

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



DISERTAČNÍ PRÁCE

2025

Mgr. Dominika Bolcarovičová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Efekt a toxicita hypertermické
intraperitoneální chemoterapie

Mgr. Dominika Bolcarovičová

Olomouc 2025

Doktorský studijní program: Onkologie

Školitel: prof. MUDr. Beatrice Mohelníková Duchoňová, Ph.D.

PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC
FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY



Effect and toxicity of hyperthermic
intraperitoneal chemotherapy

Mgr. Dominika Bolcarovičová

Olomouc 2025

Doctoral Study Programme: Oncology

Supervisor: prof. MUDr. Beatrice Mohelníková Duchoňová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci na téma: „Efekt a toxicita hypertermické intraperitoneální chemoterapie“ vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité informační zdroje. Současně dávám souhlas k zařazení této práce do Knihovny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kde může být užívána ke studijním účelům, pro publikační či přednáškovou činnost za předpokladu, že bude jako zdroj řádně citována. Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze své doktorské práce v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 30. ledna 2025

Mgr. Dominika Bolcarovičová

Poděkování

Největší poděkování patří mé školitelce prof. MUDr. Beatrice Mohelníkové Duchoňové, Ph.D. za její cenné rady, odborné vedení, trpělivost a neustálou podporu. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům Mgr. Ondřeji Strouhalovi a Mgr. Kateřině Urban za sdílení svých znalostí a zkušeností, nápomocnost a vzájemnou spolupráci. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině, a především rodině mého manžela, bez jejichž podpory bych tuto práci nikdy nedokončila.

Disertační práce byla vypracována za finanční podpory grantů: NV19-03-00097, IGA_LF_2019_006, IGA_LF_2020_005, IGA_LF_2021_004, IGA_LF_2022_003, IGA_LF_2023_002, IGA_LF_2024_004 a NW24-03-00024.

Obsah

TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 Úvod.....	9
1.1 Cytoredukční operace (CRS)	12
1.2 Hypertermická intraperitoneální chemoterapie	13
1.2.1 Požadavky pro úspěšné provedení intraperitoneální chemoterapie a hodnocení toxicity.....	13
1.2.2 Clavien-Dindo klasifikace chirurgických komplikací.....	14
1.2.3 Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)	15
1.3 Selektce pacientů pro CRS a HIPEC.....	16
1.3.1 Zobrazovací metody	17
1.3.2 Skórovací systém pro peritoneální karcinomatózu	17
1.3.3 Cytoredukční skóre	18
1.4 Cytostatika používaná v rámci HIPEC.....	19
1.4.1 Hypertermie a její vliv na cytostatika	20
1.4.2 Protinádorová antibiotika	21
1.4.3 Taxany.....	21
1.4.4 Platinové deriváty.....	22
1.5 Využití CRS/HIPEC v klinické praxi.....	22
1.5.1 Peritoneální karcinomatóza	22
1.5.2 Mezoteliom.....	23
1.5.3 Novotvary apendixu s peritoneálním šířením	24
1.5.4 Koloréktální karcinom s peritoneálním šířením.....	24
1.5.5 Karcinom žaludku	25
2 Karcinom ovaria.....	27
2.1 Epidemiologie	27
2.2 Etiologie	29

2.3	Prevence a screening	30
2.4	Stanovení diagnózy	32
2.5	Staging.....	33
2.6	Prognóza.....	35
2.7	Histologie	36
2.8	Léčebná strategie	36
2.8.1	Chirurgický staging a primární debulkingová operace	36
2.8.2	Neoadjuvantní chemoterapie a intervalová debulkingová operace	37
2.8.3	Adjuvantní chemoterapie	37
2.8.4	Hypertermická intraperitoneální chemoterapie po cytoredukční operaci	38
2.8.5	Udržovací léčba PARP inhibitory	39
3	Molekulární dráhy	41
3.1	DNA repair	41
3.1.1	Alterace v dráze DNA repair u karcinomu ovaria.....	43
3.2	PI3K/AKT/mTOR	44
3.2.1	Alterace PI3K/AKT/mTOR dráhy u karcinomu vaječníků.....	46
	PRAKTICKÁ ČÁST	47
4.1	Pilotní práce k hodnocení toxicity HIPEC	47
4.1.1	Soubor pacientů a použitá metodika	47
4.1.2	Výsledky.....	48
4.2	Pilotní práce k zavedení metodiky stanovování exprese a hodnocení alterace genové exprese buněčné signalizace na tkáních karcinomu pankreatu	49
4.2.1	Materiál a použitá metodika	49
4.2.2	Výsledky.....	50
4.3	Hlavní téma práce.....	51
4.3.1	Soubor pacientek	51
4.3.2	Metody	51

5 Výsledky a diskuze.....	56
5.1 Charakteristika studované populace.....	56
5.2 Asociace mezi <i>BRCA1/2</i> mutacemi a expresí genů cílové signální dráhy	57
5.3 Celkové přežití a přežití bez progresu	58
5.4 Korelace mezi geny a asociace mezi expresními profily a celkovým přežíváním pacientek po HIPEC	60
5.5 Asociace mezi mírou postižení peritonea a expresí genů signálních drah účastnících se oprav DNA	65
5.6 Asociace mezi expresí genů signálních drah účastnících se oprav DNA a terapeutickými výsledky HIPEC	67
5.7 Toxicita po hypertermické intraperitoneální chemoterapii	69
5.8 Diskuze.....	71
6 Závěr.....	77
6.1 Seznam tabulek	77
6.2 Seznam obrázků	78
6.3 Seznam grafů.....	79
6.4 Seznam zkratk	79
6.5 Seznam použité literatury.....	81
6.6 Seznam příloh prací autorky disertace	99

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

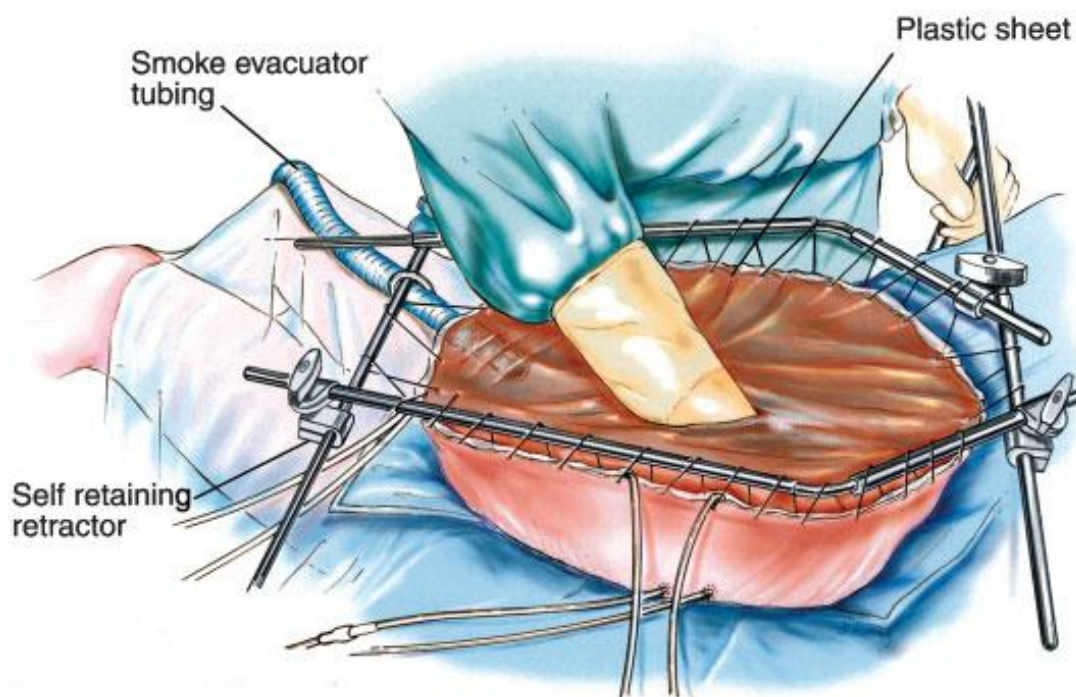
Dříve bylo nádorové šíření uvnitř peritoneální dutiny považováno za fatální. V roce 1955 došlo k prvnímu představení konceptu intraperitoneální chemoterapie k léčbě peritoneálních tumorů Weisbergem (Weisberger *et al.*, 1955). O 23 let později, studiem hloubky penetrace různých léčiv do tkání, došel Dedrick s kolegy k identifikaci skupiny cytotoxických léčiv, které byly schopné proniknout až 3 mm do tkáně (Dedrick *et al.*, 1978). Na podkladě tohoto výzkumu byl vytvořen konsensus, že nádorové ložisko by mělo mít maximálně 2,5 mm, aby intraperitoneální chemoterapie měla nějaký efekt (Witkamp *et al.*, 2001; Goodman, 2012). To je důvodem, proč je před každým intraperitoneálním podáním cytostatika nutná dobře provedená cytoredukce. Na konci 70. let začal Spratt experimentovat s možnostmi cytostatické léčby peritoneální karcinomatózy za využití hypertermie a kontinuální perfuze dutiny břišní na psích modelech (Spratt *et al.*, 1980a). To nakonec vedlo k první hypertermické intraperitoneální chemoterapii (HIPEC) provedené u člověka s psedomyxomem peritonea v únoru 1979 (Spratt *et al.*, 1980b). Sugarbaker na základě těchto poznatků metodu postupně zdokonaloval. Popsal například tzv. techniku kolosea (obrázek 1). Jde o otevřený přístup, jenž zahrnuje silikonovou plastovou fólii umístěnou přes retraktor a otevřenou břišní dutinu, která je připevněna ke kůži, čímž je vytvořena vyvýšená dutina – „koloseum“. Ve fólii je malý otvor umožňující vstup pro ruku chirurga, aby promíchal břišní obsah, čímž je zajištěna rovnoměrná distribuce zahřátého roztoku cytostatika (Sugarbaker, 1999). Tato technika má nicméně také jisté nevýhody jako je tepelná ztráta skrze otevřenou laparotomii a možný únik chemoterapeutické látky, což představuje zdravotní riziko pro zdravotnický personál na sále (Glehen *et al.*, 2008). Fujimoto a Koga v 80. letech vyvinuli perfuzní systém, při kterém byla dutina břišní během perfuze uzavřená (obrázek 2) (Fujimoto *et al.*, 1988; Koga *et al.*, 1988). Výhodou této metody je rychlé dosažení a udržení hypertermie a zároveň zabránění tepelným ztrátám, zvýšení nitrobřišního tlaku, který může zlepšit penetraci cytostatika do tkání a minimální expozice operačního týmu chemoterapeutické látky (Goldenshluger *et al.*, 2018). Metoda má ale i významné nevýhody, především jde o nerovnoměrnou distribuci léčiva s následnou akumulací toxických koncentrací látek a tepla v izolovaných oblastech. Dle studie Facy a jejích kolegů dochází při uzavřené technice HIPEC k tachykardii a poklesu krevního tlaku jako následek zvýšeného nitrobřišního tlaku (Facy *et al.*, 2015).

V posledních letech byly vyvinuty laparoskopické přístupy. Jejich hlavní výhodou je minimální invazivita, na rozdíl od konvenčních technik HIPEC. K laparoskopickému přístupu lze přistoupit, je-li nádorová zátěž malá na základě skóre pro peritoneální karcinomatózu (PCI). Existuje však značné riziko, že dojde k podhodnocení PCI, protože ne všechny oblasti dutiny břišní lze laparoskopickým přístupem dostatečně prozkoumat (Esquivel & Averbach, 2012).

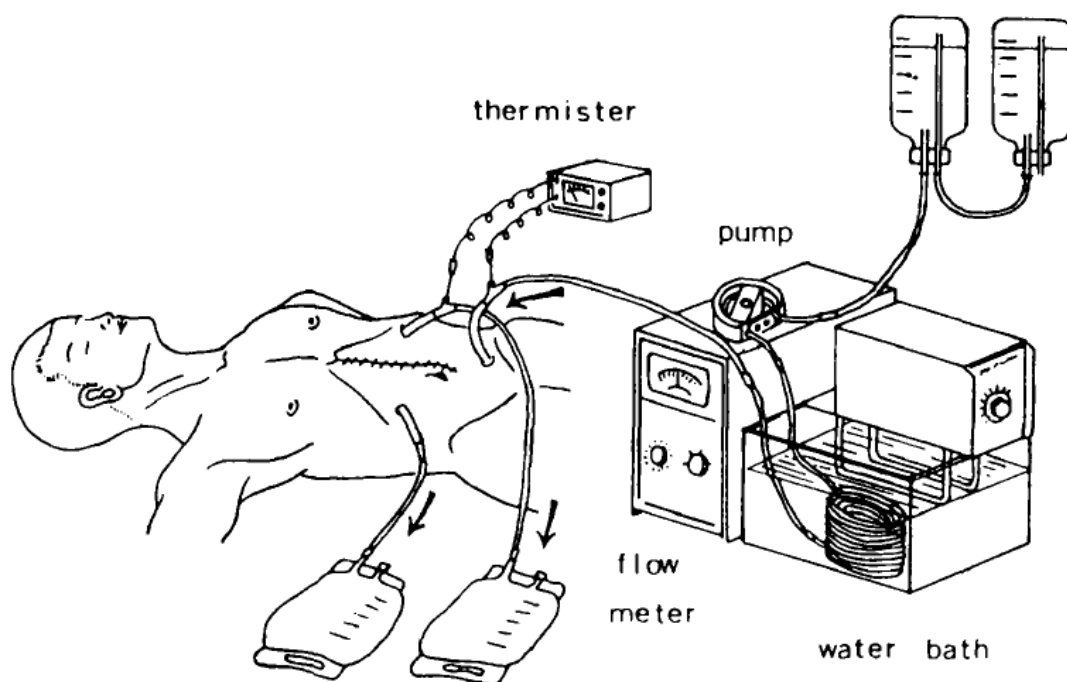
Přes různé výhody a nevýhody aplikačních technik je klinický výsledek z hlediska míry přežití a morbidit podobný (Cavaliere *et al.*, 2011; Halkia *et al.*, 2015; Rodríguez Silva *et al.*, 2017). Rozdíly v intraoperačních parametrech, jako je krevní tlak, tepová frekvence, teplota těla atd., také nejsou mezi technikami statisticky významné (Halkia *et al.*, 2015). Tato absence významných rozdílů se odráží v nedostatku konsensu o preferované technice. V analyzovaných studiích 53 % institucí používalo uzavřenou techniku, otevřenou techniku 42 % a pouze 5 % jiné techniky, jako je polootevřená nebo laparoskopická (Helderman *et al.*, 2019).

Hypertermický intraperitoneální perfuzní systém je kompaktní zařízení, které obsahuje válečková čerpadla, topné zařízení, tepelný výměník a teplotní sondy. Počítač integruje a zobrazuje informace z teplotních sond, rychlost přítoku a odtoku (González-Moreno, González-Bayón & Ortega-Pérez, 2010).

Při HIPEC se postupuje nejprve umístěním kanyl, které přivádějí a odvádějí tekutinu z dutiny břišní, která je poté recirkulována perfuzním okruhem poháněným válečkovým čerpadlem. Pro zajištění adekvátního průtoku mezi přítokovou a výtokovou kanylou se peritoneální dutina naplní tekutinou a perfuzní přístroj se nastaví tak, aby udržoval stálý průtok mezi rezervoárem a pacientem. Rezervoár pomáhá přizpůsobit objem tekutiny v peritoneální dutině, kompenzuje proměnný odtokový objem, zabraňuje cirkulaci vzduchu a v případě nouze rychle odstraňuje roztok z břicha. Tepelný výměník udržuje teplotu perfuzátu na 43 až 45 °C. Cílem je udržet intraperitoneální teplotu mezi 39–43 °C. Jakmile jsou vstupní/výstupní průtok a teploty relativně stabilní, přidá se chemoterapeutické činidlo. Perfuzát, cirkuluje mezi pacientem a přístrojem po dobu až 120 minut. Během této doby poskytují teplotní sondy v břišní dutině informace o stupni hypertermie. Při populárnější uzavřené technice je kůže kompletně sešita a uzavřena podél laparotomické incize a břišní stěna je ručně promíchávána během doby perfuze, aby se podpořila rovnoměrná distribuce tepla v peritoneální dutině (González-Moreno, González-Bayón & Ortega-Pérez, 2010).



Obrázek 1. Sugarbakerova technika kolosea pro hypertermickou intraperitoneální chemoterapii. Technika zajišťuje rovnoměrné rozložení tepla a cytostatika (obrázek převzat z článku Sugarbaker, Yu & Yonemura, 2003).



Obrázek 2. Kogův perfuzní systém, při kterém je břišní dutina uzavřená a perfuzát do dutiny vstupuje přes steh v kůži (obrázek převzat z článku Koga *et al.*, 1988).

1.1 Cytoredukční operace (CRS)

Optimální chirurgická léčba pacienta se solidním nádorovým onemocněním spočívá v en-blok resekci primárního karcinomu a přilehlých tkání, u kterých je vysoká pravděpodobnost mikroskopického postižení, ale jsou bez známek nádorového šíření. Spolu s primárním nádorem dochází k odstranění také přilehlých lymfatických uzlin. I přes maximální snahu chirurgů, dochází běžně k lokálním recidivám. Samotná operace může zapříčinit šíření nádoru, dojde-li během chirurgického zákroku k uvolnění buněk z primárního nádoru a takto uvolněné buňky se dále implantují a rostou (Sugarbaker, 1996).

Cílem cytoredukce je dosáhnout R0 resekce, tedy odstranit veškerou makroskopickou nádorovou tkáň a její funkce je zásadní i z toho hlediska, že cytostatika penetrují pouze do hloubky 3-4 mm. Zatímco chirurgická resekce cílí na odstranění makroskopické části onemocnění, tak hypertermická intraperitoneální chemoterapie, která následuje ihned po CRS, má za cíl zničit zbylá mikroskopická rezidua. CRS je soubor chirurgických postupů, kdy je nutné, aby chirurg provádějící zákrok, byl perfektně znalý technik břišní chirurgie (Klos *et al.*, 2018).

Úplnost cytoredukce se významně podílí na výsledcích léčby a celkovém přežití pacientů. Howell spolu s jeho kolegy prokázal u ovariálního karcinomu, že odpověď na hypertermickou chemoterapii byla nejvýraznější, když intraperitoneální nádorové léze nebyly větší než 2 cm (Howell *et al.*, 1987). Postupně narůstal počet studií s problematikou gastrointestinálních malignit, které došli k obdobnému závěru, tedy že objem residuálního nádoru koreluje jednoznačně s výsledky a celkovým přežíváním takto léčených pacientů. Velmi důležitým pokrokem v CRS, bylo ustanovení metodiky pro hodnocení kompletní resekability nádorů (předoperačně i intraoperačně) a zdokonalení technik k dosažení kompletní makroskopické resekce. Klíčovou součástí CRS při diseminaci v dutině břišní se stalo rozsáhlé odstranění zasažené pobřišnice (peritonea) během resekce, zejména pak u primárních peritoneálních nádorů. V roce 1995 Sugarbaker nastínil přístup k této části CRS a bylo popsáno šest samostatných peritonektomií: přední parietální peritonektomie, peritonektomie levého horního kvadrantu, peritonektomie pravého horního kvadrantu, pánevní peritonektomie, omentální burzektomie a mezenterická peritonektomie (Sugarbaker, 1995). Pomocí těchto cytoredukčních technik lze ve většině případů vytvořit optimální prostředí pro intraperitoneální chemoterapii. O rok později popsal Jacquet spolu se Sugarbakerem metodu, založenou na skórování přítomnosti a velikosti makroskopického nádoru v 13 různých oblastech břicha před a po

cytoredukci – peritoneal cancer index (PCI) (Jacquet & Sugarbaker, 1996). Index umožňuje predikovat pravděpodobnost úplné cytoredukce a tím předcházet zbytečným operacím u vysoce rizikových pacientů čímž snižuje pooperační morbiditu. Více o PCI je rozepsáno níže v kapitole 1.3.2.

1.2 Hypertermická intraperitoneální chemoterapie

Za běžných podmínek je průnik cytostatika do dutiny břišní přes peritoneální membránu obtížný. Laváž vysoce koncentrovaného cytostatika přímo v místě nádoru podstatně zvyšuje průnik do nádorové tkáně, navíc hypertermie má již sama o sobě cytotoxický účinek. Cytostatikum zahřáté na 39-43 °C má tedy významně vyšší účinnost. Z řady studií je účinnost CRC/HIPEC evidentní zejména u primárních nádorů peritonea, avšak nastavení teploty, doba perfuze, načasování použití režimu a další parametry nejsou vždy shodné a existují velké inter-institucionální rozdíly. Indikace pro použití HIPEC u agresivnějších sekundárních peritoneálních malignit, včetně kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, karcinomu vaječníků a vzácných typů nádorů s izolovaným peritoneálním šířením může být omezená (Sugarbaker, 2023). Neexistuje zatím jednoznačný celosvětově uznávaný konsensus a závisí vždy na posouzení multidisciplinárním týmem u individuálního pacienta s přihlédnutím k jeho celkovému stavu a komorbiditám, biologickému chování nemoci, dosavadní terapii, možnostem následné léčby a dalším okolnostem.

1.2.1 Požadavky pro úspěšné provedení intraperitoneální chemoterapie a hodnocení toxicity

Požadavky na intraperitoneální podání cytostatika jsou obdobné těm pro aplikaci systémové chemoterapie. Zvolené léčivo musí mít dostatečný cytotoxický účinek při dosažené tkáňové koncentraci, která musí zároveň trvat dostatečně dlouhou dobu pro zničení nádorových buněk. Vhodnější je také použití kombinace cytostatik než pouze jedno. Pro intrakavitární aplikaci se volí hydrofilní chemoterapeutická činidla s vysokou molekulovou hmotností, která mají prodlouženou retenci v pleurální nebo peritoneální oblasti. Zlepšení expozice cytostatika lze dosáhnout použitím nosného roztoku taktéž s vysokou molekulovou hmotností (de Bree *et al.*, 2017). Aby byla intraperitoneální chemoterapie co nejúčinnější, je nezbytné, aby byla podána neprodleně po cytoredukci.

Kromě hypertermické intraperitoneální chemoterapie se k léčbě používá časná pooperační intraperitoneální chemoterapie (EPIC, *angl.* early postoperative intraperitoneal chemotherapy). EPIC se aplikuje v prvním perioperačním týdnu, než pokročí hojení ran. Oba typy peroperační intrakavitární chemoterapie mají své výhody i nevýhody. Velkou předností HIPEC je právě vyšší teploty použitého cytostatika několikanásobně zvyšující jeho cytotoxicitu a schopnost penetrace. Nevýhodou pak může být krátká expozice cytostatika (60–120 minut).

U metody EPIC je výhodou dlouhodobé vystavení většiny serózních povrchů intrakavitární chemoterapii (zvykle po dobu 5 dní). EPIC se však využívá pouze zřídka především kvůli obavám ze zvýšeného výskytu pooperačních komplikací a delší hospitalizace pacientů bez jasného přínosu pro přežití (Tan *et al.*, 2016; Soucisse *et al.*, 2021).

1.2.2 Clavien-Dindo klasifikace chirurgických komplikací

Klasifikace Clavien-Dindo vznikla v roce 1992, kdy byla poprvé představena pod názvem „T92 skóre“ (Clavien, Sanabria & Strasberg, 1992). Klasifikace chirurgických komplikací před návrhem Clavien-Dindo klasifikace postrádala standardizaci a spoléhala na subjektivní terminologii, jako je mírná, střední a těžká (Clavien *et al.*, 2009). Clavien s kolegy navrhli jednotný systém hlášení negativních chirurgických výsledků založený na stupni další lékařské péče potřebné k jejich vyřešení (Clavien, Sanabria & Strasberg, 1992). Komplikace odstupňovali od I do IV, přičemž komplikace I. stupně vyžadovaly drobné odchylky od plánovaného pooperačního průběhu a IV. stupeň indikoval úmrtí pacienta v důsledku chirurgických komplikací. Tento nový skórovací systém přinesl možnost porovnávat výsledky za různá časová období v rámci stejné instituce, porovnávat různé instituce, porovnávat chirurgickou a konzervativní léčbu a dokumentovat operace a související komplikace standardizovaným způsobem, čímž usnadňuje metaanalýzy dat (Bolliger *et al.*, 2018).

Klasifikace Clavien-Dindo, skórující komplikace na základě úrovně zásahu potřebného k jejich vyřešení, těží z jednoduchosti a snadného použití, což přispívá k vysoké spolehlivosti mezi jednotlivými hodnotiteli (Golder, Casanova & Papalois, 2023) a je v současnosti široce používána při uvádění chirurgických komplikací ve vědecké literatuře.

Tabulka 1. Klasifikace Clavien-Dindo. Pokud pacient v době propuštění trpí nějakou komplikací, je k příslušnému stupni komplikace přidána koncovka „d“ (pro „postižení“). To poukazuje na nutnost dalšího sledování pro úplné vyhodnocení komplikace (Dindo *et al.*, 2004).

Stupeň	Definice
I	Jakákoli odchylka od normálního pooperačního průběhu bez nutnosti farmakologické léčby nebo chirurgických, endoskopických nebo radiologických intervencí. Povolené terapeutické režimy: antiemetika, antipyretika, analgetika, diuretika, elektrolyty a fyzioterapie. Tento stupeň zahrnuje také infekce v ráně, které lze řešit u lůžka pacienta.
II	Vyžadující farmakologickou léčbu jinými léky, než jsou povoleny pro komplikace I. stupně. Zahrnuty jsou také krevní transfuze a celková parenterální výživa.
III	Vyžadující chirurgickou, endoskopickou nebo radiologickou intervenci.
IIIa	Intervence bez celkové anestezie.
IIIb	Intervence v celkové anestezii.
IV	Život ohrožující komplikace vyžadující jednotku intenzivní péče. Zahrnuje komplikace centrálního nervového systému.
IVa	Selhání jednoho systémového orgánu. Zahrnuje dialýzu.
IVb	Multiorganové selhání.
V	Smrt pacienta.

1.2.3 Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)

Léčba nádorových onemocnění je spojena s významnými nežádoucími účinky souvisejícími s léčbou. Národní onkologický ústav Spojených států amerických (NCI, *angl.* National Cancer Institute) publikoval standardizované definice nežádoucích účinků, známé jako Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), k popisu závažnosti orgánové toxicity u pacientů, kteří se léčí s nádorovým onemocněním (Shah, 2022).

CTCAE stupně jsou přiřazovány na základě potenciálního dopadu nežádoucích účinků na klinickou léčbu, každodenní aktivity, úpravy dávkování nebo přerušení léčby (Trotti *et al.*, 2007).

CTCAE je pravidelně aktualizována NCI. Aktuální CTCAE verze 5.0 (v5.0) byla zveřejněna v listopadu 2017 a vstoupila v platnost v dubnu 2018 (Shah, 2022) a je v současnosti nejpoužívanějším skórovacím systémem k hodnocení toxicity chemoterapie v rámci klinických studií. Stále větší uplatnění nachází i v běžné klinické praxi, protože stejně jako výše zmíněná chirurgická klasifikace umožňuje srovnání přípravků a chemoterapeutických režimů a dávkovacích schémat nejen v rámci jedné instituce, ale i mezi jednotlivými pracovišti.

Tabulka 2. Závažnost nežádoucích účinků podle klasifikace CTCAE (NCI, 2017).

Stupeň	Nežádoucí účinky	Definice
I	Mírné	Asymptomatické nebo mírné příznaky; pouze klinické nebo diagnostické monitorování; intervence není indikována.
II	Střední	Indikována minimální, lokální nebo neinvazivní intervence.
III	Těžké	Hospitalizace nebo prodloužení indikované hospitalizace.
IV	Život ohrožující	Urgentní intervence.

1.3 Selekcce pacientů pro CRS a HIPEC

Vzhledem k tomu, že jde o náročnou operaci zatíženou značnou morbiditou a mortalitou, nemusí být pro každého pacienta profitující. Indikace pacienta k zákroku by vždy měla být stanovována na základě rozhodnutí multidisciplinárního týmu složeného ideálně z chirurga, onkologa, radiologa a ideálně i patologa a anesteziologa. Při vyhodnocování způsobilosti pacienta k výkonu je kromě zhodnocení celkového zdravotního stavu a komorbidit důležité vzít v úvahu také prognostické indikátory jako je histopatologie (včetně genetických prediktivních a prognostických markerů), PCI a cytoredukční skóre (CCR) odhadnuté na podkladě zobrazovacích metod jako je předoperační počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI) nebo pozitronová emisní tomografie s počítačovou tomografií (PET/CT) (Jacquet & Sugarbaker, 1996).

Dobrý výkonnostní stav je podmínkou pro indikaci pacienta k CRS a HIPEC. Kontraindikací jsou pacienti s kardiovaskulárním nebo plicním onemocněním nebo s dysfunkcí jater či ledvin. Věk není absolutní kontraindikací, je-li pacient v celkově dobré kondici a splňuje všechny ostatní předpoklady pro výkon. Dle získaných výsledků a zkušeností Klose a jeho týmu (Klos *et al.*, 2018) je absolutní kontraindikací také metotrexát používaný u pacientů s autoimunitními onemocněními vzhledem k tomu, že mnohonásobně zvyšuje riziko těžké myelotoxicity. Přítomnost vzdálených orgánových metastáz, nejčastěji v játrech a plicích, je taktéž považováno za kontraindikaci k zákroku stejně tak, jako šíření na povrchu pleury. Dále je vhodné zohlednit biologické chování nemoci (jeho dosavadní průběh a efekt předchozí terapie), stejně jako možnosti následné onkologické léčby a míru předléčenosti a předchozí toxicity onkologické terapie.

1.3.1 Zobrazovací metody

Standardem pro vyšetření pacientů zvažovaných k CRS/HIPEC je výpočetní tomografie. V indikovaných případech je možno doplnit magnetickou rezonanci, či PET/CT. PET/CT je s výhodou zejména při suspektním postižení lymfatických uzlin, či seróz mimo břišní dutinu. Důležité je, aby bylo vyšetření provedeno velmi blízko možnému datu operace, ideálně ne více než měsíc před zákrokem.

CT vyšetření má vysoké prostorové rozlišení a dokáže velmi dobře zobrazit distribuci a morfologii lézí. Radiolog na základě CT skenu může vyhodnotit, zda se jedná o resekabilní mucinózní peritoneální karcinomatózu nebo neresekabilní maligní onemocnění díky dvou radiologických kritérií. Jedno z nich je obstrukce tenkého střeva, jež značí invazivní charakter malignity na povrchu tenkého střeva, která by pravděpodobně nemohla být zcela odstraněna cytoredukci. Dalším kritériem je přítomnost nádorových uzlů větší než 5 cm na povrchu tenkého střeva, popřípadě přímo sousedící s mezenterálním cévním zásobením tenkého střeva (Sugarbaker, 1999).

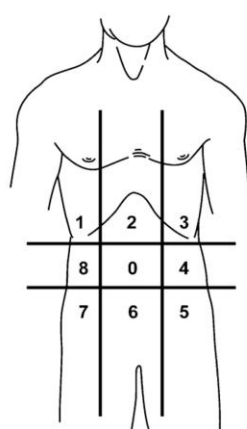
MRI se stále více používá k přesnému posouzení rozsahu peritoneálních metastáz a k detekci abdominopelvických extraperitoneálních nálezů, které mohou být na CT skenech nedetekované nebo neurčité. Tyto extraperitoneální nálezy na MRI mohou mít přímý vliv na plánování léčby a mohou ovlivnit způsobnost pacientů pro CRS/HIPEC. Navíc se MRI ukázalo jako přesné při predikci úplnosti CRS, což z ní činí cenný nástroj při diagnostice potenciálních kandidátů na CRS/HIPEC. CT skeny se tedy běžně používají pro předoperační staging a mohou poskytnout počáteční zobrazovací hodnocení peritoneálních metastáz a extraperitoneálních nálezů. Kombinace MRI a CT skenů proto může být vhodnou zobrazovací metodou pro pacienty, u kterých se uvažuje o CRS/HIPEC (van't Sant *et al.*, 2022).

1.3.2 Skórovací systém pro peritoneální karcinomatózu

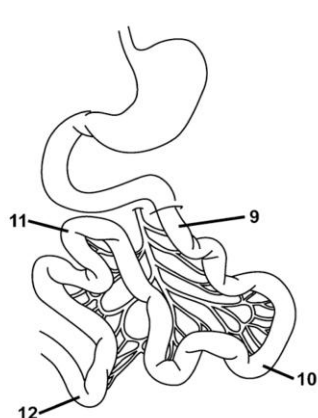
Skórovací systém pro peritoneální karcinomatózu – peritoneal cancer index je nejpoužívanějším systémem, na kterém má zásluhu, jak už bylo řečeno výše, Jacquet spolu se Sugarbakerem (Jacquet & Sugarbaker, 1996). Jde o rozdělení dutiny břišní na 13 částí, jak je patrné z obrázku 3. (na 9 segmentů je rozdělen abdomen a na 4 segmenty je rozděleno tenké střevo). Podle rozsahu PC se každému segmentu přiřadí body: 0 = žádná léze; 1 = léze <5 mm; 2 = léze od 5 mm do 5 cm; 3 = léze >5 cm. Součtem bodů všech třinácti částí získáme PCI pro daného pacienta. Hodnota PCI se může pohybovat od 0 do 39 a odráží rozsah peritoneální

karcinomatózy. PCI skóre může sloužit jako threshold pro kontraindikaci k resekci, nicméně hraniční hodnota PCI, při které už pacient není vhodný pro výkon se různí vzhledem k původu nádorového onemocnění. Pro nádorové onemocnění žaludku je udáváno PCI přes 10, u kolorektálního karcinomu PCI větší než 20. (Dohan *et al.*, 2017) U psedomyxomu peritonea a peritoneálního mezoteliomu ani vysoké PCI ještě nutně neznamená špatnou prognózu a nemělo by být absolutní kontraindikací výkonu (Baratti *et al.*, 2012).

Peritoneal Cancer Index

	<u>Regions</u>	<u>Lesion Size</u>	<u>Lesion Size Score</u>
	0 Central	_____	LS 0 No tumor seen
	1 Right Upper	_____	LS 1 Tumor up to 0.5 cm
	2 Epigastrium	_____	LS 2 Tumor up to 5.0 cm
	3 Left Upper	_____	LS 3 Tumor > 5.0 cm
	4 Left Flank	_____	or confluence
	5 Left Lower	_____	
	6 Pelvis	_____	
	7 Right Lower	_____	
	8 Right Flank	_____	
	9 Upper Jejunum	_____	
	10 Lower Jejunum	_____	
	11 Upper Ileum	_____	
12 Lower Ileum	_____		

PCI

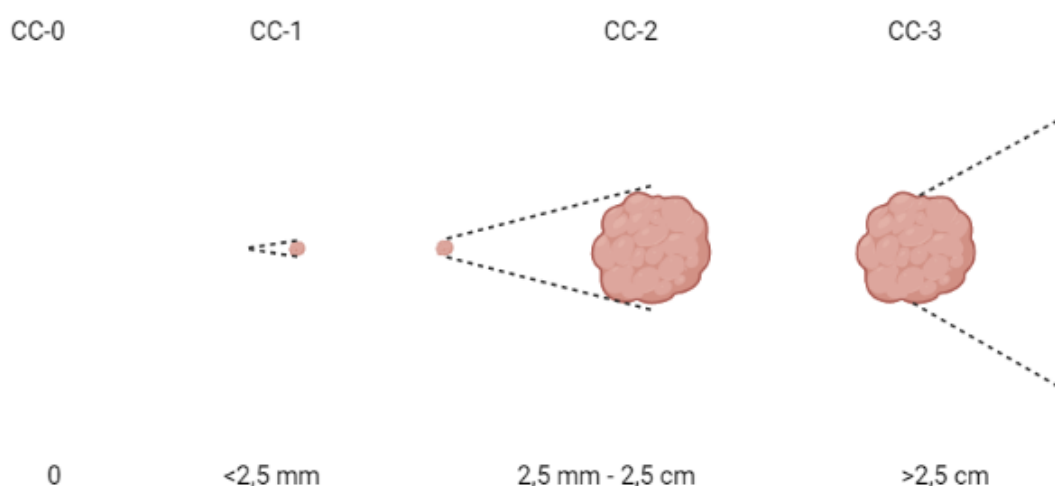


Obrázek 3. Sugarbakerův skórovací systém pro peritoneální karcinomatózu (obrázek převzat z článku Gilly *et al.*, 2006).

1.3.3 Cytoredukční skóre

Důležitým klinickým markerem pro posouzení úspěšnosti cytoredukce peritoneální karcinomatózy je cytoredukční skóre (CCR). CCR, poprvé představené Sugarbakerem v roce 1999, slouží k vyhodnocení možnosti úplného chirurgického odstranění nádoru a klasifikaci rozsahu nádorového postižení v břišní dutině (Sugarbaker, 1999).

Cytoredukční skórovací systém se stal důležitým prostředkem pro posouzení vhodnosti chirurgického zákroku a předpověď prognózy pacienta nejen s peritoneální karcinomatózou (Chua *et al.*, 2012).



Obrázek 4. Cytoredukční skóre. CC-0 je v případě, že není zřejmý žádný peritoneální nádorový rozsev v operačním poli. CC-1 označuje reziduální nádorové léze menší než 2,5 mm, které přetrvávají po cytoredukci. CC-2 je označení pro reziduální nádorové postižení mezi 2,5 mm – 2,5 cm a CC-3 pokud po cytoredukci zůstane inoperabilní nádorové postižení v dutině břišní větší než 2,5 cm.

1.4 Cytostatika používaná v rámci HIPEC

Výběr vhodné chemoterapeutické látky pro HIPEC je velmi důležitý a použité cytostatikum by ideálně nemělo mít žádnou lokální toxicitu po intraperitoneálním podání. Nevhodné jsou také látky, jež jsou metabolizovány do aktivní formy systémově. Důležitá je synergie mezi léčivem a hypertermií, jelikož zahřátí cytostatika má vliv na jeho cytotoxicitu a může mimo jiné měnit farmakokinetiku, vylučování použitého léčiva a má vliv na penetraci léčiva do tkáně (de Bree & Tsiftsis, 2007; de Bree, 2015).

Volba cytostatika je ovlivněna zásadně typem nádorového onemocnění pacienta. Při výběru by měla být zohledněna také farmakokinetika látky po intraperitoneálním podání s vysokou lokální koncentrací cytostatika, synergie látky a tepla a v neposlední řadě limitace systémové toxicity.

Intraperitoneální podání cytostatika je oproti intravenózní chemoterapii z pohledu aplikace náročnější metodou, nicméně umožňuje dosáhnout vysoké lokální koncentrace, zatímco systémová koncentrace použité látky se udržuje na nízké hladině. Rozdíl v koncentracích je dán relativně pomalou rychlostí pohybu skrze peritoneální dutinu do plazmy (Jacquet & Sugarbaker, 1996; Flessner, 2005).

K hypertermické intraperitoneální chemoterapii není vhodné používat antimetabolity jako je metotrexát, 5-fluorouracil nebo gemcitabin, jelikož doba expozice je příliš krátká na to, aby byla účinná.

Systémové množství léku a systémová toxicita závisí především na farmakokinetických vlastnostech a dávce podaného léčiva. Většinou je dávkování založeno na výpočtu plochy povrchu těla pacienta (Van der Speeten, Stuart & Sugarbaker, 2009).

1.4.1 Hypertermie a její vliv na cytostatika

První zmínky o hypertermii v souvislosti s ústupem nádoru byly zaznamenány již v druhé polovině devatenáctého století, kdy pacientům s pokročilými malignitami byla inokulována kultura streptokoka způsobující erysipel, tedy akutní lokalizovaný zánět kůže s alterací celkového stavu doprovázený vysokými horečkami. Infekcí vyvolané vysoké horečky způsobily u části pacientů regresi tumoru (Coley, 1893).

Mechanismů, kterými hypertermie působí cytotoxicky na nádorové buňky je několik, mimo jiné dochází k narušení syntézy RNA, v menší míře DNA a proteinů. Hypertermie vede k denaturaci proteinů nebo inhibici oxidativního metabolismu, což má pravděpodobně na svědomí zvýšená citlivost mitochondriálních membrán v nádorových buňkách. Mitóza je reverzibilně pozastavena. Roste počet lyzozomů a jejich enzymatická aktivita, zvýšená teplota je činí labilnější. V mikroprostředí dochází k nárůstu kyseliny mléčné a snížení pH. Hypertermie inhibuje angiogenezi a indukuje apoptózu.

Normální zdravá tkáň na hypertermii okolo 41-43 ° C přitom nereaguje tak dramaticky, má sice také reakci v podobě reverzibilního pozastavení mitózy a reverzibilní inhibice syntézy RNA, která však odezní po jednom až dvou dnech od působení zvýšené teploty.

Hypertermie tedy sama o sobě vykazuje značné benefity v terapii zhoubných nádorů, ve spojení s vhodným cytostatikem může být její účinnost ještě zvýšena. Zlepšení účinnosti chemoterapie prostřednictvím hypertermie nastává několika způsoby. Zahřátí cytostatika zvyšuje jeho cytotoxicitu, narůstá jeho schopnost penetrovat do tkáně, zvyšuje se permeabilita membrány. Synergie mezi léčivem a hypertermií přispívá k účinnosti cytostatika, a to i v případě tumorů s jinak významnou rezistencí k chemoterapii. Příkladem takovéto efektivní synergie mezi vyšší teplotou a cytostatikem u jinak málo chemosensitivních nádorů je využití hypertermické chemoterapie mitomycinem C k léčbě pseudomyxomu peritonea (Witkamp *et al.*, 2001).

1.4.2 Protinádorová antibiotika

Mitomycin C je alkylační antibiotikum s velice příznivým farmakologickým profilem. Penetrace mitomycinu C je možná až do hloubky 6 buněčných vrstev. Z důvodu vysoké systémové toxicity je jen zřídka aplikován intravenózně (Yan, Cao & Munkholm-Larsen; 2010). Intraperitoneálně je využíván především k léčbě pseudomyxomu peritonea. Důvodem jsou jeho výhodné vlastnosti umožňující smrt buněk bez ohledu na proliferační aktivitu nádorových buněk, tudíž je účinný také proti nádorům s nízkou mitotickou aktivitou, jako je právě výše zmíněný pseudomyxom (de Bree & Tsiftsis, 2007). K léčbě kolorektálních a apendikálních peritoneálních karcinomatóz je také často volen, stejně jako v případě karcinomů žaludku. Samostatně nebo v kombinaci s dalším léčivem může být indikován při maligních peritoneálních mezoteliomech, využíván je také pro léčbu karcinomu ovaria, kdy se používá pro léčbu platina-rezistentních pacientek.

Stejně jako mitomycin C, je i doxorubicin protinádorové antibiotikum. Metabolizace doxorubicinu probíhá přes metabolismus prvního průchodu, pravděpodobnost systémové toxicity je tedy malá. Penetrace tkání je možná alespoň do pěti buněčných vrstev a vykazuje také dobrou synergii s teplem. Doxorubicin je tedy ideální látkou pro intraperitoneální použití a může být kombinován i s jinými látkami vhodnými k intraperitoneálnímu podání jako je cisplatina nebo mitomycin C bez farmakologické inkompatibility (Goodman *et al.*, 2016).

1.4.3 Taxany

Paklitaxel spolu s docetaxelem patří do skupiny taxanů. Jde o látky působící skrze vazbu na mikrotubuly dělicího vřeténka. Výsledkem je jejich zvýšená stabilizace, a tedy inhibice depolymerace mikrotubulů a buněčného dělení, separace chromatid, růstu, a nakonec dochází k buněčné smrti.

Taxany jsou velmi často využívány pro HIPEC při léčbě karcinomu ovaria. Z důvodu jejich velmi příznivé farmakokinetiky, především díky jejich velké molekulové hmotnosti, jsou vhodnými látkami k intraperitoneálnímu použití (de Bree *et al.*, 2003; Fujiwara *et al.*, 2007; de Bree *et al.*, 2008). V průběhu intraperitoneálního zavedení, zůstává vysoká cytotoxická koncentrace taxanu v peritoneální dutině několik dní (de Bree *et al.*, 2006).

1.4.4 Platinové deriváty

Cytotoxicita cisplatiny pravděpodobně spočívá ve schopnosti interagovat s DNA, kdy dochází k tvorbě aduktů, které brání jak transkripci RNA, tak replikaci DNA, což má za následek zastavení cyklu a apoptóze buňky. Účinnost cisplatiny je prokázána při léčbě intraperitoneálních malignit, jako jsou mezoteliom peritonea a karcinomy peritonea, a vaječníků, popř. žaludku. Pro kolorektální a apendikální adenokarcinomy jeho použití vhodné není (Fujimoto *et al.*, 1990; Hamazoe, Maeta & Kaibara, 1994; Van de Vaart *et al.*, 1998).

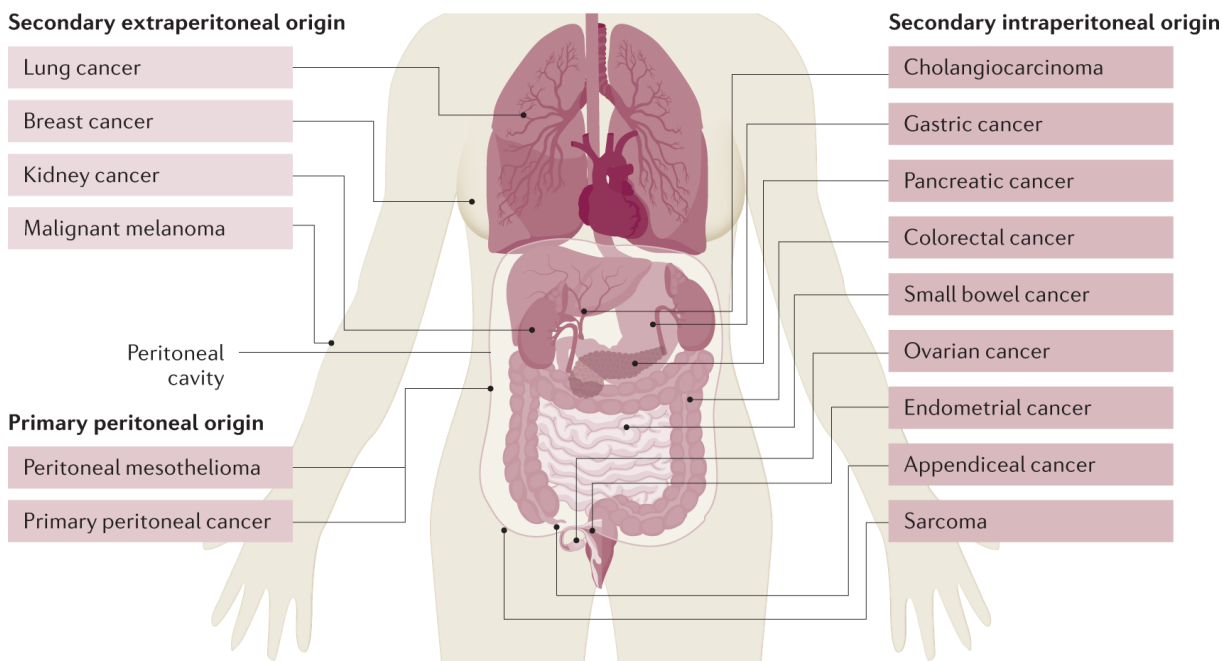
Oxaliplatina je derivát cisplatiny, působící rovněž prostřednictvím tvorby aduktů DNA v maligních buňkách bez ohledu na fázi buněčného cyklu. Výsledkem je poškozená DNA, indukce apoptózy a buněčná smrt (Alcindor & Beauger, 2011). Využívána je především pacienty s metastatickým kolorektálním karcinomem. Jednou z předností oxaliplatiny, je možnost použití vysokých dávek (do 460 mg/m² tělesného povrchu) s relativně nízkou systémovou expozicí (Elias *et al.*, 2002).

1.5 Využití CRS/HIPEC v klinické praxi

1.5.1 Peritoneální karcinomatóza

Povrchové peritoneální nádory tvoří velmi heterogenní skupinu malignit s odlišnou incidencí, citlivostí k systémové léčbě a prognózou, nicméně všechny mají sklon k peritoneální diseminaci. Peritoneální nádory mohou být primární tumory pobřišnice (peritoneální mezoteliom a primární peritoneální karcinom) nebo se sekundárně šířit jako peritoneální metastázy z tumorů jiných orgánů, které zahrnují tumory intraperitoneálního původu (nádory trávicího a ženského reprodukčního traktu a také sarkom) a extraperitoneálního původu (nádory plic, prsu a ledvin) (Cortes-Guiral *et al.*, 2021). Randomizované kontrolované studie a kohortové studie ukazují, že přežití pacientů s peritoneálními metastázami z různých primárních lokalit léčených kombinací lokoregionální a systémové léčby se zlepšilo ve srovnání s historickými údaji od pacientů, kteří dostávali samotnou paliativní léčbu (Chua *et al.*, 2012; Quenet *et al.*, 2021; Kitayama *et al.*, 2021). Důvodů pro tento trend je několik. Počet pacientů podstupujících cytoredukční chirurgii a hypertermickou intraperitoneální chemoterapii se v posledních třech desetiletích zvýšil (van Driel *et al.*, 2018; Gopinath & Bhatt, 2019; Noiret *et al.*, 2020; Schuitevoerder *et al.*, 2020). Nárůst časně diagnózy lze přičíst zlepšení zobrazovacích

metod a zvýšené informovanosti (Low, Barone & Rousset, 2021). Navíc byly vyvinuty účinnější systémové terapie, které umožňují resekci peritoneální karcinomatózy u více pacientů (Müller *et al.*, 2014; Franko, 2018; Becker *et al.*, 2021).



Obrázek 5. Peritoneální povrchové malignity mohou vzniknout z primárních nádorů pobřišnice nebo se sekundárně šířit jako peritoneální metastázy z nádorů intraperitoneálního původu a z nádorů extraperitoneálního původu (obrázek převzat z publikace Cortes-Guiral *et al.*, 2021).

1.5.2 Mezoteliom

Maligní peritoneální mezoteliom (MPM) je vzácný, ale agresivní nádor, který vzniká z mezoteliálních buněk peritonea. Má tři hlavní histopatologické podtypy: epiteloidní, sakromatoidní a smíšený. Jelikož se jedná o vzácné onemocnění, nejlepší léčba není jednoznačně stanovena. Potenciálně může být použita systémová chemoterapie, imunoterapie nebo chirurgická resekce.

V systémové terapii MPM se využívá chemoterapie (pemetrexed v kombinaci s platinovým derivátem) a check point inhibitory. Medián přežití v případě pouze systémové chemoterapie je okolo 19 měsíců (Zalcman *et al.*, 2016). I přes značný pokrok v systémové léčbě je chirurgická resekce stále považována za nejlepší volbu z pohledu dlouhodobých terapeutických výsledků, i když zařazení imunoterapie tento pohled může v budoucnosti změnit. Medián přežití pro CRS spolu s HIPEC byl dle několika studií 34-92 měsíců a 5leté přežití 29-59 % (Sugarbaker *et al.*, 2003; Alexander, Hanna & Pingpank, 2007;

Esquivel & Averbach, 2009; Levine *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2018). Vzhledem k vzácnosti onemocnění chybí srovnávací studie a postup HIPEC není plně standardizován. Používá se tedy celá řada cytostatik, zejména cisplatina, mitomycin C, jejich kombinace nebo cisplatina společně s doxorubicinem (Deraco *et al.*, 2006; Blackham *et al.*, 2010).

1.5.3 Novotvary apendixu s peritoneálním šířením

Karcinom apendixu je vzácné, ale ve většině případů agresivní onemocnění, které zahrnuje různé histologické podtypy nádorů. Velmi často jsou diagnostikovány jako náhodný nález při operačním řešení apendicitidy. Diagnóza primárního karcinomu apendixu může zahrnovat různé morfologické typy nádorů, buď adenokarcinomy, neuroendokrinní karcinomy nebo smíšené nádory s pohárkovými buňkami. Adenokarcinom je nejčastějším typem primárního karcinomu apendixu (Mccusker *et al.*, 2002). Pokročilá stadia se léčí adjuvantní systémovou chemoterapií 5-fluorouracilem a leukovorinem nebo kapecitabinem s oxaliplatinou. Karcinom apendixu nejčastěji metastazuje do peritonea, méně časté je rozšíření do jater a plic. V případě peritoneální diseminace je u pacienta zvažována kompletní cytoredukce spolu s HIPEC (Kelly, 2015).

Mucinózní adenokarcinom apendixu je dalším typem nádoru apendixu, u kterého se izolované peritoneální metastázy vyskytují nejčastěji. Produkci mucinózních hmot totiž často dojde k prasknutí primárního nádoru a mucin se rozšíří s nádorovými buňkami do peritoneální dutiny, což vede k peritoneální karcinomatóze. Léčba mucinózního adenokarcinomu apendixu závisí na rozsahu onemocnění a histologickém stupně diferenciaci. Při absenci ruptury tumoru je indikována chirurgická resekce. Na druhou stranu, pokud došlo k ruptuře, pacient by měl podstoupit kompletní cytoredukci spolu s hypertermickou intraperitoneální chemoterapií mitomycinem C (Kelly, 2015). Další možností je použití EPIC s mitomycinem C nebo 5-fluorouracilem (Kelly & Nash, 2014).

1.5.4 Kolorektální karcinom s peritoneálním šířením

Kolorektální karcinom je pátým nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění na světě (Yang *et al.*, 2023). V době diagnózy má již asi 25 % pacientů vzdálené metastázy (Massalou *et al.*, 2017). V 10 % případů jde o metastatický rozsev po peritoneu (Chu *et al.*, 1989). Peritoneální šíření je spojeno s horší prognózou (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2019).

V současnosti není CRS/HIPEC standardní terapií kolorektálního karcinomu v rámci mezinárodních doporučení, nicméně může být indikován individuálně k léčbě pacientů s kolorektálním karcinomem s peritoneálními metastázami bez prokázané diseminace do parenchymatosních orgánů, či vzdálených lymfatických uzlin po schválení multidisciplinárním týmem. Jelikož jde o obtížný chirurgický výkon, pacient musí být důkladně zkontrolován z hlediska vhodnosti pro zákrok (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2019). Pro schválení pacienta se bere v úvahu mimo jiné jeho výkonnostní stav, věk a komorbidita (Klaver *et al.*, 2017).

CRS/HIPEC v terapii kolorektálního karcinomu je vždy kombinována se systémovou onkologickou terapií (systémovou chemoterapií v kombinaci s cílenou terapií, či imunoterapií v případě podskupiny pacientů s mikrosatelitovou nestabilitou).

Intraperitoneální chemoterapeutikum pro kolorektální karcinom je stále předmětem diskuze. Studie často porovnávají mitomycin C s oxaliplatinou. Oxaliplatina vykazuje významně vyšší medián přežití ve srovnání s mitomycinem C a dle analýzy podskupin je také výhodnější pro ženy s patologií prstenčitých buněk a PCI mezi 10 a 15 (Leung *et al.*, 2017). Dle jiné srovnávací studie je celková míra pooperačních komplikací významně vyšší u pacientů léčených mitomycinem C, zejména extraabdominálních komplikací. Gastrointestinální komplikace byli častější u oxaliplatiny. Přínos v OS nebo RFS nebyl patrný ani u mitomycinu C ani oxaliplatiny (Hompes *et al.*, 2014).

1.5.5 Karcinom žaludku

Karcinom žaludku byl v roce 2020 pátým nejčastějším zhoubným nádorem na světě s přibližně 1,1 milionu nových případů a je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění s přibližně 800 000 úmrtími (Sung *et al.*, 2021; Ferlay *et al.*, 2021). Peritoneální karcinomatóza se vyskytuje až u 43 % pacientů s karcinomem žaludku (Abbasi *et al.*, 2011). U 30–50 % pacientů po kurativní operaci dochází k recidivě (Roviello *et al.*, 2003; Spolverato *et al.*, 2014; Thomassen *et al.*, 2014). Peritoneální recidiva se pak vyskytuje u 10–46 % pacientů s karcinomem žaludku (Wu *et al.*, 2003; Sakuramoto *et al.*, 2007; Thomassen *et al.*, 2014). Pokud se vyskytnou peritoneální metastázy, je prognóza horší při srovnání s prognózou pacientů s jinou lokalizací metastatického postižení. Medián přežití v případě postižení peritonea činí pouze 7–12 měsíců (Sadeghi *et al.*, 2000; Thomassen *et al.*, 2014). Medián přežití u pacientů, kteří jsou schopni podstoupit CRS/HIPEC, může být podle některých studií delší než 15 měsíců (Yonemura *et al.*, 2005; Glehen *et al.*, 2010).

Několik studií porovnávalo cytostatika pro intraperitoneální podání u pacientů s karcinomem žaludku, a to jak v monoterapii (mitomycin C/cisplatina/oxaliplatina), v kombinaci dvou cytostatik (mitomycin C + cisplatina nebo oxaliplatina + docetaxel) nebo tří cytostatik (mitomycin C + cisplatina + etiposid). Výsledky těchto studií prokázaly přínos pro přežití u pacientů léčených HIPEC s mitomycinem C + cisplatinou (11 měsíců vs. 6,5 měsíce) (Yang *et al.*, 2011). A dále pak prokázaly zvýšené OS s použitím mitomycinu C v monoterapii nebo v kombinaci s cisplatinou (Fujimoto *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2010).

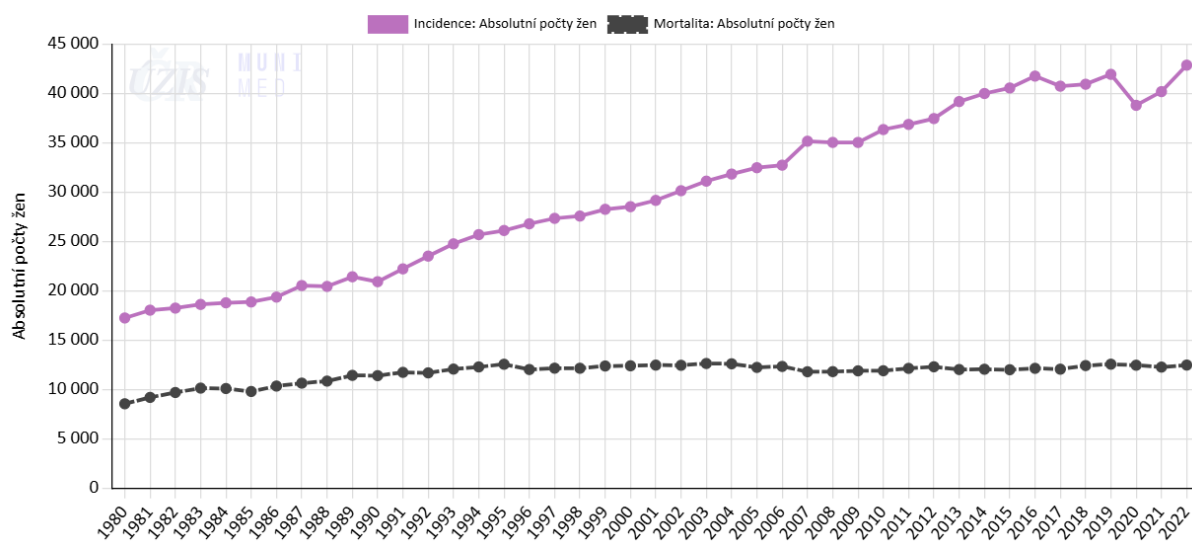
2 Karcinom ovaria

2.1 Epidemiologie

V roce 2021 bylo v České republice nově diagnostikovaných 925 žen s karcinomem vaječníků a v témže roce na stejnou diagnózu zemřelo 618 pacientek. Incidence karcinomu ovaria je nižší než u jiných gynekologických nádorových onemocnění, mortalita je však nejvyšší ze všech gynekologických nádorových onemocnění a představuje více než dvě třetiny všech úmrtí na gynekologické nádory. Důvodem je zejména pozdní stanovení diagnózy, kdy už je nádor v pokročilém stádiu (Ali, 2020). Celosvětově se prevalence karcinomů vaječníků výrazně liší, nejvyšší je v západní Evropě a Severní Americe a nejnižší na Středním východě a v Asii. Obecně lze rozdíly mezi zeměmi s nejvyšší a nejnižší prevalencí karcinomu ovaria vysvětlit rasovými, reprodukčními, socioekonomickými a kulturními rozdíly (Ali, 2018; Gaitskell *et al.*, 2018; Schrijver *et al.*, 2021).

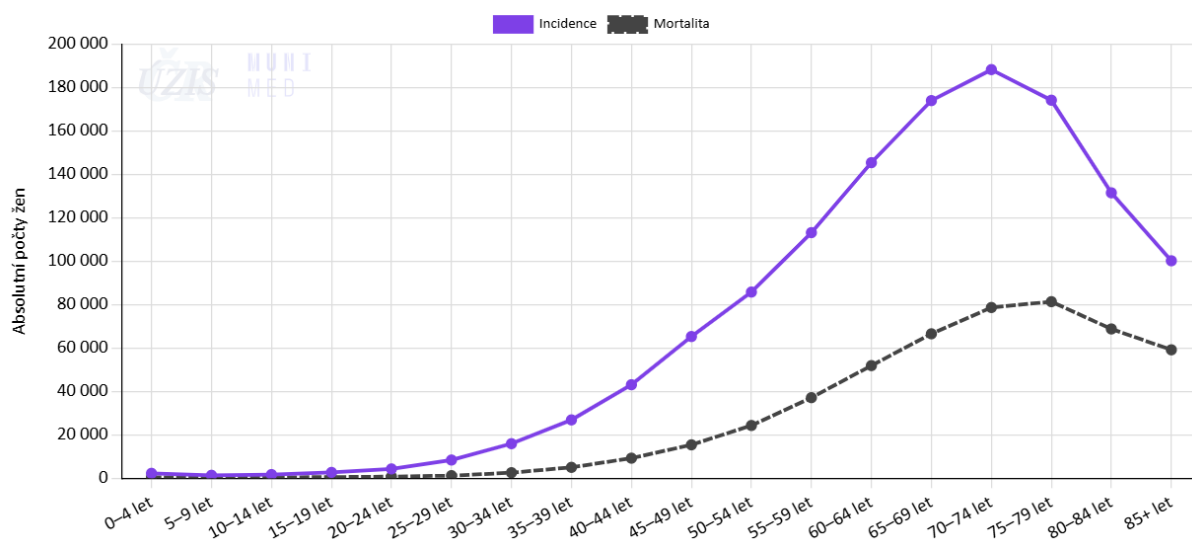
Maligní nádory vaječníků se vyskytují napříč všemi věkovými kategoriemi s rozdílnými histologickými podtypy podle věku. Například u žen mladších 20 let převažují nádory ze zárodečných buněk, u žen mezi 30. a 40. rokem se nejčastěji vyskytují borderline nádory a invazivní epiteliální karcinomy vaječníků se většinou objevují u žen po padesátém roku života (Berek *et al.*, 2021). Incidence high-grade serózního karcinomu vaječníků vrcholí u žen mezi 60. a 65. rokem a incidence low-grade endometroidního karcinomu vaječníků je nejvyšší u žen mezi 45. a 50. rokem. Světlobuněčné karcinomy vaječníků se vyskytují nejčastěji u žen ve věku 55 až 60 let (Phung *et al.*, 2023).

Incidence a mortalita. Aplikované filtry: (incidence N = 1284153, mortalita N = 503 641) Typ zhoubného nádoru: ZHOUBNÉ NOVOTVARY (C00–C97) Pohlaví: ženy Kraj: celá ČR
Rozsah: 1980–2022 Výpočetní metoda: Absolutní počty žen Zdroj dat: incidence: NOR, mortalita: ČSÚ, korekce dle NOR



Graf 1. Časový vývoj hrubé incidence a hrubé mortality karcinomu vaječníku. Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na 100 000 osob) (Převzato od Krejčí *et al.*, 2024).

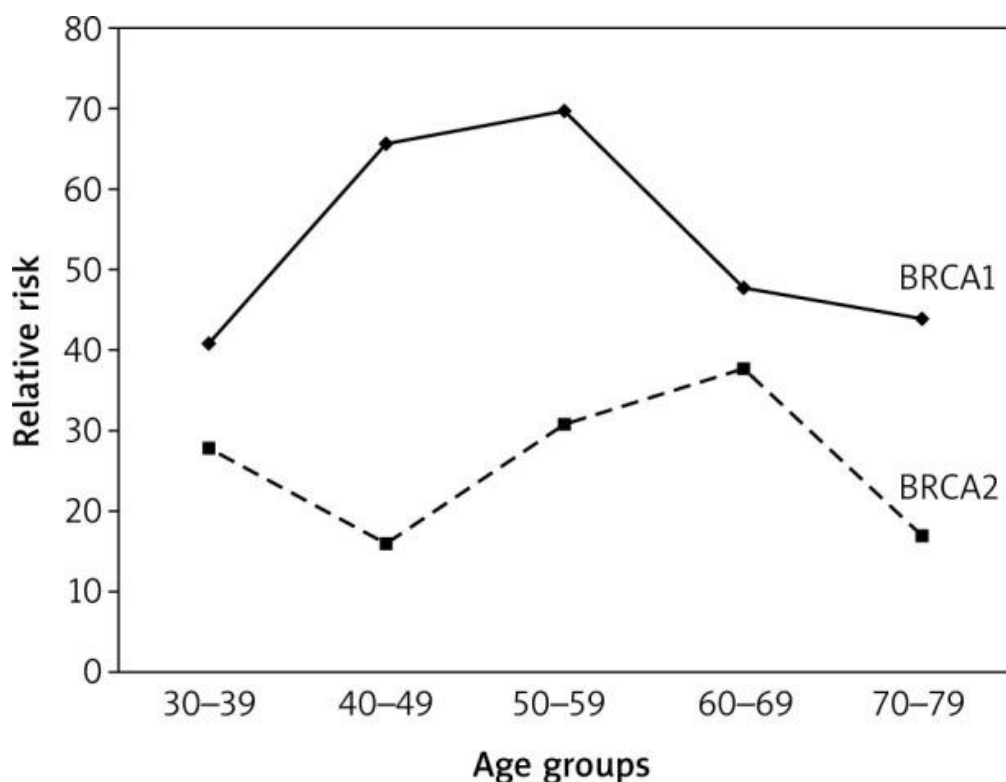
Incidence a mortalita. Aplikované filtry: (incidence N = 1284153, mortalita N = 503 641) Typ zhoubného nádoru: ZHOUBNÉ NOVOTVARY (C00–C97) Pohlaví: ženy Kraj: celá ČR
Rozsah: 1980–2022 Výpočetní metoda: Absolutní počty žen Zdroj dat: incidence: NOR, mortalita: ČSÚ, korekce dle NOR



Graf 2. Věkově specifická incidence u karcinomu ovaria. Graf zobrazující věkovou strukturu pacientek s diagnózou karcinomu vaječníku (Převzato od Krejčí *et al.*, 2024).

2.2 Etiologie

Etiologie karcinomu vaječníků není zcela jasná, je ovšem známo několik rizikových faktorů, které zvyšují pravděpodobnost rozvoje ovariálního zhoubného bujení. Faktory, které zvyšují počty ovulací v průběhu života (např. nuliparita, časná menarche nebo pozdní menopauza), jsou spojeny se zvýšeným rizikem karcinomu vaječníků (Jelovac & Armstrong, 2011). Faktory životního stylu jako je kouření, obezita nebo nezdravá strava, rovněž vystavení některým enviromentálním činitelům jako je mastek, herbicidy a pesticidy mohou mít vliv na rozvoj malignit ovaríí, ovšem pouze minimální (Zamwar & Anjankar, 2022). Významným rizikovým faktorem pro karcinom ovaria je pozitivní osobní nebo rodinná anamnéza karcinomu prsu nebo vaječníků. Zárodečné mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* jsou hlavní příčinou pro karcinogenezi těchto nádorů. Další hereditární syndromy zvyšující riziko ovariálního nádoru jsou Lynchův syndrom (mutace v genech mismatch repair systému), Li-Fraumeni syndrom (mutace v genu *TP53*) nebo Peutz-Jeghersův syndrom (mutace v genu *STK11*) a mutace v genech *CHEK2*, *RAD51*, *BRIP* a *PALB2* (Pietragalla *et al.*, 2020).

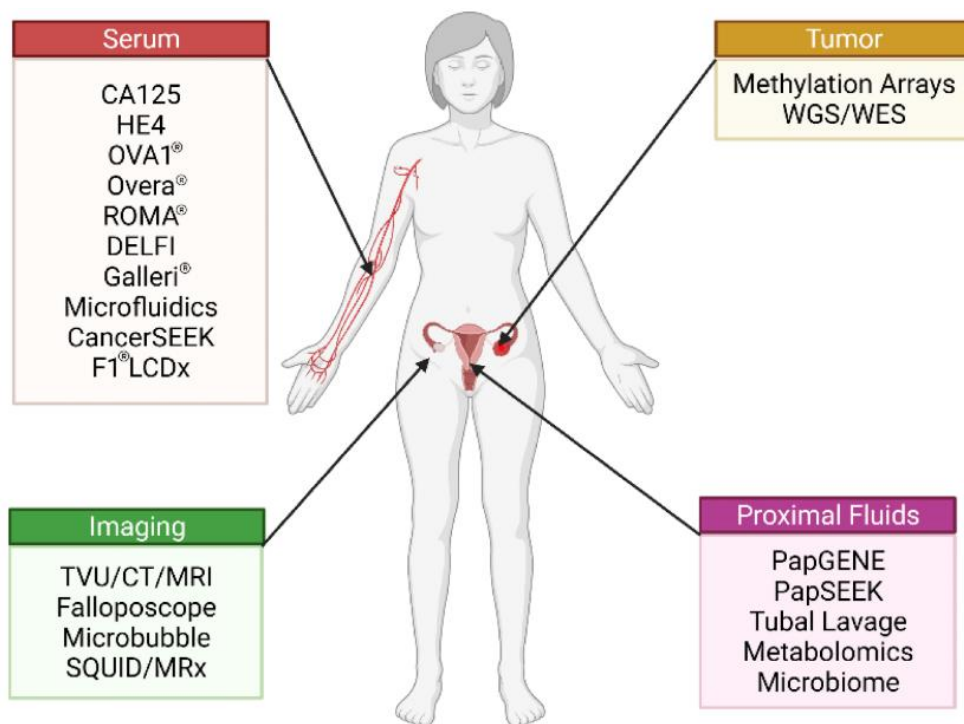


Graf 3. Porovnání rizika rozvoje karcinomu vaječníků mezi různými věkovými skupinami s mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Nositelé mutace *BRCA1* vykazují vyšší riziko rozvoje nádoru vaječníků napříč všemi věkovými skupinami (obrázek převzat z publikace Ali, Al-Ani O. & Al-Ani F., 2023).

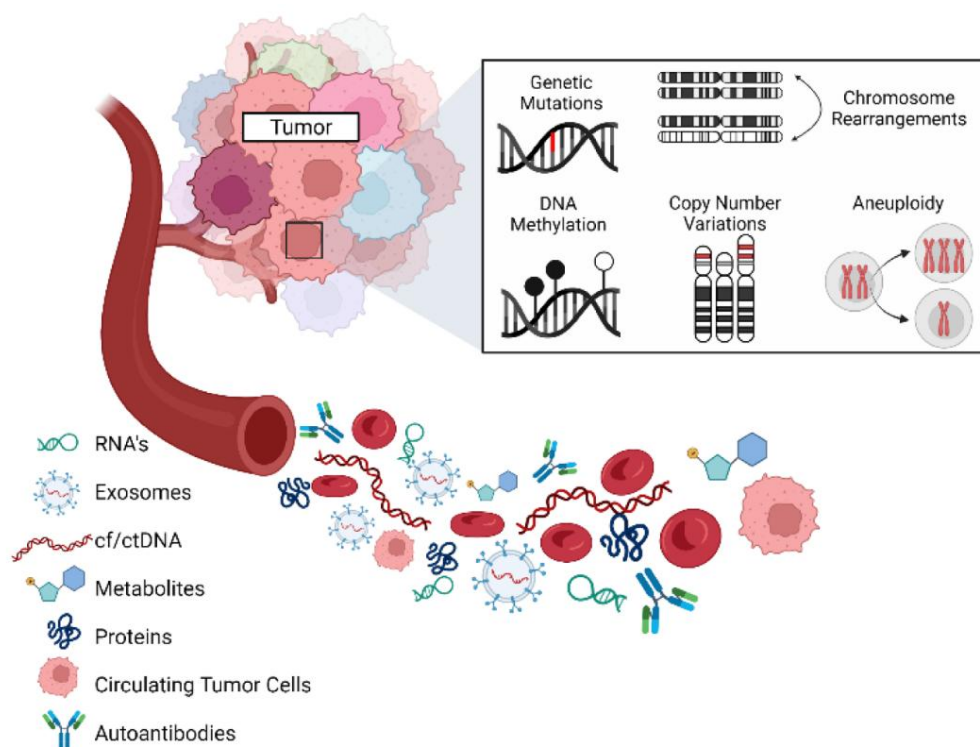
2.3 Prevence a screening

Epiteliální ovariální karcinom je obvykle diagnostikován v pokročilém stadiu, protože časná stadia onemocnění nemají žádné zjevné příznaky a účinnost screeningu dosud nebyla prokázána v prospektivních randomizovaných kontrolovaných studiích. Nejčastějším příznakem pokročilého onemocnění je nárůst objemu břicha způsobený ascitem (Goff *et al.*, 2004). Studie však naznačují, že některé ženy pociťují přetrvávající nespecifické příznaky v měsících před diagnózou, včetně bolesti zad, distenze břicha, bolesti pánve nebo břicha, potíže s jídlem nebo rychlý pocit plnosti, zvracení, poruchy trávení, změněné vyprazdňování nebo nutkání k močení nebo změna frekvence močení (Bandera *et al.*, 2016; Goff *et al.*, 2004; Bankhead *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2009). Neepiteliální nádory se často projevují specifitějšími časnými příznaky, včetně nepravidelného vaginálního krvácení (Boussios *et al.*, 2016).

Současné klinicky dostupné postupy pro screening ovariálního karcinomu jsou omezeny na fyzikální hodnocení klinickými lékaři, zobrazení adnex transvaginálním ultrazvukem (TVU) a měření sérové hladiny nádorového antigenu 125 (CA 125). TVU je nejběžnější zobrazovací modalitou používanou pro detekci karcinomu vaječníků a umožňuje lékařům identifikovat nepravidelnosti ve velikosti a tvaru ovariálních tkání, nicméně pro detekci časných malých lézí, zejména v oblasti vejcovodů v klinické praxi selhává (Kurman & Shih, 2016).



Obrázek 6. Přehled možností screeningu a diagnostických metod pro karcinom vaječníku. Na obrázku je přehled nových strategií pro screening a detekci high-grade serózního karcinomu (HGSC) (převzato z publikace Liberto *et al.*, 2022).



Obrázek 7. Cirkulující nádorové biomarkery, které mohou být testovány pro screeningové a diagnostické účely (převzato z publikace Liberto *et al.*, 2022).

2.4 Stanovení diagnózy

Téměř 60 % epiteliálních ovariálních karcinomů je diagnostikováno v pozdním stadiu, v této době je pětileté přežití pouze 29 % (Reid, Permuth & Sellers, 2017). Onemocnění je totiž v raném stadiu obvykle asymptomatické nebo jsou symptomy často přehlíženy, jelikož je lze připsat jiným možným chorobným stavům. Mezi nespecifické příznaky patří pocíty plnosti břicha a časná sytosti, nadýmání, nevolnosti, únava, změny ve frekvenci a konzistenci stolice, dysurie, bolesti zad, dyspareunie a změny hmotnosti (Bullock *et al.*, 2022). Měla by být získána důkladná klinická anamnéza, včetně pacientovy osobní a rodinné anamnézy, hodnocení dědičného rizika nádorových onemocnění a přezkoumání příznaků (Lheureux *et al.*, 2019).

Při stanovení diagnózy je třeba provést důkladné fyzikální vyšetření, doplněné vyšetřením zobrazovacími (TUS, USG břicha, CT hrudníku, břicha a MP, popř. další) a laboratorními metodami (hladiny onkomarkerů).

Hladina nádorových markerů se obvykle hodnotí společně se zobrazovacími metodami u pacientek s podezřením na malignitu. Především u mladších pacientek by měly být získány nádorové markery lidského gonadotropinu (hCG), alfa-fetoproteinu (AFP) a karcinoembryonálního antigenu (CEA), které pomohou vyloučit malignity ze zárodečných buněk a gastrointestinálního traktu (Berek *et al.*, 2018). Nádorový antigen CA 125 je glykoprotein produkovaný Müllerovým epitelem, který je detekovatelný laboratorními metodami a nejvíce doporučovaný biomarker pro hodnocení podezření na nádorové onemocnění vaječníků. Hladiny CA 125 jsou zvýšené u většiny pokročilých případů epiteliálního karcinomu vaječníků, ale jsou zvýšené pouze v 50 % případů onemocnění v raném stadiu; proto je citlivost tohoto biomarkeru omezená. Specifita a pozitivní prediktivní hodnota jsou vyšší u žen po menopauze než u žen premenopauzálních. Hladina CA 125 vyšší než 35 U/ml u ženy po menopauze ukazuje na vysoké riziko malignity. Zvýšená hladina CA 125 však nemusí svědčit pouze o epiteliálním karcinomu vaječníků, jeho zvýšené hodnoty se objevují i u pacientek s jinými onemocněními, včetně těhotenství, neovariálních malignit a zánětlivých patologií (např. akutní zánětlivé onemocnění pánve, adenomyóza a endometrióza). Dalšími zkoumanými biomarkery pro včasnou detekci karcinomu ovaria jsou folátový receptor alfa, CA 72-4, CA 15-3 nebo glykodelin. V klinické praxi se v diagnostice karcinomu ovaria nejčastěji využívá marker CA 125, HE4 (*angl.* human epididymis protein 4) a ROMA index (*angl.* risk of ovarian malignancy algorithm).

Transvaginální ultrazvuk je preferovanou počáteční zobrazovací modalitou k charakterizaci adnexální hmoty díky schopnosti vizualizovat rozlišující znaky mezi benigním a maligním onemocněním. Nálezy odpovídající nádoru ovaria zahrnují papilární nebo pevné komponenty, nepravidelnosti a ascites. 20 % pacientek s adnexálním útvarem má však nejasné nálezy, v takovém případě je doporučeno provést další vyšetření, typicky magnetickou rezonancí (Sadowski *et al.*, 2019; Burke *et al.*, 2023). Na základě ultrazvukového zobrazení spadá až 31 % adnexálních mas do kategorie neurčitého rizika. U pacientek s nejednoznačným transvaginálním ultrazvukovým nálezem nebo CA 125 v normálním rozmezí může MRI pomoci dále charakterizovat adnexální masu vzhledem k jeho vysoké specifitě při identifikaci malignit (Zhang *et al.*, 2023).

Počítačová tomografie se často provádí před MRI k vyhodnocení diferenciálních diagnóz u pacientů s nespecifickými příznaky. MRI se však doporučuje jako modalita druhé volby po ultrazvuku, protože je účinnější při vizualizaci malignit vaječníků. Přesto se běžně provádí CT zobrazení břicha, pánve a hrudníku pro zhodnocení rozsahu onemocnění a pro předoperační plánování kvůli zvýšené dostupnosti této modality (Vanderpuye *et al.*, 2021). Například rozsáhlé postižení lymfatických uzlin může být u vybraných pacientek kontraindikací operace. K určení postižení lymfatických uzlin lze zvážit PET/CT, jelikož je tato modalita při hodnocení lymfatických uzlin, peritoneálních metastáz a recidivujícího onemocnění výhodnější než samotná CT (Engbersen *et al.*, 2021).

2.5 Staging

Ačkoli CT vyšetření může do určité míry vymezit intraabdominální nádorové šíření, staging karcinomu vaječníků by měl být stanoven chirurgicky. Operativní nálezy určují přesnou histologickou diagnózu, stadium, a tedy i prognózu pacienta (Deffieux *et al.*, 2005; Levanon, Crum & Drapkin, 2008; Berek *et al.*, 2010).

U vybraných pacientů s pokročilým stadiem onemocnění může být vhodné zahájit chemoterapii před chirurgickým zákrokem, v těchto případech by mělo být provedeno histologické nebo cytologické potvrzení diagnózy před zahájením neoadjuvantní chemoterapie (Berek *et al.*, 2021).

Celosvětově se pro karcinom vaječníku používají dva hlavní systémy stagingu, kterými jsou systém Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (FIGO) a TNM (Tumor-Node-Metastasis) klasifikace. Oba systémy jsou založené na charakteristice nádoru, míře postižení regionálních lymfatických uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz. (Tokunaga *et al.*, 2019; Kehoe, 2020).

Tabulka 3. TNM a FIGO klasifikace pro karcinom vaječníku. Klasifikace z hlediska patologických charakteristik nádorů: velikost nádoru (T), postižení lymfatických uzlin (N) a přítomnost vzdálených metastáz (M) (Berek *et al.*, 2021; Shannon *et al.*, 2021).

TNM	FIGO	Definice
TX		Primární nádor nelze hodnotit.
T0		Nádor není přítomen.
T1	I	Nádor omezený na vaječník (jeden nebo oba).
T1a	IA	Nádor omezený na jeden vaječník (pouzdro intaktní); žádný nádor na povrchu vaječníku; žádné maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu.
T1b	IB	Nádor omezený na oba vaječníky (pouzdro intaktní); žádný nádor na povrchu vaječníku; žádné maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu.
T1c	IC	Nádor omezený na jeden nebo oba vaječníky s některým z následujících:
T1c1	IC1	Narušení pouzdra nádoru – rozsev způsobený chirurgickým výkonem.
T1c2	IC2	Ruptura pouzdra nádoru před chirurgickým zákrokem nebo nádor na povrchu vaječníku.
T1c3	IC3	Maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu.
T2	II	Nádor zahrnuje jeden nebo oba vaječníky s rozšířením pánve (pod pánevní okraj) nebo primární peritoneální karcinom.
T2a	IIA	Šíření a/nebo implantace na dělohu a/nebo vejcovod (y), a/nebo vaječník (y).
T2b	IIB	Rozšíření do jiných intraperitoneálních tkání pánve.
T3 a/nebo N1	III	Nádor zahrnuje jeden nebo oba vaječníky nebo primární peritoneální karcinom s cytologicky nebo histologicky potvrzeným rozšířením do pobřišnice mimo pánve a/nebo metastázou do retroperitoneálních lymfatických uzlin.
NX		Regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit
N0		Žádné metastázy do regionálních lymfatických uzlin
N0(i+)		Izolované nádorové buňky v regionální lymfatické uzlině (uzlinách) $\leq 0,2$
N1	IIIA1	Pozitivní (histologicky potvrzené) retroperitoneální lymfatické uzliny.
N1a	IIIA1(i)	Lymfatické uzliny ≤ 10 mm v největším rozměru.
N1b	IIIA1(ii)	Lymfatické uzliny > 10 mm v největším rozměru.

T3a	IIIA2	Mikroskopické extrapelvické (nad pánevním okrajem) peritoneální postižení s pozitivními retroperitoneálními lymfatickými uzlinami nebo bez nich.
T3b	IIIB	Makroskopické peritoneální metastázy za pánví ≤ 2 cm v největším rozměru, s metastázami do retroperitoneálních lymfatických uzlin nebo bez nich.
T3c	IIIC	Makroskopické peritoneální metastázy za pánví >2 cm v největším rozměru, s metastázami do retroperitoneálních lymfatických uzlin nebo bez nich (zahrnuje rozšíření tumoru do pouzdra jater a sleziny bez parenchymálního postižení kteréhokoli orgánu).
M0		Žádné vzdálené metastázy
M1	IV	Vzdálené metastázy mimo peritoneální metastázy.
M1a	IVA	Pleurální výpotek s pozitivní cytologií.
M1b	IVB	Parenchymové metastázy a metastázy do extraabdominálních orgánů (včetně tříselných lymfatických uzlin a lymfatických uzlin mimo břišní dutinu).

2.6 Prognóza

Karcinom vaječníků má obecně špatnou prognózu s 5letou mírou přežití méně než 50 % a 10letou mírou přežití přibližně 35 % (Khanlarkhani *et al.*, 2022). Prognóza karcinomu ovaria je přímo závislá na stádiu onemocnění v době diagnózy. Míra přežití se u I. stadia odhaduje na 70 % až 92 % ve srovnání s méně než 6 % u nádorů stadia IV (Jayson *et al.*, 2014). Další faktory spojené s prognózou zahrnují výchozí výkonnostní stav pacientky, histologický typ a stupeň diferenciacie nádoru a objem reziduálního onemocnění po primární cytoredukční operaci.

Vybraní pacienti s recidivujícím onemocněním mohou být léčeni sekundární cytoredukční operací. Mezi faktory spojené s lepšími chirurgickými výsledky u pacientek s recidivujícím karcinomem vaječníků patří ohraničené místo recidivy tumoru a ascites menší než 500 ml. Prognóza je také lepší u pacientek s recidivujícím karcinomem ovarií citlivým na platinu ve srovnání s recidivujícími tumory rezistentními k platině (Griffiths *et al.*, 2011; Jayson *et al.*, 2014; Vanderpuye *et al.*, 2021).

2.7 Histologie

Ovariální karcinomy zahrnují epitelální (EOC) a neepitelální ovariální malignity (gonadostromální nádory a germinální nádory). Nádory epitelálního původu představují více než 95 % všech karcinomů vaječníků, zatímco neepitelální karcinomy tvoří necelých 5 %. EOC jsou děleny podle typu buněk na: serózní (high-grade a low-grade), mucinózní, endometrioidní a světlóbuněčné karcinomy. Jednotlivé podtypy EOC se kromě etiologie liší také morfologií, molekulární biologii a prognózou. Přesto jsou považovány za jednu entitu. Vzácné histologické podtypy karcinomu ovaria zahrnují karcinosarkomy, maligní Brennerovy nádory a nediferencované karcinomy (Köbel & Kang, 2022; Lin *et al.*, 2021).

2.8 Léčebná strategie

Standardní léčbou je cytoredukční operace a kombinovaná chemoterapie platinovými deriváty s taxany. Míra odpovědi na první linii léčby se pohybuje kolem 80-90 %, ale u většiny pacientů dochází k relapsu a rozvoji rezistence. Vzhledem k anatomickému umístění vaječníků je karcinom vaječníků nejčastějším nádorovým onemocněním způsobujícím peritoneální metastázy. Časné stadium ovariálního karcinomu je řešeno chirurgicky, nicméně většina pacientek je diagnostikována pozdě pro nespecifické projevy onemocnění, kdy je karcinom již v pokročilém stádiu rozšířen po peritoneu (Bijelic, Jonson & Sugarbaker, 2007).

Při standardní léčbě pokročilého ovariálního karcinomu se obvykle nejprve provádí debulkingová operace a po ní následuje šest cyklů intravenózní chemoterapie s deriváty platiny spolu s taxany, případně se aplikují 3 cykly chemoterapie před operací a 3 cykly chemoterapie po operaci (American Cancer Society, 2022).

2.8.1 Chirurgický staging a primární debulkingová operace

Primární chirurgický staging a debulking jsou pro pacientky zásadní. Chirurgický výkon typicky zahrnuje střední laparotomii s abdominální a pánevní exploračí, paracentézu nebo odběr peritoneálního výplachu, hysterektomii, bilaterální adnexektomii, lymfadenektomii, peritoneální biopsii a omentektomii. Při optimálním chirurgickém debulkingu se resekuje všechna viditelná nádorová tkáň, aby se co nejvíce snížila nádorová zátěž (Lheureux, Braunstein & Oza, 2019). U pacientů s onemocněním stadia III nebo vyšším by měla být

provedena cytoredukce na méně než 1 cm, pokud není možná kompletní resekce. Mohou být také zahrnuty rozsáhlejší postupy, včetně resekce střeva, peritonea a bránice.

U mladých pacientek s ovariálními karcinomy, které se zdají být nízkorizikové a v raném stadiu a přejí si zachovat možnost fertility, lze zvážit fertilitu šetřící chirurgickou léčbu. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) uvádí, že fertilitu šetřící modifikace standardní debulkingové operace mohou zahrnovat retenci dělohy a kontralaterálních vaječníků a vejcovodů nebo pouze zachování dělohy, v závislosti na stádiu nádoru a histologii. K vyloučení okultního onemocnění by však stále měl být proveden chirurgický staging. Každá pacientka zvažující operaci zachovávající plodnost, by měla být důkladně poučena o rizicích recidivujícího karcinomu vaječníků. Směrnice NCCN nedoporučují operaci šetřící plodnost u pacientek se světlobuněčným karcinomem vaječníků v jakémkoli stádiu (Nitecki, Woodard & Rauh-Hain, 2020; Vanderpuye *et al.*, 2021).

2.8.2 Neoadjuvantní chemoterapie a intervalová debulkingová operace

Neoadjuvantní chemoterapie následovaná intervalovým debulkingem může být provedena u pacientek s pokročilým nálezem (stadium IIIC, IV) s nízkou pravděpodobností optimální cytoredukce. Cílem neoadjuvantní chemoterapie je snížení nádorové zátěže, aby se zvýšila pravděpodobnost optimální cytoredukce (Lheureux, Braunstein & Oza, 2019; Vanderpuye *et al.*, 2021).

U pacientek, které podstoupí neoadjuvantní chemoterapii, je nádor znovu posouzen pomocí zobrazovacích metod ke stanovení resekability po 3 až 4 cyklech chemoterapie (Kurnit, Fleming & Lengyel, 2021; Sambasivan, 2022). Pokud je během neoadjuvantní chemoterapie pozorována progresse nádoru, intervalová operace debulkingu se nedoporučuje, protože studie neprokázaly žádný přínos pro přežití. U těchto pacientů lze zvážit zařazení do klinických studií nebo ukončení léčby a zahájení paliativní péče (Vanderpuye *et al.*, 2021).

2.8.3 Adjuvantní chemoterapie

Po primární debulkingové operaci by se rozhodnutí o adjuvantní chemoterapii mělo posuzovat na základě chirurgického stagingu, vzhledem k možné změně charakterizace onemocnění po chirurgickém posouzení, například upstaging u pacienta, u kterého se předpokládalo časně stadium onemocnění. U časných stadií low-grade onemocnění adjuvantní chemoterapie nezlepšuje celkové přežití. Naproti tomu časně stadium u high-grade karcinomů

má prospěch z adjuvantní chemoterapie. Kombinace karboplatiny a paklitaxelu jsou nejčastěji používanými cytostatiky.

U pacientek s pokročilým onemocněním nebo časným stadiem ovariálního karcinomu s vysoce rizikovými rysy (stadium IC a II, high-grade nebo histologicky potvrzený světlobuněčný karcinom) je standardním léčebným přístupem chemoterapie po chirurgické cytoredukci. Chemoterapie může být podávána intravenózní nebo intraperitoneální cestou a používá se několik režimů, včetně intravenózní chemoterapie na bázi platiny, intravenózní a intraperitoneální chemoterapie na bázi platiny a intraperitoneální chemoterapie na bázi platiny plus bevacizumab, v závislosti na histologii nádoru, stádiu, a pokud bylo provedeno optimální odstranění nádoru (Sambasivan, 2022).

Studie fáze 3, GOG-111, prokázala lepší celkové přežití u pacientů s kombinací cisplatiny a paklitaxelu ve srovnání s kohortou užívající kombinaci cisplatiny a cyklofosfamidu. Chemoterapeutickou látkou první linie pro epitelální karcinom vaječníků je cisplatina nebo karboplatina spolu s cytostatikem ze skupiny taxanů, paklitaxelem nebo docetaxelem. Výsledky mnoha studií dospěly k závěru, že karboplatina je stejně účinná jako cisplatina a je lépe snášena (Kuroki & Guntupalli, 2020; Sambasivan, 2022).

V onkogenezi ovariálních karcinomů hraje důležitou roli také VEGFR signální dráha a s ní spojená patologická vaskularizace nádoru. Zvýšená exprese VEGF je spojena s nepříznivou prognózou ovariálního karcinomu a jeho vyšší diferenciací (Shen *et al.*, 2000). Kombinace inhibice angiogeneze monoklonální protilátkou bevacizumabem s chemoterapií a s následným pokračováním bevacizumabu v udržovací terapii vedla u pacientek s vysokým rizikem relapsu choroby k vyšší četnosti léčebných odpovědí a signifikantnímu prodloužení PFS ($p < 0,0001$) oproti chemoterapii samotné, nicméně bez vlivu na prodloužení mediánu OS (Burger *et al.*, 2011; Oza *et al.*, 2015).

2.8.4 Hypertermická intraperitoneální chemoterapie po cytoredukční operaci

HIPEC s cisplatinou lze zvážit po intervalové cytoredukční operaci u onemocnění stadia III. Multicentrická studie fáze III zveřejnila výsledky ukazující, že podání HIPEC po cytoredukci zlepšilo přežití bez recidivy (RFS) o 3,5 měsíce a celkové přežití o 11,8 měsíce ve srovnání se samotnou operací, navíc bez zvýšení perioperační morbidita (van Driel, *et al.*, 2018). Studie zahrnovala 245 pacientek ve stádiu III EOC, které absolvovaly po třech cyklech neoadjuvantní léčby karboplatinou a paklitaxelem. Medián RFS byl 10,7 měsíce ve skupině pouze s chirurgickým výkonem a 14,2 měsíce ve skupině s cytoredukční operací plus HIPEC.

Medián celkového přežití byl 33,9 měsíce ve skupině se samostatnou cytoredukční operací a 45,7 měsíce ve skupině s operací plus HIPEC. Míra pooperačních komplikací byla u obou skupin téměř totožná. K obdobnému výsledku dospěla i novější multicentrická studie (González *et al.*, 2023). Všechny pacientky byly dříve léčeny neoadjuvantní chemoterapií. Pacientky byly randomizovány, kdy jedna skupina absolvovala pouze CRS a druhá skupina byla léčena HIPEC (cisplatina 75 mg/m²) po cytoredukční operaci. Léčba CRS/HIPEC byla provedena u 35 pacientek oproti skupině 36 pacientek bez HIPEC. Byl zjištěn klinicky hodnotný rozdíl se zlepšením přežití bez onemocnění ve prospěch HIPEC + 6 měsíců. Opět nebyl nalezen žádný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami s ohledem na pooperační komplikace nebo kvalitu života.

Přestože u peritoneálních metastáz karcinomu ovaria stadia FIGO III je cytoredukce obvykle standardním terapeutickým výkonem, HIPEC dosud jednotnou součástí doporučených postupů není.

2.8.5 Udržovací léčba PARP inhibitory

U významné části ovariálních karcinomů se vyskytuje mutace genu *BRCA1* a *BRCA2*. Tyto geny se účastní procesu opravy DNA pomocí homologní rekombinace. Nádorová buňka s poruchou homologní rekombinace je tak odkázána na jiné opravné mechanismy, např. excizi bází, kterou je možné inhibovat pomocí PARP inhibitorů (inhibitory poly ADP ribózo polymerázy). Tím dochází v nádorové buňce ke dvojitým zlomům DNA, které jsou letální.

Asi 50 % nádorů vaječníků je klasifikováno s deficiencí homologní rekombinace, což vede k tomu, že inhibitory PARP představují průlom v léčbě karcinomů ovaria.

Olaparib jako jeden z prvních PARP inhibitorů v klinické praxi prokázal zcela bezprecedentní benefit v udržovací terapii u nově diagnostikovaných pacientek stadia III a IV s odpovědí na úvodní chemoterapii s platinovými deriváty. V randomizované studii fáze III SOLO-1 udržovací léčba olaparibem snížila riziko progresu nebo smrti o 70 % (HR 0.30; 95 % CI 0.23-0.41; $p < 0,001$), přičemž po 5 letech 48 % pacientek v rameni s olaparibem jsou stále bez progresu nemoci oproti 21 % pacientek užívajících placebo (Banerjee *et al.*, 2021). Další z PARP inhibitorů, niraparib, prokázal svou účinnost jako udržovací léčba po platina senzitivním relapsu ovariálního karcinomu bez ohledu na přítomnost zárodečné mutace BRCA nebo poruchy homologní rekombinace (HRD) v randomizované studii fáze III NOVA, přičemž pacientky s přítomností zárodečné mutace *BRCA* z léčby profitovaly nejvíce (Oza *et al.*, 2018).

Léčba PARP inhibitory má velmi příznivý toxický profil, nezvyšuje morbiditu ani mortalitu pacientů. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří hematologická toxicita, především anémie a trombocytopenie, dále pak gastrointestinální toxicita typu nauzey. Nicméně největší limitací této terapie je rozvoj sekundární rezistence s následnou nepříznivou prognózou nemoci.

3 Molekulární dráhy

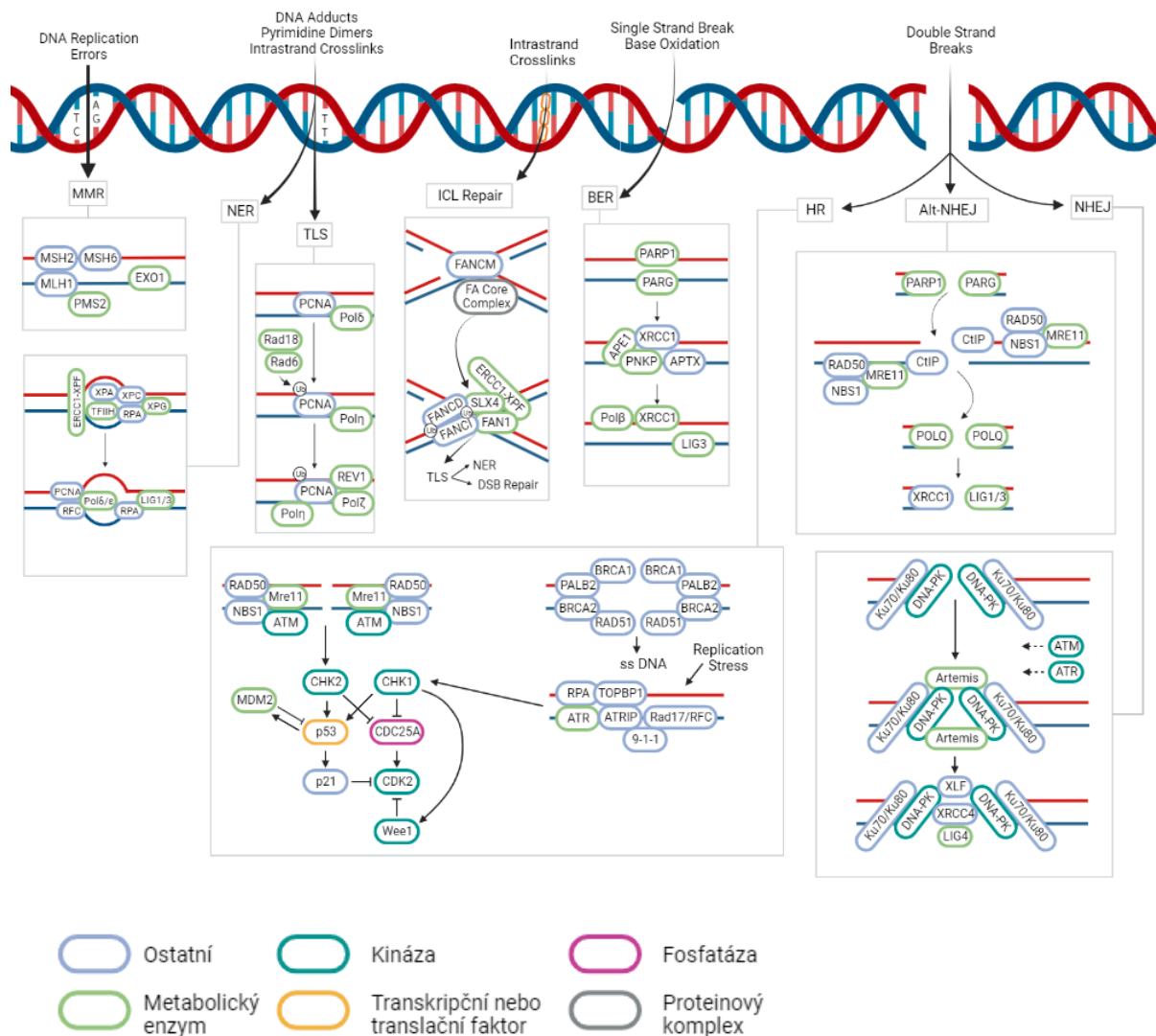
3.1 DNA repair

Kombinace obsahující léčiva na bázi platiny, zejména cisplatinu a karboplatinu, představují léčbu první volby EOC. Mechanismus účinku jak cisplatinu, tak karboplatinu zahrnuje jejich interakci s DNA a tvorbu monoaduktů, převážně kovalentně interagujících na pozici N7 molekuly guaninu. Tento monoadukt se posléze skrze druhou kovalentní vazbu naváže na DNA příčnou vazbu, která může být na stejném řetězci DNA (tj. intrařetězcové příčné vazby představující nejhojnější platinové adukty) nebo na opačném vlákně (tj. meziřetězcové příčné vazby, které jsou odpovědné za protinádorovou aktivitu léku) (Hongo *et al.*, 1994; Hah *et al.*, 2006). Pokud tyto léze nejsou opraveny, dochází k blokování syntézy a transkripce DNA. Navíc dochází ke zpoždění replikační vidlice, což zcela destabilizuje syntézu DNA s aktivací replikativní stresové reakce. (Dobbelstein & Sørensen, 2015).

Obecně platí, že přítomnost lézí DNA aktivuje reakci na poškození DNA s aktivací buněčných drah vedoucích ke zpomalení nebo přerušení syntézy DNA, zablokování buněčného cyklu a aktivaci opravných drah (Pilié *et al.*, 2019). Tyto dráhy jsou součástí DDR (*angl.* DNA damage response) a mají klíčovou roli v udržování integrity genomu (Jeggo, Pearl & Carr, 2016; Roos, Thomas & Kaina, 2016). Genomová nestabilita byla popsána jako charakteristický znak nádorového onemocnění (Hanahan & Weinberg, 2000). Defekty v DDR jsou tedy spojeny se zvýšeným rizikem rozvoje nádorového onemocnění během života. První krok DDR spočívá v rozpoznání poškození „senzorovými“ proteiny, které identifikují struktury DNA indukované činností poškozujícími DNA a replikačním stresem. Hlavními senzorovými proteiny jsou ATM (*angl.* ataxia-telangiectasia mutated), ATR (*angl.* ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) a DNA-PK (DNA – dependentní proteinkináza). Jedná se o velké serin/threonin kinázy – členy rodiny fosfatidylinositol-3-kinázy podobných kináz (PIKK), které organizují rozsáhlou síť buněčných procesů k udržení genomové integrity s odlišnými specifitami a funkcemi (Lovejoy & Cortez, 2009; Lempiäinen & Halazonetis, 2009). ATM kináza je primárně aktivována dvouřetězcovými zlomy DNA (DSB, *angl.* double strand breaks) a vede k fosforylaci řady substrátů, jako jsou BRCA1, CHK2 a p53, zprostředkovávající opravu DNA, zastavení buněčného cyklu a apoptózu. ATR kináza je nezbytná pro přežití proliferujících buněk, protože monitoruje progresi replikační vidlice, reaguje na široké spektrum poškození DNA, včetně zlomů jednovláknové DNA (SSB, *angl.* single strand breaks) a různých lézí DNA,

které interferují s replikací (Curtin, 2012). Fosforyluje substráty jako BRCA1, CHK1, p53 a RAD17, které zase zprostředkovávají inhibici replikace DNA a podporují opravu DNA. Konečně, DNA-PK hraje roli především v nehomologním spojování konců (NHEJ, *angl.* non-homologous end joining) pro opravu dvouřetězcových zlomů. (Reinhardt *et al.*, 2007; Matsuoka *et al.*, 2007).

Existuje šest hlavních cest opravy DNA: 1/ oprava chybného párování (MMR, *angl.* mismatch repair), 2/ oprava excize bázi (BER, *angl.* base excision repair), 3/ oprava excize nukleotidů (NER, *angl.* nucleotid excision repair), 4/ homologní rekombinace (HR, *angl.* homologous recombination), 5/ nehomologní spojování konců a 6/ Fanconiho anémie (FA, *angl.* Fanconi anemia) (Curtin, 2012). Koordinovaná souhra mezi těmito různými drahami vede k opravě a přežití buněk bez fixního poškození DNA. Nízká úroveň oprav a akumulace poškození DNA, které mohou buňky tolerovat, ale může vést k rozvoji patologií, včetně rozvoje nádoru. Změny (upregulace a downregulace) v těchto drahách přispívají k citlivosti a rezistenci vůči platinovým derivátům (Damia & Brogini, 2019).



Obrázek 8. Schématické znázornění DNA opravných drah. Na obrázku jsou schématicky znázorněny opravné dráhy DNA, konkrétně: oprava chybného párování (MMR), oprava excize nukleotidů (NER), syntéza translází (TLS), oprava meziřetězcových křížových vazeb (ICL), oprava excize bází (BER), homologní rekombinace (HR), nehomologní spojování volných konců (NHEJ) a alternativní cesta pro nehomologické spojování volných konců (Alt-NHEJ).

3.1.1 Alterace v dráze DNA repair u karcinomu ovaria

U přibližně poloviny high-grade serosních ovariálních karcinomů (HGSOC) nalézáme defektní DNA repair dráhu, konkrétně inaktivaci homologní rekombinace (HR) v důsledku zárodečných a somatických mutací v *BRCA1* (11 %), *BRCA2* (9 %), či hypermetylace promotoru *BRCA1* (10 %) a *RAD51C* (2 %) (Konstantinopoulos *et al.*, 2015). Dalšími změnami na molekulární úrovni, jenž jsou korelovány s deficiencí homologní rekombinace u HGSOC

jsou mutace nebo amplifikace *CDK12*, které jsou přítomny přibližně ve 4 % případů. Preklinické studie naznačují, že knock-down této kinázy senzibilizuje buňky jak na PARP inhibitory, tak na platinové deriváty v důsledku downregulace genů zapojených do HR (Chilà, Guffanti & Damia, 2016; Lui, Grandori & Kemp, 2018). Deficience homologní rekombinace by také mohla být důsledkem homozygotní ztráty *PTEN*, která je přítomna ~ 7 % HGSOE.

Zárodečné mutace *BRCA1* a *BRCA2* jsou nejčastějšími změnami a jsou přítomny u minimálně – 15 % všech ovariálních karcinomů (Pal *et al.*, 2005; Alsop *et al.*, 2012), zatímco somatické mutace *BRCA1* a *BRCA2* byly identifikovány u 6–7 % HGSOE (Hennessy *et al.*, 2010). Většina zárodečných a somatických *BRCA1/2* mutací jsou inserce nebo delece s posunem čtecího rámce, zatímco missense mutace jsou vzácné (Rebbeck *et al.*, 2015). U EOC se epigenetické umlčování prostřednictvím hypermetylace promotoru vyskytuje u *BRCA1*, ale nebylo popsáno u *BRCA2* genu. Hypermetylace promotoru *BRCA1* u HGSOE se vzájemně vylučuje s mutacemi *BRCA1/2*, což naznačuje, že existuje silný selektivní tlak na inaktivaci *BRCA* buď mutací, nebo epigenetickým umlčením u tohoto onemocnění (Baldwin *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2000). Další změny dráhy HR zahrnují mutace v několika genech FA (hlavně *PALB2*, *FANCA*, *FANCI*, *FANCL* a *FANCC*), v genech RAD, jako je *RAD50*, *RAD51*, *RAD51C* a *RAD54L*, a v genech DDR zapojených do HR, jako je *ATM*, *ATR*, *CHEK1* a *CHEK2* (Konstantinopoulos *et al.*, 2015).

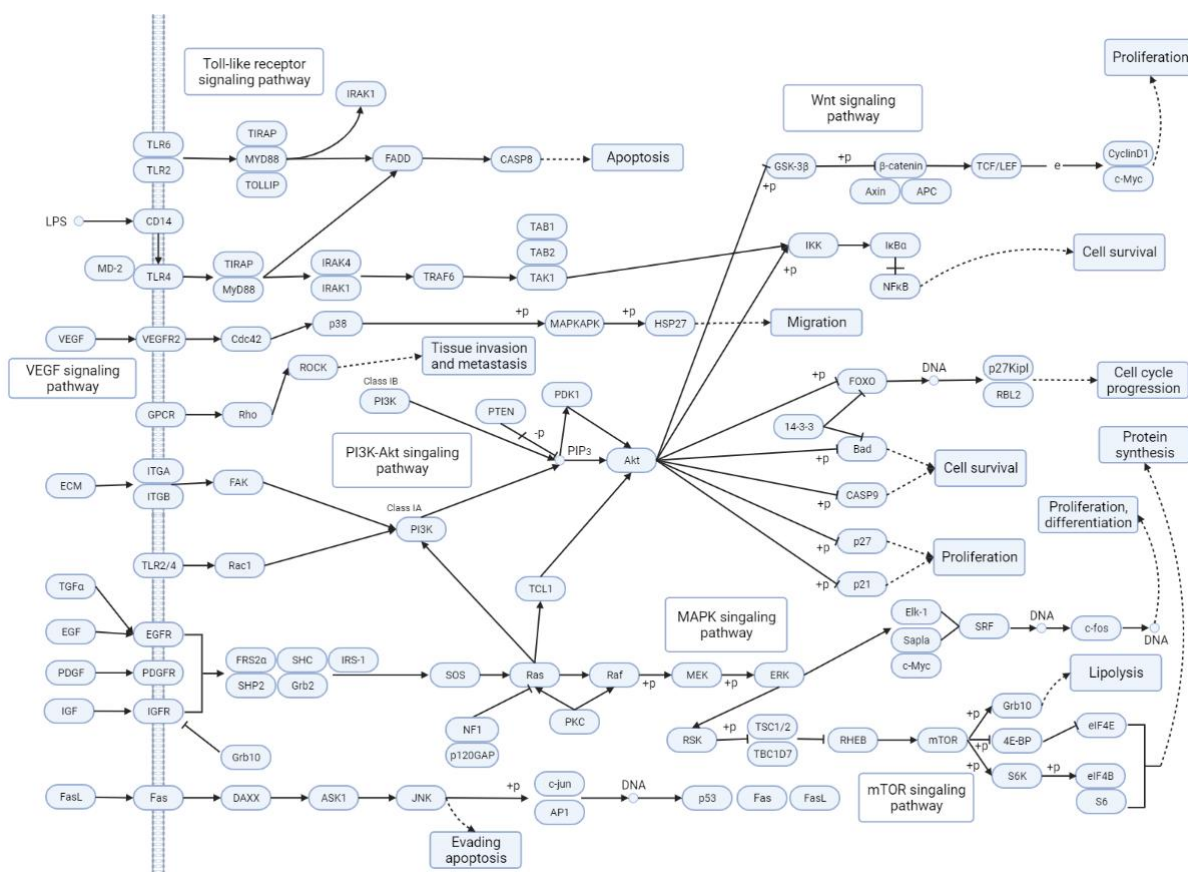
3.2 PI3K/AKT/mTOR

Signální kaskáda zahrnující PI3K, AKT a mTOR je nejčastěji alterovaná dráha u nádorových onemocnění a řídí mnoho procesů, které jsou důležité pro rozvoj nádoru, jako je buněčný cyklus, přežití buněk, metabolismus, motilita, angiogeneze, chemorezistence a genomická nestabilita. Jako hlavní downstream efektor receptorových tyrosinkináz (RTK) a receptorů spřažených s G proteinem převádí PI3K intracelulárně signály různých růstových faktorů a cytokinů generováním fosfolipidů, které následně aktivují efekторы včetně AKT a mTORC1. Existují tři třídy PI3K (třídy I–III). Třída I PI3K se dále dělí na kinázy IA PI3K (PI3K α , β a γ), které jsou aktivovány receptory s aktivitou protein tyrosinkinázy, a kinázy IB PI3K (PI3K δ), které jsou aktivovány receptory spřaženými s G proteinem. Třída IA PI3K jsou heterodimerní kinázy skládající se z regulační podjednotky p85 a katalytické podjednotky p110 a má se za to, že hrají mnohem důležitější roli v nádorových onemocněních než jiné PI3K. Existují tři izoformy p110 podjednotky třídy IA (α , β a γ), které jsou kódovány třemi geny

(*PIK3CA*, *PIK3CB* a *PIK3CD*, v tomto pořadí). Z nich pouze *PIK3CA* bývá v nádorech často mutován (Fruman & Rommel, 2014). V reakci na extracelulární signály aktivovaný PI3K fosforyluje fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PI(4,5)P₂; PIP₂) za vzniku fosfatidylinositolu (3,4,5)-trifosfátu (PI(3,4,5)P₃; PIP₃), což vede k inkorporaci AKT do plazmatické membrány, jeho následné fosforylaci a aktivaci. Nádorové supresory PTEN a INPP4B jsou nejdůležitějšími negativními regulátory signální dráhy PI3K. PTEN defosforyluje fosfát PIP₃ za vzniku PIP₂ a INPP4B defosforyluje fosfát v poloze 4 fosfatidylinositol (3,4)-bisfosfátu (PI(3,4)P₂) za vzniku PI(3)P. Oba tyto produkty inhibují aktivaci AKT závislou na PI3K (Gewinner *et al.*, 2009). Ztráta PTEN nebo INPP4B tedy vede k akumulaci PIP₃, respektive PI(3,4)P₂, což vede k prodloužené fosforylaci a aktivaci AKT.

Aktivovaný AKT může přímo aktivovat mTORC1 fosforylací mTOR a nepřímo aktivovat mTORC1 fosforylací komplexu tuberózní sklerózy 2 (TSC2). Fosforylace TSC2 pomocí AKT vede k inhibici funkce komplexu TSC1/TSC2. Když je komplex TSC1/TSC2 aktivován, TSC2 stimuluje konverzi Rheb (homolog Ras) -GTP na Rheb-GDP, který inaktivuje mTORC1. Když je TSC2 inaktivován (fosforylován) AKT, Rheb-GTP stimuluje aktivitu mTORC1. Proto genetické změny, které ovlivňují tuto signální dráhu, vedou ke zvýšené aktivaci mTORC1 (Mabuchi, Hisamatsu & Kimura, 2011; Laplante & Sabatini, 2012). Po aktivaci mTORC1 fosforyluje translaci regulující faktor ribozomální S6 kinázu-1 (S6K-1) a eukaryotní translační iniciační faktor 4E vazebný protein-1 (4EBP-1). Aktivace S6K-1 vede k translaci mRNA kódující ribozomální proteiny, elongační faktory a další proteiny potřebné pro přechod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Fosforylace 4EBP-1 také zvyšuje translaci mRNA kódující cyklin D1, c-Myc a hypoxií indukovatelný faktor-1 α (HIF-1 α), což vede k progresi buněčného cyklu nebo angiogenezi (Laplante & Sabatini, 2012).

Druhý mTOR komplex, mTORC2, se skládá ze šesti proteinů. Přesný mechanismus, kterým je mTORC2 aktivován, ale zůstává nejasný. Pravděpodobně je však k aktivaci mTORC2 vyžadován PI3K (Zinzalla *et al.*, 2011). Aktivovaný mTORC2 naopak fosforyluje kinázy, jako je AKT, sérum a glukokortikoidy regulované kinázy a proteinkinázu C- α , a řídí buněčnou proliferaci, metabolismus glukózy, remodelaci cytoskeletu a apoptózu (Laplante & Sabatini, 2012).



Obrázek 9. Schématické znázornění PI3K/AKT signální dráhy a souvisejících signálních drah.

3.2.1 Alterace PI3K/AKT/mTOR dráhy u karcinomu vaječníků

Dysregulace PI3K dráhy zahrnující amplifikaci a somatické mutace *PIK3CA*, delece nebo inaktivace *PTEN* a amplifikace nebo mutace *AKT* je často pozorována u různých typů nádorů (Janku, Yap & Meric-Bernstam, 2018). Rané genomické výzkumy prokázaly četné genetické alterace *PIK3CA* také u epiteliálních nádorů vaječníků (4–12 %) (Campbell *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), zejména u světlobuněčných karcinomů (20–46 %) (Campbell *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2009), a u endometroidních karcinomů vaječníků (20 %), méně pak u high-grade serosních karcinomů ovaria (2,3 % – 3 %) (Campbell *et al.*, 2004; Matulonis *et al.*, 2011). Mezi další časté alterace této dráhy u karcinomu vaječníků patří amplifikace *AKT2* (Nakayama *et al.*, 2006; Carden *et al.*, 2012) a ztráta *PTEN* prostřednictvím různých mechanismů (delece, ztráta heterozygotnosti nebo epigenetické umlčování) (Obata *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000; Kurose *et al.*, 2001; McConechy *et al.*, 2014).

PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Pilotní práce k hodnocení toxicity HIPEC

4.1.1 Soubor pacientů a použitá metodika

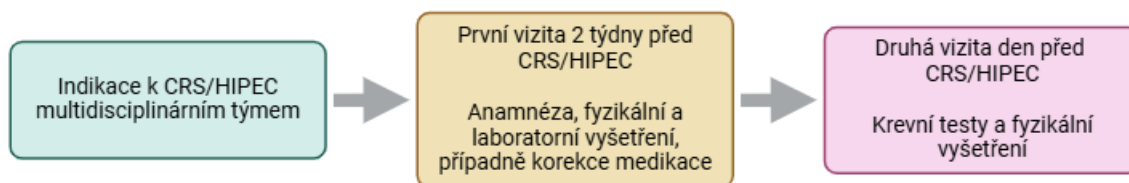
Od 1. ledna 2016 do 1. ledna 2018 podstoupilo ve Fakultní nemocnici Olomouc 44 pacientů CRS/HIPEC. Byla získána klinická a patologická data těchto pacientů zahrnující pohlaví, věk, místo primárního nádoru, rozsah onemocnění, rozsah peritoneálního postižení (hodnoceno pomocí PCI), rozsah a úplnost chirurgického zákroku (hodnoceno pomocí CCR), předchozí chirurgická a systémová léčba, pooperační systémová léčba a doba do progresu onemocnění (PFS). PFS byl definován jako čas od data CRS/HIPEC k datu progresu choroby. Datum progresu bylo založeno na klinických a zobrazovacích vyšetřeních. Nádorové markery (CA 125, CEA, CA 19-9 a CA 72-4) byly vyšetřovány v 3měsíčních intervalech. CT hrudníku, dutiny břišní a pánve bylo prováděno v 6měsíčních intervalech. Pro výpočet mediánu PFS byla použita Kaplan-Meier metoda s pomocí SAS EG 5 softwaru. Nežádoucí účinky, toxicita a bezpečnost léčby byly hodnoceny podle klasifikace Clavien-Dindo. Všichni pacienti byli diskutováni multidisciplinárním týmem.

Indikační kritéria zahrnovala: 1/ karcinomatóza peritonea; 2/ absence efektivnější možnosti léčby; 3/ dobrý výkonnostní stav pacienta (PS 0-1 dle WHO klasifikace). Kontraindikacemi bylo: 1/ přítomnost viscerálních metastáz (například jaterní nebo plicní metastázy nebo přítomnost kostních metastáz); 2/ celkový výkonnostní stav pacienta PS 2 a méně dle WHO klasifikace; 3/ nádorová infiltrace velkých žil, tepen nebo serózy tenkého střeva, případně zasažení viscerálních orgánů nebo stěny břišní.

U pacientů byl sledován zejména nutriční stav, riziko vzniku infekce, užívání kortikosteroidů a perorálních antikoagulancií, které mohou ovlivnit pooperační komplikace (krvácení, opožděné hojení operačních ran, proleženiny, systémové infekce, respirační selhání apod.) vedoucí k delší době hospitalizace a vyšší pooperační mortalitě.

První vizita proběhla dva týdny před CRS/HIPEC během které byla odebrána anamnéza, provedeno fyzikální a laboratorní vyšetření, a případně i provedeny korekce medikace. Druhá vizita proběhla den před CRS/HIPEC opět s krevními testy a fyzikálním vyšetřením pacienta. Diagram vyobrazující přípravu pacienta před CRS/HIPEC je znázorněn na obrázku 10. Čtyři

až šest týdnů po zákroku proběhla vizita k posouzení toxicity a zvládnutí nežádoucích účinků, poté byli pacienti sledováni v 3měsíčních intervalech.



Obrázek 10. Schéma přípravy pacienta před CRS/HIPEC.

Tabulka 4. Podskupiny pacientů podle primárního nádoru. n – počet pacientů; PCI – peritoneal cancer index; CCR – cytoredukční skóre.

Primární nádor	n	Recidivující onemocnění / Primární léčba	PCI	CCR0	CCR1	CCR2
Karcinom ovaria	17	7/10	5	10	3	4
Kolorektální karcinom	9	8/1	10	6	0	3
Pseudomyxom peritonea	8	1/7	15	6	1	1
Mezoteliom	9	0/9	20	5	2	2
Karcinom endometria	1	1/0	6	0	0	1

4.1.2 Výsledky

Do naší retrospektivní analýzy bylo zařazeno 32 žen a 12 mužů ve věku 36 až 76 let s mediánem 61 let. 17 patientek bylo s diagnózou karcinomu vaječníku, 9 pacientů s kolorektálním karcinomem, 9 pacientů s peritoneálním mezoteliomem, 8 pacientů s pseudomyxomem peritonea a jedna pacientka s karcinomem endometria.

Medián PFS nebyl v podskupině patientek s karcinomem vaječníku v době hodnocení dosažen. Medián sledování byl 7 měsíců. V podskupině pacientů s kolorektálním karcinomem byl medián PFS 6 měsíců. Žádný pacient s pseudomyxomem peritonea neprogredoval během mediánu sledování 7 měsíců. Ve skupině pacientů s mezoteliomem došlo k progresi u jednoho pacienta, přičemž medián sledování v této podskupině byl 10 měsíců. Jedna pacientka s karcinomem endometria byla bez onemocnění 9 měsíců po CRS/HIPEC.

Perioperační mortalita byla 2 % (1/44). K úmrtí došlo v důsledku akutní jaterní nekrózy u jednoho pacienta, který byl léčen HIPEC s oxaliplatinou. Závažná perioperační morbidita 3. a 4. stupně podle Clavien-Dindo klasifikace byla 11 % (5/44). Závažné komplikace se vyskytly

u 4 pacientů s kolorektálním karcinomem a jednoho pacienta s pseudomyxomem peritonea. Všichni tito pacienti podstoupili HIPEC s oxaliplatinou 460 mg/m². Pacienti byli reoperováni pro podezření na krvácení do břicha a zánětlivé komplikace. Pozorovali jsme pooperační nechirurgické krvácení v peritoneální dutině pouze u pacientů, kterým byla podána při HIPEC oxaliplatina (Lemstrová *et al.*, 2019, Příloha 1).

4.2 Pilotní práce k zavedení metodiky stanovování exprese a hodnocení alterace genové exprese buněčné signalizace na tkáních karcinomu pankreatu

4.2.1 Materiál a použitá metodika

Nejprve byl připraven xenograft, kdy athymické myši byla subkutánně injikována buněčná suspenze Paca-44. Buněčná linie lidského karcinomu pankreatu Paca-44 byla použita, jelikož obsahuje *KRAS* mutaci G12V, která se často vyskytuje u pacientů s PDAC (Moore *et al.*, 2001). Poté, co nádory dosáhly velikosti ~100 mm³, byla zahájena léčba experimentálním taxanem SB-T-1216 u jedné skupiny xenograftů (n = 5), druhá skupina (n = 7) nedostala žádnou léčbu. Po druhé dávce léčiva byla zvířata usmrcena, odebrána nádorová tkáň k dalšímu zpracování a vyšetření.

Nádorová tkáň byla homogenizována a RNA byla vyizolována dle již dříve popsanych postupů (Mohelníková-Duchoňová *et al.*, 2013). Následovala syntéza cDNA, dle již dříve popsanych postupů (Souček *et al.*, 2005).

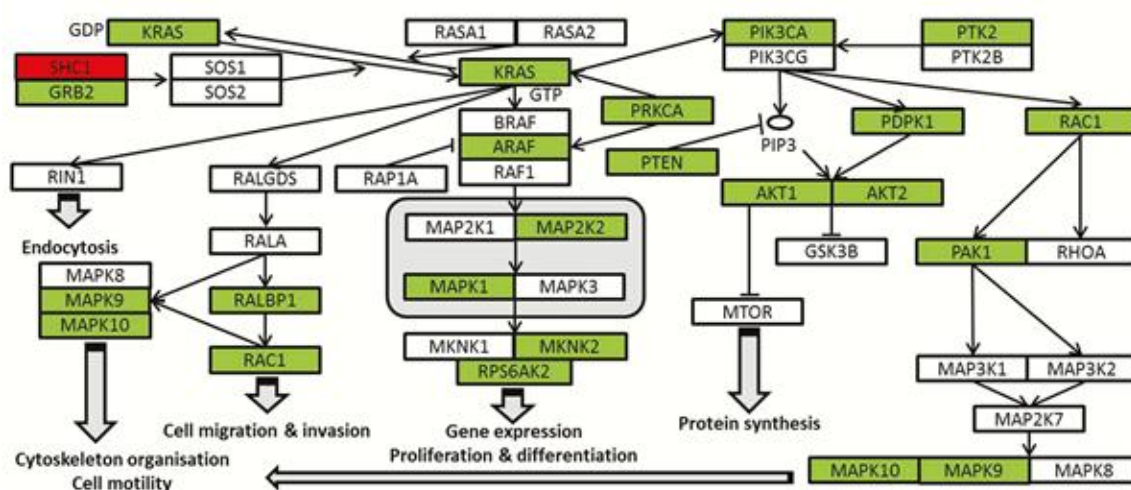
Geny pro studium signální dráhy *KRAS* byly vybrány pomocí veřejně dostupné databáze KEGG. Celkem bylo pro analýzu genové exprese vybráno 42 genů. Kvantitativní real-time PCR (qPCR) byla prováděna s použitím TaqMan® Gene Expression Assays s optimalizovanými sadami primerů a sond a TaqMan™ Universal Master Mix II s UNG (Uracil-DNA glykosyláza). *POP4*, *ELF1*, *MRPL19* a *EIF2B1* byly použity jako referenční geny specifické pro studie PDAC založené na dříve publikovaných datech (Mohelníková-Duchoňová *et al.*, 2012). Negativní kontrola (NTC; *angl.* non-template control) obsahovala vodu místo cDNA. Negativní kontroly syntézy cDNA (RNA transkribovaná bez reverzní transkriptázy) byly také použity k odhalení možných kontaminací. Každý vzorek byl testován v duplikátech a pro výpočet byla použita střední hodnota. PCR reakce byla zahájena při 50 °C po dobu 2 minut, poté následovala počáteční denaturace 10 minut při 95 °C, následně 40 cyklů denaturace

po dobu 15 s při 95 °C a elongace po dobu 1 minuty při 60 °C. Míra genové exprese byla analyzována pomocí Roche LightCycler 480 System softwaru. Poměr Ct konkrétního cílového genu k aritmetickému průměru Ct všech referenčních genů byly vypočteny pro každý vzorek a použity pro statistické vyhodnocení pomocí analýzy dat RT² Profiler PCR Array v3.5.

Zpracování dat a kontrola kvality byly provedeny s použitím softwaru Microsoft Excel. Změna exprese vlivem léčby byla vypočítána z hodnot Ct v souladu s komparativní Ct metodou popsanou Livakem a Schmittgenem (Livak & Schmittgen, 2001).

4.2.2 Výsledky

Výsledky překvapivě prokázali sníženou expresi většiny genů KRAS signální dráhy působením taxanu SB-T-1216 *in vivo*. Downregulované geny představovaly upstream větev PI3K/AKT signální dráhy, včetně *AKT1/2*, *RAC1* a *PAK1* a downstream geny větví *RALGDS* a *RIN1* signální dráhy KRAS, včetně JNK kináz *MAPK9* a *MAPK10*. Geny MAPK větve signální dráhy KRAS byly také většinou downregulované (*KRAS*, *ARAF*, *MAP2K2*, *MAPK1*, *MKNK2* a *RPS6AK2*), což indikovalo supresi dráhy na úrovni transkriptu (Oliverius *et al.*, 2019, Příloha 2).



Obrázek 11. Mapa signální dráhy KRAS zachycující odlišně exprimované geny u kontrolních xenograftů ve srovnání s xenografty léčenými experimentálním taxanem SB-T-1216. Downregulované geny jsou znázorněny zeleně a upregulované geny jsou červeně.

4.3 Hlavní téma práce

4.3.1 Soubor pacientek

V období od února 2018 do prosince 2019 byly shromážděny vzorky primárních nádorů a párových peritoneálních metastáz od 28 pacientek podstupující CRS/HIPEC pro EOC. Po chirurgickém odstranění nádoru (maximální možné cytoredukci) byla následně u všech pacientek provedena hypertermická intraperitoneální chemoterapie cisplatinou v dávce 100 mg/m². Doba aplikace cytostatika byla 60 minut. Tkáňové vzorky byly ihned po vyjmutí uloženy do stabilizačního roztoku – RNA lateru a odeslány potrubní poštou do laboratoře, kde byly skladovány v -80 °C. Klinická data byla shromážděna z lékařských záznamů pacientek. Před zařazením do studie byly všechny pacientky požádány o přečtení a podepsání informovaného souhlasu v souladu s požadavky Etické komise Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc (protokol č. 118/17).

4.3.2 Metody

4.3.2.1 Izolace RNA a následná syntéza cDNA

Prvním krokem izolace byla homogenizace odebraných tkání pomocí tekutého dusíku. Celková RNA byla izolována pomocí Trizol reagentu podle výrobního protokolu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Vyizolovaná RNA byla alikvotována a uložena při teplotě -80 °C. Koncentrace izolované RNA byla měřena pomocí UV BioSpectrometeru (Eppendorf, Hamburg, Germany). Hodnocení integrity RNA bylo provedeno pomocí denaturační elektroforézy založené na vizualizaci dvou ribozomálních podjednotek, 28S a 18S. Vizualizace byla provedena pomocí systému ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Vzorky RNA, které prošly kontrolou kvality, byly přepsány do komplementární DNA (cDNA). Pro reverzní transkripci byl použit iScript gDNA Clear cDNA kit pro syntézu (Bio-Rad 172-5034), sterilní voda bez přítomnosti Dnáz a Rnáz a RNA. Ošetření vzorků RNA s DNase I a následná syntéza cDNA byly provedeny podle výrobního protokolu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla použita k amplifikaci fragmentu ubiquitin C ke kontrole kvality nasyntetizované cDNA, pro možné kontaminace genomovou DNA (gDNA). Amplifikační produkt ubiquitin C, cDNA, měl délku 190 bp, zatímco v případě gDNA měl

délku 1009 bp. Každý vzorek byl identifikován číslem a příponou – AR (nádorová tkáň) nebo – MR (metastatická tkáň).

4.3.2.2 Kvantitativní real-time PCR

Expres 84 genů DNA repair dráhy (tabulka 5) byla měřena pomocí kvantitativního PCR v reálném čase (qPCR) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pro normalizaci výsledků bylo použito pět referenčních genů (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* a *RPLP0*). Pro PCR byly použity PrimePCR SYBR Green Assays (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a navrhnutý primer 5'→3' se sekvencí ATT TGG GTC GCA GTT CTT GT a reverse primer 3'→5' se sekvencí TCC AGC AAA GAT CAG CCT CT.

Aby byly zajištěny konzistentní výsledky, celá kvantitativní analýza byla provedena v trojitém opakování. PCR reakce byly prováděny v 384 - jamkových destičkách a celkový objem směsi reakce na jamku byl 10 µL. Koncentrace cDNA v reakci byla 30 ng. No primer control (NPC) obsahoval nuklease-free vodu namísto esaje.

PCR reakce byla zahájena počáteční denaturací při 95 °C po dobu 30 s, následovanou 40 cykly denaturace po dobu 5 s při 95 °C a elongace po dobu 30 s při 60 °C. Reakce byla zakončena denaturací při 95 °C po dobu 5 s. Po posledním kole amplifikace byla reakce podrobena teplotnímu gradientu od 65 °C do 95 °C za vzniku křivky tání.

Tabulka 5. Seznam testovaných genů použitých v naší studii pro analýzu genové exprese. BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubiquitinace a modifikace. Referenční geny jsou označeny symbolem (*).

Gen	RefSeq	ID eseje	OMIM číslo	DNA repair dráha
APEX1	NM_080649	qHsaCID0012533	107748	BER
APEX2	NM_014481	qHsaCED0046611	300773	BER
ATM	NM_000051	qHsaCED0045448	607585	SDDA
ATP23	NM_033276	qHsaCID0008603	619760	Nelze zařadit
ATR	NM_001184	qHsaCID0022638	601215	Nelze zařadit
ATXN3	NM_004993	qHsaCED0037933	607047	Nelze zařadit
BRCA1	NM_007294	qHsaCED0038604	113705	HR
BRCA2	NM_000059	qHsaCED0044922	600185	FA
BRIP1	NM_032043	qHsaCED0044695	605882	FA

CCNH	NM_001239	qHsaCID0007234	601953	NER
CCNO	NM_021147	qHsaCED0002266	607752	Nelze zařadit
CDK7	NM_001799	qHsaCED0044530	601955	NER
DDB1	NM_001923	qHsaCID0021586	600045	NER
DDB2	NM_000107	qHsaCID0016961	600811	NER
DMC1	NM_007068	qHsaCID0017628	602721	HR
ERCC1	NM_001983	qHsaCID0008822	126380	NER
ERCC2	NM_000400	qHsaCID0037822	126340	NER
ERCC3	NM_000122	qHsaCED0046050	133510	NER
ERCC4	NM_005236	qHsaCID0018113	133520	NER
ERCC5	NM_000123	qHsaCED0044577	133530	NER
ERCC6	NM_000124	qHsaCED0048692	609413	NER
ERCC8	NM_000082	qHsaCED0042118	609412	NER
EXO1	NM_130398	qHsaCED0035328	606063	EPN
FEN1	NM_004111	qHsaCED0036761	600393	EPN
LIG1	NM_000234	qHsaCID0008449	126391	NER
LIG3	NM_002311	qHsaCID0018427	600940	BER
LIG4	NM_002312	qHsaCED0047042	601837	NHEJ
MGMT	NM_002412	qHsaCED0036780	156569	DRD
MLH1	NM_000249	qHsaCED0042382	120436	MMR
MLH3	NM_014381	qHsaCID0021156	604395	MMR
MMS19	NM_022362	qHsaCED0002239	614777	NER
MPG	NM_002434	qHsaCED0057200	156565	BER
MRE11A	NM_005590	qHsaCED0042016	600814	HR
MSH2	NM_000251	qHsaCED0042676	609309	MMR
MSH3	NM_002439	qHsaCED0043488	600887	MMR
MSH4	NM_002440	qHsaCED0042166	602105	MMR
MSH5	NM_002441	qHsaCED0038330	603382	MMR
MSH6	NM_000179	qHsaCED0043663	600678	MMR
MUTYH	NM_012222	qHsaCED0038608	604933	BER
NEIL1	NM_024608	qHsaCED0056614	608844	BER
NEIL2	NM_145043	qHsaCED0045633	608933	BER
NEIL3	NM_018248	qHsaCED0043285	608934	BER
NTHL1	NM_002528	qHsaCED0042216	602656	BER
OGG1	NM_002542	qHsaCED0043531	601982	BER
PARP1	NM_001618	qHsaCED0045162	173870	BER
PARP2	NM_005484	qHsaCED0044268	607725	BER
PARP3	NM_005485	qHsaCED0042084	607726	BER
PMS1	NM_000534	qHsaCID0022093	600258	MMR
PMS2	NM_000535	qHsaCED0043945	600259	MMR
PNKP	NM_007254	qHsaCID0014360	605610	BER
POLB	NM_002690	qHsaCED0056776	174760	DP
POLD3	NM_006591	qHsaCID0007030	611415	DP
POLL	NM_013274	qHsaCED0046360	606343	DP
PRKDC	NM_006904	qHsaCID0007587	600899	NHEJ
RAD18	NM_020165	qHsaCID0007443	605256	UM

RAD21	NM_006265	qHsaCED0046249	606462	Nelze zařadit
RAD23A	NM_005053	qHsaCED0037589	600061	NER
RAD23B	NM_002874	qHsaCED0005365	600062	NER
RAD50	NM_005732	qHsaCID0013265	604040	HR
RAD51	NM_002875	qHsaCED0042133	179617	HR
RAD51B	NM_133509	qHsaCID0036877	602948	HR
RAD51C	NM_058216	qHsaCED0036407	602774	FA
RAD51D	NM_002878	qHsaCED0047745	602954	HR
RAD52	NM_134424	qHsaCED0041872	600392	HR
RAD54L	NM_003579	qHsaCED0042535	603615	HR
RFC1	NM_002913	qHsaCED0042061	102579	Nelze zařadit
RPA1	NM_002945	qHsaCID0016650	179835	NER
RPA3	NM_002947	qHsaCED0023169	179837	NER
SLK	NM_014720	qHsaCED0042224	616563	Nelze zařadit
SMUG1	NM_014311	qHsaCED0037592	607753	BER
TDG	NM_003211	qHsaCED0004553	601423	BER
TOP3A	NM_004618	qHsaCED0047236	601243	SDDA
TOP3B	NM_003935	qHsaCID0008975	603582	Nelze zařadit
TREX1	NM_016381	qHsaCED0048594	606609	EPN
UNG	NM_003362	qHsaCED0042383	191525	BER
XAB2	NM_020196	qHsaCID0017153	610850	NER
XPA	NM_000380	qHsaCID0022359	611153	NER
XPC	NM_004628	qHsaCED0045651	613208	NER
XRCC1	NM_006297	qHsaCID0023107	194360	BER
XRCC2	NM_005431	qHsaCID0015694	600375	HR
XRCC3	NM_005432	qHsaCID0014128	600675	HR
XRCC4	NM_003401	qHsaCID0016093	194363	NHEJ
XRCC5	NM_021141	qHsaCID0011752	194364	NHEJ
XRCC6	NM_001469	qHsaCED0048082	152690	NHEJ
ACTB*	NM_001101	qHsaCED0036269	102630	
B2M*	NM_004048	qHsaCID0015347	109700	
GAPDH*	NM_002046	qHsaCED0038674	138400	
HPRT1*	NM_000194	qHsaCID0016375	308000	
RPLP0*	NM_001002	qHsaCED0038653	180510	

4.3.2.3 Statistická analýza

Vytvoření analýzy hlavních komponent (PCA, *angl.* Principal Component Analysis), hierarchické shlukování a vizualizace heat mapy byly provedeny za pomoci veřejně dostupného bioinformatického webového nástroje ClustVis (Metsalu & Vilo, 2015). Asociace mezi kategorizovanými hodnotami, jako je například stav mutace *BRCA1/2* a klinickými daty, byly analyzovány pomocí Fisherova exaktního testu. Pro hodnocení kontinuálních proměnných, jako je genová exprese v porovnání se stavem mutace *BRCA1/2* nebo klinických parametrů, byl

použit Kruskal–Wallisův test. Pro hodnocení rozdílů v expresi genů mezi oběma typy nádorových tkání (primárních nádorů a metastáz) jsme použili Wilcoxonův test. Vzájemné korelace genové exprese byly analyzovány testem Spearmanova rho. Korekce pro opakované testování byla aplikována podle Benjaminiho a Hochberga (Benjamini & Hochberg, 1995). Pouze korelace, které prošly opakovaným testováním korekce, byly dále brány v potaz ($p_{adj} \leq 7,1 \times 10^{-6}$). Funkce přežití byly zobrazeny metodou Kaplan–Meier a byly vyhodnoceny pomocí log-rank testu. P-hodnoty byly odchylkami od dvoustranných testů. Výše uvedené analýzy byly provedeny ve statistickém programu SPSS v16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Pro hodnocení funkčních vztahů mezi korelujícími a klinicky důležitými geny byla využita databáze STRING známých a předpovídaných interakcí mezi proteiny s výchozími nastaveními (Szkarczyk *et al.*, 2021).

4.3.2.4 Klinická data

Germinální mutace *BRCA* byly analyzovány v rámci NGS testování za využití panelu CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application; vlastní panel SeqCap EZ choice; Roche), jak bylo již dříve podrobně popsáno (Soukupová *et al.*, 2018).

Klinicko-patologická data byla získána z lékařských záznamů pacientek a korelována s výsledky sekvenace i expresními profily (zahrnovala věk, stádium onemocnění, histopatologický stupeň diferenciacie nádoru, předchozí léčbu, indukční léčbu a radikalitu cytoreduktivní chirurgické léčby, stejně jako výsledky léčby, konkrétní dobu do progresu onemocnění (PFS) a celkové přežití pacientek (shrnutí v tabulce 6). PFS byla stanovena jako čas mezi CRS a prokázanou recidivou nebo progresí nemoci a OS bylo stanoveno jako čas mezi cytoredukcí a smrtí. Dále byly sledovány vztahy mezi mutacemi a klinickými daty.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Charakteristika studované populace

Studovaná populace čítala 28 pacientek (tabulka 6). Průměrný věk pacientek byl v době diagnózy 57 let s rozmezím od 29 do 72 let. V naší studované populaci převažovala diagnóza high-grade serózního karcinomu (78 %) a průměrné PCI bylo 12. Medián přežití bez progresse byl 14 měsíců a OS pacientek po cytoredukční operaci a HIPEC byl 30 měsíců. CCR, tedy index kvantifikující rozsah reziduální choroby po resekci se pohyboval od 0 do 2. Většina pacientek měla CCR0 (>50 %), zatímco pouze jedna pacientka měla CCR2.

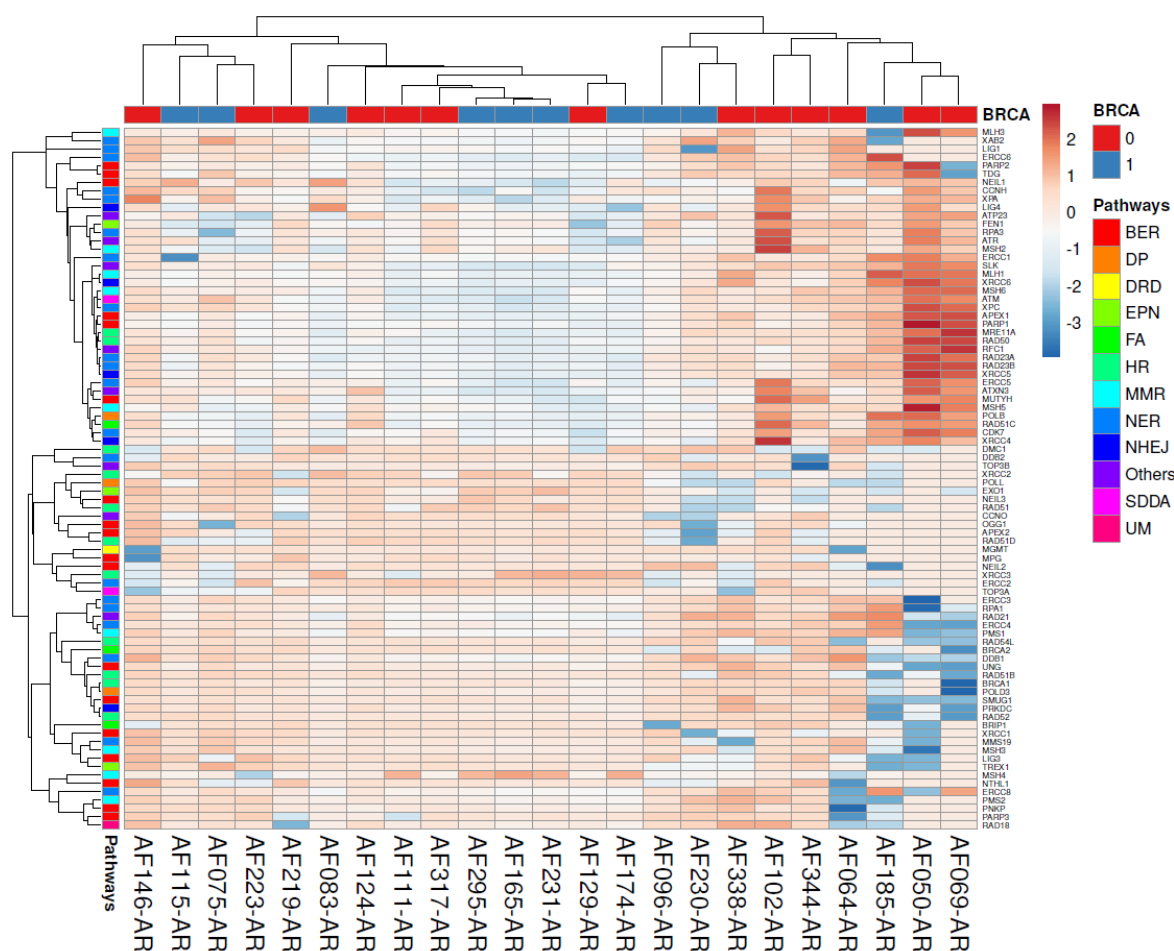
Tabulka 6. Přehledová tabulka všech pacientek naší studie včetně jejich zdravotních záznamů.

CBDCA – karboplatina; HGSC – high-grade serózní karcinom; LGSC – low-grade serózní karcinom; CCA – světlóbněčný adenokarcinom; EC – endometroidní karcinom; GCT – nádor z granulózních buněk; SPA – serózní papilární adenokarcinom, neg – negativní stran mutace, tedy wild type, NA – not able, vyšetření není k dispozici, CCR – cytoredukční skóre, PCI – skóre pro peritoneální karcinomatózu, PFS – doba do progresse onemocnění, OS – celkové přežití.

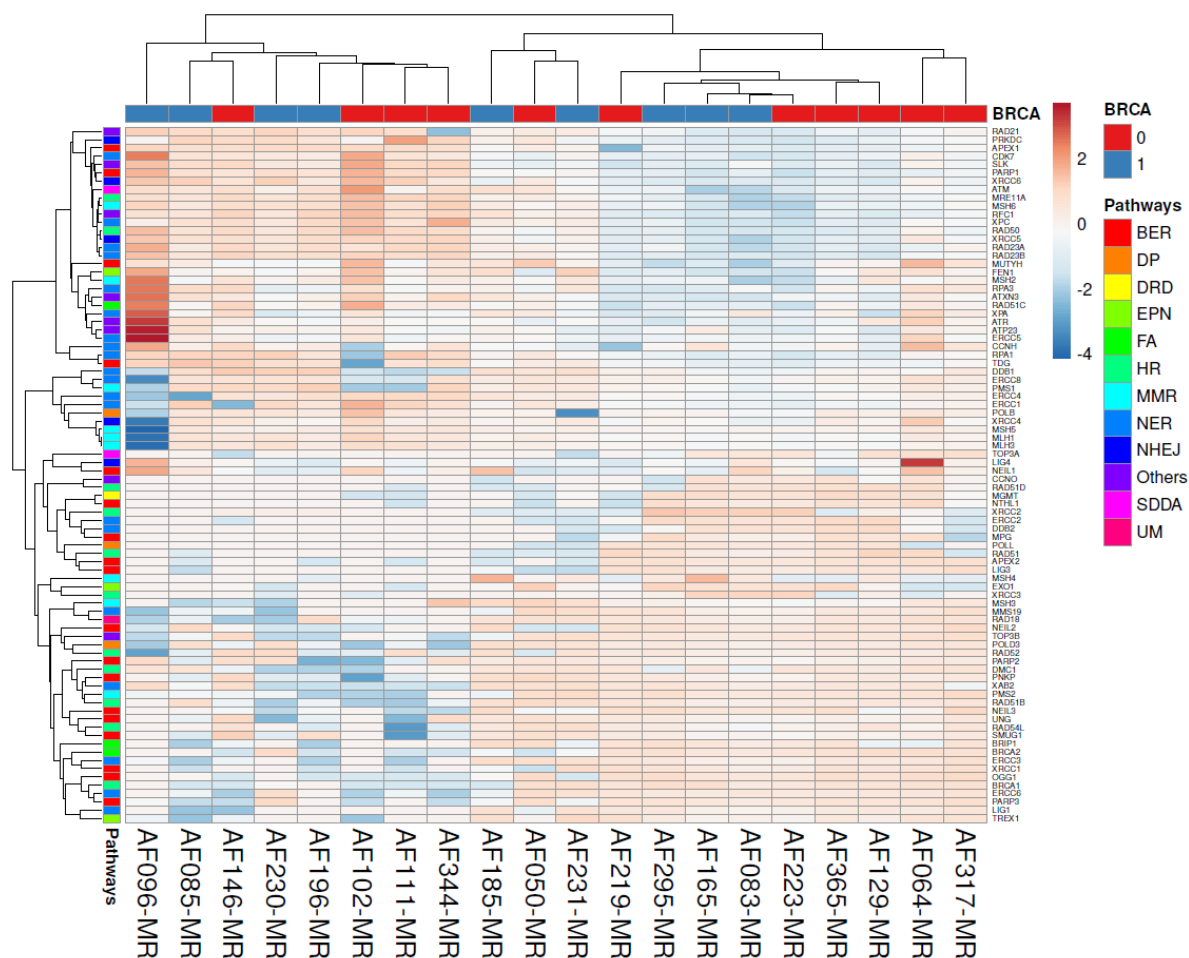
	ID	Věk	Histologický typ	BRCA status	HIPEC	Indukční léčba	CCR	PCI	PFS (měsíce)	OS (měsíce)
1.	AF050	29	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	30	8	44
2.	AF064	54	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	14	18	38
3.	AF069	64	HGSC	neg	Cisplatina	-	0	14	-	39
4.	AF075	61	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	3	11	23
5.	AF083	46	HGSC	BRCA2	Mitomycin/Doxorubicin	-	0	2	12	31
6.	AF085	35	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	6	18	39
7.	AF096	48	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	7	26	32
8.	AF102	56	HGSC	neg	Cisplatina	-	1	8	17	39
9.	AF111	60	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	6	-	37
10.	AF115	55	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	17	5	8
11.	AF124	51	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	8	-	32
12.	AF129	72	CCA	neg	Doxorubicin	-	0	3	11	18
13.	AF146	64	EC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA/Bevacizumab	1	11	-	36
14.	AF159	52	GCT	NA	Cisplatina	NO	2	10	18	23
15.	AF165	63	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	18	10	13
16.	AF174	61	SPA	BRCA2	Cisplatina	-	0	3	-	34
17.	AF185	65	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	12	-	34
18.	AF196	64	HGSC	BRCA2	Cisplatina	-	0	3	-	34
19.	AF219	53	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	21	-	21
20.	AF223	67	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	25	7	23
21.	AF230	62	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	17	7	32
22.	AF231	67	HGSC	BRCA2	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	6	-	0
23.	AF295	54	HGSC	BRCA1	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	15	16	28
24.	AF317	68	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	21	22	25
25.	AF329	50	HGSC	NA	Cisplatina	Gemcitabin/CBDCA	1	18	15	24
26.	AF338	59	HGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	0	-	23
27.	AF344	63	LGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	0	6	-	22
28.	AF365	66	LGSC	neg	Cisplatina	Paklitaxel/CBDCA	1	21	-	21

5.2 Asociace mezi *BRCA1/2* mutacemi a expresí genů cílové signální dráhy

Mutace v *BRCA1/2* byly přítomny ve 12 případech (46,2 %), z toho 8 pacientek mělo mutaci *BRCA1* (66,7 %) a 4 pacientky měly mutaci *BRCA2* (33,3 %). Z heat mapy (obrázek 12 pro nádorovou tkáň a obrázek 13 pro peritoneální metastázy) nebyly zjištěny žádné významné změny expresního profilu mezi vzorky divokého typu a vzorky s přítomnou patogenní *BRCA* mutací.



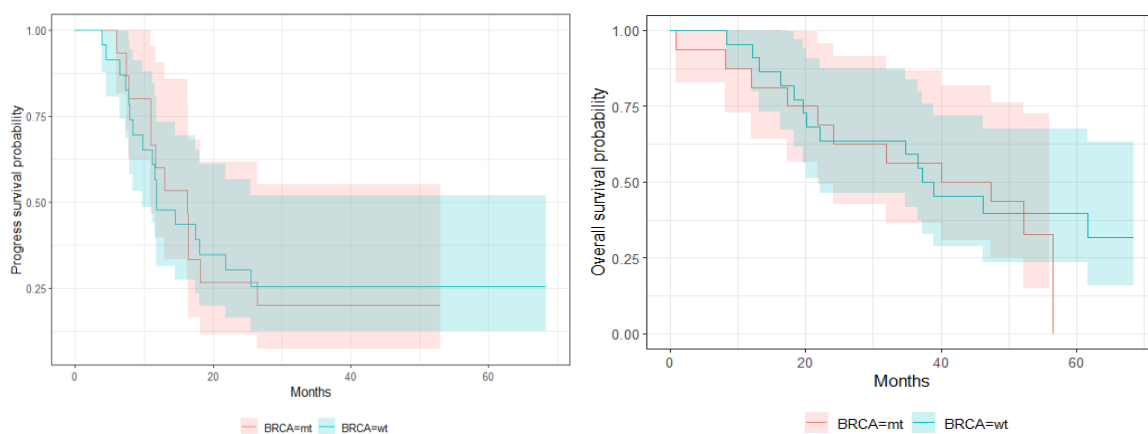
Obrázek 12. Heatmapa asociace mezi úrovněmi transkriptu a *BRCA1/2* mutacemi v nádorové tkáni. BRCA 0 – divoký typ; BRCA 1 – mutovaný; BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubikvitinace a modifikace.



Obrázek 13. Heatmapa asociace mezi úrovněmi transkriptu a *BRCA1/2* mutacemi v nádorové tkáni. BRCA 0 – divoký typ; BRCA 1 – mutovaný; BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubikvitinace a modifikace.

5.3 Celkové přežití a přežití bez progresse

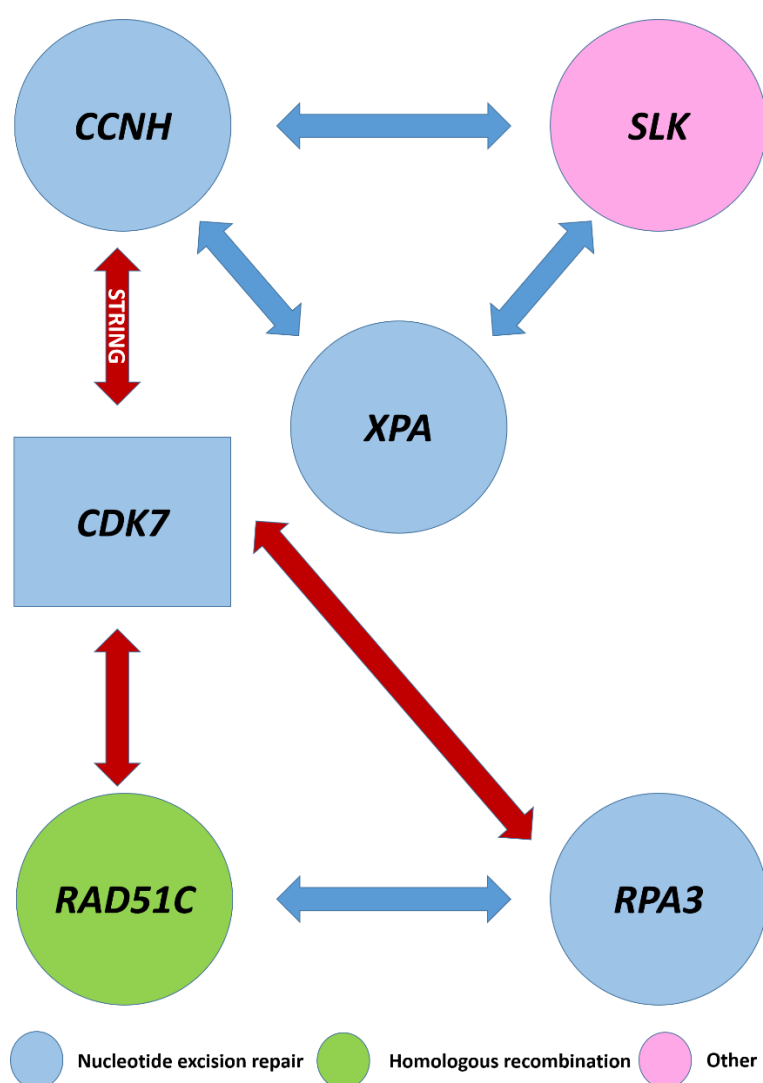
V naší studii byl medián PFS patientek s mutacemi *BRCA1/2* 16 měsíců (95% CI 10,98- NA), zatímco patientky s PFS bez mutace *BRCA1/2* měly medián PFS 11,8 měsíců (95% CI 9,84-NA), ale trend nedosahuje statistické významnosti (log-rank test $p=1,00$). Medián OS patientek bez mutace byl 38 měsíců (95% CI; 22,2-NA), zatímco medián OS patientek s mutací *BRCA1/2* byl 43,7 měsíců (95% CI; 21,8-NA), ale ani tyto výsledky nebyly statisticky významné (long-rank test $p=0,6$). Medián sledování 3,35 let. Patientky byly sledovány v období od února 2018 do května 2023.



Obrázek 14. Kaplan Meierovy křivky celkového přežití a přežití bez progresu onemocnění u EOC pacientek s *BRCA* wild type vs. mutovaný *BRCA*.

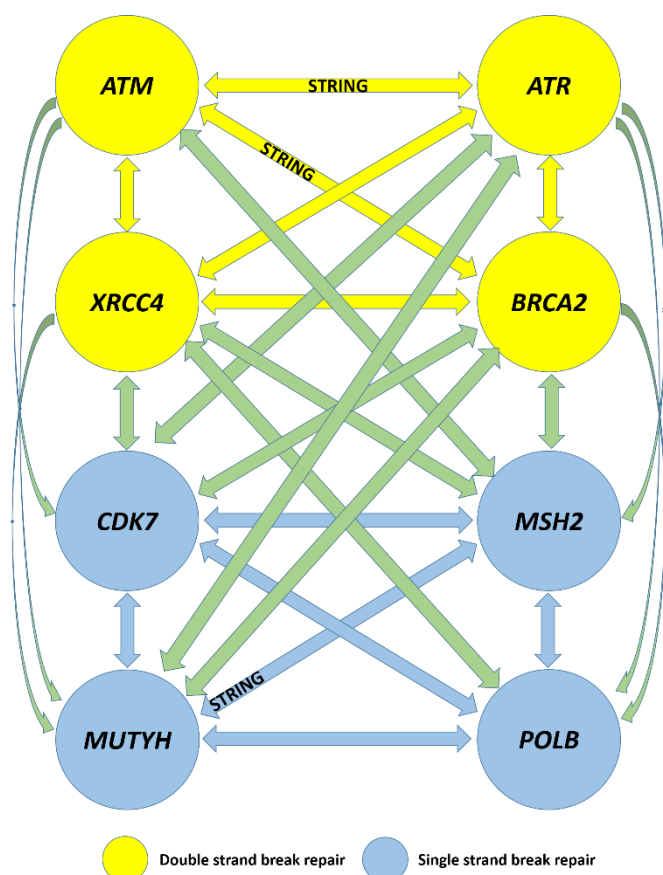
5.4 Korelace mezi geny a asociace mezi expresními profily a celkovým přežíváním pacientek po HIPEC

Pozorovali jsme významnou souvislost mezi OS a expresí šesti genů (*CCNH*, *MLH3*, *RAD51C*, *RPA3*, *SLK* a *XPA*) v primárních nádorových tkáních. Nízká exprese těchto genů (pod mediánem) predikovala významně kratší OS (obrázek 17). Navíc exprese *CCNH* koreluje v řetězci s *XPA* a *SLK* a s *CDK7*, který koreluje s *RAD51C* a *XPA*. *RAD51C* a *XPA* spolu také korelují v jiném řetězci (jak je znázorněno na obrázku 15). Všechny genové korelace byly po korekci významné vzhledem k vícenásobnému testování ($p_{\text{adj}} \leq 7,1 \times 10^{-6}$).

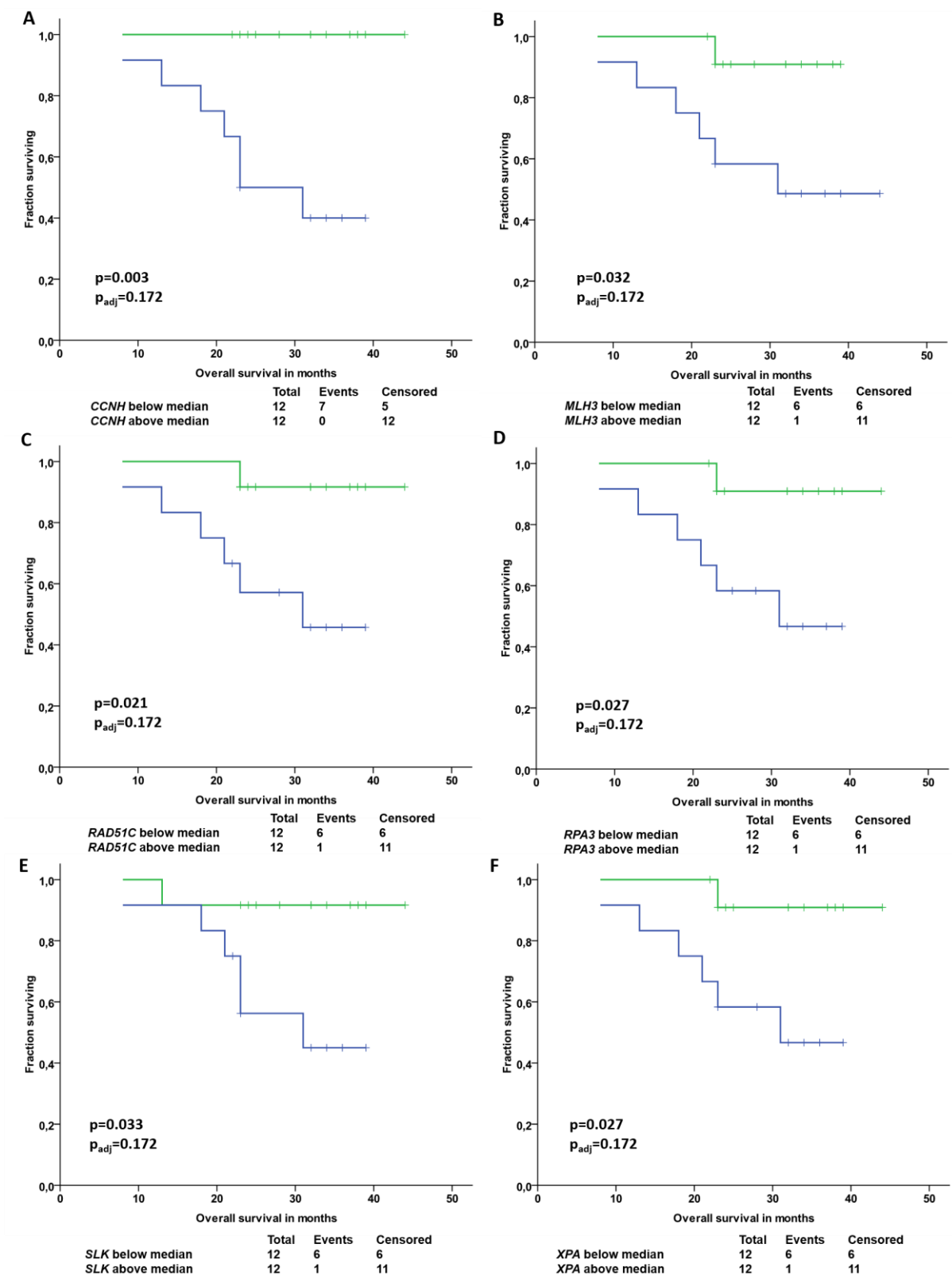


Obrázek 15. Korelace mezi několika prognosticky důležitými geny v primárních tkáních. Geny asociující s OS v kruzích a gen nesouvisející s OS ve čtverci. Interakce protein-protein potvrzená STRING databází je zvýrazněna bílým textem.

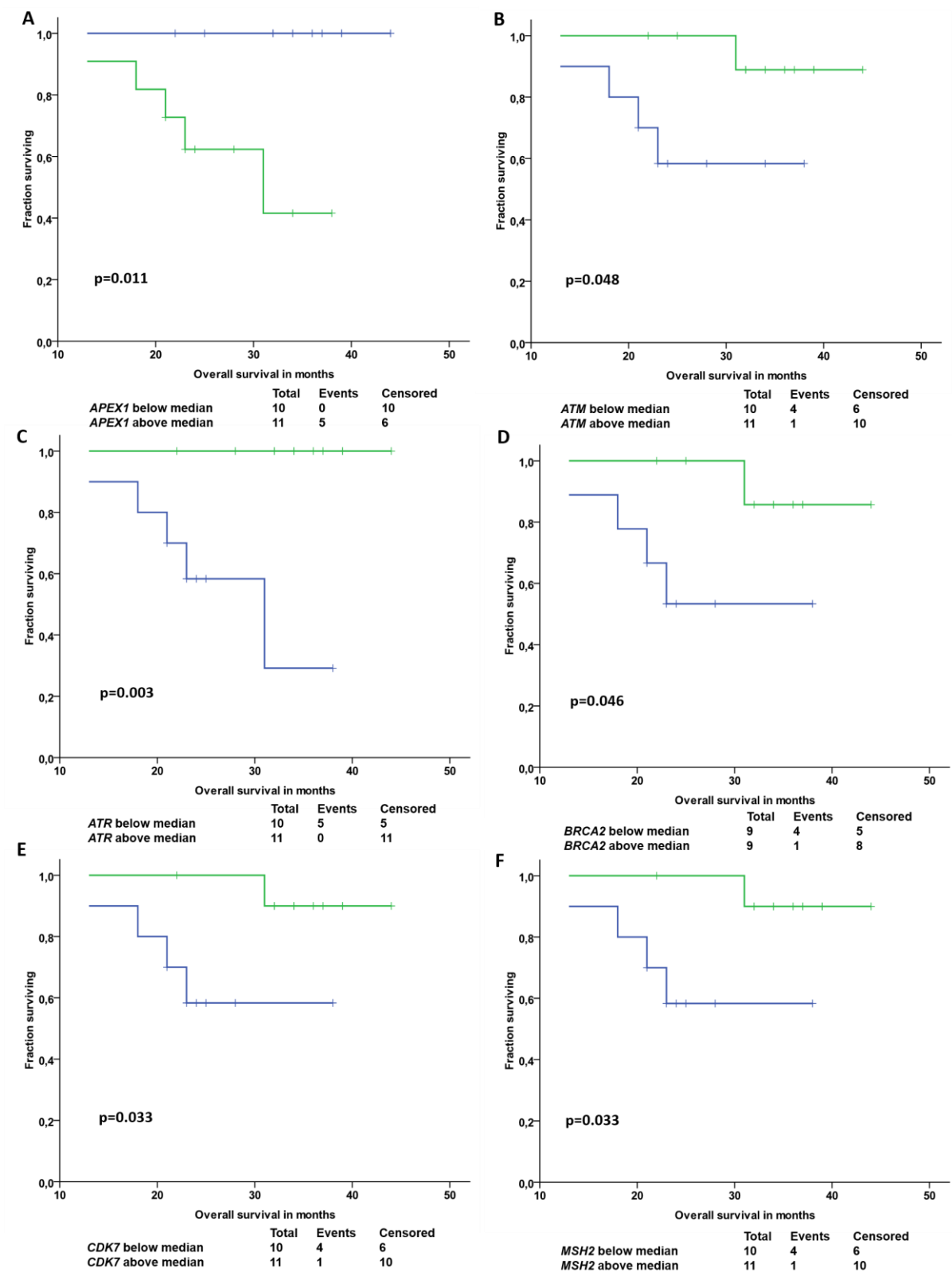
V metastatických tkáních jsme vzhledem k větší variabilitě zjistili i větší množství asociací. Pozorovali jsme významnou souvislost mezi OS a expresí 14 genů (*APEX1*, *ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB*, *PRKDC*, *RAD21*, *RAD23B*, *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*). Genová exprese většiny genů i v tomto případě byla inverzním prognostickým faktorem (*ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB* a *XRCC4*), tedy že nízká exprese (pod mediánem) je spojena s kratší OS jako v případě primárních nádorů (obrázek 17). Na druhou stranu vysoká exprese šesti genů (*APEX1*, *PRKDC*, *RAD21*, *RAD23B*, *XRCC5* a *XRCC6*) byla spojena s kratším OS (obrázek 18). Korelační analýza ukazuje zajímavé spojení mezi geny pro opravu dvouřetězcových zlomů (DSBR) a opravu jednořetězcových zlomů (SSBR), včetně genů pro opravu chybného párování a opravu excize bází. *ATM*–*ATR*–*BRCA2* koreluje s *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB* a *XRCC4* a tvoří velmi silné řetězce. Interakce mezi *MUTYH*–*MSH2*, *ATM*–*ATR* a *ATM*–*BRCA2* jsou podporovány také databází STRING, takže jsou nejzajímavějšími prognostickými faktory v našem souboru (obrázek 16). Naproti tomu geny *APEX1*, *PRKDC*, *RAD21*, *RAD23B*, *XRCC5* a *XRCC6* nekorelovaly mezi sebou ani s výše uvedenými geny DSBR–SSBR.

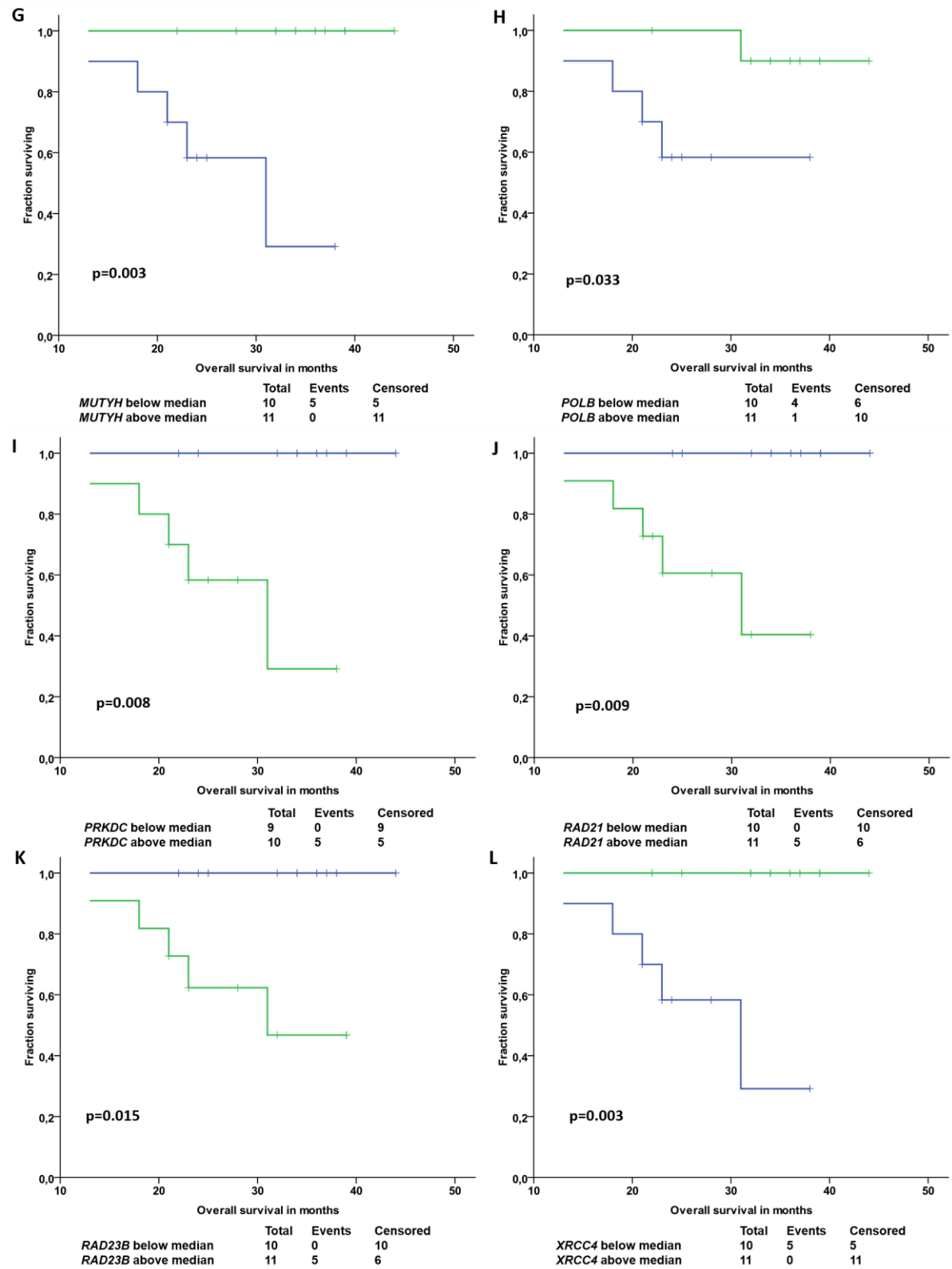


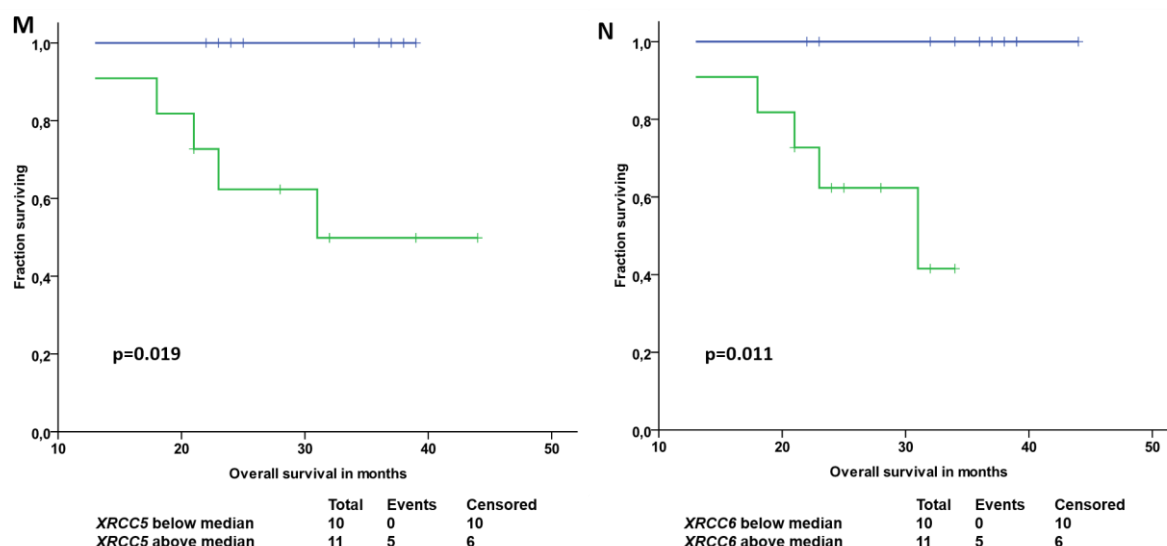
Obrázek 16. Korelace mezi prognosticky významnými geny DSBR-SSBR v metastatických tkáních. Interakce protein-protein potvrzená databází STRING je zvýrazněna.



Obrázek 17. Významné asociace genové exprese v primárních nádorových lokusech s celkovým přežitím. Kaplan Meierovy křivky přežití dělené střední hladinou exprese A – CCNH, B – MLH3, C – RAD51C, D – RPA3, E – SLK a F – XPA. Zelená čára – vyšší genová exprese než medián, modrá čára – nižší genová exprese než medián.



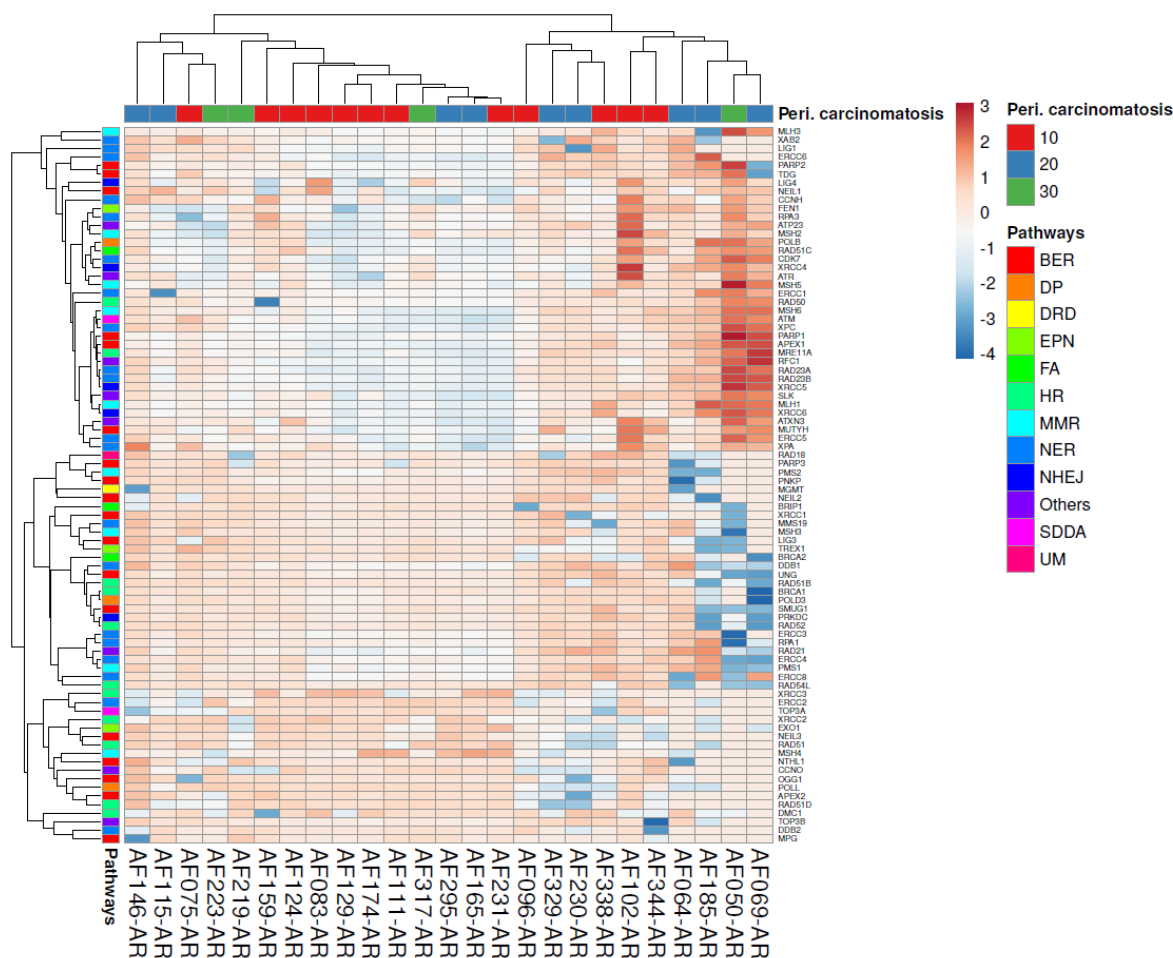




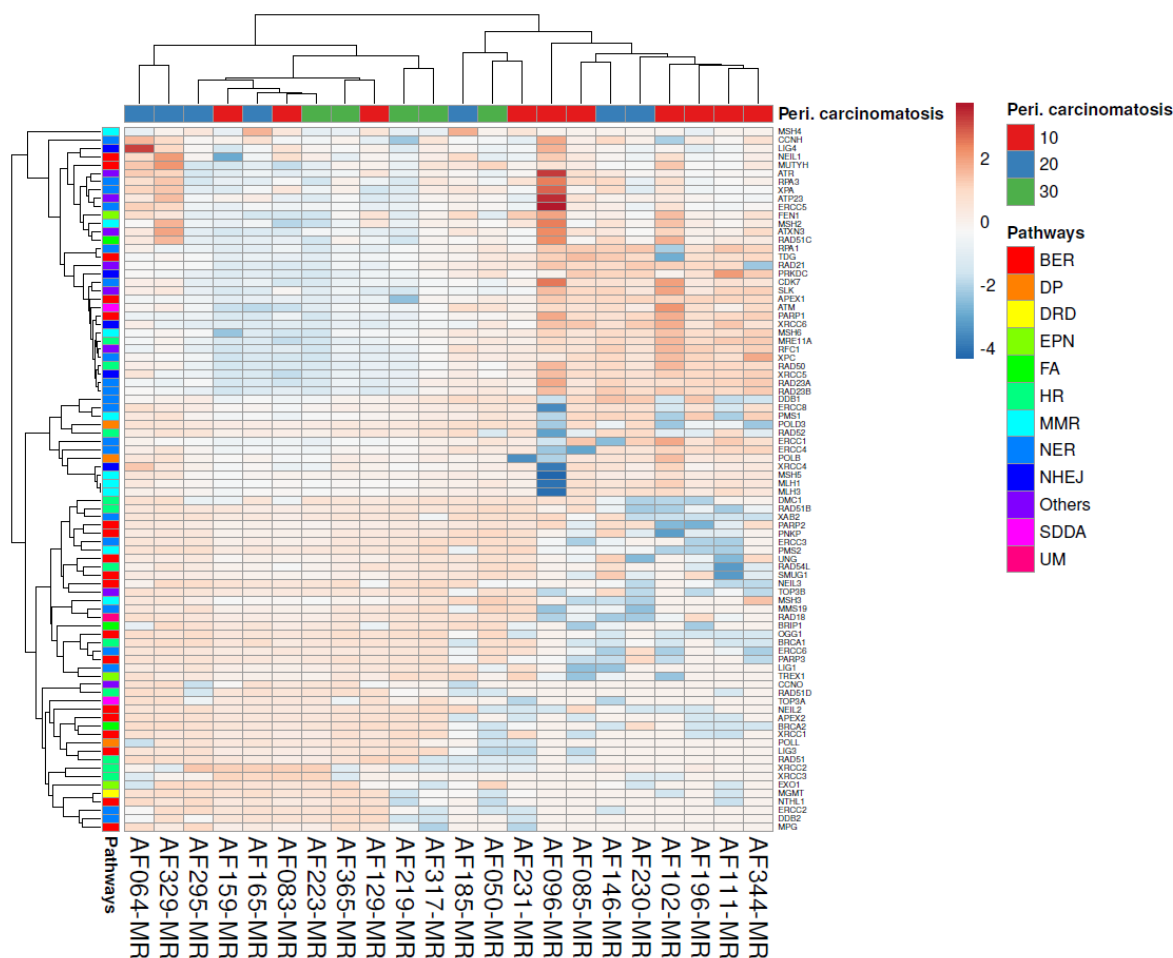
Obrázek 18. Významné asociace genové exprese v metastatických lokusech s celkovým přežitím. Kaplan Meierovy křivky přežití dělené střední hladinou exprese A – *APEX1*, B – *ATM*, C – *ATR*, D – *BRCA2*, E – *CDK7*, F – *MSH2*, G – *MUTYH*, H – *POLB*, I – *PRKDC*, J – *RAD21*, K – *RAD23B*, L – *XRCC4*, M – *XRCC5* a N – *XRCC6*. Zelená čára - vyšší genová exprese než medián, modrá čára - nižší genová exprese než medián.

5.5 Asociace mezi mírou postižení peritonea a expresí genů signálních drah účastnících se oprav DNA

Skórovací systém pro peritoneální karcinomatózu (PCI) je důležitým kritériem pro posouzení rozsahu nádoru a jeho lokalizaci a zároveň i prognostickým faktorem souvisejícím s rizikem časně recidivy a rizikem viscerálních metastáz. Podle Lampe *et al.*, 2015, aby bylo dosaženo CCR0, cut-off PCI skóre pro primární karcinom ovaria by měl být <25. Pacientky s mutací *BRCA1/2* měly medián PCI 7, zatímco pacientky bez mutace měly vyšší medián PCI 13. Na heat mapách (obrázky 19 a 20) je srovnání exprese jednotlivých genů DNA repair dráhy stratifikované pomocí PCI pacientů. Pozorovali jsme významnější změny exprese v primárních nádorech ovaria ve srovnání s peritoneálními metastázami, nicméně nebyla prokázána statisticky významná asociace mezi mírou exprese cílových signálních drah DNA reparace a mírou postižení peritonea v době CRS/HIPEC.



Obrázek 19. Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů a peritoneální karcinomatózou v nádorové tkáni. BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubiquitinace a modifikace.

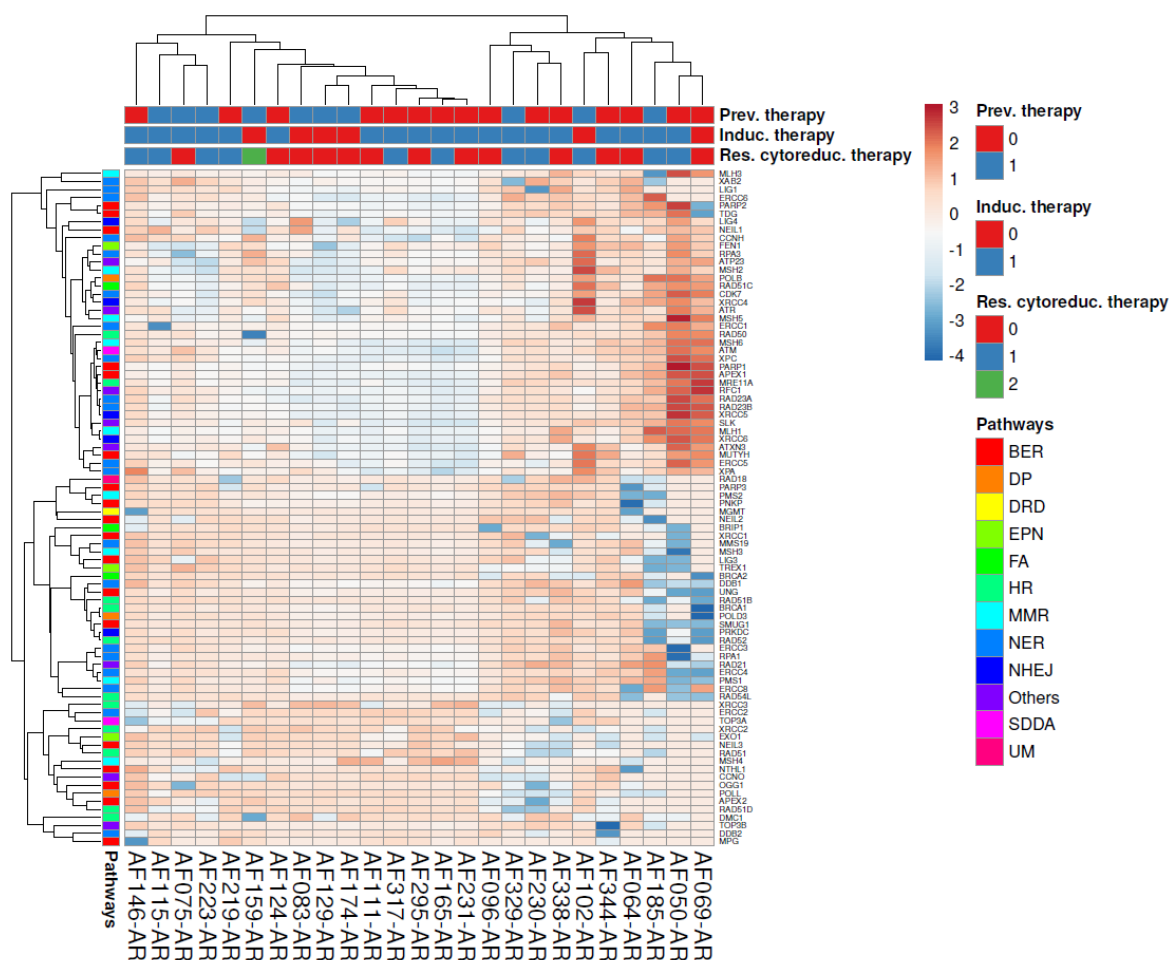


Obrázek 20. Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů a peritoneální karcinomatózou v metastatické tkáni. BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubiquitinace a modifikace.

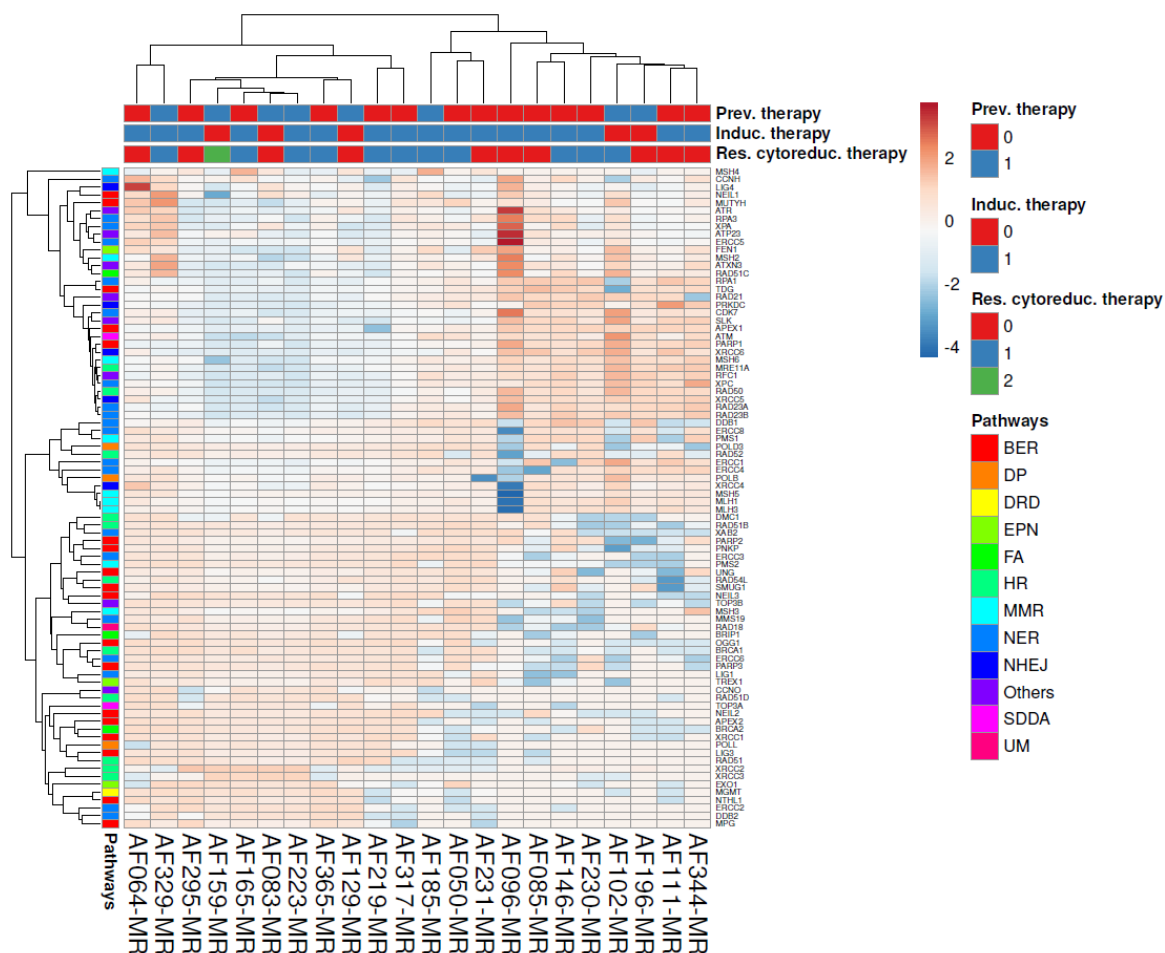
5.6 Asociace mezi expresí genů signálních drah účastnících se oprav DNA a terapeutickými výsledky HIPEC

Z hlediska terapie byly v analýzách zohledňovány tři základní parametry – předchozí terapie, indukční terapie před provedením CRS/HIPEC a přítomnost rezidua po CRS. 17 pacientek (60,7 %) neabsolvovalo žádnou předchozí léčbu, 11 pacientek v minulosti již absolvovalo minimálně jednu linii chemoterapie založenou na platinovém derivátu v kombinaci s taxanem. Pouze sedm pacientek (25 %) nepodstoupilo indukční léčbu před CRS/HIPEC, ostatní podstoupily indukční terapii karboplatinou (CBDCA) v kombinaci s paklitaxelem (20 pacientek), či gemcitabinem (1 pacientka). Nebyly nalezeny žádné statisticky významné

rozdíly, které by naznačovaly, že by předchozí terapie, indukční terapie nebo radikalita výkonu (CCR) ovlivňovali míru exprese signálních DNA reparačních drah v primárních nádorech nebo metastázách ovariálních karcinomů (viz heat mapy, obrázek 21 a obrázek 22).



Obrázek 21. Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů v nádorové tkáni a terapii EOC pacientek. BER – oprava excize báží; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubikvitinace a modifikace.



Obrázek 22. Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů v metastatické tkáni a terapií EOC pacientek. BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubikvitinace a modifikace.

5.7 Toxicita po hypertermické intraperitoneální chemoterapii

U 26 pacientek (93 %) byla dutina břišní po CRS promývána po dobu 90 minut cisplatinou v dávce 100 mg /m² v 3-6 l lavážního izotonického roztoku ohřátého na teplotu 41-42 °C. V případě platina rezistentních pacientek (n = 2) byl použit doxorubicin v dávce 35 mg/m² (u 1 pacientky v kombinaci s mitomycinem C v dávce 15 mg/m²) v 3-6 l lavážního izotonického roztoku ohřátého na teplotu 41-42 °C po dobu 60 minut. Jako prevence nefrotoxicity (poškození ledvin) v případě použití cisplatiny byly pacientky před HIPEC hydratovány 2 l krystaloidů i.v. 24 hodin před CRS/HIPEC s kontrolou diurézy před zahájením

hypertermické perfuze ≥ 1 ml/kg/hod. Diuréza během hypertermické perfuze a po dobu 3 hodin po operaci byla ≥ 1 ml/kg/hod.

Z 28 pacientek u 24 (86 %) byly reportovány nežádoucí účinky (toxicita) po intraperitoneálním podání cytostatika. Nejčastěji se u pacientek projevila hypotenze (54 %), častá byla také anémie (25 %), ostatní hematologická toxicita byla velmi nízká (trombocytopenie pozorována u 1 pacientky, neutropenie, či leukopenie se nevyskytla). Infekční komplikace či pooperační krvácení se vyskytlo u 11 pacientek. Vzhledem k velmi variabilnímu a nízkému zastoupení komplikací a nežádoucích účinků terapie v malém souboru nebyla toxicita terapie korelována s expresními profily, neboť výsledky by nebylo možno statisticky analyzovat. Navíc hodnocení toxicity zde komplikuje souběh mnoha faktorů. Samotný dlouhý a rozsáhlý chirurgický výkon je zatížen větší četností pooperačních komplikací, stejně tak samotná dlouhá narkóza je pro tělo toxická. Pooperační analgetapie včetně opiátů ovlivňuje krevní tlak a může způsobovat hypotenzi. Samotná toxicita HIPEC je v takto komplexní problematice tedy velmi obtížně rozklíčovatelná.

Tabulka 7. Přehled toxicit vyskytujících se u pacientek naší studie. DIC – diseminovaná intravaskulární koagulopatie.

Toxicita	Počet pacientek s toxicitou
Hypotenze	15
Absces v jizvě/ráně	3
Absces v dutině břišní	3
Infekce v dutině břišní	2
Krvácení do dutiny břišní	3
Bolesti břicha	1
Průjemy	3
Nauzea, zvracení	1
Renální insuficience	2
Respirační insuficience	1
Pneumonie	1
Únava	1
Váhový úbytek	1
Anémie	7
Trombocytopenie	1
DIC	2
Dehydratace	1
Alergická reakce – anafylaxe	1

5.8 Diskuze

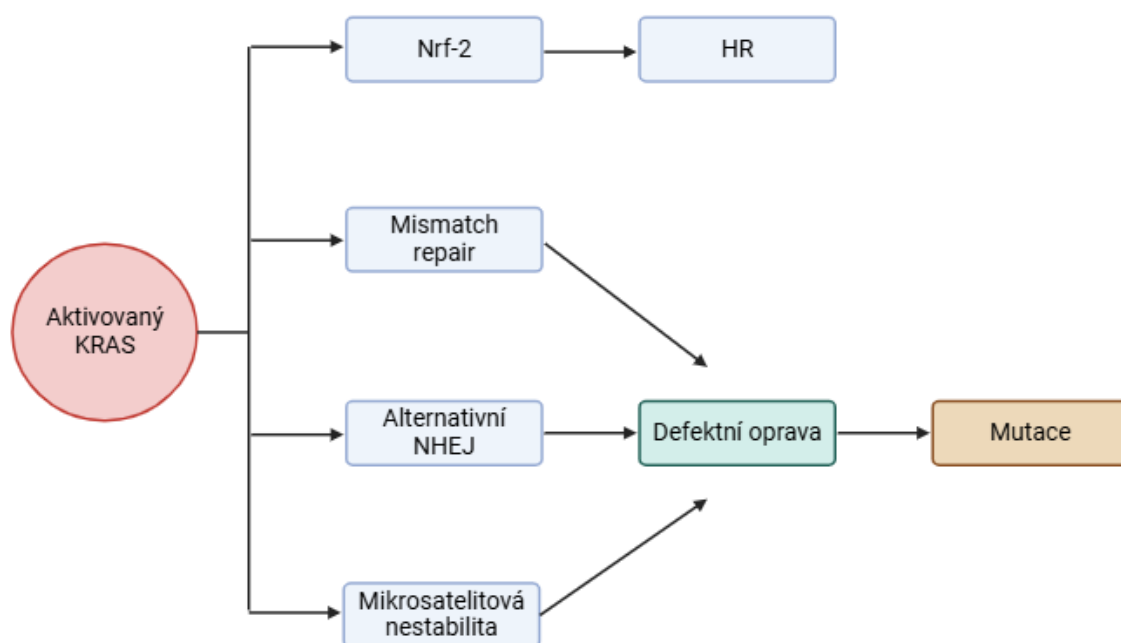
Cytoredukční chirurgie s hypertermickou intraperitoneální chemoterapií je unikátní léčebná metoda spojující radikální chirurgický zákrok, regionální aplikaci cytotoxické látky a účinky hypertermie. Metoda CRS/HIPEC je významným přínosem v léčbě peritoneálních malignit prokázaný řadou prospektivních studií. Nicméně i navzdory velmi slibným výsledkům, není CRS/HIPEC v současné době standardem léčby. Chybí jednotný systém nejen pro klasifikaci nežádoucích účinků, ale rozdíly jsou i v indikačních kritériích, rozsahu operačního výkonu nebo v režimech HIPEC.

V naší první pilotní studii zaměřené na evaluaci a management nežádoucích účinků a toxicitu po CRS/HIPEC byly výsledky v prospěch této léčebné metody. Nízká perioperační mortalita (2 %) a přijatelná pooperační morbidita (11 %) korespondovala s publikovanými výsledky (Kusamara *et al.*, 2006; Gusani *et al.*, 2008; Haslinger *et al.*, 2013). Překvapivě se lišila toxicita a tíže nežádoucích účinků dle primárního origa nádorů, přičemž vyšší pooperační morbidita a vážnější nežádoucí účinky byly pozorovány především u pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří měli recidivující onemocnění a byli již onkologicky předléčeni. U pacientů s kolorektálním karcinomem byl medián PCI 10 a kompletní cytoredukce byla provedena pouze v 50 %. Použitý režim HIPEC byla oxaliplatina v dávce 460 mg/m² podávaná 30 min. Naše výsledky se tímto liší od dříve publikovaných retrospektivních studií, které nezaznamenaly zvýšenou míru toxicity oxaliplatiny ve srovnání s jinými cytotoxickými látkami (Glockzin *et al.*, 2013; Votanopoulos *et al.*, 2013; Prada-Villaverde *et al.*, 2014), ale jsou konzistentní s výsledky velké randomizované studie Prodigé 7 (Quenet *et al.*, 2019). Tato studie neprokázala větší účinnost HIPEC s oxaliplatinou ve smyslu prodlouženého OS nebo PFS, ale zvýšené riziko pooperačních komplikací. Potenciální přínos oxaliplatiny byl pozorován pouze u pacientů s nízkým PCI (11-15). Vyhodnocení PFS a OS v našem souboru bylo limitované krátkou dobou sledování pacientů a velkou heterogenitou.

V druhé studii bylo našim cílem především zavedení metodiky stanovování exprese a hodnocení alterace genové exprese buněčné signalizace. Expresní profil byl stanovován u 42 genů KRAS signální dráhy, jejíž deregulace patří k nejčastějším alteracím v průběhu onkogeneze solidních nádorů. Vysoká frekvence KRAS mutace se objevuje také u kolorektálního karcinomu (40 %) (Yang *et al.*, 2021), v případě duktálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC) nacházíme mutovaný KRAS dokonce u 80-90 % případů. Právě mutace onkogenu KRAS vede k následné deregulaci čtyř efektorových drah (RAF/MAPK,

PI3K/PDK1/AKT, RAL guanine nucleotide exchange factor a RIN1/ABL dráhy) a posléze k rozvoji karcinomu pankreatu. Léčba experimentálním taxanem SB-T-1216 významně potlačila expresi nejen samotného genu *KRAS*, ale celé signální dráhy *KRAS*. Podobné snížení exprese na úrovni celé signální dráhy bylo již dříve popsáno v případě jiné hlavní signální dráhy spojené s karcinogenezí PDAC (Mohelníková-Duchoňová *et al.*, 2017) - dráhy Hedgehog. Ač se nám podařilo prokázat efekt taxanu na expresi *KRAS* signální dráhy u PDAC, potvrdili se výsledky dřívější studie (Lemstrová *et al.*, 2017), tedy že *KRAS* mutace ani míra exprese *KRAS* signální dráhy není prediktivním markerem odpovědi na podanou chemoterapii.

KRAS signální dráha je úzce propojena s DNA repair drahami a navzájem se ovlivňují. Například mismatch repair (MMR), jeden z mechanismů opravy DNA v buňkách, může v případě defektu vést k mutačním hotspotům/nestabilitě mikrosatelitů a může být příčinou mutací aktivujících *KRAS*. Aktivovaný *KRAS* je také schopen řídit genomovou nestabilitu v tumorigenezi právě prostřednictvím DNA repair drah (obrázek 23) (Jinesh *et al.*, 2018).



Obrázek 23. *KRAS*-řízená genomová nestabilita v tumorigenezi. HR – homologní rekombinace; NHEJ – nehomologní spojování konců.

Hlavní téma disertační práce bylo stanovit alterace v expresi 84 genů DNA repair signálních drah u pacientek léčených HIPEC pro karcinom ovaria a změny v této oblasti korelovat s klinickými faktory, jako je celkové přežití, rozsah postižení peritonea a předchozí terapie. Následně byly výsledky korelovány i s faktory genetickými, zejména s patogenními mutacemi v genech, které způsobují většinu hereditárních karcinomů ovaria – *BRCA1* a *BRCA2*. Tyto byly v našem souboru nalezeny u 43 % pacientek.

Nejzajímavějším zjištěním studie se zdá vzájemná korelace mezi *ATM*–*ATR*–*BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB* a *XRCC4* geny, které tvoří interaktivní komplex a jejich prognostická relevance v tomto konkrétním souboru pacientek. Některé z těchto interakcí jsou navíc potvrzeny databází STRING, konkrétně *MUTYH*–*MSH2* (*MUTYH* představuje dráhu BER a *MSH2* představuje dráhu MMR), *ATM*–*ATR* (*ATM* představuje DSBR; *ATR* představuje SSBR a oba geny zajišťují integritu genomu) a *ATM*–*BRCA2* (tyto geny představují DSBR), což dále ztraktivňuje jejich další výzkum jako potenciálních prognostických biomarkerů pro ovariální nádory. O některých zmíněných genech se uvažovalo jako o potenciálních prognostických biomarkerech pro karcinom ovaria již v dřívějších studiích (Feng *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020).

Celkové přežití pacientů s vysokou expresí *ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB* a *XRCC4* v peritoneálních metastázách bylo významně delší než u pacientů s nízkou nebo žádnou expresí. Guo ve své publikaci uvedl (Guo *et al.*, 2019), že buňky spinocelulárního karcinomu jícnu s downregulovanou aktivitou *MUTYH* mají vyšší rezistenci k terapii cisplatinou. Podobně jako u karcinomu vaječníků, také u karcinomu jícnu dochází ke ztrátě počáteční citlivosti k platinovým derivátům a rozvoji rezistence, což limituje další možnosti onkologické terapie. Naše práce naznačuje, že podobný mechanismus downregulace *MUTYH* by mohl být spojen se vznikem chemorezistence i v případě karcinomu vaječníků. Rezistence na platinová cytostatika má za následek horší celkové přežití, což koreluje s naším zjištěním, že nízká exprese *MUTYH* koreluje s kratším OS pacientek podstupujících CRS/HIPEC s cisplatinou.

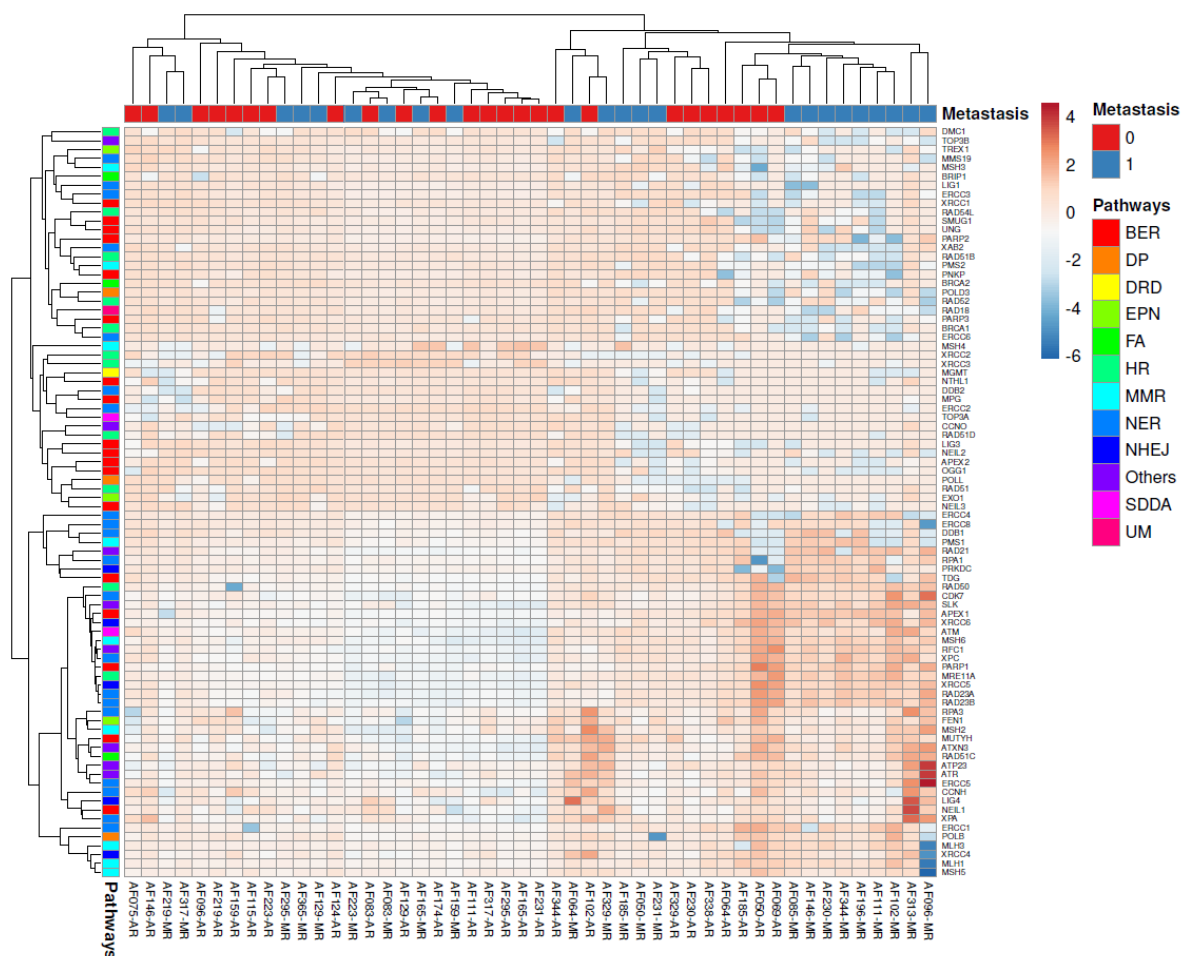
V primární nádorové tkáni byly nalezeny zajímavé řetězcové korelace mezi *CCNH*, *XPA* a *SLK*; *CCNH* a *CDK7* a v neposlední řadě korelace *CDK7* s *RAD51C* a *XPA*. *CCNH*, *CDK7* a *XPA* představují NER dráhu a *RAD51C* představuje dráhu FA. Stejně jako u některých genů v peritoneálních metastázách, tak i v případě tkáně primárního nádoru se objevuje stejný fenomén vzájemného vztahu mezi OS a expresí DNA repair genů – konkrétně *CCNH*, *MLH3*, *RAD51C*, *RPA3*, *SLK* a *XPA*. Nízká exprese těchto genů koreluje s horším OS a naopak. Stejný výsledek pro gen *XPA* byl také pozorován ve studii Ganzinelli *et al.*, 2011.

Při srovnání expresních profilů ve tkáních primárního EOC a peritoneálních metastáz (obrázek 24) je patrná zvýšená exprese většiny genů účastnících se oprav DNA zejména *CDK7*, *RPA3*, *ERCC5* a *XPA* (NER); *ATP23*, *ATR* a *LIG4* (NHEJ); *NEIL1* (BER); a *ATP23* a *ATR*. Zvýšeně exprimovány jsou však také další geny: *RPA1*, *XPC*, *RAD23A* a *RAD23B* (NER); *PRKDC*, *XRCC6* a *XRCC5* (NHEJ); *TDG*, *APEX1* a *PARP1* (BER); *RAD50* a *MRE11A* (HR); *ATM* (SDDA); *MSH6* (MMR); a *RAD21*, *SLK* a *RFC1*. Tyto geny tvoří společný klastr. Klastr je patrný i pro některé nedostatečně exprimované geny. Zde můžeme zahrnout geny pro opravu bází – *XRCC1*, *SMUG1*, *UNG*, *PARP2*, *PNKP* a *PARP3*; geny homologní rekombinace – *DMC1*, *RAD54L*, *RAD51B*, *RAD52* a *BRCA1*; geny nukleotidové excizní opravy – *MMS19*, *LIG1*, *ERCC3*, *XAB2* a *ERCC6*; *BRIP1* a *BRCA2*; *RAD18* – geny ubiquitinace a modifikace; *POLD3* – geny DNA polymeráz; a *TOP3B* – ostatní. Brodsky ve své publikaci uvádí, že metastatické a primární nádory mají různé expresní profily, které odrážejí jejich stav proliferace a apoptózy. Toto tvrzení souhlasí i s naší studií, tedy že profil exprese se liší mezi primární nádorovou tkání a metastatickou tkání. U metastáz tak mohou být aktivovány jiné dráhy než u primárních nádorů, což v důsledku může vést k rozdílné citlivosti na cytostatika a je potenciálně využitelné v personalizaci onkologické léčby (Brodsky *et al.*, 2014).

Z výsledků heat mapy velmi překvapivě nevyplývá žádná významná souvislost mezi expresí genů DNA repair dráhy a přítomností patogenní *BRCA* mutace.

Tsibulak a kolektiv (Tsibulak *et al.*, 2018) porovnávali expresi mRNA *BRCA1* a *BRCA2* v nádorové a nenádorové tkáni ovariálního karcinomu. V této studii byla exprese *BRCA1* nižší v případě *BRCA1* mutovaných nádorů, ale žádný takový vztah nebyl popsán v případě *BRCA2* mutace. Takový vztah bohužel v naší studii popsán nebyl, vzhledem k tomu, že pouze dvě *BRCA1* mutované pacientky z osmi měly downregulaci *BRCA1* (AF185-AR, AF185-MR a AF085-MR). Nicméně pro vyvození finálních závěrů, by bylo potřeba provést analýzu na větším počtu pacientů. Důvodem může být i vliv předchozí terapie (předléčenost) pacientek s *BRCA1* mutací a její ovlivnění exprese zkreslující naše výsledky. Ovlivnění exprese hlavních signálních drah onkogeneze v nádorové tkáni chemoterapií byla právě popsána v předchozích našich analýzách *in vivo*, a to jak v případě *KRAS*, tak i Hedgehog signální dráhy.

V našem souboru nebyla pozorována žádná významná souvislost mezi expresí genů DNA repair dráhy a přítomností mutace *BRCA*. Bylo by však potřeba více pacientů pro stanovení konečných závěrů. Vliv *BRCA* mutace na prognózu EOC pacientek je v současnosti kontroverzním tématem. Zatímco některé studie uvádějí lepší prognózu u pacientek s mutacemi v *BRCA1/2* vzhledem k lepší odpovědi na chemoterapii na bázi platiny (Gallagher *et al.*, 2011; Pennington *et al.*, 2014; Norquist *et al.*, 2018, Alsop *et al.*, 2012), Lontos se svými kolegy zastává opačný názor, tedy že mutace v *BRCA1/2* prognózu nikterak neovlivňují (Lontos *et al.*, 2021). Některé studie předpokládají, že přežití pacienta může být touto mutací ovlivněno jen za specifických podmínek, například v případě, že je mutace lokalizovaná na vazebné doméně *RAD51* (exon 11) genu *BRCA2* (Labidi-Galy *et al.*, 2018). Ani naše studie neprokázala statisticky významný benefit *BRCA* mutace na OS pacientek podstupujících CRS/HIPEC pro karcinom ovaria. Medián celkového přežití u pacientek bez *BRCA1/2* mutace byl 38 měsíců, zatímco pacientky s mutací *BRCA1/2* měly OS o 5,7 měsíce delší, tedy 43,7 měsíců, což nedosáhlo statistické významnosti, $p=0,6$). V hodnocení *BRCA* mutace jako prognostického faktoru však situaci komplikuje komplexita dějů účastnících se oprav DNA, stejně jako předchozí a následná terapie pacientek zahrnující krom chemoterapie i cílenou léčbu (inhibice VEGFR a PARP inhibitory) a imunoterapii (checkpoint inhibitory). V případě hodnocení prognostických a prediktivních markerů HIPEC je navíc nutno zohlednit i rozsah a kvalitu předchozího cytoredukčního výkonu (erudice a learning curve operátora a celého týmu) jakožto i kvalitu předoperační a pooperační péče, což je v případě většiny nejen retrospektivních analýz, ale i prospektivních studií velmi komplikované. Jako důsledek všech výše zmíněných faktorů, jsou výsledky jednotlivých týmů těžko komparovatelné, což přispívá k zatím nejednoznačným závěrům.



Obrázek 24. Heat mapa porovnávající změny exprese u nádorové a metastatické tkáně. BER – oprava excize bází; SDDA – geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA; HR – homologní rekombinace; FA – Fanconiho anémie; NER – oprava nukleotidové excize; EPN – editace a zpracování nukleáz; NHEJ – nehomologní spojování konců; DRD – přímá výměna poškození; MMR – oprava chybného párování; DP – DNA polymerázy; UM – ubikvitinace a modifikace.

6 Závěr

Závěrem lze říct, že naše studie byla pilotní a první studií zabývající se podrobnějším molekulárně genetickým vyšetřením pacientek podstupujících CRS/HIPEC. Přestože se jednalo o malou nerandomizovanou studii jednoho centra, přinesla velké množství zajímavých potenciálních prognostických a prediktivních markerů v řadě genů účastnících se opravy DNA, které je však nutno verifikovat na rozsáhlejších souborech. CRS/HIPEC je přínosem v léčbě peritoneálních malignit pouze v případě uvážlivé indikace a měla by být individuálně zvažována multidisciplinárním týmem komplexních onkologických center. Nepodařilo se prokázat prediktivní význam *BRCA* mutace, či alterace v expresi DNA-repair signální dráhy u EOC pacientek podstupujících HIPEC s cispatinou. Výsledky však mohou být ovlivněny nejen malým souborem zařazených pacientek, ale i jejich předchozí onkologickou léčbou. Ovlivnění exprese hlavních signálních drah onkogeneze v nádorové tkáni chemoterapií byla popsána v našich analýzách *in vivo* na myších xenograftech, a to jak v případě *KRAS*, tak i Hedgehog signální dráhy. K validaci prediktivních a prognostických markerů, by měly být provedeny další studie zohledňující roli histologických a molekulárních charakteristik u HIPEC. Nicméně budoucí klinické studie by měly reflektovat a komparovat všechny možnosti a management dostupných léčebných modalit, protože do klinické praxe byly přidány nové preparáty cílené terapie a imunoterapie a jejich využití posunuje výsledky doposud publikovaných prací mimo současnou relevanci.

6.1 Seznam tabulek

Tabulka 1.	Klasifikace Clavien-Dindo.
Tabulka 2.	Závažnost nežádoucích účinků podle klasifikace CTCAE
Tabulka 3.	TNM a FIGO klasifikace pro karcinom vaječníku.
Tabulka 4.	Podskupiny pacientů podle primárního nádoru.
Tabulka 5.	Seznam testovaných genů.
Tabulka 6.	Přehledová tabulka všech pacientek.
Tabulka 7.	Přehled toxicit.

6.2 Seznam obrázků

- Obrázek 1.** Sugarbakerova technika kolosea.
- Obrázek 2.** Kogův perfuzní systém.
- Obrázek 3.** Sugarbakerův skórovací systém pro peritoneální karcinomatózu.
- Obrázek 4.** Cytoredukční skóre.
- Obrázek 5.** Peritoneální povrchové malignity.
- Obrázek 6.** Přehled možností screeningu a diagnostických metod.
- Obrázek 7.** Cirkulující nádorové biomarkery.
- Obrázek 8.** Schématické znázornění DNA opravných drah.
- Obrázek 9.** Schématické znázornění PI3K/AKT signální dráhy.
- Obrázek 10.** Schéma přípravy pacienta před CRS/HIPEC.
- Obrázek 11.** Mapa signální dráhy KRAS.
- Obrázek 12.** Heatmapa asociace mezi úrovněmi transkriptu a *BRCA1/2* mutacemi v nádorové tkáni.
- Obrázek 13.** Heatmapa asociace mezi úrovněmi transkriptu a *BRCA1/2* mutacemi v metastatické tkáni.
- Obrázek 14.** Kaplan Meierovy křivky celkového přežití a přežití bez progresu onemocnění.
- Obrázek 15.** Korelace mezi několika prognosticky důležitými geny v primárních tkáních.
- Obrázek 16.** Korelace mezi prognosticky významnými geny DSB1-SSBR v metastatických tkáních.
- Obrázek 17.** Významné asociace genové exprese v primárních nádorových lokusech.
- Obrázek 18.** Významné asociace genové exprese v metastatických lokusech.
- Obrázek 19.** Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů a peritoneální karcinomatózou v nádorové tkáni.
- Obrázek 20.** Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů a peritoneální karcinomatózou v metastatické tkáni.
- Obrázek 21.** Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů a terapií v nádorové tkáni a terapií EOC pacientek.
- Obrázek 22.** Heat mapa asociace mezi hladinami transkriptů a terapií v metastatické tkáni a terapií EOC pacientek.

Obrázek 23. KRAS-řízená genomová nestabilita v tumorigenezi.

Obrázek 24. Heat mapa porovnávající změny exprese u nádorové a metastatické tkáně.

6.3 Seznam grafů

Graf 1. Časový vývoj hrubé incidence a hrubé mortality karcinomu vaječníku.

Graf 2. Věkově specifická incidence u karcinomu ovaria.

Graf 3. Porovnání rizika rozvoje karcinomu vaječníků.

6.4 Seznam zkratk

AFP	alfa-fetoprotein
Alt-NHEJ	alternativní cesta pro nehomologické spojování volných konců
ATM	<i>angl.</i> ataxia-telangiectasia mutated
ATR	<i>angl.</i> ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BER	oprava excize báží
BRCA	tumor supresorový gen rakoviny prsu
CA 125	nádorový antigen 125
CBDCA	karboplatina
CCA	světlobuněčný adenokarcinom
CEA	karcinoembryonální antigen
CCR	cytoredukční skóre
CRS	cytoredukční operace
CT	výpočetní tomografie
CTCAE	<i>angl.</i> Common Terminology Criteria for Adverse Events
DDR	<i>angl.</i> DNA damage response
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulopatie
DNA-PK	DNA dependentní proteinkináza
DP	DNA polymeráza
DRD	přímá výměna poškození
DSB	<i>angl.</i> double strand breaks
DSBR	<i>angl.</i> double strand break repair; oprava dvouřetězcových zlomů

EC	endometroidní karcinom
EOC	epiteliální ovariální karcinom
EPIC	<i>angl.</i> early postoperative intraperitoneal chemotherapy; časná pooperační intraperitoneální chemoterapie
EPN	editace a zpracování nukleáz
FA	Fanconiho anémie
FIGO	Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví
GCT	nádor z granulóznicích buněk
gDNA	genomová DNA
hCG	gonadotropin
HE4	<i>angl.</i> human epididymis protein 4
HGSC	high-grade serózní karcinom
HIPEC	hypertermická intraperitoneální chemoterapie
HR	homologní rekombinace
HRD	<i>angl.</i> homologous recombination deficiency; poruchy homologní rekombinace
ICL	<i>angl.</i> intrastrand crosslink; meziřetězcová křížová vazba
LGSC	low-grade serózní karcinom
MMR	<i>angl.</i> mismatch repair; oprava chybného párování
MPM	maligní peritoneální mezoteliom
MRI	magnetická rezonance
NCCN	<i>angl.</i> National Comprehensive Cancer Network
NCI	<i>angl.</i> National Cancer Institute
NER	oprava nukleotidové excize
NHEJ	nehomologní spojování konců
NPC	<i>angl.</i> no primer control
NTC	<i>angl.</i> non-template control
OS	celkové přežití
PARP	poly-(ADP-ribózo) polymeráza
PCA	<i>angl.</i> Principal Component Analysis; analýza hlavních komponent
PCI	<i>angl.</i> peritoneal cancer index, skóre pro peritoneální karcinomatózu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDAC	duktální adenokarcinom pankreatu
PET	pozitronová emisní tomografie

PIKK	<i>angl.</i> phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
PIPAC	tlakové intraperitoneální aerosolové chemoterapie
PS	<i>angl.</i> performance status
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RFS	přežití bez recidivy
ROMA	<i>angl.</i> risk of ovarian malignancy algorithm
RTK	efektor receptorových tyrosinkináz
SDDA	geny defektní při onemocněních spojených s citlivostí k činidlům poškozujícím DNA
SN-38	7-ethyl-10-hydroxycamptothecin
SPA	serózní papilární adenokarcinom
SSB	<i>angl.</i> single strand breaks
SSBR	<i>angl.</i> single strand break repair; oprava jednořetězcových zlomů
TLS	<i>angl.</i> translesion synthesis; syntéza translézí
TNM	tumor – uzlina – metastáze
TVU	transvaginální ultrazvuk
UM	ubikvitinace a modifikace
UNG	uracil-DNA glykosyláza
USG	ultrasonografie
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

6.5 Seznam použité literatury

ABBASI, Salah Y., et al. Advanced gastric cancer in Jordan from 2004 to 2008: a study of epidemiology and outcomes. *Gastrointestinal cancer research: GCR*, 2011, 4.4: 122.

ALCINDOR, T.; BEAUGER, N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current oncology*, 2011, 18.1: 18.

ALEXANDER, H. Richard; HANNA, Nader; PINGPANK, James F. Clinical results of cytoreduction and HIPEC for malignant peritoneal mesothelioma. *Peritoneal Carcinomatosis: A Multidisciplinary Approach*, 2007, 343-355.

ALI, Aus T. Towards prevention of ovarian cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 2018, 18.6: 522-537.

ALI, Aus Tariq. Can we prevent ovarian cancer? *Ceska Gynekologie*, 2020, 85.1: 49-58.

ALI, Aus Tariq; AL-ANI, Osamah; AL-ANI, Faisal. Epidemiology and risk factors for ovarian cancer. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 2023, 22.2: 93-104.

ALSOP, Kathryn, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *Journal of clinical oncology*, 2012, 30.21: 2654-2663.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Invasive epithelial ovarian cancer treatment, by stage. American Cancer Society, 2022. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/types/ovarian-cancer/treating/by-stage.html>. Naposledy navštíveno: září 2024.

BALDWIN, Rae Lynn, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer research*, 2000, 60.19: 5329-5333.

BANDERA, Elisa V., et al. Racial/ethnic disparities in ovarian cancer treatment and survival. *Clinical cancer research*, 2016, 22.23: 5909-5914.

BANERJEE, Susana, et al. Maintenance olaparib for patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer and a BRCA mutation (SOLO1/GOG 3004): 5-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 2021, 22.12: 1721-1731.

BANKHEAD, C. R., et al. Identifying symptoms of ovarian cancer: a qualitative and quantitative study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2008, 115.8: 1008-1014.

BARATTI, Dario, et al. Identification of a subgroup of patients at highest risk for complications after surgical cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Annals of surgery*, 2012, 256.2: 334-341.

BECKER, Ondine, et al. Nivolumab activity in advanced refractory malignant peritoneal mesothelioma. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 2021, 144: 386-388.

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 1995, 57.1: 289-300.

BEREK, Jonathan S.; HACKER, Neville F. (ed.). Berek and Hacker's gynecologic oncology. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

BEREK, Jonathan S., et al. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International journal of gynecology & obstetrics*, 2018, 143: 59-78.

BEREK, Jonathan S., et al. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2021, 155: 61-85.

BIJELIC, L.; JONSON, A.; SUGARBAKER, P. H. Systematic review of cytoreductive surgery and heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy for treatment of peritoneal carcinomatosis in primary and recurrent ovarian cancer. *Annals of Oncology*, 2007, 18.12: 1943-1950.

BLACKHAM, Aaron U., et al. Cytoreductive surgery with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: mitomycin versus cisplatin. *Annals of surgical oncology*, 2010, 17.10: 2720-2727.

BOLLIGER, M., et al. Experiences with the standardized classification of surgical complications (Clavien-Dindo) in general surgery patients. *European Surgery*, 2018, 50: 256-261.

BOUSSIOS, Stergios, et al. Non-epithelial ovarian cancer: elucidating uncommon gynaecological malignancies. *Anticancer research*, 2016, 36.10: 5031-5042.

BULLOCK, Brian, et al. Management of the adnexal mass: considerations for the family medicine physician. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9: 913549.

BURGER, Robert A., et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 2011, 365.26: 2473-2483.

BURKE, William, et al. Executive summary of the ovarian cancer evidence review conference. *Obstetrics & Gynecology*, 2023, 142.1: 179-195.

CAMPBELL, Ian G., et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer research*, 2004, 64.21: 7678-7681.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 2011, 474.7353: 609-615.

CARDEN, Craig P., et al. The association of PI3 kinase signaling and chemoresistance in advanced ovarian cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 2012, 11.7: 1609-1617.

CAVALIERE, F., et al. Prognostic factors and oncologic outcome in 146 patients with colorectal peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Italian multicenter study SITILO. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2011, 37.2: 148-154.

CLAVIEN, Pierre-Alain; SANABRIA, Juan R.; STRASBERG, Steven M. Proposed classification of complications of surgery with examples of utility in cholecystectomy. *Surgery*, 1992, 111.5: 518-526.

CLAVIEN, Pierre A., et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Annals of surgery*, 2009, 250.2: 187-196.

COLEY, William B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1. *The American Journal of the Medical Sciences* (1827-1924), 1893, 105.6: 487.

CORTES-GUIRAL, Delia, et al. Primary and metastatic peritoneal surface malignancies. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021, 7.1: 91.

CURTIN, Nicola J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12.12: 801-817.

DAMIA, Giovanna; BROGGINI, Massimo. Platinum resistance in ovarian cancer: role of DNA repair. *Cancers*, 2019, 11.1: 119.

DE BREE, Eelco, et al. Pharmacokinetic study of docetaxel in intraoperative hyperthermic ip chemotherapy for ovarian cancer. *Anti-cancer drugs*, 2003, 14.2: 103-110.

DE BREE, Eelco, et al. Intraperitoneal chemotherapy with taxanes for ovarian cancer with peritoneal dissemination. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2006, 32.6: 666-670.

DE BREE, Eelco, et al. Cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel: a clinical and pharmacokinetic study. *Annals of surgical oncology*, 2008, 15.4: 1183-1192.

DE BREE, Eelco. Optimal drugs for HIPEC in different tumors. *Journal of BU ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 2015, 20: S40-6.

DE BREE, Eelco, et al. Pharmacological principles of intraperitoneal and bidirectional chemotherapy. *Pleura and Peritoneum*, 2017, 2.2: 47-62.

DE BREE, Eelco; TSIFTISIS, Dimitris D. Principles of perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. In: *Advances in peritoneal surface Oncology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 39-51.

DEDRICK, Robert L., et al. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration. *Cancer Treat Rep*, 1978, 62: 1-13.

DEFFIEUX, Xavier, et al. Anatomy of pelvic and para-aortic nodal spread in patients with primary fallopian tube carcinoma. *Journal of the American College of Surgeons*, 2005, 200.1: 45-48.

DERACO, Marcello, et al. Prognostic analysis of clinicopathologic factors in 49 patients with diffuse malignant peritoneal mesothelioma treated with cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic perfusion. *Annals of surgical oncology*, 2006, 13.2: 229-237.

DINDO, Daniel; DEMARTINES, Nicolas; CLAVIEN, Pierre-Alain. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Annals of surgery*, 2004, 240.2: 205-213.

DO, Khanh; CHEN, Alice P. Molecular pathways: targeting PARP in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19.5: 977-984.

DOBBELSTEIN, Matthias; SØRENSEN, Claus Storgaard. Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 2015, 14.6: 405-423.

DOHAN, A., et al. Evaluation of the peritoneal carcinomatosis index with CT and MRI. *Journal of British Surgery*, 2017, 104.9: 1244-1249.

ELIAS, D., et al. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. *Annals of oncology*, 2002, 13.2: 267-272.

ENGBERSEN, Maurits Peter, et al. The role of CT, PET-CT, and MRI in ovarian cancer. *The British Journal of Radiology*, 2021, 94.1125: 20210117.

ESQUIVEL, Jesus; AVERBACH, Andrew. Combined laparoscopic cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in a patient with peritoneal mesothelioma. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques*, 2009, 19.4: 505-507.

ESQUIVEL, Jesus; AVERBACH, Andrew. Laparoscopic cytoreductive surgery and HIPEC in patients with limited pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, 2012.1: 981245.

ESTELLER, Manel, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2000, 92.7: 564-569.

FACY, Olivier, et al. High pressure does not counterbalance the advantages of open techniques over closed techniques during heated intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin. *Surgery*, 2015, 157.1: 72-78.

FENG, Wenlong, et al. ATR and p-ATR are emerging prognostic biomarkers and DNA damage response targets in ovarian cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*, 2020, 12: 1758835920982853.

FERLAY, Jacques, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 2021, 149.4: 778-789.

FLESSNER, Michael F. The transport barrier in intraperitoneal therapy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2005, 288.3: F433-F442.

FONG, Peter C., et al. Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *Journal of clinical oncology*, 2010, 28.15: 2512-2519.

FRANKO, Jan. Therapeutic efficacy of systemic therapy for colorectal peritoneal carcinomatosis: surgeon's perspective. *Pleura and peritoneum*, 2018, 3.1: 20180102.

FRUMAN, David A.; ROMMEL, Christian. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 2014, 13.2: 140-156.

FUJIMOTO, Shigeru, et al. Intraperitoneal hyperthermic perfusion combined with surgery effective for gastric cancer patients with peritoneal seeding. *Annals of surgery*, 1988, 208.1: 36.

FUJIMOTO, Shigeru, et al. Positive results of combined therapy of surgery and intraperitoneal hyperthermic perfusion for far-advanced gastric cancer. *Annals of surgery*, 1990, 212.5: 592-596.

FUJIMOTO, Shigeru, et al. Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery. *Cancer*, 1997, 79.5: 884-891.

FUJIWARA, K., et al. Principles and practice of intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2007, 17.1: 1-20.

GAITSKELL, Kezia, et al. Histological subtypes of ovarian cancer associated with parity and breastfeeding in the prospective Million Women Study. *International journal of cancer*, 2018, 142.2: 281-289.

GALLAGHER, D. J., et al. Survival in epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis incorporating BRCA mutation status and platinum sensitivity. *Annals of oncology*, 2011, 22.5: 1127-1132.

GANZINELLI, M., et al. Expression of DNA repair genes in ovarian cancer samples: biological and clinical considerations. *European journal of cancer*, 2011, 47.7: 1086-1094.

GEWINNER, Christina, et al. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer cell*, 2009, 16.2: 115-125.

GILLY, F. N., et al. Quantitative prognostic indices in peritoneal carcinomatosis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2006, 32.6: 597-601.

GLEHEN, Olivier, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: nomenclature and modalities of perfusion. *Journal of surgical oncology*, 2008, 98.4: 242-246.

GLEHEN, Olivier, et al. Peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: a multi-institutional study of 159 patients treated by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Annals of surgical oncology*, 2010, 17.9: 2370-2377.

GLOCKZIN, Gabriel, et al. Treatment-related morbidity and toxicity of CRS and oxaliplatin-based HIPEC compared to a mitomycin and doxorubicin-based HIPEC protocol in patients with peritoneal carcinomatosis: A matched-pair analysis. *Journal of Surgical Oncology*, 2013, 107.6: 574-578.

GOFF, Barbara A., et al. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *Jama*, 2004, 291.22: 2705-2712.

GOLDENSHLUGER, M., et al. Core body temperature but not intraabdominal pressure predicts postoperative complications following Closed-System hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) administration. *Annals of Surgical Oncology*, 2018, 25.3: 660-666.

GOLDER, Henry; CASANOVA, Daniel; PAPALOIS, Vassilios. Evaluation of the usefulness of the Clavien-Dindo classification of surgical complications. *Cirugía Española*, 2023, 101.9: 637-642.

GONZÁLEZ GIL, Alida, et al. HIPEC in Ovarian Cancer Is the Future... and Always Will Be? Results from a Spanish Multicentric Survey. *Cancers*, 2023, 15.13: 3481.

GONZÁLEZ-MORENO, Santiago; GONZÁLEZ-BAYÓN, Luis A.; ORTEGA-PÉREZ, Gloria. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. *World journal of gastrointestinal oncology*, 2010, 2.2: 68.

GOODMAN, Martin. *Regional Therapeutics for Advanced Malignancies*. JP Medical Ltd, 2012.

GOODMAN, Martin D., et al. Chemotherapy for intraperitoneal use: a review of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and early post-operative intraperitoneal chemotherapy. *Journal of gastrointestinal oncology*, 2016, 7.1: 45.

GOPINATH, K. S.; BHATT, Aditi. Preface 'Changing trend in peritoneal surface oncology in Asian countries'. *Indian journal of surgical oncology*, 2019, 10.Suppl 1: 1-2.

GRIFFITHS, Richard Wyn, et al. Outcomes after multiple lines of chemotherapy for platinum-resistant epithelial cancers of the ovary, peritoneum, and fallopian tube. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2011, 21.1.

GUO, Yanxia, et al. Downregulation of MUTYH contributes to cisplatin-resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells by promoting Twist-mediated EMT. *Oncology Reports*, 2019, 42.6: 2716-2727.

GUSANI, Niraj J., et al. Aggressive surgical management of peritoneal carcinomatosis with low mortality in a high-volume tertiary cancer center. *Annals of Surgical Oncology*, 2008, 15: 754-763.

HAH, Sang Soo, et al. Kinetics of carboplatin– DNA binding in genomic DNA and bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 2006, 19.5: 622-626.

HALKIA, E., et al. Peritoneal carcinomatosis: intraoperative parameters in open (coliseum) versus closed abdomen HIPEC. *International journal of surgical oncology*, 2015, 2015.1: 610597.

HAMAZOE, Ryuichi; MAETA, Michio; KAIBARA, Nobuaki. Intraperitoneal thermochemotherapy for prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer. Final results of a randomized controlled study. *Cancer*, 1994, 73.8: 2048-2052.

HAMILTON, William, et al. Risk of ovarian cancer in women with symptoms in primary care: population based case-control study. *Bmj*, 2009, 339.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. *cell*, 2000, 100.1: 57-70.

HASLINGER, Michelle, et al. A contemporary analysis of morbidity and outcomes in cytoreduction/hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion. *Cancer medicine*, 2013, 2.3: 334-342.

HELDERMAN, Roxan FCPA, et al. Variation in clinical application of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: a review. *Cancers*, 2019, 11.1: 78.

HENNESSY, Bryan TJ, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28.22: 3570-3576.

HOMPES, D., et al. The use of Oxaliplatin or Mitomycin C in HIPEC treatment for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a comparative study. *Journal of surgical oncology*, 2014, 109.6: 527-532.

HONGO, Atsushi, et al. A comparison of in vitro platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. *The International journal of biochemistry*, 1994, 26.8: 1009-1016.

HOWELL, Stephen B., et al. Long-term survival of advanced refractory ovarian carcinoma patients with small-volume disease treated with intraperitoneal chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 1987, 5.10: 1607-1612.

CHILÀ, Rosaria; GUFFANTI, Federica; DAMIA, Giovanna. Role and therapeutic potential of CDK12 in human cancers. *Cancer treatment reviews*, 2016, 50: 83-88.

CHU, David ZJ, et al. Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer*, 1989, 63.2: 364-367.

CHUA, Terence C., et al. Early-and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, 30.20: 2449-2456.

JACQUET, Pierre; SUGARBAKER, Paul H. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Peritoneal carcinomatosis: principles of management*, 1996, 359-374.

JANKU, Filip; YAP, Timothy A.; MERIC-BERNSTAM, Funda. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?. *Nature reviews Clinical oncology*, 2018, 15.5: 273-291.

JEGGO, Penny A.; PEARL, Laurence H.; CARR, Antony M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 2016, 16.1: 35-42.

JELOVAC, Danijela; ARMSTRONG, Deborah K. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2011, 61.3: 183-203.

JINESH, G. G., et al. Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis. *Oncogene*, 2018, 37.7: 839-846.

KEGG PATHWAY Database. Dostupné z: <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>. Naposledy navštíveno: listopad 2024.

KEHOE, Sean. FIGO staging in ovarian carcinoma and histological subtypes. *Journal of Gynecologic Oncology*, 2020, 31.4.

KELLY, Kaitlyn J.; NASH, Garrett M. Peritoneal debulking/intraperitoneal chemotherapy—non-sarcoma. *Journal of surgical oncology*, 2014, 109.1: 14-22.

KELLY, Kaitlyn J. Management of appendix cancer. *Clinics in colon and rectal surgery*, 2015, 28.04: 247-255.

KHANLARKHANI, Neda, et al. Metabolic risk factors of ovarian cancer: a review. *JBRA Assisted Reproduction*, 2022, 26.2: 335.

KIM, Jihye, et al. CDK7 is a reliable prognostic factor and novel therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 2020, 156.1: 211-221.

KITAYAMA, Joji, et al. ASO author reflections: repeated intraperitoneal paclitaxel with systemic chemotherapy as the first-line treatment for peritoneal malignancy. *Annals of Surgical Oncology*, 2021, 28: 3871-3872.

KLAVER, C. E. L., et al. Recommendations and consensus on the treatment of peritoneal metastases of colorectal origin: a systematic review of national and international guidelines. *Colorectal Disease*, 2017, 19.3: 224-236.

KLOS, D., et al. Současné postavení cytoredukční chirurgie (CRS) a intraperitoneální hypertermické chemo terapie (HIPEC) v multimodální léčbě nádorů peritoneálního povrchu. *Čas. Lék. Čes*, 2018, 157.8: 419-428.

KOGA, Shigemasa, et al. Prophylactic therapy for peritoneal recurrence of gastric cancer by continuous hyperthermic peritoneal perfusion with mitomycin C. *Cancer*, 1988, 61.2: 232-237.

KONSTANTINOPOULOS, Panagiotis A., et al. Homologous recombination deficiency: exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer discovery*, 2015, 5.11: 1137-1154.

KÖBEL, Martin; KANG, Eun Young. The evolution of ovarian carcinoma subclassification. *Cancers*, 2022, 14.2: 416.

KUO, Kuan-Ting, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *The American journal of pathology*, 2009, 174.5: 1597-1601.

KURMAN, Robert J.; SHIH, Ie-Ming. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *The American journal of pathology*, 2016, 186.4: 733-747.

KURNIT, Katherine C.; FLEMING, Gini F.; LENGYEL, Ernst. Updates and new options in advanced epithelial ovarian cancer treatment. *Obstetrics & Gynecology*, 2021, 137.1: 108-121.

KUROKI, Lindsay; GUNTUPALLI, Saketh R. Treatment of epithelial ovarian cancer. *Bmj*, 2020, 371.

KUROSE, Keisuke, et al. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *The American journal of pathology*, 2001, 158.6: 2097-2106.

KUSAMURA, Shigeki, et al. Cytoreductive surgery followed by intraperitoneal hyperthermic perfusion: analysis of morbidity and mortality in 209 peritoneal surface malignancies treated with closed abdomen technique. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2006, 106.5: 1144-1153.

LABIDI-GALY, S. Intidhar, et al. Location of mutation in BRCA2 gene and survival in patients with ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 2018, 24.2: 326-333.

LAMPE, Bjoern, et al. Prognostic significance of Sugarbaker's peritoneal cancer index for the operability of ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2015, 25.1.

LAPLANTE, Mathieu; SABATINI, David M. mTOR signaling in growth control and disease. *cell*, 2012, 149.2: 274-293.

LEMPIÄINEN, Harri; HALAZONETIS, Thanos D. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *The EMBO journal*, 2009, 28.20: 3067-3073.

LEMSTROVÁ, Radmila, et al. Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome. *Oncology letters*, 2017, 14.5: 5980-5988.

LEUNG, V., et al. Oxaliplatin versus Mitomycin C for HIPEC in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2017, 43.1: 144-149.

LEVANON, Keren; CRUM, Christopher; DRAPKIN, Ronny. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26.32: 5284-5293.

LEVINE, Douglas A., et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clinical cancer research*, 2005, 11.8: 2875-2878.

LEVINE, Edward A., et al. Intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancy: experience with 1,000 patients. *Journal of the American College of Surgeons*, 2014, 218.4: 573-585.

LHEUREUX, Stephanie, et al. Epithelial ovarian cancer. *The Lancet*, 2019, 393.10177: 1240-1253.

LHEUREUX, Stephanie; BRAUNSTEIN, Marsela; OZA, Amit M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2019, 69.4: 280-304.

LI, Chen, et al. Surgical resection with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer patients with peritoneal dissemination. *Journal of Surgical Oncology*, 2010, 102.5: 361-365.

LIBERTO, Juliane M., et al. Current and emerging methods for ovarian cancer screening and diagnostics: a comprehensive review. *Cancers*, 2022, 14.12: 2885.

LIN, Douglas I., et al. Recurrent urothelial carcinoma-like FGFR3 genomic alterations in malignant Brenner tumors of the ovary. *Modern Pathology*, 2021, 34.5: 983-993.

LIONTOS, Michalis, et al. BRCA1/2 mutation types do not affect prognosis in ovarian cancer patients. *Current Oncology*, 2021, 28.6: 4446-4456.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 2001, 25.4: 402-408.

LOVEJOY, Courtney A.; CORTEZ, David. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA repair*, 2009, 8.9: 1004-1008.

LOW, Russell N.; BARONE, Robert M.; ROUSSET, Pascal. Peritoneal MRI in patients undergoing cytoreductive surgery and HIPEC: history, clinical applications, and implementation. *European Journal of Surgical Oncology*, 2021, 47.1: 65-74.

LUI, Goldie YL; GRANDORI, Carla; KEMP, Christopher J. CDK12: an emerging therapeutic target for cancer. *Journal of clinical pathology*, 2018, 71.11: 957-962.

MABUCHI, S.; HISAMATSU, T.; KIMURA, T. Targeting mTOR signaling pathway in ovarian cancer. *Current medicinal chemistry*, 2011, 18.19: 2960-2968.

MATSUOKA, Shuhei, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *science*, 2007, 316.5828: 1160-1166.

MCCONECHY, Melissa K., et al. Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Modern pathology*, 2014, 27.1: 128-134.

METSALU, Tauno; VILO, Jaak. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic acids research*, 2015, 43.W1: W566-W570.

MASSALOU, Damien, et al. Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer: novel clinical and molecular outcomes. *The American Journal of Surgery*, 2017, 213.2: 377-387.

MATULONIS, Ursula A., et al. High throughput interrogation of somatic mutations in high grade serous cancer of the ovary. *PloS one*, 2011, 6.9: e24433.

MCCUSKER, Margaret E., et al. Primary malignant neoplasms of the appendix: A population-based study from the surveillance, epidemiology and end-results program, 1973–1998. *Cancer*, 2002, 94.12: 3307-3312.

MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, Beatrice, et al. Evaluation of Reference Genes and Normalization Strategy for Quantitative Real-Time PCR in Human Pancreatic Carcinoma. *Disease markers*, 2012, 32.3: 203-210.

MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, Beatrice, et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas*, 2013, 42.4: 707-716.

MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, B., et al. Hedgehog pathway overexpression in pancreatic cancer is abrogated by new-generation taxoid SB-T-1216. *The pharmacogenomics journal*, 2017, 17.5: 452-460.

MOORE, Patrick S., et al. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines: analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Archiv*, 2001, 439: 798-802.

MÜLLER, H., et al. Systemic chemotherapy using FLOT-regimen combined with cytoreductive surgery plus HIPEC for treatment of peritoneal metastasized gastric cancer. *Age (years)*, 2014, 53: 39-71.

NAKAYAMA, Kentaro, et al. Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer biology & therapy*, 2006, 5.7: 779-785.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) V5.0 ed. Bethesda Md: U.S. Department of Health and Human Services; 2017. Dostupné z: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf. Naposledy navštíveno: říjen 2024.

NITECKI, Roni; WOODARD, Terri; RAUH-HAIN, J. Alejandro. Fertility-sparing treatment for early-stage cervical, ovarian, and endometrial malignancies. *Obstetrics & Gynecology*, 2020, 136.6: 1157-1169.

NOIRET, Barbara, et al. Centralization and oncologic training reduce postoperative morbidity and failure-to-rescue rates after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancies: study on a 10-year national French practice. *Annals of Surgery*, 2020, 272.5: 847-854.

NORQUIST, Barbara M., et al. Mutations in homologous recombination genes and outcomes in ovarian carcinoma patients in GOG 218: an NRG oncology/gynecologic oncology group study. *Clinical Cancer Research*, 2018, 24.4: 777-783.

OBATA, Koshiro, et al. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer research*, 1998, 58.10: 2095-2097.

OLBROMSKI, Piotr Józef, et al. Identification of new molecular biomarkers in ovarian cancer using the gene expression profile. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11.13: 3888.

OSORIO, Ana, et al. DNA glycosylases involved in base excision repair may be associated with cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *PLoS genetics*, 2014, 10.4: e1004256.

OZA, Amit M., et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *The Lancet Oncology*, 2015, 16.8: 928-936.

OZA, Amit M., et al. Quality of life in patients with recurrent ovarian cancer treated with niraparib versus placebo (ENGOT-OV16/NOVA): results from a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 2018, 19.8: 1117-1125.

PADMANABHAN, Naveen, et al. Preliminary experience and morbidity analysis of cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (CRS/HIPEC) from a tertiary cancer center in India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 2015, 9.6: XC09.

PAL, Tuya, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2005, 104.12: 2807-2816.

PENNINGTON, Kathryn P., et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 2014, 20.3: 764-775.

PHUNG, Minh Tung, et al. Trends of ovarian cancer incidence by histotype and race/ethnicity in the United States 1992–2019. *Cancer research communications*, 2023, 3.1: 1-8.

PIETRAGALLA, Antonella, et al. Ovarian cancer predisposition beyond BRCA1 and BRCA2 genes. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2020, 30.11.

PILIÉ, Patrick G., et al. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 2019, 16.2: 81-104.

PRADA-VILLAVARDE, Arancha, et al. The American Society of Peritoneal Surface Malignancies evaluation of HIPEC with Mitomycin C versus Oxaliplatin in 539 patients with colon cancer undergoing a complete cytoreductive surgery. *Journal of surgical oncology*, 2014, 110.7: 779-785.

QUENET, F., et al. A UNICANCER phase III trial of Hyperthermic Intra-peritoneal Chemotherapy (HIPEC) for Colorectal Peritoneal Carcinomatosis. *PRODIGE 7. European Journal of Surgical Oncology*, 2019, 45.2: e17.

QUENET, François, et al. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus cytoreductive surgery alone for colorectal peritoneal metastases (PRODIGE 7): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 2021, 22.2: 256-266.

REBBECK, Timothy R., et al. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *Jama*, 2015, 313.13: 1347-1361.

REID, Brett M.; PERMUTH, Jennifer B.; SELLERS, Thomas A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer biology & medicine*, 2017, 14.1: 9.

REINHARDT, H. Christian, et al. p53-deficient cells rely on ATM-and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer cell*, 2007, 11.2: 175-189.

RODRÍGUEZ SILVA, Cristina, et al. Are there intra-operative hemodynamic differences between the Coliseum and closed HIPEC techniques in the treatment of peritoneal metastasis? A retrospective cohort study. *World Journal of Surgical Oncology*, 2017, 15: 1-8.

ROOS, Wynand P.; THOMAS, Adam D.; KAINA, Bernd. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 2016, 16.1: 20-33.

ROVIELLO, F., et al. Prospective study of peritoneal recurrence after curative surgery for gastric cancer. *British journal of surgery*, 2003, 90.9: 1113-1119.

SADEGHI, Babak, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2000, 88.2: 358-363.

SADOWSKI, E. A., et al. Adnexal lesions: imaging strategies for ultrasound and MR imaging. *Diagnostic and interventional imaging*, 2019, 100.10: 635-646.

SAKURAMOTO, Shinichi, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357.18: 1810-1820.

SAMBASIVAN, Suchetha. Epithelial ovarian cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*, 2022, 33: 100629.

SÁNCHEZ-HIDALGO, Juan Manuel, et al. Colorectal peritoneal metastases: Optimal management review. *World journal of gastroenterology*, 2019, 25.27: 3484.

SATO, Nakako, et al. Loss of heterozygosity on 10q23. 3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer research*, 2000, 60.24: 7052-7056.

SHAH, S. Common terminology criteria for adverse events. *National Cancer Institute: USA*, 2022, 784: 785.

SHANNON, M.; et al. Ovarian Cancer Staging, 2021. Medscape. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/2007140-overview?form=fpf>. Naposledy navštíveno: září 2024.

SHEN, G. H., et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *British journal of cancer*, 2000, 83.2: 196-203.

SCHRIJVER, Lieske H., et al. Oral contraceptive use and ovarian cancer risk for BRCA1/2 mutation carriers: an international cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2021, 225.1: 51. e1-51. e17.

SCHUITEVOERDER, Darryl, et al. Assessment of the surgical workforce pertaining to cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the United States. *Annals of surgical oncology*, 2020, 27: 3097-3102.

SOU CISSE, Mikael L., et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with or without early post-operative intraperitoneal chemotherapy for appendix neoplasms with peritoneal metastases: a propensity score analysis. *European Journal of Surgical Oncology*, 2021, 47.1: 157-163.

SOUČEK, Pavel, et al. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 2005, 23.9: 1417-1422.

SOUKUPOVA, Jana, et al. Validation of CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PloS one*, 2018, 13.4: e0195761.

SPOLVERATO, Gaya, et al. Rates and patterns of recurrence after curative intent resection for gastric cancer: a United States multi-institutional analysis. *Journal of the American College of Surgeons*, 2014, 219.4: 664-675.

SPRATT, John S., et al. Hyperthermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Research*, 1980a, 40.2: 253-255.

SPRATT, John S., et al. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer research*, 1980b, 40.2: 256-260.

SUGARBAKER, Paul H. Peritonectomy procedures. *Annals of surgery*, 1995, 221.1: 29.

SUGARBAKER, P. H., et al. Pseudomyxoma peritonei syndrome. *Advances in surgery*, 1996, 30: 233-280.

SUGARBAKER, P. H. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbeck's archives of surgery*, 1999, 384.6: 576-587.

SUGARBAKER, Paul H., et al. A review of peritoneal mesothelioma at the Washington Cancer Institute. *Surgical oncology clinics of North America*, 2003, 12.3: 605-21, xi.

SUGARBAKER, Paul H.; YU, Wansik; YONEMURA, Yutaka. Gastrectomy, peritonectomy, and perioperative intraperitoneal chemotherapy: the evolution of treatment

strategies for advanced gastric cancer. In: *Seminars in surgical oncology*. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2003. p. 233-248.

SUGARBAKER, Paul H. A narrative review of what can HIPEC do. *European Journal of Surgical Oncology*, 2023.

SUNG, Hyuna, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2021, 71.3: 209-249.

SZKLARCZYK, Damian, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research*, 2021, 49.D1: D605-D612.

TAN, Grace Hwei Ching, et al. Does early post-operative intraperitoneal chemotherapy (EPIC) for patients treated with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) make a difference?. *International Journal of Hyperthermia*, 2016, 32.3: 281-288.

THOMASSEN, Irene, et al. Peritoneal carcinomatosis of gastric origin: a population-based study on incidence, survival and risk factors. *International journal of cancer*, 2014, 134.3: 622-628.

TOKUNAGA, Hideki, et al. TNM classification of gynaecological malignant tumours: changes between the seventh and eighth editions. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2019, 49.4: 311-320.

TROTTI, Andy, et al. Patient-reported outcomes and the evolution of adverse event reporting in oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, 25.32: 5121-5127.

TSIBULAK, Irina, et al. BRCA1 and BRCA2 mRNA-expression prove to be of clinical impact in ovarian cancer. *British journal of cancer*, 2018, 119.6: 683-692.

TUTT, A. N. J., et al. Exploiting the DNA repair defect in BRCA mutant cells in the design of new therapeutic strategies for cancer. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. p. 139-148.

VANDERPUYE, Verna D., et al. Assessment of adult women with ovarian masses and treatment of epithelial ovarian cancer: ASCO resource-stratified guideline. *JCO Global Oncology*, 2021, 7: 1032-1066.

VAN DER SPEETEN, Kurt; STUART, Oswald A.; SUGARBAKER, Paul H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of perioperative cancer chemotherapy in peritoneal surface malignancy. *The Cancer Journal*, 2009, 15.3: 216-224.

VAN DE VAART, P. J. M., et al. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin–DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *European journal of cancer*, 1998, 34.1: 148-154.

VAN DRIEL, Willemien J., et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378.3: 230-240.

VAN’T SANT, I., et al. Seeing the whole picture: Added value of MRI for extraperitoneal findings in CRS-HIPEC candidates. *European Journal of Surgical Oncology*, 2022, 48.2: 462-469.

VERMA, Vivek, et al. Malignant peritoneal mesothelioma: national practice patterns, outcomes, and predictors of survival. *Annals of surgical oncology*, 2018, 25.7.

VOTANOPOULOS, Konstantinos, et al. A comparison of hematologic toxicity profiles after heated intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin and mitomycin C. *Journal of surgical research*, 2013, 179.1: e133-e139.

WANG, Yun, et al. PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas. *Human mutation*, 2005, 25.3: 322-322.

WEISBERGER, Austin S.; LEVINE, Bennett; STORAASLI, John P. Use of nitrogen mustard in treatment of serous effusions of neoplastic origin. *Journal of the American Medical Association*, 1955, 159.18: 1704-1707.

WITKAMP, Arjen J., et al. Rationale and techniques of intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Cancer treatment reviews*, 2001, 27.6: 365-374.

WU, Chew-Wun, et al. Incidence and factors associated with recurrence patterns after intended curative surgery for gastric cancer. *World journal of surgery*, 2003, 27.2: 153-158.

YAN, Tristan D.; CAO, Christopher Qian; MUNKHOLM-LARSEN, Stine. A pharmacological review on intraperitoneal chemotherapy for peritoneal malignancy. *World journal of gastrointestinal oncology*, 2010, 2.2: 109.

YANG, Linlin, et al. Oncogenic KRAS drives radioresistance through upregulation of NRF2-53BP1-mediated non-homologous end-joining repair. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49.19: 11067-11082.

YANG, Wen-Juan, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2023, 29.16: 2452.

YANG, Xiao-Jun, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: final results of a phase III randomized clinical trial. *Annals of surgical oncology*, 2011, 18: 1575-1581.

YONEMURA, Y., et al. Treatment of peritoneal dissemination from gastric cancer by peritonectomy and chemohyperthermic peritoneal perfusion. *British Journal of Surgery: Incorporating European Journal of Surgery and Swiss Surgery*, 2005, 92.3: 370-375.

ZALCMAN, Gérard, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 2016, 387.10026: 1405-1414.

ZAMWAR, Udit M.; ANJANKAR, Ashish P. Aetiology, epidemiology, histopathology, classification, detailed evaluation, and treatment of ovarian cancer. *Cureus*, 2022, 14.10.

ZHANG, Qing; DAI, Xiaoli; LI, Wei. Systematic review and meta-analysis of O-RADS ultrasound and O-RADS MRI for risk assessment of ovarian and adnexal lesions. *American Journal of Roentgenology*, 2023, 1-13.

6.6 Seznam příloh prací autorky disertace

- 1) Původní vědecké publikace in extenso související s disertační prací uveřejněné v časopisech s IF
1. Oliverius M*, **Flasarova D***, Mohelnikova-Duchonova B, Ehrlichova M, Hlavac V, Kocik M, Strouhal O, Dvorak P, Ojima I, Soucek P. KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models by conventional and experimental taxanes. *Mutagenesis*. 2019 Dec 19;34(5-6):403-411. doi: 10.1093/mutage/gez021. PMID: 31375828; PMCID: PMC6923165. (Příloha 1; IF 3.379 Q2)
2. **Flasarova D**, Urban K, Strouhal O, Klos D, Lemstrova R, Dvorak P, Soucek P, Mohelnikova-Duchonova B. DNA Repair Pathway in Ovarian Cancer Patients Treated with HIPEC. *Int J Mol Sci*. 2023 May 17;24(10):8868. doi: 10.3390/ijms24108868. PMID: 37240218; PMCID: PMC10219140. (Příloha 2; IF 4.9 Q1)
3. Lemstrova R, **Flasarova D**, Spisarova M, Melichar B, Lovecek M, Havlik R, Neoral C, Mohelnikova-Duchonova B, Klos D. Evaluation and management of toxicity of cytoreductive surgery/hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: the initial experience of a single centre study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2020 Sep;164(3):300-306. doi: 10.5507/bp.2019.035. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31435073. (Příloha 3; IF 1.000 Q4)

* Oba autoři přispěli stejnou měrou.

2) Ostatní původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopise s IF

1. Novy Z, Stepankova J, Hola M, **Flasarova D**, Popper M, Petrik M. Preclinical Evaluation of Radiolabeled Peptides for PET Imaging of Glioblastoma Multiforme. *Molecules*. 2019 Jul 8;24(13):2496. doi: 10.3390/molecules24132496. PMID: 31288488; PMCID: PMC6651196. (IF 3.267 Q3)

3) Přednášky a postery s abstraktem

1. 4th International Cancer Symposium of the Cancer Research Center of Lyon, 2. – 4. 10. 2019, Taxane treatment and KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models.
2. PragueONCO 2020, 30. 1. 2020, Léčba taxany a změny exprese v KRAS signální dráze u PDAC myších modelů.

Příloha 1.

Oliverius M*, **Flasarova D***, Mohelnikova-Duchonova B, Ehrlichova M, Hlavac V, Kocik M, Strouhal O, Dvorak P, Ojima I, Soucek P. KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models by conventional and experimental taxanes. *Mutagenesis*. 2019 Dec 19;34(5-6):403-411. doi: 10.1093/mutage/gez021. PMID: 31375828; PMCID: PMC6923165.

IF 3.379; Q2

* Oba autoři přispěli stejnou měrou.

Original Manuscript

KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models by conventional and experimental taxanes

M. Oliverius^{1,2,†}, D. Flasarova^{3,†}, B. Mohelnikova-Duchonova^{3,4},
M. Ehrlichova⁵, V. Hlavac⁵, M. Kocik², O. Strouhal³, P. Dvorak⁵, I. Ojima⁶ and
P. Soucek^{4,5,*}

¹Department of Surgery, Faculty Hospital Kralovske Vinohrady and Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, 100 00, Czech Republic, ²Transplantation Center, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, 140 00, Czech Republic, ³Department of Oncology and Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, 779 00, Czech Republic, ⁴Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, Prague, 100 42, Czech Republic, ⁵Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, 301 00, Czech Republic, ⁶Institute of Chemical Biology and Drug Discovery, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY, 117 94-3400, USA

*To whom correspondence should be addressed. Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic. Tel: +420-267 082 711; Fax: +420-267 082 711; Email: pavel.soucek@szu.cz

[†]Both authors contributed equally to this work.

Received 7 March 2019; Editorial decision 6 July 2019; Accepted 6 July 2019.

Abstract

The KRAS signalling pathway is pivotal for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) development. After the failure of most conventional cytotoxic and targeted therapeutics tested so far, the combination of taxane nab-paclitaxel (Abraxane) with gemcitabine recently demonstrated promising improvements in the survival of PDAC patients. This study aimed to explore interactions of conventional paclitaxel and experimental taxane SB-T-1216 with the KRAS signalling pathway expression in *in vivo* and *in vitro* PDAC models in order to decipher potential predictive biomarkers or targets for future individualised therapy. Mouse PDAC PaCa-44 xenograft model was used for evaluation of changes in transcript and protein levels of the KRAS signalling pathway caused by administration of experimental taxane SB-T-1216 *in vivo*. Subsequently, KRAS wild-type (BxPc-3) and mutated (MiaPaCa-2 and PaCa-44) cell line models were treated with paclitaxel to verify dysregulation of the KRAS signalling pathway gene expression profile *in vitro* and investigate the role of KRAS mutation status. By comparing the gene expression profiles, this study observed for the first time that *in vitro* cell models differ in the basal transcriptional profile of the KRAS signalling pathway, but there were no differences between KRAS mutated and wild-type cells in sensitivity to taxanes. Generally, the taxane administration caused a downregulation of the KRAS signalling pathway both *in vitro* and *in vivo*, but this effect was not dependent on the KRAS mutation status. In conclusion, putative biomarkers for prediction of taxane activity or targets for stimulation of taxane anticancer effects were not discovered by the KRAS signalling pathway profiling in various PDAC models.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC, OMIM: 260350) ranks among the less frequent cancer diagnoses (ranking 12th in incidence worldwide). However, its mortality is the fourth leading cause of

cancer death today and predicted to become the second leading cause of cancer death in the USA by 2030 (1,2). Systemic chemotherapy is administered to >80% of PDAC patients, but the mortality,

paralleling the incidence, indicates the failure of either conventional chemotherapy or any so far tested targeted therapeutics.

As stated above, the need for better therapies resulted in numerous clinical trials and experiments aiming to individualise the therapy (3). The combination of taxane nab-paclitaxel (Abraxane) with gemcitabine, along with some other drug combination regimens, e.g. leucovorin, 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX), brought promising improvements in survival of PDAC patients (4,5). Taxanes are mitotic poisons inhibiting microtubule depolymerisation during cell division (6) and blocking the G2/M phase of the cell cycle. Our previous work has shown that

the new generation taxoid SB-T-1216 (7) suppresses the Hedgehog pathway expression in PDAC PaCa-44 xenograft *in vivo* model indicating a new mechanism of taxane action with potential use for PDAC treatment (8). In line with the previous observation that another new generation taxane SB-T-1214 exerts high cytotoxic potency against human PDAC cell line (BxPc-3 and PANC-1) *in vitro* and CFPAC-1 xenograft *in vivo* models these compounds seem very promising for future PDAC therapy development (7).

The RAS pathway, together with Hedgehog, TGF β , NOTCH, WNT/CTNNB1, RB, SWI/SNF and DNA repair, is among the most frequently implicated pathways in PDAC (9). Somatic KRAS gene

Table 1. Time-dependent changes of expression of the KRAS signalling pathway genes after treatment of PDAC model cell lines differing by the KRAS mutation status with paclitaxel *in vitro*

24 h	BxPc-3	MiaPaCa-2	PaCa-44	Consensus	72 h	BxPc-3	MiaPaCa-2	PaCa-44	Consensus
AKT1	No change	↑	No change	No	AKT1	No change	No change	No change	No
AKT2	↓	No change	↓	No	AKT2	No change	No change	No change	No
ARAF	↓	↓	↓	Yes	ARAF	↓	No change	↓	No
BRAF	↓	↓	↓	Yes	BRAF	↓	↓	↓	Yes
GSK3B	↓	↓	↓	Yes	GSK3B	↓	↓	No change	No
KRAS	↓	↓	↓	Yes	KRAS	↓	↓	↓	Yes
MAP2K1	↓	↓	↓	Yes	MAP2K1	↓	↓	↓	Yes
MAP2K2	↓	↓	↓	Yes	MAP2K2	↓	↓	No change	No
MAP2K7	↓	↓	↓	Yes	MAP2K7	↓	↓	↓	No
MAP3K1	No change	↓	No change	No	MAP3K1	↓	↓	↓	Yes
MAP3K2	No change	↓	↓	No	MAP3K2	No change	No change	↓	No
MAPK1	↓	↓	No change	No	MAPK1	No change	No change	↓	No
MAPK10	↓	No change	No change	No	MAPK10	No change	No change	No change	Yes
MAPK3	↓	No change	↓	No	MAPK3	↓	↓	↓	Yes
MAPK8	↓	↓	↓	Yes	MAPK8	↓	↓	↓	Yes
MAPK9	↓	↓	↓	No	MAPK9	↓	No change	No change	No
MKNK1	↓	↓	↓	No	MKNK1	↓	No change	↓	No
MKNK2	↓	↓	↓	Yes	MKNK2	↓	↓	↓	No
MTOR	↓	↓	↓	Yes	MTOR	↓	↓	No change	No
PAK1	↓	↓	↓	Yes	PAK1	No change	↓	↓	No
PDPK1	↓	↓	↓	Yes	PDPK1	↓	↓	No change	No
PIK3CA	↓	↓	↓	Yes	PIK3CA	↓	↓	↓	Yes
PIK3CG	↓	↓	No change	No	PIK3CG	↓	↓	No change	No
PRKCA	No change	No change	No change	Yes	PRKCA	No change	↓	No change	No
PTEN	↓	No change	↓	No	PTEN	↓	↓	No change	No
PTK2	↓	↓	No change	No	PTK2	↓	↓	↓	Yes
PTK2B	↓	↓	No change	No	PTK2B	↓	↓	No change	No
RAC1	↓	↓	↓	Yes	RAC1	No change	↓	↓	No
RAF1	↓	No change	↓	No	RAF1	No change	↓	No change	No
RALA	↓	↓	↓	Yes	RALA	↓	↓	No change	No
RALBP1	↓	↓	↓	Yes	RALBP1	↓	↓	↓	Yes
RALGDS	No change	↓	↓	No	RALGDS	↓	↓	↓	Yes
RHOA	↓	↓	No change	No	RHOA	↓	↓	No change	No
RIN1	↓	↓	No change	No	RIN1	↓	↓	↓	Yes
RPS6KA2	↓	No change	↓	No	RPS6KA2	↓	↓	↓	No
Resume—24 h:					Resume—72 h:				
Agreement in all three cell lines				17 genes	Agreement in all three cell lines				13 genes
Disagreement between wild-type and mutated cells				6 genes	Disagreement between wild-type and mutated cells				3 genes
Discrepant results between KRAS mutated cells				12 genes	Discrepant results between KRAS mutated cells				19 genes

Cells were treated with increasing concentration of paclitaxel (30, 100 and 300 nM) and gene expression changes monitored after 24 h (left panel) and 72 h (right panel) incubation. The results of the KRAS signalling pathway dysregulation analysis were compared among all three cell models by hierarchical clustering (Figure 3) and clear trends of upregulation (↑) or downregulation (↓) in the paclitaxel concentration course are displayed for each cell line. In the consensus column, agreements in the paclitaxel concentration-dependent trends among all three lines are marked as yes and discrepancies as no. The differences in these trends between KRAS wild-type BxPc-3 model and both KRAS mutated models (PaCa-44 and MiaPaCa-2) were consequently compared. Genes that demonstrated discrepant trends in KRAS wild-type model cells compared to both mutated cell lines are highlighted (dark grey for upregulation and light grey for down regulation). The resume is presented at the bottom of the table and the dynamics in gene expression changes for both incubation times are compared. It is apparent that only a few genes ($n = 6$) differed in response to paclitaxel treatment in KRAS wild-type cells compared to the mutated models. Moreover, these differences, except for MAPK9 downregulation, mostly normalised in time. None of the observed differences concerned the KRAS signalling pathway stem of MAPK scaffold.

(OMIM: 190070) mutations were observed in 71% PDAC patients ($n = 7431$) and 99% of these are missense substitutions, mainly in codon 12 (10). The most prevalent mutations are p.G12D (47% from all KRAS mutations), p.G12V (31%) and p.G12R (12%), while the rest accounts for <10% of the total (10). These mutations cause persistent KRAS activation and subsequent dysregulation of a number of cellular functions leading to metabolic reprogramming, loss of differentiation, accelerated proliferation and prolonged survival. Despite numerous studies about the prognostic and predictive role of KRAS mutations in PDAC having been conducted, the published results remain controversial and so far preclude the clinical use of KRAS in PDAC diagnosis, prognosis and therapy individualisation (11). Association of the KRAS signalling pathway dysregulation and the KRAS mutation status with survival of PDAC patients has not recently been confirmed (12). Moreover, there are no clinically successful inhibitors of this pathway either (13) and therefore it is imperative to search for biomarkers of personalisation of conventional therapeutics most successful in PDAC treatment to date.

Taken together, the detailed mechanisms and consequences of the KRAS signalling pathway dysregulation in PDAC chemoresistance and progression remain incompletely understood and the same applies to the potential contribution of the KRAS signalling pathway status to taxane mechanism of action. Recently, functional genetic screens demonstrated that KRAS expression in cancer cell lines leads to sensitivity and interference with mitosis and the co-existence of KRAS mutations and high MYC expression predicts anti-mitotic drug sensitivity (14).

The aim of the present study was to evaluate whether the administration of experimental taxane SB-T-1216 to PDAC mouse xenograft model *in vivo* and conventional paclitaxel to PDAC cell lines *in vitro* interacts with the KRAS signalling pathway expression on both a transcript and protein level. This is the first study to date addressing interactions between the major PDAC driver signalling pathway (RAS) and the clinically successful anticancer compounds used for treatment of this cancer.

Materials and methods

Xenografts

The human-mouse xenograft study was conducted in the Institute of Clinical and Experimental Medicine (Prague, Czech Republic) and approved by the Institutional Review Board of the Institute.

SB-T-1216 was synthesised and characterised as previously described (7). Female athymic nude mice (nu/nu) between 4 and 6 weeks of age were obtained from Charles River Laboratories (Duesseldorf, Germany). Human pancreatic carcinoma cell line Paca-44 with the already described characteristics (8) was obtained from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany) and cultivated according to the manufacturer's protocol. The Paca-44 cell line was used because it harbours the G12V mutation in KRAS (15) frequently occurring in PDAC patients and also for its fast and homogeneous growth in subcutaneous tumours compared to other PDAC cell lines (16). On Day 0, the animals were injected subcutaneously with 200 μ l of a cell suspension containing 5×10^6 cells in phosphate-buffered saline. The treatment was initiated after the tumours reached a size of ~ 100 mm³. In total, 12 Paca-44 xenografts were prepared and divided into two groups: (A) SB-T-1216-treated group ($n = 5$) and (B) control group ($n = 7$). Group A received intravenously two doses of 10 mg of SB-T-1216 per kg weight weekly, i.e. the first dose on Day 1 and the second dose on Day 7. Group B received no treatment.

The animals were sacrificed on the day after the second dose, i.e. on the eighth day after the first dose. Tumour volume was estimated by calliper in weekly intervals and expressed in mm³ using the standard formula, ($W^2 \times L/2$), where L and W are the major and minor diameters of the tumour in millimetres.

Isolation of nucleic acids and cDNA synthesis

Tissue samples and cell pellets were homogenised and total RNA and DNA was isolated and characterised as previously described (17). cDNA was synthesised using 0.5 μ g of total RNA, characterised as described previously (18) and then preamplified by TaqMan PreAmp Master Mix to enrich the specific targets for gene expression analysis using TaqMan Gene Expression Assays (Supplementary Table 1, available at *Mutagenesis* Online, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA). The cDNA preamplification was performed with 5 μ l of cDNA using 14 preamplification cycles, and the preamplification uniformity of cDNA was checked by the procedure recommended by the manufacturer (Life Technologies Corp.).

Selection of genes representing the KRAS signalling pathway

Genes for the study of the KRAS signalling pathway were selected using publicly available databases KEGG (19) and BioCarta (20). In total, 42 genes were selected for gene expression analysis (Supplementary Table 1, available at *Mutagenesis* Online).

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed by the Roche LightCycler 480 Real-Time PCR System using TaqMan® Gene Expression Assays with optimised primer and probe sets and TaqMan™ Universal Master Mix II with UNG (Life Technologies Corp.). The PCR reaction was run in a 96-well plate and the total volume of the reaction mixture per well was 10 μ l. *POP4*, *ELF1*, *MRPL19* and *EIF2B1* were used as reference genes specific for studies of human PDAC based on our previously published data (21). The non-template control (NTC) contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. Each sample was assayed in duplicate and the mean value was used for calculations. The PCR reaction was started at 50°C for 2 min, followed by initial denaturation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturing for 15 s at 95°C and elongation for 1 min at 60°C. Samples with a variation larger than 0.5 Ct (cycle threshold) were reanalysed. Transcript levels were analysed by Roche LightCycler 480 System Software. The ratio of Ct of a particular target gene to an arithmetic mean of Ct of all the reference genes was calculated for each sample and used for statistical evaluation using RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 (Qiagen). The qPCR study adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (22).

Cells and culture conditions

Human PDAC MiaPaCa-2 cell line [harbouring the KRAS G12C mutation and resistant to gemcitabine (23)] and BxPc-3 [KRAS wild-type and sensitive to gemcitabine (23)] were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The origin of the cell line Paca-44 [KRAS G12V mutant (15)] is described above in the chapter about xenografts. Cells between 4th and 40th passages were used for all the experiments. The cell line was authenticated

and genomic stability monitored in the 4th and 40th passages by Short Tandem Repeat profiling using PowerPlex ESI 17 Pro System (Promega Corp., Madison, WI, USA). Cells were cultured in a basic medium with added heat-inactivated (Paca-44, MIA-PaCa-2) or native (BxPC-3) 10% foetal bovine serum in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. RPMI 1640 containing extra L-glutamine (300 µg/ml), sodium pyruvate (110 µg/ml), 15 mM HEPES buffer, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) was used as a basic medium. The cells were trypsinised by 0.25% Trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (all chemicals from PANBioTech GmbH, Aidenbach, Germany).

Cell line treatment with paclitaxel

Cells grown in the culture medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with medium, seeded at 1×10^6 cells/5 ml (biological duplicates) of medium into plastic culture dishes and preincubated for 18 h allowing the cells to attach. The medium was changed to a culture medium without paclitaxel (control) or with selected concentrations of paclitaxel (30, 100 and 300 nM). After the required incubation period (24 and 72 h), the cells were harvested by low-speed centrifugation, washed with phosphate-buffered saline and the pellets of the cells were suspended in 1 ml of Trizol Reagent. The total RNA was isolated and cDNA was synthesised as described before (17,18).

Cytotoxicity assessment

Cells maintained in the culture medium were harvested by low-speed centrifugation, washed with the medium and then seeded at 5×10^3 cells/200 µl of the medium into the wells of a E-Plate View 16PET (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA). After 18 h of preincubation period allowing the cells to attach, the medium without a taxane (control) or with a taxane at desired concentrations (0, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 nM) was added in a 2 µl volume. Cell growth and survival were evaluated after 72 h of incubation by xCELLigence Real-Time cell Analyzer (RTCA). The number of living cells (IC₅₀) was determined by RTCA Software (ACEA Biosciences Inc.).

Immunoblotting analysis of protein expression

All tissue samples were stored at -80°C prior to protein isolation. The samples were ground using a mortar and pestle and then the protein was isolated using Allprep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hildenheim, Germany) in accordance with the manufacturer's protocol. Protein concentration was determined by a bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA). Immunoblotting was performed as previously described (24). Briefly, 20 µg of protein was used for separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% gel, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards Bio-Rad #161-0375 as a ladder) and transferred onto 0.2 µm Protran® nitrocellulose membrane (Whatman, Kent, UK). The membranes were first blocked in 5% w/v bovine serum albumin for 30 min at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Rabbit monoclonal antibodies against total MEK1/2 (no. D1A5, dilution in incubation 1:1000 in 1% blocking reagent), phospho-MEK1/2-Ser221 (no. 166F8, 1:2000), total ERK1/2 (no. 137F5, 1:1000), phospho-ERK1/2-Tyr202/Tyr204 (no. D13.14.4E, 1:2000), total AKT (no. C67E7, 1:1000), phospho-AKT-Ser473 (no. D9E, 1:2000), β-actin (no. 13E5, 1:1000 for tumour samples and 1:2000 for cell line

samples) and GAPDH (no. 14C10, 1:2000) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and antibodies against KRAS (no. GTX100636, dilution 1:1000) and RAF1 (no. GTX61196, dilution 1:1000) from GeneTex (Irvine, CA, USA). After the washing steps, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (no. A0545, dilution 1:10000; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic). Protein bands were visualised with an enhanced chemiluminescence detection system (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products) by Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Densitometry was performed using ImageJ program (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Statistical analyses

Data preprocessing and a quality check was performed with the use of Microsoft Excel software. The fold change due to treatment was calculated from raw Ct values in accordance with the comparative Ct method described by Livak and Schmittgen (25). Hierarchical clustering and heat map visualisation were performed with the help of publicly available bioinformatic tools, Heatmapper (26) and Shinyheatmap (27). Hierarchical clustering with Euclidean distances and the Ward method was chosen as the best for visualisation of our data from *in vivo* experiment in accordance with previous experiences (8,28) and the Spearman correlation with complete linkage was used for evaluation of *in vitro* experiments.

Differences in single gene and protein expression levels between the treated and control xenografts were assessed by the ANOVA test using SPSS v16.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The transcript levels of target genes normalised to reference genes and protein levels normalised to the level of GAPDH or β-actin control proteins were used.

A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. All *P*-values are departures from two-sided tests. Type I error in single gene expression analyses was controlled by the false discovery rate (FDR) test according to Benjamini and Hochberg (29) and adjusted *P*-values are provided for each comparison except for xenograft protein level analyses.

Results

Transcript levels of the KRAS signalling pathway genes in mouse xenografts—effect of SB-T-1216 treatment *in vivo*

Expression of 42 KRAS pathway genes was determined in tumour tissues by qPCR. First, the KRAS signalling pathway gene expression profile was evaluated by hierarchical clustering and then by single gene analysis. Cluster analysis indicated that SB-T-1216 treatment of Paca-44 xenografts resulted in division of the expressed genes into two major clusters, one composed of 25 and the other composed of 17 genes (heat map in Figure 1A, genes divided into both clusters in Supplementary Figure 1, available at *Mutagenesis* Online). Single gene analysis basically confirmed the general view of the cluster analysis, i.e. downregulation of the majority of the KRAS signalling pathway genes by SB-T-1216 treatment *in vivo* (Figure 1B). Significant downregulation of 18 genes and upregulation of SHC1 were observed after correction to multiple testing (Supplementary Table 2, available at *Mutagenesis* Online).

The downregulated genes represented the upstream branch of the PI3K/AKT pathway including AKT1/2, RAC1 and PAK1 and the downstream genes of RALGDS and RIN1 branches of the KRAS signalling

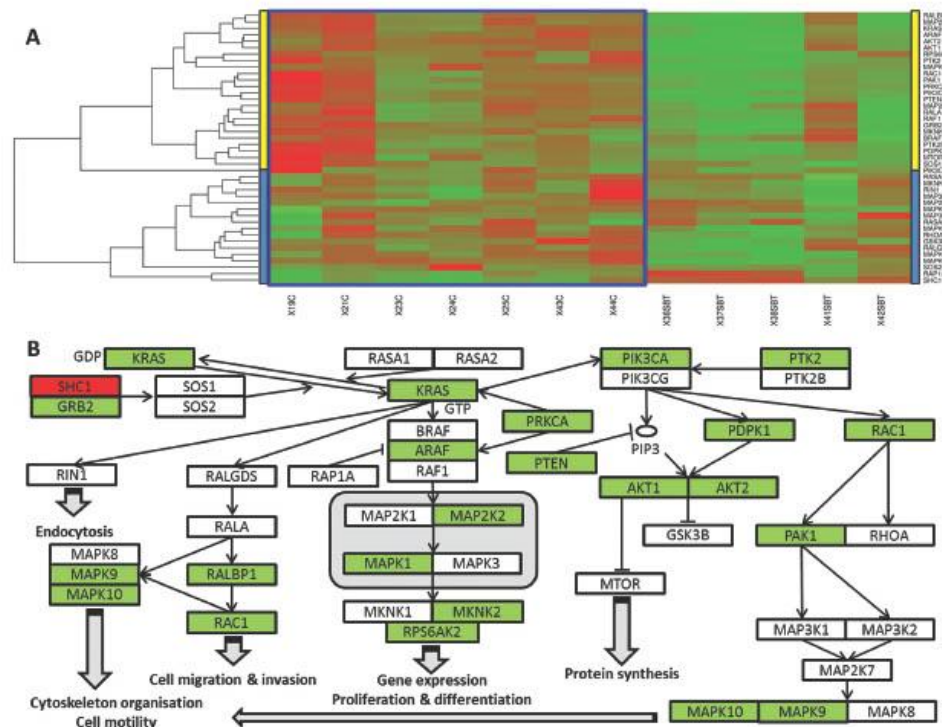


Figure 1. Dysregulation of the KRAS signalling pathway by treatment of PDAC mouse PaCa-44 xenograft model with SB-T-1216 *in vivo*. (A) Heat map of the KRAS pathway gene expression profile in control animals ($n = 7$, marked with rectangle) compared with SB-T-1216-treated ones ($n = 5$). Upregulated genes are in red (in black and white resolution represented in dark colour) and downregulated genes are in green (in black and white resolution represented in light colour). The two most apparent clusters of dysregulated genes between both groups are highlighted with a light and dark grey box (for a list of genes and their positions in the KRAS signalling pathway, see [Supplementary Figure 1](#), available at [Mutagenesis Online](#)). (B) The KRAS signalling pathway map noting the differentially expressed genes in control animals compared with SB-T-1216-treated ones. Downregulated genes are in green (in black and white resolution represented in light colour) and upregulated genes are in red (in black and white resolution represented in dark colour). Genes without differential expression are without colour. A list of genes with significances and directions of dysregulation is in [Supplementary Table 2](#), available at [Mutagenesis Online](#). MAPK pathway scaffold is in rounded rectangle. Figure available in colour online.

pathway, including JNK kinases MAPK9 and MAPK10. The stem, including MAPK scaffold, of the KRAS signalling pathway was also mostly downregulated (KRAS, ARAF, MAP2K2, MAPK1, MKNK2 and RPS6AK2) indicating pathway suppression on a transcript level.

Protein expression of major parts of the KRAS signalling pathway in SB-T-1216-treated mouse xenografts *in vivo*

In order to elaborate results from gene expression study, the levels of proteins representing the stem of the KRAS and the scaffold of the MAPK pathways (KRAS, RAF1, MAP2K1/2—MEK, MAPK1/3—ERK) and (pan)AKT were determined in tumour samples from control and SB-T-1216-treated animals by immunoblotting. MAPK scaffold (MEK and ERK) and AKT were followed in both total and phosphorylated protein forms ([Figure 2A](#)). Densitometry demonstrated that the KRAS protein level was downregulated ($P = 0.039$) while RAF1, pERK and tAKT were significantly upregulated

($P = 0.027$, $P = 0.009$ and $P = 0.007$, respectively) by the SB-T-1216 treatment *in vivo* ([Figure 2B](#)).

Immunoblotting analysis therefore confirmed downregulation of KRAS effector previously observed on the transcript level, but revealed upregulation of RAF1 and AKT in contrast with downregulation of the corresponding transcripts levels (of the borderline significance for RAF1 transcript, $P = 0.055$). In terms of ERK, the significant increase in the phosphorylated protein level as the post-transcriptional event cannot be paralleled with the transcript data and represents a unique observation of this study.

Transcript level analysis of the KRAS signalling pathway genes in cell line models with different KRAS mutation status—effect of treatment with paclitaxel *in vitro*

The time and concentration course of taxane effects on the gene expression of the KRAS signalling pathway and the potential

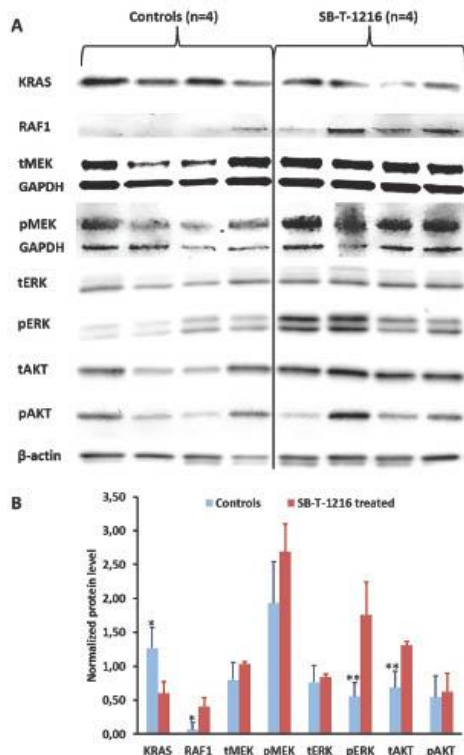


Figure 2. Changes in the major KRAS signalling pathway protein levels by treatment of PDAC mouse PaCa-44 xenograft model with SB-T-1216 *in vivo*. (A) Immunoblots of the KRAS signalling pathway proteins in control animals ($n = 4$) compared with SB-T-1216-treated ones ($n = 4$). KRAS, RAF1, t- and p-MEK, t- and p-ERK and t- and p-AKT levels were determined by immunoblotting and quantified by densitometry as described in the Materials and methods. Actin and GAPDH protein levels were used for normalisation of the results (the average of the three independent blots). (B) Normalised levels of the KRAS signalling pathway proteins in the control and SB-T-1216-treated animals assessed by densitometry. Statistical significance is depicted by stars (* means $0.05 > P > 0.01$ and ** $P < 0.01$). Figure available in colour online.

modulatory effect of the *KRAS* mutation status were studied using several *in vitro* models differing in terms of the *KRAS* mutation status. Genes upstream *KRAS* effector (GRB2, RASA1/2, SOS1/2 and SHC1) and RAPIA were not addressed in these experiments due to the lack of major effects *in vivo*. Paclitaxel was used in these experiments because it had comparable cytotoxicity (measured as IC_{50} by RTCA—see Supplementary Figure 2, available at *Mutagenesis* Online) in all the examined PDAC models. Moreover, paclitaxel is relevant to anticancer therapy of patients.

The gene expression profile of all the cell lines without treatment was initially compared together to estimate major differences connected with *KRAS* mutation status. Cells cultivated for 24 h without any treatment were compared by hierarchical clustering (Supplementary Figure 3A, available at *Mutagenesis* Online). The *KRAS* signalling pathway gene expression profile of BxPc-3 *KRAS*

wild-type cell line notably differed from both *KRAS* mutated cell lines MiaPaCa-2 and PaCa-44. The *KRAS* pathway stem, including the *KRAS* effector molecule and MAPK scaffold, was mostly downregulated while several upstream genes belonging to branches (RALGDS, RIN1, RAC1 and PIK3CG) were upregulated in *KRAS* wild-type BxPc-3 line compared to both *KRAS* mutated lines *in vitro* (Supplementary Figure 3B and Supplementary Table 3, available at *Mutagenesis* Online).

The time and concentration course of paclitaxel effects was consequently studied in all three cell line models differing by the *KRAS* mutation status *in vitro*. The time course analysis monitored changes in the *KRAS* signalling pathway gene expression as early changes—24 h after paclitaxel treatment and late changes—72 h after treatment. The concentration course involved control cells without treatment and cells treated with increasing concentration of paclitaxel (30, 100 and 300 nM).

The *KRAS* signalling pathway dysregulation in PaCa-44 cells, caused by paclitaxel after treatment for 24 h *in vitro*, was compared to changes in PaCa-44 mouse xenografts treated with SB-T-1216 *in vivo*. Several common trends were observed, namely downregulation of the main stem genes *KRAS*, *ARAF*, *MAP2K2*, *MKNK2* and *RPS6AK2* and downregulation of other genes representing pathway branches (*PIK3CA*, *PDPK1*, *AKT2*, *PAK1*, *RALBP1* and *RAC1*) (Supplementary Figure 4, available at *Mutagenesis* Online). This overall concordance suggested that both taxane derivatives produce similar main effects in both *in vitro* and *in vivo* models. In contrast, *MAPK9* was downregulated by SB-T-1216 *in vivo*, but upregulated by paclitaxel *in vitro* suggesting subtle differences worth further study.

The effect of paclitaxel on dysregulation of the *KRAS* signalling pathway genes in various cell line models, differing in the *KRAS* mutation status, was finally evaluated by hierarchical clustering. Concentration-dependent changes were monitored in both times (24 and 72 h) and within all three cell lines (cluster analysis in Supplementary Figure 5, available at *Mutagenesis* Online). Consistent changes in all three cell lines (trends of up or downregulation with increasing paclitaxel concentration) for both times were observed in general. A comparison makes it apparent that the response of cell line models to paclitaxel on a transcript level does not significantly differ according to the *KRAS* mutation status (BxPc-3 compared to the rest).

Early effects of paclitaxel (24-h treatment, Figure 3A) may be generalised as downregulation of the major *KRAS* pathway stem including MAPK scaffold (*KRAS*, *ARAF*, *BRAF*, *MAP2K1/2* and *MKNK2* genes) and branches, namely upstream *RAC1* (*RALA* and *RALBP1*) and downstream *PIK3CA* (*PDPK1* and *RAC1*) and *AKT* (*MTOR* and *GSK3B*). The majority of early changes rather faded away at 72 h with several exceptions. *PTK2*, *MAPK3* and *MAP3K1* became downregulated and *RALGDS* upregulated after 72 h and may be considered major late effects of paclitaxel treatment (Figure 3B; Table 1).

Discussion

PDAC is a disease with infaust prognosis, especially for late diagnosis in the advanced stage of the disease, high resistance to chemotherapy and the absence of effective targeted therapy. Mutations in *KRAS* occur in PDAC with frequencies higher than 90%. Mutations in codons 12 and 13 of the *KRAS* gene result in protein blockage in an active state in which it is unable to hydrolyse GTP, triggering continuous *KRAS* signalling activity. Dysregulation of this pathway ultimately results in the development of pancreatic cancer. Genes

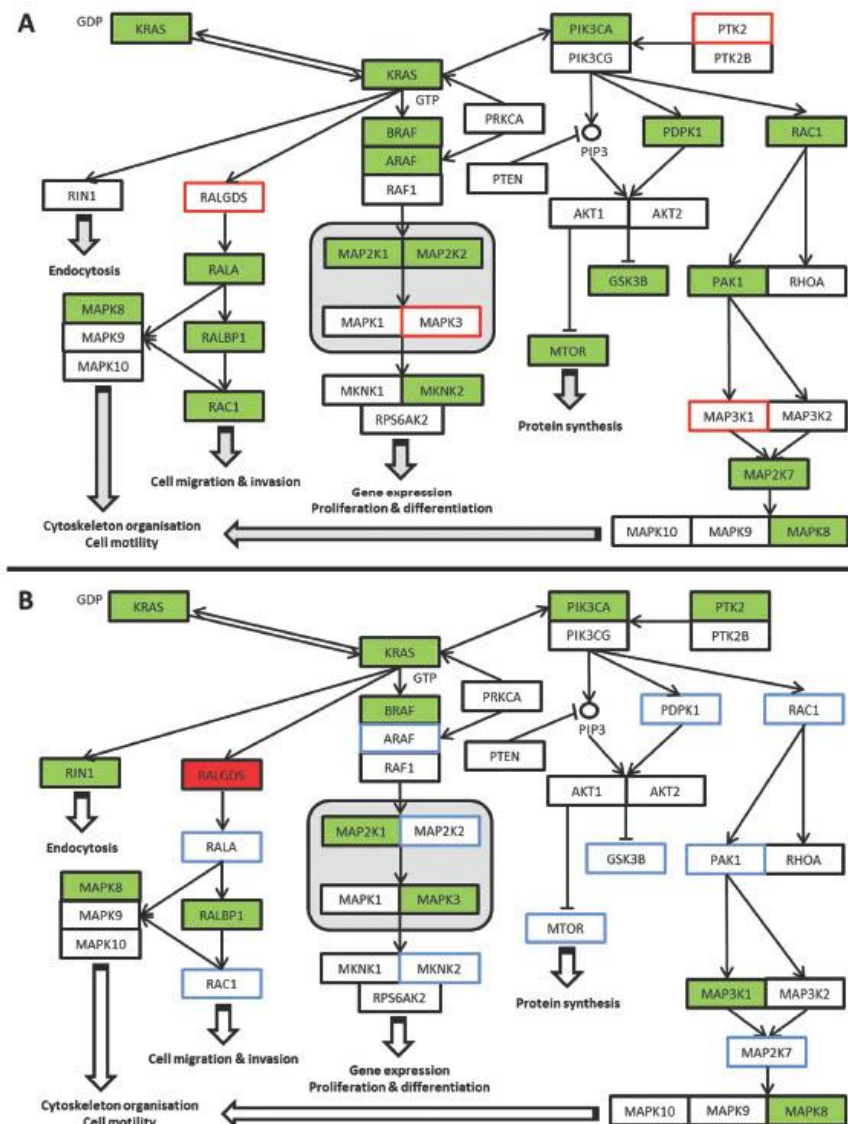


Figure 3. Time-dependent changes of gene expression of the KRAS signaling pathway after treatment of PDAC model cell lines differing by the KRAS mutation status with paclitaxel *in vitro*. Map of consensus in the KRAS signaling pathway expression profiles of paclitaxel (30, 100 and 300 nM) treated BxPc-3, PaCa-44 and MiaPaCa-2 cell lines treated with the same paclitaxel concentrations for 24 h (A) and 72 h (B) compared to corresponding untreated controls. Genes upregulated in a concentration dependent manner are in red (in black and white resolution represented in dark colour) and downregulated genes in green (in black and white resolution represented in light colour). Genes without differential expression are without color. Time-dependent differences are highlighted by rectangles. Changes present only after 24 h treatment are in light grey rectangles in the B part and changes present only after 72 h treatment are in dark grey rectangles in the A part. MAPK pathway scaffold is in rounded rectangle. Figure available in colour online.

of four branches of KRAS signalling pathway are differentially expressed in PDAC tumour tissue compared to non-tumour paired tissue. Three out of four branch pathways (PI3K/PDK1/AKT, RAL guanine nucleotide exchange factor and RIN1/ABL) are significantly overexpressed, which are in direct context with tumour cell migration and disease spread. In contrast, the expression of RAF/MAPK branch pathway in PDAC is reduced (12). Studying the KRAS signalling pathway is therefore extremely important and a detailed understanding of its functioning can contribute to the effectiveness of PDAC treatment.

The present study addressed the effect of taxanes on the expression of KRAS signalling pathway in various experimental PDAC models in search of biomarkers and/or targets enabling personalised therapy of this cancer.

In vivo, the treatment with experimental taxane SB-T-1216 significantly suppressed the KRAS signalling pathway stem and major branches on the transcript level paralleled by the observed downregulation of KRAS effector protein expression. A highly similar observation has previously been described in a case of other major PDAC carcinogenesis-associated signalling pathway (8). All the Hedgehog signalling pathway genes downstream of the Sonic Hedgehog ligand were transcriptionally downregulated by SB-T-1216 treatment of PaCa-44 mouse xenografts *in vivo* (8). We further explored this phenomenon using *in vitro* PDAC models with a different KRAS mutation status.

A recently published patient study concluded that KRAS mutation status is not associated with either the intratumoural gene expression profile of KRAS signalling pathway or with the clinical outcome of PDAC patients (12). Although a recent meta-analysis reported the potential prognostic role of KRAS mutation status in PDAC (30), another study has found no significant difference in overall survival for KRAS wild-type patients compared to mutation carriers (31). Congruently, no putative biomarker or therapeutic target in the KRAS signalling pathway has been found by the present study.

Some particular results may need more attention. Despite transcriptional downregulation of the upstream branch of the PI3K/AKT signalling pathway (AKT1/2, RAC1 and PAK1) having been observed, AKT and RAF1 proteins were increased by taxane treatment *in vivo*. The PI3K/AKT/MTOR pathway represents a significant target for various clinically tested inhibitors (32). However, despite the fact that tAKT was increased, its active form pAKT remained unchanged by taxane treatment in the present study and thus the observed discrepancy may not be biologically relevant. In contrast, the RAF1 induction by taxane treatment *in vivo* may have future implications for drug design. First, very recently a detailed mapping of membrane components necessary for the KRAS signal transduction discovered the key role of RAF1 domains synergising the KRAS partitioning to the membrane (33). Second, RAF proteins activate MEK1/2 and subsequently drive the MAPK pathway stem modulating terminal regulators of cell proliferation, survival, differentiation and apoptosis (34). Additionally, the present study ascertained the discrepancy in MAPK9 dysregulation; it was downregulated by SB-T-1216 *in vivo*, but upregulated by paclitaxel *in vitro*. MAPK9 has been found as the top immunogenic candidate antigen in PDAC compared to healthy donor sera (35) and together with several other tested factors related to host immune response to cancer has potential as a putative diagnostic screening tool or prognostic biomarker (36). Moreover, docetaxel induces activation of MAPK9 (formerly termed JNK2) and accelerates cancer cell death under hypoxic conditions (37). Taken together, both observations suggest that subtle

differences may exist which are worth further study, especially in individual patients who greatly differ from the quite homogeneous cancer models used here.

In contrast to the lack of considerable differences in dysregulation of most KRAS signalling pathway parts between taxane-treated cell models with different KRAS mutation status, the baseline gene expression profile of KRAS wild-type cell line notably differed from both KRAS mutated cell lines. The KRAS signalling pathway stem, including the KRAS effector molecule and MAPK scaffold, was mostly downregulated while several upstream genes belonging to branches (RALGDS, RIN1, RAC1 and PIK3CG) were upregulated in the KRAS wild-type compared to both KRAS mutated lines *in vitro*. The ratio, however, between the total and phosphorylated protein forms of KRAS stem part in the KRAS wild-type model was not estimated, and this observation does not seem to represent a clinically meaningful result as previously no statistically significant differences in transcript levels of the KRAS signalling pathway have been found in PDAC tumours of patients after surgical treatment for an early stage of PDAC (12). Thus, the present study detected dysregulation of the gene expression among uniform cell culture *in vitro* models, which widely differ from the clinical reality of PDAC tumours consisting of a heterogeneous population of malignant cells.

The study has some limitations. First, *in vitro* experiments were performed with conventional taxane paclitaxel and data for SB-T-1216 are not available. Since minor differences in the exact effect of the taxanes on cell death have been described (Ehrlichova et al. 2009), we decided to test in particular the clinically relevant paclitaxel (on biologically distinct types of PDAC cell lines) and to validate *in vivo* the results of only a selected line using an experimental taxane with a higher cytotoxic effect. The cytotoxicity testing revealed, however, a similar efficacy of both compounds in all cell line models *in vitro* and a comparison of gene expression data from *in vivo* model treated with SB-T-1216 and *in vitro* model treated with paclitaxel also demonstrated a good agreement. Second, the results of *in vitro* experiments were not confirmed on the protein level due to the fact that the gene expression analysis has not indicated major changes between KRAS mutated and wild-type models and also the time and concentration effects of paclitaxel failed to indicate dramatic trends. Despite these facts, protein changes may not necessarily correlate with gene expression levels and thus, further studies should confirm or disprove data presented on the transcript level here.

In conclusion, this study demonstrated for the first time that the cell models often used for study of PDAC differ in basal transcriptional levels in accordance with the KRAS mutation status *in vitro*, but these changes do not seem to contribute to the mechanism of action of taxanes, namely paclitaxel. Thus, there are no differences in KRAS mutated and wild-type cells in the sensitivity to taxanes *in vitro*. Using *in vitro* and *in vivo* models, treatment with taxanes caused the downregulation of the KRAS signalling pathway, but no apparent targets for further pre-clinical testing were identified in the KRAS signalling pathway on the transcriptional level.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Mutagenesis* Online.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (16-28375A to B.M.-D.); the Czech Ministry of Education (LO1304 to

B.M.-D. and LO1503 to P.S.); Palacky University (IGA_LF_2018_010 to D.F.); National Institutes of Health, USA (CA 103314 to L.O.) and Charles University (UNCE/MED/006 to P.S.).

Conflict of interest statement: None declared.

References

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2017) Cancer Statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.*, 67, 7–30.
2. Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M. and Matrisian, L. M. (2014) Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.*, 74, 2913–2921.
3. Zemanek, T., Melichar, B., Lovcsek, M., Soucek, P. and Mohelnikova-Duchonova, B. (2019) Biomarkers and pathways of chemoresistance and chemosensitivity for personalized treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Pharmacogenomics*, 20, 113–127.
4. Von Hoff, D. D., Ramanathan, R. K., Borad, M. J., et al. (2011) Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J. Clin. Oncol.*, 29, 4548–4554.
5. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, et al. (2015) nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 107, 1–10.
6. Spencer, C. M. and Faulds, D. (1994) Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs*, 48, 794–847.
7. Ojima, I., Chen, J., Sun, L., et al. (2008) Design, synthesis, and biological evaluation of new-generation taxoids. *J. Med. Chem.*, 51, 3203–3221.
8. Mohelnikova-Duchonova, B., Kocik, M., Duchonova, B., et al. (2017) Hedgehog pathway overexpression in pancreatic cancer is abrogated by new-generation taxoid SB-T-1216. *Pharmacogenomics J.*, 17, 452–460.
9. Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., et al. (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321, 1801–1806.
10. COSMIC. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (accessed March 6, 2019).
11. Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P. and Buscail, L. (2016) Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: hopes and realities. *Eur. J. Cancer*, 54, 75–83.
12. Lomstova, R., Brynychova, V., Hughes, D. J., et al. (2017) Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome. *Oncol. Lett.*, 14, 5980–5988.
13. Knudsen, E. S., O'Reilly, E. M., Brody, J. R. and Witkiewicz, A. K. (2016) Genetic diversity of pancreatic ductal adenocarcinoma and opportunities for precision medicine. *Gastroenterology*, 150, 48–63.
14. Pereira, D. and Venkataraman, A. R. (2016) Oncogenic KRAS triggers MAPK-dependent errors in mitosis and MYC-dependent sensitivity to anti-mitotic agents. *Sci. Rep.*, 6, 29741.
15. Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., et al. (2001) Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.*, 439, 798–802.
16. Hlavaty, J., Petzcnk, H., Holzmüller, H., Url, A., Jandl, G., Berger, A., Salmons, B., Günzburg, W. H. and Renner, M. (2012) Evaluation of a gene-directed enzyme-product therapy (GDEPT) in human pancreatic tumor cells and their use as *in vivo* models for pancreatic cancer. *PLoS One*, 7, e40611.
17. Mohelnikova-Duchonova, B., Brynychova, V., Oliverius, M., Honsova, E., Kala, Z., Muckova, K. and Soucek, P. (2013) Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas*, 42, 707–716.
18. Soucek, P., Anzenbacher, P., Skoumalová, I. and Dvořák, M. (2005) Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 23, 1417–1422.
19. KEGG PATHWAY Database. <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html> (accessed December 31, 2015).
20. BioCarta. https://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways (accessed December 31, 2015).
21. Mohelnikova-Duchonova, B., Oliverius, M., Honsova, E. and Soucek, P. (2012) Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. *Dis. Markers*, 32, 203–210.
22. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 55, 611–622.
23. Sipos, B., Mösser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M. and Klöppel, G. (2003) A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an *in vitro* research platform. *Virchows Arch.*, 442, 444–452.
24. Mohelnikova-Duchonova, B., Brynychova, V., Hlavac, V., et al. (2013) The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 72, 669–682.
25. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 402–408.
26. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A. and Wishart, D. S. (2016) Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.*, 44, W147–W153.
27. Khomtchouk, B. B., Hennessey, J. R. and Wahlstedt, C. (2017) shinyheatmap: ultra fast low memory heatmap web interface for big data genomics. *PLoS One*, 12, e0176334.
28. Dvorak, P., Hlavac, V., Mohelnikova-Duchonova, B., Linka, V., Peta, M. and Soucek, P. (2017) Downregulation of ABC transporters in non-neoplastic tissues confers better prognosis for pancreatic and colorectal cancer patients. *J. Cancer*, 8, 1959–1971.
29. Benjamini Y. H. Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 57, 289–300.
30. Tao, L. Y., Zhang, L. F., Xiu, D. R., Yuan, C. H., Ma, Z. L. and Jiang, B. (2016) Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.*, 14, 146.
31. Haas, M., Ormanns, S., Bachmann, S., et al. (2017) Extended RAS analysis and correlation with overall survival in advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 116, 1462–1469.
32. Montoy, W. R., Salas, A. R. O. S. E. and McLo, F. H. M. (2018) Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Mol. Cancer*, 17, 55.
33. Lakshman, B., Messing, S., Schmid, E. M., et al. (2019) Quantitative biophysical analysis defines key components modulating recruitment of the GTPase KRAS to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 294, 2193–2207.
34. Oikonomou, E., Koustas, E., Goulisaki, M. and Pintzas, A. (2014) BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*, 5, 11752–11777.
35. Gnjatic, S., Rittig, E., Büchler, M. W., et al. (2010) Serum profiling of ovarian and pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5088–5093.
36. Bracci, P. M., Zhou, M., Young, S. and Wicniewski, J. (2012) Serum autoantibodies to pancreatic cancer antigens as biomarkers of pancreatic cancer in a San Francisco Bay Area case-control study. *Cancer*, 118, 5384–5394.
37. Oh, E. T., Kim, C. W., Kim, S. J., Lee, J. S., Hong, S. S. and Park, H. J. (2016) Docetaxel induced-JNK2/PHD1 signaling pathway increases degradation of HIF-1 α and causes cancer cell death under hypoxia. *Sci. Rep.*, 6, 27382.

Příloha 2.

Flasarova D, Urban K, Strouhal O, Klos D, Lemstrova R, Dvorak P, Soucek P, Mohelnikova-Duchonova B. DNA Repair Pathway in Ovarian Cancer Patients Treated with HIPEC. *Int J Mol Sci.* 2023 May 17;24(10):8868. doi: 10.3390/ijms24108868. PMID: 37240218; PMCID: PMC10219140.

IF 4.9; Q1



Article

DNA Repair Pathway in Ovarian Cancer Patients Treated with HIPEC

Dominika Flasarova ¹, Katerina Urban ¹, Ondrej Strouhal ¹, Dusan Klos ², Radmila Lemstova ¹, Pavel Dvorak ³, Pavel Soucek ⁴ and Beatrice Mohelnikova-Duchonova ^{1,*}

¹ Department of Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, 779 00 Olomouc, Czech Republic

² Department of Surgery I, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital Olomouc, 779 00 Olomouc, Czech Republic

³ Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, 323 00 Pilsen, Czech Republic

⁴ Department of Toxicogenomics, National Institute of Public Health, 100 00 Prague, Czech Republic

* Correspondence: d.beatrice@seznam.cz



Citation: Flasarova, D.; Urban, K.; Strouhal, O.; Klos, D.; Lemstova, R.; Dvorak, P.; Soucek, P.; Mohelnikova-Duchonova, B. DNA Repair Pathway in Ovarian Cancer Patients Treated with HIPEC. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8868. <https://doi.org/10.3390/ijms24108868>

Academic Editors: Carmela Ricciardelli and Vladimir Isachenko

Received: 2 April 2023

Revised: 1 May 2023

Accepted: 15 May 2023

Published: 17 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract DNA repair pathways are essential for maintaining genome stability, and understanding the regulation of these mechanisms may help in the design of new strategies for treatments, the prevention of platinum-based chemoresistance, and the prolongation of overall patient survival not only with respect to ovarian cancer. The role of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) together with cytoreductive surgery (CRS) and adjuvant systemic chemotherapy is receiving more interest in ovarian cancer (OC) treatment because of the typical peritoneal spread of the disease. The aim of our study was to compare the expression level of 84 genes involved in the DNA repair pathway in tumors and the paired peritoneal metastasis tissue of patients treated with CRS/platinum-based HIPEC with respect to overall patient survival, presence of peritoneal carcinomatosis, treatment response, and alterations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. Tumors and metastatic tissue from 28 ovarian cancer patients collected during cytoreductive surgery before HIPEC with cisplatin were used for RNA isolation and subsequent cDNA synthesis. Quantitative real-time PCR followed. The most interesting findings of our study are undoubtedly the gene interactions among the genes *CCNH*, *XPA*, *SLK*, *RAD51C*, *XPA*, *NEIL1*, and *ATR* for primary tumor tissue and *ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB*, and *XRCC4* for metastases. Another interesting finding is the correlation between gene expression and overall survival (OS), where a low expression correlates with a worse OS.

Keywords: DNA repair; ovarian cancer; HIPEC; biomarkers

1. Introduction

In 2020, according to the Global Cancer Observatory's statistics, 313,959 women were newly diagnosed with ovarian cancer (OC) and nearly 185,000 died. The forecast for 2040 indicates that the incidence will increase to 434,184 and the mortality rate will increase to over 290,000 [1]. The danger of this disease is mainly in late diagnoses, with more than 70% of OC diagnosed at an advanced stage; therefore, this malignancy has the highest mortality rate of all gynecological cancers [2,3]. Additionally, due to the anatomical location of the ovaries, ovarian cancer is the most common neoplastic disease causing peritoneal metastases [4]. Currently, the gold standard for first-line chemotherapy is a treatment based on platinum derivatives (cisplatin/ carboplatin) in combination with paclitaxel [5]. Neoadjuvant systemic chemotherapy is indicated for patients in whom primary surgical resection cannot be performed, optimally in three–four cycles, and systemic treatment is continued even after surgery [6]. Although OC is one of the most chemoresponsive tumors, the main obstacle to successful treatment and long overall survival is the development of drug resistance.

The presence of individually diverse multidrug resistance (MDR) to chemotherapy is the major challenge limiting the efficacy of systemic treatment and influencing its toxicity. The resistance of cells to anticancer drugs may be attributed to different mechanisms including abnormal membrane transport, ineffective metabolic drug conversion, enhanced metabolic inactivation, increased DNA repair, alteration of apoptotic pathways, enhanced desmoplastic reaction with paracrine activity, and activation of stem cells [7]. Intensive efforts have been made to clarify the mechanisms of platinum resistance *in vitro* [8], which can be divided into four groups: (i) mechanisms that reduce platinum accumulation; (ii) mechanisms that involve the intracellular inactivation of platinum compounds (e.g., coordination to thiol-containing biomolecules, such as glutathione and metallothioneins); (iii) mechanisms that enhance the repair of DNA damage; and (iv) mechanisms that block apoptosis. Thus, research addressing the pharmacogenomics of platinum compounds so far has focused mainly on interindividual differences in platinum pharmacokinetics and variations in genes coding transmembrane proteins, such as drug efflux ATP-binding cassette (ABC) and drug uptake solute carrier (SLC) transporters, and pathways involved in apoptosis (MAP kinase pathway and PI3K-AKT pathway) and DNA repair.

In 2018, the results of the first randomized controlled phase III trial were published to evaluate the effectiveness of cytoreductive surgery/hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (CRS/HIPEC) in advanced OC. The OS of the patients was extended by almost 12 months due to the intraperitoneal administration of cisplatin warmed up to 42 °C during surgery [9].

HIPEC is used in conjunction with CRS for the removal of abdominal malignancies with peritoneal dissemination. Under normal conditions, the penetration of cytostatics into the abdominal cavity through the peritoneal membrane is difficult. The lavage of highly concentrated cytostatics directly to the tumor location significantly increases the penetration into the tumor tissue; in addition, hyperthermia already has a cytotoxic effect by itself. In such a way, the heating of cytostatics to 39–43 °C enhances their efficiency, activates heat shock proteins, and induces apoptosis and protein denaturation. Hyperthermia also affects the repair process of damaged DNA by accelerating the degradation of the BRCA2 protein. BRCA2 is essential for the repair of double-stranded DNA breaks by homologous recombination (HR), where it transfers RAD51 to the location of the damage. The RAD51 protein generates a break recovery process by copying information from an intact copy of damaged DNA [10–12]. By suppressing the DNA repair pathway, hyperthermia increases the effectiveness of treatment [13].

The purpose of this study was to provide better insight into the mechanism of resistance to platinum-containing HIPEC, and we evaluated changes in the expression of an 84-gene panel of DNA repair genes in primary tumor-peritoneal metastasis tissue pairs from ovarian cancer patients. We associated gene expression with BRCA1/2 mutation status, overall survival, presence of peritoneal carcinomatosis, and treatment response.

2. Results

2.1. Study Population Characteristics

The study population consisted of 28 patients (the list of patients together with their characteristics is given in Table 1). The mean age of the patients was 57 years at the time of diagnosis with a range from 29 to 72 years. The majority of patients were high-grade serous carcinomas (HGSC) (78%) and had a mean peritoneal cancer index (PCI) of 12 (Table 1). The median progression-free survival (PFS) was 14 months, and the OS of patients after CRS/HIPEC was 30 months. The completeness of cytoreduction (CCR), which is an index quantifying the extent of residual disease after resection, ranged from 0 to 2. The majority of patients had CCR0 (>50%), while only one had CCR2.

Table 1. List of patients and their characteristics. CBDCA—carboplatin; HGSC—high-grade serous carcinoma; LGSC—low-grade serous carcinoma; CCA—clear cell adenocarcinoma; EC—endometroid carcinoma; GCT—granulosa cell tumor; SPA—serous papillary adenocarcinoma. †—dead.

ID	Tumor	Meta	Age	Histological Type	BRCA Status	Induction Therapy	CCR	PCI	Death	PFS (Months)	OS (Months)
AF050	AR	MR	29	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	1	30	alive	8	44
AF064	AR	MR	54	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	0	14	alive	18	38
AF069	AR	-	64	HGSC	neg	NO	0	14	alive	-	39
AF075	AR	-	61	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	0	3	†	11	23
AF083	AR	MR	46	HGSC	BRCA2	NO	0	2	†	12	31
AF085	-	MR	35	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	0	6	alive	18	39
AF096	AR	MR	48	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	0	7	alive	26	32
AF102	AR	MR	56	HGSC	neg	NO	1	8	alive	17	39
AF111	AR	MR	60	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	0	6	alive	-	37
AF115	AR	-	55	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	1	17	†	5	8
AF124	AR	-	51	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	0	8	alive	-	32
AF129	AR	MR	72	CCA	neg	NO	0	3	†	11	18
AF146	AR	MR	64	EC	neg	Paclitaxel/CBDCA/ Bevacizumab	1	11	alive	-	36
AF159	AR	MR	52	GCT	NA	NO	2	10	†	18	23
AF165	AR	MR	63	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	1	18	†	10	13
AF174	AR	-	61	SPA	BRCA2	NO	0	3	alive	-	34
AF185	AR	MR	65	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	1	12	alive	-	34
AF196	-	MR	64	HGSC	BRCA2	NO	0	3	alive	-	34
AF219	AR	MR	53	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	1	21	†	-	21
AF223	AR	MR	67	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	1	25	alive	7	23
AF230	AR	MR	62	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	1	17	alive	7	32
AF231	AR	MR	67	HGSC	BRCA2	Paclitaxel/CBDCA	0	6	†	-	0
AF295	AR	MR	54	HGSC	BRCA1	Paclitaxel/CBDCA	0	15	alive	16	28
AF317	AR	MR	68	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	1	21	alive	22	25
AF329	AR	MR	50	HGSC	NA	Gemcitabine/CBDCA	1	18	alive	15	24
AF338	AR	-	59	HGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	0	0	alive	-	23
AF344	AR	MR	63	LGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	0	6	alive	-	22
AF365	-	MR	66	LGSC	neg	Paclitaxel/CBDCA	1	21	alive	-	21

2.2. Associations between Transcript Levels and BRCA1/2 Mutations

Mutations in *BRCA1/2* were present in 12 cases (46.2%), of which 8 patients had a mutation in *BRCA1* (66.7%) and 4 patients had a mutation in *BRCA2* (33.3%). From the heatmap (Figures S1 and S2), there were no significant expression profile changes between the wild-type and mutated samples.

2.3. Overall Survival and Progression-Free Survival

In our study, the median PFS of *BRCA1/2*-mutated patients was 12 months, while PFS patients without a *BRCA1/2* mutation had a median PFS of 14 months, but the trend does not reach statistical significance ($p \geq 0.05$). The median OS of patients without a mutation was 29 months, while the median OS of patients with a *BRCA1/2* mutation was 32 months, but those results were not statistically significant either.

2.4. Correlation between Genes and Associations between Transcript Levels and Overall Survival

We observed a significant association between OS and the expression of six genes (*CCNH*, *MLH3*, *RAD51C*, *RPA3*, *SLK*, and *XPA*) in primary tumor tissues. The expression of these genes below the median predicted a significantly shorter OS (Figure S8). Additionally, *CCNH* expression correlates in a string with *XPA* and *SLK* and with *CDK7*, which correlates with *RAD51C* and *XPA*, correlating together in another string. All gene correlations were significant after a correction relative to multiple testing ($\text{padj} \leq 7.1 \times 10^{-6}$).

Due to greater variability in metastatic tissues, we also found a higher number of associations here. We observed a significant association between OS and the expression of 14 genes in the metastatic loci. The gene expression of most genes (*ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB*, and *XRCC4*) also showed the opposite relationship; i.e., the expression below the median is associated with shorter OS as in primary tumors (Figure S9).

On the other hand, a high expression of six genes was associated with poor OS (*APEX1*, *PKRDC*, *RAD21*, *RAD23B*, *XRCC5*, and *XRCC6*) (Figure S9). The correlation analysis shows an interesting link between double-strand break repair (DSBR) and single-strand break repair (SSBR), including the mismatch repair (MMR) and base excision repair (BER) genes. *ATM-ATR-BRCA2* correlates with *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB*, and *XRCC4* and forms very strong strings. Interactions among *MUTYH-MSH2*, *ATM-ATR*, and *ATM-BRCA2* are also supported by the STRING database, so they are the most interesting prognostic factors in our set. In contrast, the *APEX1*, *PKRDC*, *RAD21*, *RAD23B*, *XRCC5*, and *XRCC6* genes did not correlate with each other or with the above-mentioned DSB-SSB repair genes.

2.5. Associations between Transcript Levels and Peritoneal Carcinomatosis

The peritoneal cancer index is an important criterion for determining the extent of a tumor, its location, and the detection of distant metastases. Recurrence can be predicted based on the PCI value. According to Lampe et al. [14], in order to achieve CCR0, the cut-off PCI score for primary ovarian cancer should be <25. Patients with a *BRCA1/2* mutation had a median PCI of 7, while patients without the mutation had a higher median PCI of 13. On the heatmaps (Figures S3 and S4), there is a comparison of the expression of the individual genes of the DNA repair pathway stratified by the PCI of patients. In primary tumor tissue, more significant changes in expression are apparent compared to metastatic tissue. Nevertheless, no fundamental pattern indicating significant changes in expression levels, for example, in patients with high PCI, was observed.

2.6. Associations between Transcript Levels and Therapy

In terms of therapy, three parameters were considered—previous therapy, induction therapy, and the presence of residue after CRS. A total of 17 patients (60.7%) had not received previous treatment. Patients who had received previous treatment before CRS + HIPEC were in most cases treated with paclitaxel + carboplatin. Only seven patients (25%) did not receive induction treatments, and all other patients were treated with paclitaxel + CBDCA; only patients AF146 (Paclitaxel + CBDCA + Bevacizumab) and AF329 (Gemcitabine + CBDCA) had different induction treatments. According to the heatmap, there were no patterns to suggest that previous therapies, induction therapies, or CCR had a significant effect on expression changes in primary tumors (Figure S5) or metastatic tissues (Figure S6).

3. Discussion

This study aimed to provide biomarkers predicting platinum resistance. Our study offers an interesting insight into a broad area encompassing 84 genes of the DNA repair pathway and changes in this area in correlation with factors, such as overall survival, peritoneal carcinomatosis, therapy, or germline mutations in genes, that cause most hereditary ovarian cancers—*BRCA1* and *BRCA2*.

The most interesting finding in our study is the mutual correlation among the *ATM-ATR-BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB*, and *XRCC4* genes creating an interactive network and, additionally, its prognostic relevance for the specific set of patients under study. Moreover, some of these interactions are confirmed by the STRING database, specifically, *MUTYH-MSH2* (*MUTYH* represents the BER pathway, and *MSH2* represents the MMR pathway), *ATM-ATR* (*ATM* represents DSBR; *ATR* represents SSBR, and both genes ensure genome integrity), and *ATM-BRCA2* (these genes represent DSBR). Thus, this further substantiates their potential as prognostic biomarkers that would be worth further investigation in ovarian cancer. Some of the mentioned genes were already considered potential prognostic biomarkers for ovarian cancer in some earlier studies [15,16]. The OS of patients with a high expression of *ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *CDK7*, *MSH2*, *MUTYH*, *POLB*, and *XRCC4* in metastases was significantly longer than in patients with low or no expression.

Guo et al. [17] reported that esophageal squamous cell carcinoma cells with down-regulated *MUTYH* activity contribute to cisplatin resistance. Similarly to ovarian cancer,

esophageal cancer also loses its initial sensitivity to platinum and develops resistance, suggesting that a similar mechanism to *MUTYH* could be at work in ovarian cancer. Resistance to platinum cytostatics results in poorer overall survival, and this correlates with our finding that low *MUTYH* expression corresponds to poorer OS.

In primary tumor tissue, the string correlations among *CCNH*, *XPA*, and *SLK* are interesting: *CCNH* and its correlation with *CDK7* and, last but not least, the correlation of *CDK7* in strings with *RAD51C* and *XPA*. *CCNH*, *CDK7*, and *XPA* represent the NER pathway and *RAD51C* represents the FA pathway. As with certain genes in metastatic tissue, the same phenomenon of interrelation between OS and expressions appears in tumor tissues. Specifically for the genes *CCNH*, *MLH3*, *RAD51C*, *RPA3*, *SLK*, and *XPA*, the low expression of these genes correlates with worse OS and vice versa. The same result for the *XPA* gene was also observed by Garzinelli et al. [18].

When comparing tumor tissue vs. metastases (Figure S7), a preponderance of overexpression is evident. It seems that the first nine samples of metastatic tissue have the most pronounced expression changes; i.e., both the overexpression and underexpression of certain genes can be observed. The most pronounced overexpression is in the genes *CDK7*, *RPA3*, *ERCC5*, and *XPA* (nucleotide excision repair); *ATP23*, *ATR*, and *LIG4* (nonhomologous end joining); *NEIL1* (base excision repair); and *ATP23* and *ATR* (Supplementary data). However, overexpression is also evident in several other genes: *RPA1*, *XPC*, *RAD23A*, and *RAD23B* (nucleotide excision repair); *PRKDC*, *XRCC6*, and *XRCC5* (nonhomologous end joining); *TDG*, *APEX1*, and *PARP1* (base excision repair); *RAD50* and *MRE11A* (homologous recombination); *ATM* (genes defective in diseases associated with sensitivity to DNA-damaging agents); *MSH6* (mismatch repair); and *RAD21*, *SLK*, and *RFC1* (others). These genes form a cluster. A cluster is also shown for some underexpressed genes. Here, we can include base excision repair genes—*XRCC1*, *SMUG1*, *UNG*, *PARP2*, *PNKP*, and *PARP3*; homologous recombination genes—*DMC1*, *RAD54L*, *RAD51B*, *RAD52*, and *BRCA1*; nucleotide excision repair genes—*MMS19*, *LIG1*, *ERCC3*, *XAB2*, and *ERCC6*; *BRIP1* and *BRCA2*; *RAD18*—ubiquitination and modification; *POLD3*—DNA polymerases; and *TOP3B*—others. Brodsky in his publication states that metastatic and primary tumors have different expression profiles that reflect their state of proliferation and apoptosis, which also agrees with our study that the expression profile differs between tumor tissue and metastases. Thus, different pathways may be activated in metastases than in the primary tumors [19].

From the heatmap's results, no significant association between the expression of DNA repair genes and *BRCA* mutation status was observed. However, more patients would be needed to draw final conclusions.

Tsibulak et al. [20] compared *BRCA1* and *BRCA2* mRNA expression in ovarian cancer tissues and noncancerous tissue in their study. An interesting feature of his study is that *BRCA1* expression was lower in the *BRCA1* mutants. This does not agree with our study in this respect, given that only two patients have a downregulation of the *BRCA1* genes in mutated *BRCA1* (AF185—AR, AF185—MR, and AF085—MR). However, the reason may be the small number of patients with a *BRCA1* mutation; thus, the result may be distorted. Similarly to our study, no significant expression changes in *BRCA1* and *BRCA2* were observed in the study by Olbromski et al. [21]. Osorio et al. [22] showed *OGG1* single nucleotide polymorphism association with the risk of ovarian cancer in *BRCA1* carriers, but there was no correlation between *BRCA1* mutation and *OGG1* expression in our sample set.

In primary tumor tissue samples, the greatest changes in expression are mainly in AF050 and AF069 patients who have wild-type *BRCA1/2*. In these two samples, approximately half of the genes are overexpressed compared to other patients, with the smaller half showing significant underexpression. Apparent deregulation can also be observed in AF185, but there is already a mutation in *BRCA1*. The heatmap for metastatic tissue looks to be split in half with respect to overexpression and underexpression, perhaps with a slight preponderance of underexpression regardless of the *BRCA* mutation. From the heatmap's results, no significant association between the expression of DNA repair genes

and *BRCA* mutation status was observed. However, more patients would be needed to draw final conclusions. There are studies that report a better prognosis in patients with a *BRCA1/2* mutation due to a better response to platinum-derived chemotherapy; [23–25] in contrast, there are studies with the opposite opinion [26]. Some studies suggest that patient survival may be prolonged under specific conditions: For example, when the mutation is located in the *RAD51*-binding domain (exon 11) of the *BRCA2* gene [27]. The results of our study correspond to the first opinion that mutants have a better chance of survival. The median overall survival of patients without a *BRCA1/2* mutation was 29 months, while patients with a *BRCA1/2* mutation had an OS that was 3 months longer, thus resulting in 32 months (but it did not reach statistical significance). Alsop et al. reported that a mutation in *BRCA1/2*, in addition to improved overall survival compared to patients without the mutation, also had an effect on prolonging progression-free survival [28]. In our study, the median PFS of patients with a mutation in the *BRCA1/2* gene was 12 months, while patients without a mutation progressed after a median of 14 months.

According to the results of our study, we concluded that PCI and therapy seem to have no effect on the expression of DNA repair pathway genes.

Certain limitations of this study, such as the modest number of samples, need to be acknowledged, so our results require further confirmation in a larger cohort of patients. However, due to the fact that CRS together with HIPEC is a demanding surgical procedure and patient selection is strict, obtaining a sufficient number of patients is difficult. Despite the smaller number of patients, we reached interesting results justifying a more detailed study in the next phase. The benefit of our study is also the fact that it is the first of its kind to link the expression of DNA repair pathway genes with the results of HIPEC therapy in advanced ovarian cancer, so this constitutes hypothesis-generating research. In addition, this is a single-center study with homogeneously treated patients.

In the future, it would be beneficial to perform further verification analyses, especially at the level of protein expression and activity, and it would certainly be worthwhile to further study genes with significant mutual correlations.

4. Materials and Methods

4.1. Participants

Primary tumor and paired peritoneal metastatic tissue were removed from 28 patients with ovarian cancer who were treated with cytoreductive surgery and cisplatin-containing hyperthermic intraperitoneal chemotherapy between February 2018 and December 2019. Cisplatin was administered at 100 mg/m² according to the platinum-sensitive patient protocol. The application time was 60 min. Immediately after cytoreduction, tissue samples were placed in RNA and later in a stabilization solution; they were then sent to a laboratory by a pneumatic tube where they were stored at −80 °C prior to processing. We also collected clinical data from medical patient records. All patients were asked to read and sign an informed consent form in accordance with the requirements of the institutional review boards of the Department of Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc (protocol no. 118/17).

4.2. Isolation of RNA and cDNA Synthesis

Tissue samples were homogenized in liquid nitrogen. The total RNA was isolated using a Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Aliquots were stored at −80 °C. The concentration of isolated RNA was measured using a UV BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). The evaluation of RNA integrity was performed by denaturing electrophoresis. For the RNA sample to be continually used, two ribosomal subunits, 28S and 18S, had to be visible on the gel. Visualization was performed using the ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). RNA samples passing quality checks were transcribed into complementary DNA (cDNA). The iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad 172-5034), with nuclease-free water and 1 µg of RNA, was used for reverse transcription. The treatment of RNA samples with

DNase I and subsequent cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The polymerase chain reaction (PCR) amplification of the ubiquitin C fragment was used to control the quality of the synthesized cDNA for possible genomic DNA (gDNA) contamination. The amplification product of ubiquitin C, cDNA, was 190 bp, while genomic DNA contained 1009 bp. Each sample was identified by the number and suffix -AR (tumor tissue) or -MR (metastatic tissue).

4.3. Quantitative Real-Time PCR

The level of expression of 84 DNA repair genes (Table S1) was measured by quantitative real-time PCR (qPCR). Five reference genes (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, and RPLP0) were used for the normalization of results. To ensure consistent results, the entire quantitative analysis was performed in triplicate. PrimePCR SYBR Green Assays (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Table S1) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used for PCR. The PCR reaction was run in 384-well plates, and the total volume of the reaction mixture per well was 10 μ L. The concentration of cDNA in the reaction was 30 ng. The no primer control (NPC) contained nuclease-free water instead of the assay. The PCR reaction was started by initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 30 s, followed by 40 cycles of denaturing for 5 s at 95 $^{\circ}$ C and elongation for 30 s at 60 $^{\circ}$ C. Following denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 5 s, a melt curve was generated by heating from 65 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C with 0.5 $^{\circ}$ C increments, 5 s dwell time, and plate read.

4.4. Statistical Analyses

Creating principal component analysis (PCA) plots, hierarchical clustering and heatmap visualization were performed with the help of the publicly available bioinformatic web tool ClustVis [29]. Associations between categorized values, such as BRCA1/2 mutation status and clinical data, were analyzed using the two-sided Fisher's exact test. For the evaluation of continuous variables, such as gene expression against BRCA1/2 mutation status or clinical variables, the Kruskal–Wallis test was used. For the assessment of differences in gene expressions between both tumor loci types, we employed the paired Wilcoxon signed-rank test. Mutual gene expression correlations were analyzed by Spearman's rho test. The correction for multiple testing was applied according to Benjamini and Hochberg [30]. Only correlations passing the multiple testing correction were further considered ($\text{padj} \leq 7.1 \times 10^{-6}$). Survival functions were plotted by the Kaplan–Meier method and evaluated using the logrank test. The p -values were departures from two-sided tests. The above analyses were conducted in the statistical program SPSS v16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

For the assessment of functional relations between correlating and clinically important genes, the STRING database of known and predicted protein–protein interactions with default settings was used [31].

4.5. Clinical Data

BRCA germline mutations were analyzed by the CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application; custom-made SeqCap EZ choice panel; Roche) panel, as previously described in detail [32].

Patient data concerning the peritoneal cancer index (PCI), which is an important criterion for determining the extent of a tumor, its location, and the detection of distant metastases, were correlated with the results. Clinicopathological data were obtained from patient records, namely, age, stage, grade, previous therapy, induction therapy, and presence of residue after CRS, as well as treatment outcomes, progression-free survival (PFS), and overall survival (summarized in Table 1). PFS was established as the time between the CRS and the proven recurrence or progression of the disease, and OS was established as the time between CRS and death. Furthermore, relationships between mutations and clinical data were monitored.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24108868/s1>.

Author Contributions: D.E., O.S. and B.M.-D. planned the study; O.S. designed the experiments; D.E. performed the experiments and wrote the manuscript; K.U. helped with the experiments; B.M.-D., R.L., P.D., P.S. and D.K. revised and edited the manuscript; P.D. and P.S. analyzed the corresponding results; D.K. performed the operations and provided the obtained biological materials. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Czech Health Research Council, grant no. NU22-08-00186 for P.S. and by student grant project IGA_2022_003 from Palacky University for D.E.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic (protocol No. 118/17).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Global Cancer Observatory. Available online: <https://gco.iarc.fr/> (accessed on 25 October 2022).
- Burges, A.; Schmalfeldt, B. Ovarian Cancer Diagnosis and Treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2011**, *108*, 635–641. [\[CrossRef\]](#)
- Momenimovahed, Z.; Tiznobaik, A.; Taheri, S.; Salehiniya, H. Ovarian Cancer in the World: Epidemiology and Risk Factors. *Int. J. Womens Health* **2019**, *11*, 287. [\[CrossRef\]](#)
- Desai, J.P.; Moustarah, F. Peritoneal Metastasis. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Tampa, FL, USA, 2022.
- Ozols, R.F. Treatment Goals in Ovarian Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2005**, *15*, 3–11. [\[CrossRef\]](#)
- Mohelníková-Duchoňová, B.; Lemstrová, R.; Klos, D.; Hanuliak, J.; Stašek, M.; Neoral, C.; Melichar, B. Significance of Systemic Chemotherapy and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Primary and Secondary Peritoneal Surface Malignancies. *Onkologie* **2017**, *11*, 289–292. [\[CrossRef\]](#)
- Lemstrová, R.; Souček, P.; Melichar, B.; Mohelníková-Duchonova, B. Role of Solute Carrier Transporters in Pancreatic Cancer: A Review. *Pharmacogenomics* **2014**, *15*, 1133–1145. [\[CrossRef\]](#)
- Siddik, Z.H. Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279. [\[CrossRef\]](#)
- Van Driel, W.J.; Koole, S.N.; Sikorska, K.; Schagen van Leeuwen, J.H.; Schreuder, H.W.R.; Hermans, R.H.M.; de Hingh, I.H.J.T.; van der Velden, J.; Arts, H.J.; Massuger, L.F.A.G.; et al. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 230–240. [\[CrossRef\]](#)
- Moynahan, M.E.; Pierce, A.J.; Jasin, M. BRCA2 Is Required for Homology-Directed Repair of Chromosomal Breaks. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 263–272. [\[CrossRef\]](#)
- Krawczyk, P.M.; Eppink, B.; Essers, J.; Stap, J.; Rodermond, H.; Odijk, H.; Zelensky, A.; van Bree, C.; Stalpers, L.J.; Buist, M.R.; et al. Mild Hyperthermia Inhibits Homologous Recombination, Induces BRCA2 Degradation, and Sensitizes Cancer Cells to Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 9851–9856. [\[CrossRef\]](#)
- Jasin, M.; Rothstein, R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012740. [\[CrossRef\]](#)
- Van Den Tempel, N.; Laffeber, C.; Odijk, H.; Van Cappellen, W.A.; Van Rhoort, G.C.; Franckena, M.; Kanaar, R. The Effect of Thermal Dose on Hyperthermia-Mediated Inhibition of DNA Repair through Homologous Recombination. *Oncotarget* **2017**, *8*, 44593. [\[CrossRef\]](#)
- Lampe, B.; Kroll, N.; Piso, P.; Forner, D.M.; Mallmann, P. Prognostic Significance of Sugarbaker's Peritoneal Cancer Index for the Operability of Ovarian Carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2015**, *25*, 135–144. [\[CrossRef\]](#)
- Feng, W.; Dean, D.C.; Hornicek, F.J.; Wang, J.; Jia, Y.; Duan, Z.; Shi, H. ATR and P-ATR Are Emerging Prognostic Biomarkers and DNA Damage Response Targets in Ovarian Cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 1758835920982853. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, J.; Cho, Y.J.; Ryu, J.Y.; Hwang, I.; Han, H.D.; Ahn, H.J.; Kim, W.Y.; Cho, H.; Chung, J.Y.; Hewitt, S.M.; et al. CDK7 Is a Reliable Prognostic Factor and Novel Therapeutic Target in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2020**, *156*, 211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Guo, Y.; Jia, Y.; Wang, S.; Liu, N.; Gao, D.; Zhang, L.; Lin, Z.; Wang, S.; Kong, F.; Peng, C.; et al. Downregulation of MUTHYH Contributes to Cisplatin resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells by Promoting Twist mediated EMT. *Oncol. Rep.* **2019**, *42*, 2716–2727. [\[CrossRef\]](#)
- Ganzinelli, M.; Mariani, P.; Cattaneo, D.; Fossati, R.; Fruscio, R.; Corso, S.; Ricci, F.; Broggin, M.; Damia, G. Expression of DNA Repair Genes in Ovarian Cancer Samples: Biological and Clinical Considerations. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 1086–1094. [\[CrossRef\]](#)

19. Chatterjee, N.; Walker, G.C. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 235–263. [\[CrossRef\]](#)
20. Tsibulak, I.; Wieser, V.; Degasper, C.; Shivalingaiah, G.; Wenzel, S.; Sprung, S.; Lax, S.F.; Marth, C.; Fiegl, H.; Zeimet, A.G. BRCA1 and BRCA2 mRNA-Expression Prove to Be of Clinical Impact in ovarian Cancer. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 683. [\[CrossRef\]](#)
21. Olbromski, P.J.; Pawlik, P.; Bogacz, A.; Sajdak, S. Identification of New Molecular Biomarkers in Ovarian Cancer Using the Gene Expression Profile. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 3888. [\[CrossRef\]](#)
22. Osorio, A.; Milne, R.L.; Kuchenbaecker, K.; Vaclová, T.; Pita, G.; Alonso, R.; Peterlongo, P.; Blanco, I.; de la Hoya, M.; Duran, M.; et al. DNA glycosylases involved in base excision repair may be associated with cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004256. [\[CrossRef\]](#)
23. Gallagher, D.J.; Konner, J.A.; Bell-McGuinn, K.M.; Bhatia, J.; Sabbatini, P.; Aghajanian, C.A.; Offit, K.; Barakat, R.R.; Spriggs, D.R.; Kauff, N.D. Survival in Epithelial Ovarian Cancer: A Multivariate Analysis Incorporating BRCA Mutation Status and Platinum Sensitivity. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 1127–1132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Pennington, K.P.; Walsh, T.; Harrell, M.L.; Lee, M.K.; Pennil, C.C.; Rendi, M.H.; Thornton, A.; Norquist, B.M.; Casadei, S.; Nord, A.S.; et al. Germline and Somatic Mutations in Homologous Recombination Genes Predict Platinum Response and Survival in Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 764–775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Norquist, B.M.; Brady, M.F.; Harrell, M.L.; Walsh, T.; Lee, M.K.; Gulsuner, S.; Bernards, S.S.; Casadei, S.; Burger, R.A.; Tewari, K.S.; et al. Mutations in Homologous Recombination Genes and Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients in GOG 218: An NRG Oncology / Gynecologic Oncology Group Study. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 777–783. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Lontos, M.; Zografos, E.; Zoumpourlis, P.; Andrikopoulou, A.; Svama, A.; Fiste, O.; Kunadis, E.; Papatheodoridi, A.M.; Kaparelou, M.; Koutsoukos, K.; et al. BRCA1/2 Mutation Types Do Not Affect Prognosis in Ovarian Cancer Patients. *Curr. Oncol.* **2021**, *28*, 4446–4456. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Labidi-Galy, S.I.; Olivier, T.; Rodrigues, M.; Ferraioli, D.; Derbel, O.; Bodmer, A.; Petignat, P.; Rak, B.; Chopin, N.; Tredan, O.; et al. Location of Mutation in BRCA2 Gene and Survival in Patients with Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 326–333. [\[CrossRef\]](#)
28. Alsop, K.; Fereday, S.; Meldrum, C.; DeFazio, A.; Emmanuel, C.; George, J.; Dobrovic, A.; Birner, M.J.; Webb, P.M.; Stewart, C.; et al. BRCA Mutation Frequency and Patterns of Treatment Response in BRCA Mutation-Positive Women with Ovarian Cancer: A Report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2654. [\[CrossRef\]](#)
29. ClustVis: A Web Tool for Visualizing Clustering of Multivariate Data (BETA). Available online: <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/> (accessed on 25 October 2022).
30. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [\[CrossRef\]](#)
31. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Nastou, K.C.; Lyon, D.; Kirsch, R.; Pyysalo, S.; Doncheva, N.T.; Legeay, M.; Fang, T.; Jensen, L.J.; et al. The STRING Database in 2021: Customizable Protein-Protein Networks, and Functional Characterization of User-Uploaded Gene/Measurement Sets. *Nucleic. Acids Res.* **2021**, *49*, 605–612. [\[CrossRef\]](#)
32. Soukupova, J.; Zemankova, P.; Lhotova, K.; Janatova, M.; Borecka, M.; Stolarova, L.; Lhota, F.; Foretova, L.; Machackova, E.; Stranecky, V.; et al. Validation of CZE CANCA (CZEch CAncer PaNel for Clinical Application) for Targeted NGS-Based Analysis of Hereditary Cancer Syndromes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195761. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Příloha č. 3

Lemstrova R, **Flasarova D**, Spisarova M, Melichar B, Lovecek M, Havlik R, Neoral C, Mohelnikova-Duchonova B, Klos D. Evaluation and management of toxicity of cytoreductive surgery/hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: the initial experience of a single centre study. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2020 Sep;164(3):300-306. doi: 10.5507/bp.2019.035. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31435073.

IF 1.000; Q4

Evaluation and management of toxicity of cytoreductive surgery/hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: the initial experience of a single centre study

Radmila Lemstrová^a, Dominika Flasarová^a, Martina Spisarová^a, Bohuslav Melichar^{ab}, Martin Lovecek^c, Roman Havlik^c, Cestmir Neoral^c, Beatrice Mohelnikova-Duchonova^a, Dusan Klos^b

Background. Cytoreductive surgery (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) is a treatment modality for peritoneal surface malignancies with efficacy reported in many trials. Discrepancies, however, in the indication criteria, the extent of the surgical procedure, HIPEC regimens and toxicity evaluation represent a problem when comparing this method with other therapeutic modalities.

Methods. We describe the initial experience with CRS/HIPEC using different chemotherapy regimens (oxaliplatin, cisplatin, mitomycin C and doxorubicin) at the Comprehensive Oncology Centre Olomouc.

Results. A perioperative mortality of 2% and perioperative morbidity of 11%, according to Clavien-Dindo were observed. Interestingly, all these patients underwent HIPEC with oxaliplatin 460 mg/m². The median duration of admission to hospital was 6 days in the intensive care unit (range 2–28 days) and 7 days in the surgical ward (range 1–21 days). Hospital admission did not exceed 2 weeks in 75% of patients. These results are consistent with the published results of large centres performing this treatment modality mainly due to pre-operative preparation of patients and pre-treatment and post-treatment management of HIPEC/CRS toxicity. Evaluation of the efficacy in terms of time to progression and overall survival (OS) is limited by the short follow up period.

Conclusion. CRS/HIPEC performed is a safe method with low perioperative mortality.

Key words: cytoreductive surgery, hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, oxaliplatin, mitomycin C, cisplatin, toxicity, adverse events, morbidity

Received: February 27, 2019; Revised: July 10, 2019; Accepted: July 22, 2019; Available online: August 21, 2019

<https://doi.org/10.5507/bp.2019.035>

© 2020 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

^aDepartment of Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

^bInstitute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^cDepartment of Surgery I, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic
Corresponding author: Dusan Klos, e-mail: dusan.klos@fnol.cz

INTRODUCTION

Surgery, radiation and pharmacological therapy represent the three principal components of the multimodality curative treatment of cancer. Cytoreductive surgery (CRS)/ hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), a therapeutic method consisting of radical surgery, regional application of cytotoxic agents and hyperthermia, is unique in combining all of these three fundamental approaches in the treatment of peritoneal malignancies. In an era of targeted therapy, CRS/HIPEC represents an alternative concept to molecular targeting, i.e. anatomical targeting of anticancer drugs, increasing the efficacy by potential synergisms with surgical cytoreduction and with the effect of hyperthermia. The options for the treatment of peritoneal carcinomatosis were limited until the advent of CRS/HIPEC. Peritoneal carcinomatosis is considered the terminal stage of a disease. The efficacy of systemic chemotherapy is limited by poor vascularisation of the peritoneum¹, the presence of tumour hypertension, which prevents the influx of cytotoxic drugs into the tumour tissue², and also by the fact that most tumors presenting with peritoneal carcinomatosis are only

moderately sensitive to cytotoxic drugs. The incidence of peritoneal malignancies is not negligible. The incidence ranges from 0.2–3 cases per million people per year, for rare tumours such as mesothelioma, to 4 to 7.2 cases per 100 000 people per year for secondary peritoneal malignancies such as colorectal cancer or ovarian cancer³.

CRS/HIPEC combines extensive surgical procedure with administration of heated (41–43 °C) high dose chemotherapy. The surgical procedure includes peritoneal surface stripping, omental resection, multiple visceral resections (such as splenectomy, appendectomy, and bowel resection) and lymphadenectomy of regional basins. Mitomycin C, cisplatin, oxaliplatin, doxorubicin and paclitaxel are the cytotoxic agents most commonly used in HIPEC protocols. The duration of the surgery is around 10 h. Nevertheless, low mortality from 0.9 to 3.2% and acceptable morbidity of 12–33% is reported when appropriate procedure and selection of patients is performed in tertiary centres⁴. There is no unified classification system of treatment toxicity. Different authors use several classification systems including Clavien-Dindo or Common Terminology Criteria of Adverse Events (CTCAE) v3.0. The reported serious toxicity differs according to the in-

dividual classification system from 11% to 60% (ref.⁴⁶) and declines within 4 months after CRS/HIPEC (ref.⁷).

The efficacy of CRS/HIPEC in the treatment of peritoneal malignancies has been demonstrated in a number of prospective trials. CRS/HIPEC have been reported to prolong the median OS to 5 years, - i.e. by 50% compared with conventional surgery in the treatment of pseudomyxoma peritonei. The median OS of patients with mesothelioma peritonei has been reported to increase from 12 months to 34-92 months^{4,9}. The results of the randomized phase 3 trial, comparing CRS with CRS/HIPEC in the treatment of inoperable ovarian cancer stage FIGO III, revealed the prolongation of median OS by 11.8 months in favour of CRS + HIPEC (ref.¹⁰). The efficacy of CRS/HIPEC has also been demonstrated in the treatment of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin, a disease entity with a dismal prognosis. CRS/HIPEC has increased the median OS by 12 months compared with standard systemic chemotherapy¹¹. There are several ongoing randomized trials evaluating the efficacy of CRS/HIPEC in the treatment of peritoneal carcinomatosis of gastric primary.

In spite of these encouraging results, CRS/ HIPEC has yet not become the standard of care. There is a lack of a unified system for adverse events classification and evaluation of peritoneal surface involvement. Moreover, there is a difference in the extent of the surgical procedure, the method of the lavage as well as in the HIPEC regimens. The choice of the appropriate cytotoxic agents or drug combination is crucial. The cytotoxic agents should not lead to local intraperitoneal toxicity. Agents which are systemically metabolized into an active form are also not suitable. There is an important synergism between the drug and hyperthermia. Heat influences chemotherapy cytotoxicity and the pharmacokinetics in terms of influx and efflux of the agent into the tissue.

We present the initial experience and preliminary results of CRS/HIPEC performed in the Comprehensive Oncology Centre Olomouc with evaluation and management of CRS/HIPEC toxicity.

PATIENTS AND METHODS

We retrospectively evaluated a cohort of 44 patients who underwent CRS/ HIPEC between 1 January 2016 and 1 January 2018 in the Comprehensive Oncology Centre Olomouc. The clinical and pathologic parameters of all the patients, such as gender, age, site of the primary, extent of the disease, extent of the peritoneal involvement (evaluated with peritoneal cancer index; PCI), extent and completeness of the surgical procedure (evaluated with the CCS score), previous surgical and systemic treatment, postoperative systemic treatment and time to progression of the disease (progression-free survival; PFS) were retrieved. PFS was defined as the time from the date of the CRS/HIPEC procedure to the date of progression of the disease. The date of progression was based on clinical and imaging examination. Tumour markers (CA 125, CEA, CA 19-9, and CA 72-4) were examined in 3-month intervals. Computed Tomography scan of the thorax, abdomi-

nal cavity and pelvis were performed in 6-month intervals. The Kaplan-Meier method was used to calculate median PFS with the help of software SAS EG 5.

The adverse events, toxicity and safety of the treatment have been evaluated according to the surgical classification Clavien-Dindo (postoperative morbidity), length of hospital admission, stay in the intensive care unit and in the surgical ward. Perioperative mortality was defined as the ratio of the deceased patients, within 30 days of the procedure to the total number of the patients who underwent CRS/HIPEC.

All patients were discussed by a multidisciplinary team.

The indication criteria were as follows:

- 1/ disease disseminating to the peritoneum
- 2/ no more effective treatment option available
- 3/ performance status of patients PS 0-1 according to the WHO classification

The contraindications were:

- 1/ the presence of visceral metastases, e.g. liver metastases, pulmonary metastases; or the presence of bone metastases
- 2/ the performance status of patients PS 2 and less according to the WHO classification
- 3/ surgical contraindications including involvement of large veins of arteries, metastases of small intestine serosa and invasion of the visceral organs or the abdominal wall
- 4/ comorbidities contraindicating large surgical procedures

Eligible patients for CRS/HIPEC signed an informed consent with the procedure. Regarding the safety of the

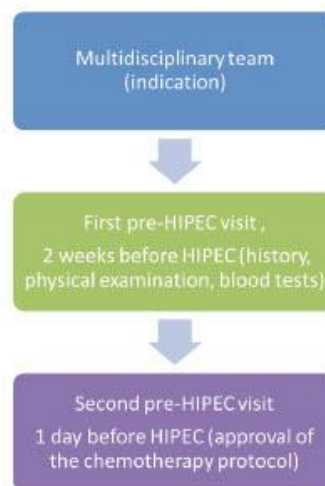


Fig. 1. Scheme of pre-HIPEC preparation of patients.

Table 1. Subgroups of patients according to the primary tumor.

Primary	n	Recurrent disease / Primary treatment	PCI (range)	CCS0	CCS1	CCS2
Ovarian cancer	17	7/10	5 (2-39)	10	3	4
Colorectal cancer	9	8/1	10 (1-25)	6	0	3
Pseudomyxoma peritonei	8	1/7	15 (6-34)	6	1	1
Mesothelioma	9	0/9	20 (3-31)	5	2	2
Endometrial cancer	1	1/0	6	0	0	1

n – number of patients, PCI – Peritoneal cancer index, CCS – cytoreduction score defined as macroscopically complete surgery (CCS0); optimal residual disease ≤ 2.5 mm in any region (CCS-1); or largely incomplete surgery with residual disease > 2.5 mm (CCS-2).

procedure, patients are followed in several pre HIPEC and post HIPEC visits (Fig. 1).

Special attention was paid to nutritional status, risk of infection, medication especially regarding corticosteroids and oral anticoagulant use which may affect postoperative complications such as bleeding, delayed surgical wounds healing, pressure lesions, systemic infections, respiratory failure and increased hospitalization duration and increased mortality rate¹²⁻¹⁴.

The first visit took place 2 weeks before CRS/HIPEC with a review of the patient's history, changes in medication, physical examination and complete blood test. The second visit followed one day before CRS/HIPEC with actual blood tests and a physical examination. The HIPEC regimen protocol is only approved in case of no contraindications. The post-CRS/ HIPEC visit to assess additional toxicity and manage adverse events followed 4 to 6 weeks after the procedure. The patients are followed further in 3 month intervals.

RESULTS

Forty-four patients, 32 females and 12 males, were included in the retrospective analysis. All patients underwent the close method of CRS/HIPEC procedure. The cohort consisted of 17 patients with ovarian cancer, 9 patients with colorectal cancer, 9 patients with peritoneal mesothelioma, 8 patients with pseudomyxoma peritonei and 1 patient with endometrial cancer. The median age of the patients was 61 years (range 36 to 76 years).

The subgroup of 17 patients with ovarian cancer included 7 patients with the second or third recurrence of the disease. Ten patients had prior surgery for ovarian cancer. The median PCI was 5 (range 2-39). Cisplatin (75 mg/m²) was administered in 16 patients and mitomycin C (30 mg/m²) was administered in one patient with platinum-resistant disease. Ten patients had complete cytoreduction CCS0, 3 patients CCS1 and 4 patients CCS2 (Tables 1 and 2).

Only one patient out of 9 in the subgroup with colorectal cancer had no prior treatment. All the other patients had recurrent disease and had prior surgical or systemic treatment. The median PCI was 10 (range 1-25). Oxaliplatin (460mg/m²) was administered to 7 patients and mitomycin C (30 mg/m²) was used with 2 patients. Six patients underwent complete cytoreduction CCS0. It

Table 2. HIPEC regimens used in COC Olomouc.

Primary	HIPEC regimen	n
Colorectal cancer	oxaliplatin 460 mg/m ²	7
	mitomycin C 30 mg/m ²	2
Mesothelioma peritonei	cisplatin 50 mg/m ²	9
	doxorubicin 15 mg/m ²	
Ovarian cancer	cisplatin 75 mg/m ²	17
	mitomycin C 30 mg/m ²	1
Pseudomyxoma peritonei	Oxaliplatin 460 mg/m ²	7
	mitomycin C 30 mg/m ²	1
Endometrial cancer	cisplatin 75 mg/m ²	1

n – number of patients.

was impossible to accomplish a complete cytoreduction with 3 patients; the score of the cytoreduction was CCS 2.

With one exception, all the patients in the subgroup with pseudomyxoma peritonei underwent CRS/HIPEC as the primary treatment. Only one patient had a recurrent disease. The median PCI was 15 (range 6-34). Oxaliplatin (460 mg/m²) was administered in 8 patients, and mitomycin C (30 mg/m²) was administered in one patient. Complete cytoreduction of CCS 0 was achieved in 6 cases, one patient had minimal residual disease CCS1, and one patient had incomplete cytoreduction of CCS 2.

All the patients with mesothelioma peritonei were treatment-naïve. A definitive histology confirmed sarcomatoid mesothelioma in one patient while other patients had epithelial peritoneal mesothelioma. The median PCI was 20 (range 3-31). All the patients were treated with cisplatin (50 mg/m²) and doxorubicin (15 mg/m²). Optimal cytoreduction of CCS-0 was achieved with 5 patients, cytoreduction of CCS-1 with 2 patients, and CCS-2 was accomplished in with 2 patients.

Preliminary results of PFS in the subgroups of patients

The median PFS has not been reached in the subgroup of 17 patients with ovarian cancer. The median of the follow up was 7 months (range 1–19 months; Fig. 2). In the subgroup of patients with colorectal cancer, the median PFS was 6 months (95% CI: 3–6.3 months; Fig. 3). No patient with pseudomyxoma peritonei has progressed during the median follow up of 7 months (range 1-16 months). One patient with mesothelioma peritonei had a disease

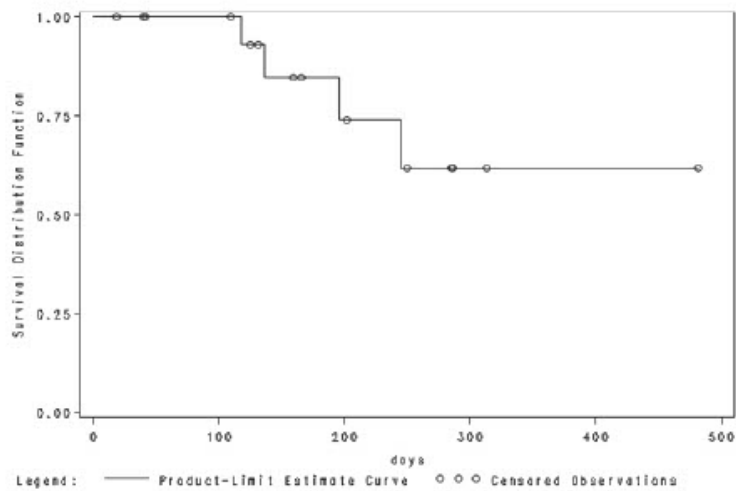


Fig. 2. Progression-free survival of patients with ovarian cancer.

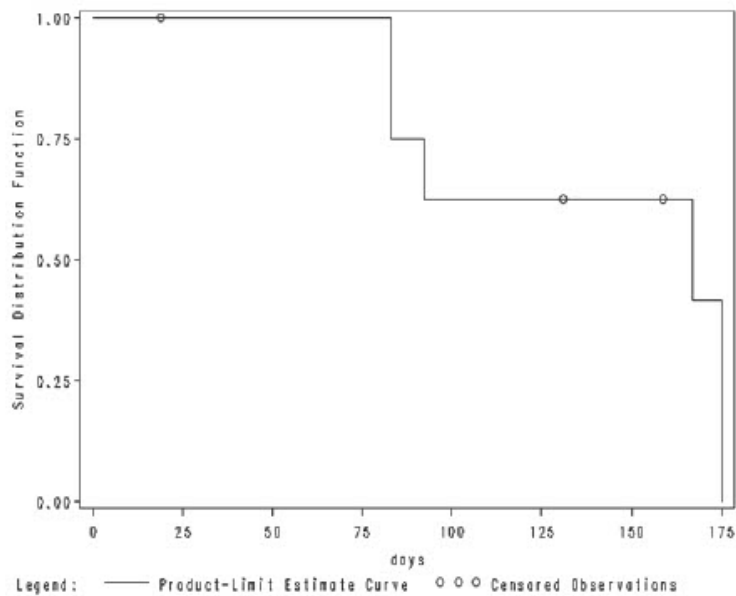


Fig. 3. Progression-free survival of patients with colorectal cancer.

progression, and the median follow up in this subgroup was 10 months (range 1–22 months). One patient with endometrial cancer was free of the disease 9 months after CRS/ HIPEC.

Adverse events, toxicity and safety of the treatment

Perioperative mortality was 2% (1/44) due to acute liver necrosis in one patient who received HIPEC oxaliplatin

during the first week after surgery. Serious perioperative morbidity grade 3 and 4, according to the Clavien-Dindo classification, was 11% (5/44). Serious complications occurred in 4 patients with colorectal cancer and 1 patient with pseudomyxoma peritonei. All these patients underwent HIPEC with oxaliplatin 460 mg/m². The patients were re-operated for suspected abdominal bleeding and inflammatory complications.

We observed postoperative non-surgical bleeding in the peritoneal cavity in our set with oxaliplatin HIPEC administration. We have not found any surgical source, eg. bleeding from vessels or from visceral organs as liver or spleen. This was a kind of diffuse bleeding from the soft tissues, from the retroperitoneum and abdominal wall after peritonectomy even if we have used a very precise surgical technique with the use of advanced thermocoagulation.

The median duration of admission to hospital was 6 days in the intensive care unit (range 2–28 days) and 7 days in the surgical ward (range 1–21 days). The hospital admission did not exceed 2 weeks in 75% of the patients.

DISCUSSION

The results of the present cohort of patients show a low perioperative mortality and acceptable morbidity associated with CRS/HIPEC with the proposed management of pre-HIPEC and post-HIPEC visits. No prolonged admission to either the intensive care unit or general surgical ward was reported. Most patients were discharged within 14 days of the procedure with the possibility of sequential adjuvant systemic treatment. The results of perioperative mortality of 2% and postoperative morbidity of 11% are consistent with the published results of high volume centres⁴⁴. The results reflect the experience of the centre in terms of the “learning curve” and correct patient selection by the multidisciplinary team¹⁵. The perioperative mortality and morbidity are influenced by the extent of the surgical procedure, HIPEC regimens used as well as by the performance status of the patient, age, nutritional status, previous antitumor treatment, comorbidities and current medication. Increased morbidity is associated with performance status > 1, age > 60 years and hypoalbuminemia. Additional complications occur in obese patients¹⁵. We believe that the scheme of pre-HIPEC and post-HIPEC visits with intervention to minimize the complications also contributed to the low morbidity and mortality numbers in our cohort. Serious morbidity was mainly reported in patients with colorectal cancer who had a recurrent disease and were mostly heavily pre-treated. In patients with colorectal cancer, the median PCI was 10 and complete cytoreduction was accomplished only in 50%. The HIPEC regimen utilized was oxaliplatin at a dose of 460 mg/m² administered in 30 min. Oxaliplatin is one of the most commonly used cytotoxic agents in HIPEC regimens. Oxaliplatin efficacy and toxicity have been evaluated in several retrospective trials. Some authors report the superiority of oxaliplatin above mitomycin C in terms of prolonged OS (ref.¹⁶), mostly in tumours with an unfavorable histology and more extensive involvement of peritoneum⁷. The present results differ from previously published retrospective data that did not report an increased rate of oxaliplatin toxicity compared to other cytotoxic agents^{18–20} but are consistent with the results of the large randomized trial Prodigé 7 (ref.²¹). This trial did not show greater efficacy of HIPEC

with oxaliplatin in terms of prolonged OS or PFS compared to cytoreductive surgery alone, but increased risk of postoperative complications. The potential benefit of oxaliplatin was only observed in patients with low PCI from 11 to 15, and in this subgroup of patients the median OS was prolonged compared to surgery alone²¹.

The evaluation of time to progression is limited by the short duration of the follow up in the present cohort. The cohort is also very heterogeneous even when split into subgroups of patients according the primary site. The heterogeneity with regard to the prior treatment of the patients and recurrence of the disease is mainly pronounced in the subgroup of patients with ovarian cancer and colorectal cancer. There is also heterogeneity in the HIPEC regimens and completeness of surgery. Only one patient had progression of the disease in the subgroups with mesothelioma and pseudomyxoma peritonei in the follow up of 7 to 10 months. These results are consistent with the published data that consider CRS/HIPEC as a standard therapeutic modality in this setting. In the case of pseudomyxoma peritonei, CRS/HIPEC has a prolonged median PFS to 8.2 years and median OS to 16.3 years²². In case of mesothelioma peritonei, conventional surgery and systemic chemotherapy resulted in a median OS of 1 year whereas CRS/HIPEC led to a median OS of 2.8 to 7.8 years²³.

The results of a prospective randomized trial of ovarian cancer, comparing CRS versus CRS/HIPEC, confirm CRS/HIPEC as a standard treatment modality in ovarian cancer stage FIGO III. This trial reported a median PFS of 14.2 months in a patient treated with CRS/ HIPEC versus 10 months in patients treated with CRS alone. The median OS was prolonged by 11 months¹⁰. The present cohort included 7 patients with recurrent ovarian cancer. In case of recurrent ovarian cancer, a much shorter PFS is expected. The PFS in a randomized phase 3 trial of recurrent ovarian cancer and maintenance therapy with PARP inhibitors reached only 5.5 months in the placebo group²⁴. In the subgroup of patients with ovarian cancer the median PFS was not reached after a follow up of 7 months.

The prognosis of carcinomatosis of colorectal origin is dismal, with the reported median OS ranging between 5–12 months²⁵. CRS/HIPEC initially brought some encouraging results which were presented by Verwaal et al.²⁶. In the randomized trial, CRS/HIPEC prolonged OS by 5 months compared to systemic treatment of the peritoneal carcinomatosis. Similar results were reported by Elias et al.²⁷ in the patients treated with CRS/HIPEC the median OS was 63 months. These results were not confirmed, however, by prospective randomized trial PRODIGE 7 presented by Quenet et al.²¹. The trial compared CRS versus CRS/HIPEC. Patients who underwent CRS/HIPEC with oxaliplatin had more postoperative complications. The key role of cytoreductive surgery was emphasized, however, in this study. The median PFS in the subgroup of patients with colorectal cancer in the present cohort reached only 6.2 months. As mentioned previously, however, this subgroup consisted of heavily pre-treated

patients, and only 50% of the patients had complete cytoreduction of CCSO.

This initial experience and preliminary results confirm the safety of the combined treatment modality of CRS/HIPEC although the results are limited by the size and heterogeneity of the cohort. More complications were seen in HIPEC with oxaliplatin in the present cohort. These results are consistent with the recently published data from a prospective randomized trial of colorectal cancer and differ from previous retrospective trials. A larger cohort of patients is needed to compare the toxicity of the individual HIPEC regimens.

CONCLUSION

Correct indication of the patients by multidisciplinary teams is essential. Close follow up with pre-HIPEC and post-HIPEC visits with early interventions may contribute to low morbidity and mortality numbers. The performance status of the patients, previous treatments and the possibility of performing complete cytoreduction of CCSO-I needs to be taken into consideration. The present preliminary results need to be assessed with caution with regard to the short duration of the follow up and heterogeneity of the cohort. However, these results support the benefit of CRS/HIPEC in the treatment of patients with pseudomyxoma peritonei, peritoneal mesothelioma and ovarian cancer.

Acknowledgment: This work was supported by grant project AZV MZČR NV18-03-00130 to D.K., student grant project IGA_LF_2018_010 from Palacky University to D.F., and Department for Administration and Development project, Ministry of Education, Youth and Sport, Czech Republic, Molecular and Cellular Clinical Approach to Healthy Ageing (ENOC project) via IMTM to B.M.

Author contributions: RL, DF, MS, DK: literature search; BMD, BM, RH, DK: conceptualization; RL, CN, DK, ML, BMD: methodology; DK, VMD, BM, RL: validation; RL, DF, MS: data processing; DK, RL, BMD: data analysis; RL, DF, ML, DK: manuscript writing- original draft preparation; BM, BMD: writing- review and editing; RH, BM: supervising, CN, DK: project administration; DK, BMD: funding acquisition; BMD, DK: final approval.

Conflicts of interest statement: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

- Markman M. Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: rationale and results. *Lancet Oncol* 2003;4(5):277-83.
- Minchinton AJ, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006;6(8):583.
- The national oncology registry, www.uzis.cz/registry-nzis/nor
- Kusamura S, Younan R, Baratti D, Costanzo P, Favaro M, Gavazzi C, Deraco M. Cytoreductive surgery followed by intraperitoneal hyperthermic perfusion: analysis of morbidity and mortality in 209 peritoneal surface malignancies treated with closed abdomen technique. *Cancer* 2006;106(5):1144-53.
- Haslinger M, Francescetti V, Attwood K, McCart JA, Fakih M, Kane III JM, Skitzki JJ. A contemporary analysis of morbidity and outcomes in cytoreduction/hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion. *Cancer Med* 2013;2(3):334-42.
- Gusani NJ, Cho SW, Colovos C, Seo S, Franko J, Richard SD, Edwards RP, Brown CK, Holtzman MP, Zeh HJ, Bartlett DL. Aggressive surgical management of peritoneal carcinomatosis with low mortality in a high-volume tertiary cancer center. *Ann Surg Oncol* 2008;15(3):754-63.
- Ford J, Hanna M, Boston A, Berri R. Life after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: measuring quality of life and performance status after cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Am J Surg* 2016;211(3):546-50.
- Sugarbaker PH. New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome? *Lancet Oncol* 2006;7(1):69-76.
- Yan TD, Welch L, Black D, Sugarbaker PH. A systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for diffuse malignancy peritoneal mesothelioma. *Ann Oncol* 2006;18(5):827-34.
- Van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HW, Hermans RH, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2018;378(3):230-40.
- Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Slooten GW, van Tinteren H, Boot H, Zoetmulder FA. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(20):3737-43.
- Mignini EV, Scarpellini E, Rinninella E, Lattanzi E, Valeri MV, Clementi N, Abenavoli L, Gasbarrini A, Rasetti C, Santori P. Impact of patients nutritional status on major surgery outcome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(11):3524-33.
- Subramanian V, Saxena S, Kang JY, Pollok RC. Preoperative steroid use and risk of postoperative complications in patients with inflammatory bowel disease undergoing abdominal surgery. *Am J Gastroenterol* 2008;103(9):2373.
- Belli S, Aytac HO, Yabanoglu H, Karagulle E, Parlakgumus A, Nursal TZ, Yildirim S. Results of surgery in general surgical patients receiving warfarin: retrospective analysis of 61 patients. *Int Surg* 2015;100(2):225-32.
- Newton AD, Bartlett EK, Karakousis GC. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: a review of factors contributing to morbidity and mortality. *J Gastrointest Oncol* 2016;7(1):99-111.
- van Eden WJ, Kok NFM, Woensdregt K, Huitema ADR, Boot H, Aalbers AGJ. Safety of intraperitoneal Mitomycin C versus intraperitoneal oxaliplatin in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer undergoing cytoreductive surgery and HIPEC. *Eur J Surg Oncol* 2018;44(2):220-7.
- Leung V, Huo YR, Liauw W, Morris DL. Oxaliplatin versus Mitomycin C for HIPEC in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(1):144-9.
- Prada-Villaverde A, Esquivel J, Lowy AM, Markman M, Chua T, Pelz, Baratti D, Baumgartner JM, Berri R, Bretcha-Boix P, Deraco M, Flores-Ayala G, Glehen O, Gomez-Portilla A, Gonzalez-Moreno S, Goodman M, Halkia E, Kusamura S, Moller M, Passot G, Pocard M, Salti G, Sardi A, Senthil M, Spiliotis J, Torres-Melero J, Turaga K, Trout R. The American Society of Peritoneal Surface Malignancies evaluation of HIPEC with Mitomycin C versus Oxaliplatin in 539 patients with colon cancer undergoing a complete cytoreductive surgery. *J Surg Oncol* 2014;110(7):779-85.
- Votanopoulos K, Ihemelandu C, Shen P, Stewart J, Russell G, Levine EA. A comparison of hematologic toxicity profiles after heated intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin and mitomycin C. *J Surg Res* 2013;179(1):e133-e139.
- Glockzin G, von Breitenbuch P, Schlitt HJ, Piso P. Treatment-related morbidity and toxicity of CRS and oxaliplatin-based HIPEC compared to a mitomycin and doxorubicin-based HIPEC protocol in patients with peritoneal carcinomatosis: a matched-pair analysis. *J Surg Oncol* 2013;107(6):574-8.
- Quenet F, Elias D, Roca L, Goere D, Ghouti L, Marchal F. A UNICANCER phase III trial of hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy

- (HIPEC) for colorectal peritoneal carcinomatosis PRODIGE 7. *Eur J Surg Oncol* 2019;45(2):e17.
22. Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, Baratti D, Deraco M, Elias D, Sardi A, Liauw W, Yan TD, Barrios P, Gómez Portilla A, de Hingh IH, Ceelen WP, Pelz JO, Piso P, González-Moreno S, Van Der Speeten K, Morris DL. Early-and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2012;30(20):2449-56.
 23. Yan TD, Welch L, Black D, Sugarbaker PH. A systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for diffuse malignancy peritoneal mesothelioma. *Ann Oncol* 2006;18(5):827-34.
 24. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Penson RT, Oza AM, Korach J, Huzarski T, et al. Treatment with olaparib monotherapy in the maintenance setting significantly improves progression-free survival in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer: results from the phase III SOLO2 study. *Gynecol Oncol* 2017;145(suppl 1):219-20.
 25. Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, Bleichrodt RP. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann Surg* 2006;243(2):212.
 26. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Slooten GW, van Tinteren H, Boot H, Zoetmulder FA. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(20):3737-43.
 27. Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe JM, Ferron G, Guilloit JM, Meeus P, Goéré D, Bonastre J. Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol* 2008;27(5):681-5.