-2 expression as the predictive markers of the pathological effect of chemoradiotherapy in rectal cancer patients*. *Dis Colon Rectum*, 2011. **54**(9): p. 1098-106.
 98. Giralt, J., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy*. *Oncology*, 2006. **71**(5-6): p. 312-9.
 99. Spitz, F.R., et al., *p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(10): p. 1685-90.
 100. Rebischung, C., et al., *Prognostic value of P53 mutations in rectal carcinoma*. *Int J Cancer*, 2002. **100**(2): p. 131-5.
 101. Chen, M.B., et al., *P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment: a meta-analysis in rectal cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45388.

102. Huh, J.W., J.H. Lee, and H.R. Kim, *Pretreatment expression of 13 molecular markers as a predictor of tumor responses after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer*. *Ann Surg*, 2014. **259**(3): p. 508-15.
103. Stone, H.B., L.J. Peters, and L. Milas, *Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1979. **63**(5): p. 1229-35.
104. Yasuda, K., et al., *Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer*. *Radiat Oncol*, 2011. **6**: p. 49.
105. Kitayama, J., et al., *Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 64.
106. Tada, N., et al., *Prediction of the preoperative chemoradiotherapy response for rectal cancer by peripheral blood lymphocyte subsets*. *World J Surg Oncol*, 2015. **13**: p. 30.
107. Milne, K., et al., *Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 33.
108. Chen, Z., et al., *Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011. **50**(9): p. 689-99.
109. Spindler, K.L., et al., *Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors*. *Dis Colon Rectum*, 2007. **50**(9): p. 1363-9.
110. Hur, H., et al., *Thymidylate synthase gene polymorphism affects the response to preoperative 5-fluorouracil chemoradiation therapy in patients with rectal cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **81**(3): p. 669-76.
111. Ghadimi, B.M., et al., *Effectiveness of Gene Expression Profiling for Response Prediction of Rectal Adenocarcinomas to Preoperative Chemoradiotherapy*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2005. **23**(9): p. 1826-1838.
112. Rimkus, C., et al., *Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(1): p. 53-61.
113. Brettingham-Moore, K.H., et al., *Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(9): p. 3039-47.
114. Della Vittoria Scarpati, G., et al., *A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012. **83**(4): p. 1113-9.
115. Scott, N., et al., *A histopathological assessment of the response of rectal adenocarcinoma to combination chemo-radiotherapy: relationship to apoptotic activity, p53 and bcl-2 expression*. *Eur J Surg Oncol*, 1998. **24**(3): p. 169-73.
116. Rodel, C., et al., *Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. **52**(2): p. 294-303.
117. McDowell, D.T., et al., *Increased spontaneous apoptosis, but not survivin expression, is associated with histomorphologic response to neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 2009. **24**(11): p. 1261-9.

118. Tannapfel, A., et al., *Apoptosis, proliferation, bax, bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998. **41**(3): p. 585-91.
119. Bidard, F.C., et al., *Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(4): p. 406-14.
120. Ignatiadis, M., et al., *Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial*. *Eur J Cancer*, 2016. **63**: p. 97-104.
121. Rahbari, N.N., et al., *Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(5): p. 1714-26.
122. Magni, E., et al., *Detection of circulating tumor cells in patients with locally advanced rectal cancer undergoing neoadjuvant therapy followed by curative surgery*. *Int J Colorectal Dis*, 2014. **29**(9): p. 1053-9.
123. Sun, W., et al., *Circulating tumor cells: A promising marker of predicting tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiation therapy*. *Oncotarget*, 2016. **7**(43): p. 69507-69517.
124. Stroun, M., et al., *About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release*. *Clin Chim Acta*, 2001. **313**(1-2): p. 139-42.
125. Mouliere, F., et al., *Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer*. *Molecular Oncology*, 2014. **8**(5): p. 927-941.
126. Diehl, F., et al., *Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics*. *Nature Medicine*, 2008. **14**: p. 985.
127. Day, E., P.H. Dear, and F. McCaughan, *Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine*. *Methods*, 2013. **59**(1): p. 101-107.
128. Ondrouskova, E. and R. Hrstka, *[Circulating Tumor DNA in Blood and Its Utilization as a Potential Biomarker for Cancer]*. *Klin Onkol*, 2015. **28 Suppl 2**: p. 2s69-74.
129. El Messaoudi, S., et al., *Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations*. *Clinica Chimica Acta*, 2013. **424**: p. 222-230.
130. Sefrioui, D., et al., *Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer*. *Dig Liver Dis*, 2015. **47**(10): p. 884-90.
131. Spindler, K.L., et al., *Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer--results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(9): p. 2215-22.
132. Tie, J., et al., *Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(8): p. 1715-22.
133. Minarik, M., et al., *Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(7-8): p. 1016-21.
134. Prochazkova, K., et al., *Somatic TP53 mutation mosaicism in a patient with Li-Fraumeni syndrome*. *Am J Med Genet A*, 2009. **149a**(2): p. 206-11.
135. Hinselwood, D.C., T.W. Abrahamsen, and P.O. Ekstrom, *BRAF mutation detection and identification by cycling temperature capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2005. **26**(13): p. 2553-61.

136. Fiala, O., et al., *Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(4): p. 1705-11.
137. Levy, M., et al., *Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients*. *Anticancer Res*, 2012. **32**(5): p. 1621-6.
138. Diehl, F., et al., *BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions*. *Nat Methods*, 2006. **3**(7): p. 551-9.
139. Team., R.D.C., *A language and environment for statistical computing*. 2008, R Foundation for Statistical Computing.: Vienna, Austria.
140. Zitt, M., et al., *Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring*. *Dis Markers*, 2008. **25**(3): p. 159-65.
141. Agostini, M., et al., *Circulating cell-free DNA: a promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy*. *Ann Surg Oncol*, 2011. **18**(9): p. 2461-8.
142. Sun, W., et al., *The role of plasma cell-free DNA detection in predicting preoperative chemoradiotherapy response in rectal cancer patients*. *Oncol Rep*, 2014. **31**(3): p. 1466-72.
143. Carpinetti, P., et al., *The use of personalized biomarkers and liquid biopsies to monitor treatment response and disease recurrence in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation*. *Oncotarget*, 2015. **6**(35): p. 38360-71.
144. Li, M., et al., *Predictive value of circulating tumor DNA in locally advanced rectal cancer patients receiving neoadjuvant radiochemotherapy*. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. **35**(15_suppl): p. e15125-e15125.
145. Yang, L., et al., *Predicting treatment outcome of rectal cancer patients underwent neoadjuvant chemoradiotherapy by ctDNA: The potential use of ctDNA monitoring as organ-sparing approach*. *Journal of Clinical Oncology*, 2018. **36**(15_suppl): p. 3608-3608.
146. Benesova, L., et al., *Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients*. *Anal Biochem*, 2013. **433**(2): p. 227-34.
147. Tie, J., et al., *Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study*. *Gut*, 2018.
148. Hrebien, S., et al., *Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression-free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial*. *Ann Oncol*, 2019. **30**(6): p. 945-952.
149. Osumi, H., et al., *Early change in circulating tumor DNA as a potential predictor of response to chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 17358.
150. Reece, M., et al., *The Use of Circulating Tumor DNA to Monitor and Predict Response to Treatment in Colorectal Cancer*. *Front Genet*, 2019. **10**: p. 1118.
151. Benešová, L., et al., *Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA*. *World J Gastroenterol*, 2019. **25**(48): p. 6939-6948.
152. Khier, S. and L. Lohan, *Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature*. *Future Sci OA*, 2018. **4**(4): p. Fso295.
153. Kustanovich, A., et al., *Life and death of circulating cell-free DNA*. *Cancer biology & therapy*, 2019. **20**(8): p. 1057-1067.

154. Vanpouille-Box, C., et al., *DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15618.
155. Lyskjaer, I., et al., *Correlation between early dynamics in circulating tumour DNA and outcome from FOLFIRI treatment in metastatic colorectal cancer*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11542.
156. Vymetalkova, V., et al., *Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
157. Raja, R., et al., *Early Reduction in ctDNA Predicts Survival in Patients with Lung and Bladder Cancer Treated with Durvalumab*. Clinical Cancer Research, 2018. **24**(24): p. 6212.
158. Husain, H., et al., *Monitoring Daily Dynamics of Early Tumor Response to Targeted Therapy by Detecting Circulating Tumor DNA in Urine*. Clinical Cancer Research, 2017. **23**(16): p. 4716.