

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Barbora Jenčíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv exprese opioidních receptorů na léčbu
pacientů s nádory zažívacího traktu**

Diplomová práce

Bc. Barbora Jenčíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Marta Khoylou, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Monika Vidlařová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením
Mgr. Marty Khoylou, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Martě Khoylou, Ph.D za odborné vedení v laboratoři při zpracování experimentální části této práce. Dále bych velmi poděkovala Mgr. Monice Vidlařové za trpělivost, vstřícnost a ochotu mi pomoci při zpracování celé diplomové práce. Poděkování patří také Doc. MUDr. *et* MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D., Ph.D. za laskavý přístup s pomocí mi odečíst preparáty, které musí být hodnoceny odborníkem a také Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D.za zpracování statistické analýzy. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat celé mojí rodině za morální podporu během studia.

Souhrn

Kolorektální karcinom a karcinom pankreatu patří mezi nejčastěji diagnostikovaná nádorová onemocnění trávicího systému. Oba karcinomy mohou vznikat sporadicky nebo na základě dědičné predispozice. Pro tlumení bolesti u pacientů s tímto onemocněním se často používají opioidní analgetika. Takovými analgetiky mohou být morfin nebo syntetický piritramid, jejichž účinek je zprostředkován opioidními receptory. Studium vlivu různých druhů opioidních analgetik na nádorovou progresi je významné s ohledem na poskytnutí informace o vhodné onkologické léčbě.

Z uvedeného důvodu jsme v rámci diplomové práce sledovali expresi genů a proteinů opioidních receptorů mu a kappa pomocí nepřímé imunohistochemické metody a real-time PCR ve tkáních kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu. Oba geny a jejich proteiny jsou přítomné ve všech fázích vývoje těchto nádorů. Analýza námi získaných dat byla provedena pomocí softwaru R a graficky znázorněna prostřednictvím Kaplan-Meierovy metody. Expresi proteinů u kolorektálního karcinomu byla korelována s histologickým typem adenokarcinomu, celkovým přežíváním a délkou bezpříznakového období. Expresi opioidního receptoru mu souvisí s postižením uzlin a s vyšším stádiem onemocnění, tedy pravděpodobně horším přežíváním. Vyšší exprese opioidního receptoru kappa souvisí s kratší délkou bezpříznakového období. Dále byl sledován vliv podané analgezie a vliv exprese opioidních receptorů na přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem pankreatu. Bylo pozorováno lepší nádorově specifické přežívání u pacientů s kolorektálním karcinomem a pozitivní expresí opioidního receptoru kappa při podání piritramidové analgezie než při podání morfinové. Dále bylo zjištěno, že exprese opioidního receptoru kappa negativně ovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu. Nicméně morfinová analgezie v kombinaci s expresí opioidního receptoru mu nebo kappa má pozitivní vliv na délku přežívání pacientů s karcinomem pankreatu.

Z této studie vyplývá, že exprese opioidních receptorů mu a kappa by mohla být vhodným prognostickým markerem u pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem pankreatu.

Summary

Colorectal and pancreatic cancer represent one of the most frequent malignancies of gastrointestinal system. Both cancers can develop sporadically or based on hereditary predisposition. The most common method how to relief pain in patients with cancer is using opioid analgesia. These opioid analgesia are morphin or synthetic piritramide and their effect is mediated by opioid receptors. The study of influence different types of opioid drugs on tumor progression could be important for getting the information about suitable oncological treatment.

Therefore, the aim of my diploma thesis was to study the gene expression of opioid receptors mu and kappa and their proteins in colorectal or pancreatic cancer patiens using indirect imunohistochemical method and real-time PCR. These proteins participate in every phase of development of both cancers. Data analysis has been processed by software R. Charts have been modelled using Kaplan-Meier method. Overall survival and disease free survival have been correlated with histological type of adenocarcinoma and with the expression of proteins mu and kappa in CRC patients. The expression of mu opioid receptor relates with number of positive lymph nodes and with higher stage of CRC, so probably also with worse survival. Increased expression of kappa opioid receptor is associated with worse disease free survival. Afterwards, we have observed the influence of used opioid analgesia and also the influence of the expression of opioid receptors in patients with colorectal or pancreatic cancer. CRC patients with the expression of kappa opioid receptor have better cancer specific survival after using analgesia with morphin, in comparison with patients after using analgesia with piritramide. The expression of kappa opioid receptor negatively influences the survival of pancreatic cancer patients. However, using morphine analgesia is associated with better survival of pancreatic cancer patients with the expression of mu or kappa opioid receptors.

Consequently, this study implies that the expression of mu or kappa opioid receptors could be suitable prognostic marker in patients with colorectal or pancreatic cancer.

Obsah

1	ÚVOD	9
2	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ TRÁVICÍHO SYSTÉMU	11
2.1	Epidemiologie a rizikové faktory kolorektálního karcinomu	11
2.2	Epidemiologie a rizikové faktory karcinomu pankreatu.....	12
2.3	Staging a léčba kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu.....	14
2.4	Vznik kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni	16
2.5	Vznik karcinomu pankreatu na molekulární úrovni	18
3	OPIOIDNÍ RECEPTORY	21
3.1	Struktura opioidních receptorů	21
3.2	Aktivace a deaktivace G proteinu	23
3.3	Geny pro opioidní receptory.....	23
3.3.1	MOR - μ opioidní receptor.....	23
3.3.2	DOR – δ opioidní receptor	24
3.3.3	KOR – κ opioidní receptor.....	25
3.3.4	NOP receptor – Nociceptinový/orfanový receptor FQ	25
3.4	Opioidy jako analgetika	25
3.5	Role opioidních receptorů v nádorové progresi	26
3.5.1	Nepřímé účinky	26
3.5.2	Přímé účinky.....	27
4	CÍLE PRÁCE.....	30
5	MATERIÁL A METODIKA	31
5.1	Pacienti.....	31
5.2	Imunohistochemie.....	32
5.2.1	Biologický materiál.....	32
5.2.2	Chemikálie a roztoky	32
5.2.3	Přístrojové vybavení laboratoře.....	33
5.2.4	Materiál	33
5.2.5	Vlastní postup.....	34
5.2.6	Hodnocení a statistická analýza.....	35

5.3	Reverzně-transkriptázová PCR v reálném čase (Real-time RT-PCR).....	37
5.3.1	Biologický materiál.....	37
5.3.2	Chemikálie a roztoky	37
5.3.3	Přístrojové vybavení laboratoře.....	38
5.3.4	Materiál	38
5.3.5	Vlastní postup.....	38
5.3.6	Hodnocení a statistická analýza.....	41
6	VÝSLEDKY	42
6.1	Imunohistochemie.....	42
6.2	Reverzně transkriptázová PCR v reálném čase	46
7	DISKUZE	54
8	ZÁVĚR	57
9	POUŽITÁ LITERATURA	58
9.1	Knihy.....	67
9.2	Použité internetové zdroje.....	67
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	68

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí, především v rozvinutých zemích světa. V roce 2008 zastoupila nádorová onemocnění 13 % všech úmrtí. Prodlužující se délka života vede k růstu rizika vzniku nádoru. Ačkoli se většina nádorů objeví v pokročilejším věku, je tato problematika mnohem důležitější, než u jiných onemocnění v populaci s dlouhou životností (Zali *et al.*, 2011).

Kolorektální karcinom (CRC – colorectal carcinoma) i karcinom pankreatu patří mezi nádorová onemocnění zažívacího systému. Kolorektální karcinom zahrnuje nádory tlustého střeva a konečníku. Karcinom pankreatu je označení pro nádorové onemocnění slinivky břišní.

Podstatnou část obou typů nádorů představují adenokarcinomy, které vyrůstají ze žláзовých buněk. U obou typů nádorů může dojít k jejich šíření, a to jak lokálně, tak vzdáleně. V dřívějším stádiu se nádorové buňky mohou dostat do lymfatických uzlin. V pozdějším stádiu onemocnění dochází k šíření pomocí vzdálených metastáz, které se objevují nejčastěji v játrech a plicích.

Kolorektální karcinom i karcinom pankreatu představují především sporadické formy nádorů, zbývající, menší zastoupení, jsou hereditární karcinomy (URL: <http://www.linkos.cz> [cit. 2016-10-5]).

Léčba je především chirurgická v kombinaci s chemoterapií či radioterapií. Často se používají analgetika k úlevě bolesti, ale mohou mít také vliv na pooperační relaps onemocnění. Mezi taková analgetika patří opioidy jako jsou morfin či piritramid. Podaná anestezie může být lokální nebo celková a může být pacientovi podána před nebo v průběhu chirurgického zákroku (perioperativní anestezie) nebo po chirurgickém (pooperační anestezie), (Bovill, 2010).

Opioidy jsou látky, které se vážou k opioidním receptorům. Jedná se o receptory spřažené s G proteinem, které se nacházejí v buněčných membránách (Hughes *et* Kosterlitz, 1983).

V předchozí studii jsme analyzovali přítomnost cirkulujících nádorových buněk (CTC) u pacientů s kolorektálním karcinomem a u pacientů s karcinomem pankreatu po podání morfinové či piritramidové analgezie. Zjistili jsme, že morfinová analgezie je u pacientů s CRC asociovaná s rostoucím počtem CTC a kratší délkou bezpříznakového období (DFS – disease free survival). Nicméně u pacientů s karcinomem pankreatu byl pozorován efekt opačný. Pacienti, kterým byla podána morfinová analgezie měli signifikantně delší celkové přežití (OS – overall survival) i DFS, než pacienti, kterým byla podána piritramidová analgezie.

Tato studie nás vedla k analýze míry exprese opioidní receptorů ve vzorcích tkání pacientů s nádorovým onemocněním a jejich možného vlivu na přežívání pacientů.

2 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ TRÁVICÍHO SYSTÉMU

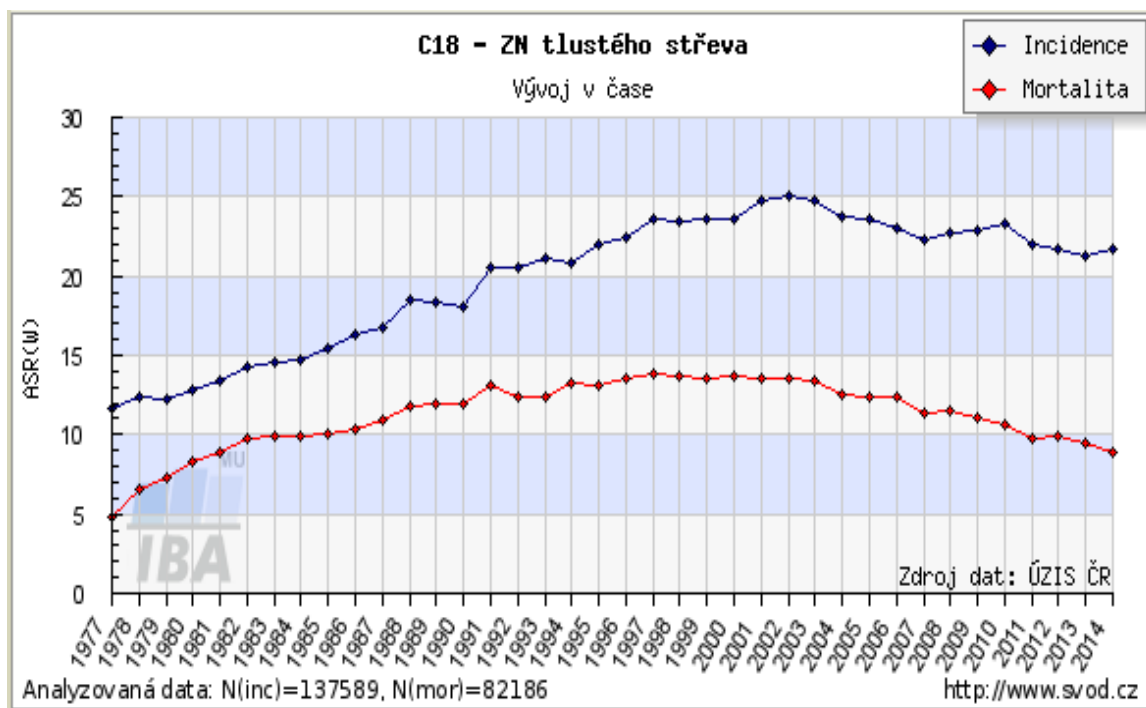
Mezi nádory trávicí trubice a zažívacích orgánů patří zhoubné nádory jícnu, žaludku, tenkého střeva, tlustého střeva, konečníku, řiti, žlučníku a slinivky břišní. Vysoká incidence nádorových onemocnění zažívacího traktu je především v ekonomicky vyspělých státech světa. Kolorektální karcinom je nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění trávicí trubice, na druhém místě je následován karcinomem pankreatu (URL:<<http://www.svod.cz>> [cit. 2016-10-7]).

Tlusté střevo je nezbytnou součástí trávicího systému, jelikož zde dochází k jednomu z posledních kroků trávení potravy, a především se zahušťuje střevní obsah, jenž se mění ve stolici, která je přes konečník odváděna z těla ven.

Taktéž slinivka břišní je nepostradatelnou součástí trávicího traktu. Slinivka břišní je žláza uložená v dutině břišní, jejímž úkolem je produkce inzulínu a dalších hormonů, které jsou transportovány do krve a umožňují tělu správné využívání energie přicházející z potravy. Slinivka břišní vytváří pankreatické šťávy, jejichž součástí jsou enzymy napomáhající trávení potravy (URL:<<http://www.linkos.cz>>[cit. 2016-10-7]).

2.1 Epidemiologie a rizikové faktory kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom je odborný termín pro zhoubný nádor tlustého střeva (colon cancer) a konečníku (rectal cancer). Z dat z roku 2012 vyplývá, že se jedná o třetí nejběžnější nádorové onemocnění na světě po karcinomu plic a karcinomu prsu, kdy bylo celosvětově diagnostikováno přibližně 1,4 milionu nových případů. Incidence kolorektálního karcinomu je vyšší v rozvinutějších zemích světa, mezi něž patří také Česká republika. V roce 2012 při hodnocení počtu nových případů na 100 000 obyvatel byla zařazena na 6. místo za Korejskou republikou, Slovenskou republikou, Maďarskem, Dánskem a Nizozemskem (URL:<<http://www.wcrf.org>>[cit. 2016-10-7]). Ačkoli byl od roku 2003 zaznamenán mírný pokles incidence i mortality v rámci České republiky (**Obr. 1**), (URL:<<http://www.svod.cz>>[cit. 2016-10-7]), je stále kolorektální karcinom druhým nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním, jak u českých mužů – po rakovině prostaty, tak u českých žen – po rakovině prsu (URL:<<http://www.globocan.iarc.fr>>[cit. 2016-10-7]). Tento pokles je možným důsledkem lepší léčebné péče, celkové perioperační péče a prevence oproti období před rokem 2003 (Dušek, 2012). Při srovnání pohlaví, je známo větší množství případů s tímto onemocněním u mužů, než u žen.



Obr. 1: Vývoj incidence a mortality kolorektálního karcinomu v letech 1977 – 2014 v České republice

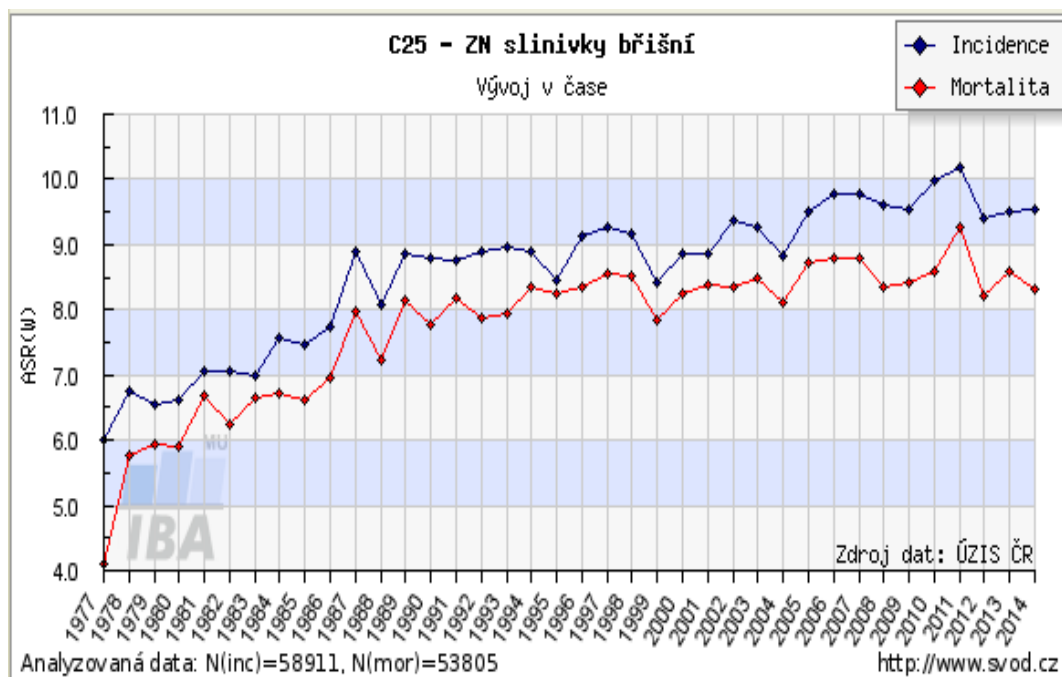
(URL:<<http://www.svod.cz>>[cit. 2016-10-16])

U většiny nemocných není příčina vzniku kolorektálního karcinomu přesně známá, nicméně jsou známy rizikové faktory (dědičné a nedědičné), které k jeho vzniku přispívají. Takovým faktorem je například věk, neboť onemocnění častěji podléhají lidé starší 50 let. Mezi nedědičné rizikové faktory patří složení potravy. Konzumace nadměrného množství červeného masa a uzenin, a naopak omezená konzumace vlákniny v zelenině, ovoci a luštěninách je považována za negativní faktor (Bostick *et al.*, 1994). Mezi rizikové faktory, které však nemůžeme ovlivnit, patří, kromě již výše zmíněného věku, dědičné predispozice, výskyt střevních polypů a chronická zánětlivá onemocnění střev jako jsou Crohnova choroba, či ulcerózní kolitida (Kinzler *et Vogelstein*, 1996; Ekobom *et al.*, 1990).

2.2 Epidemiologie a rizikové faktory karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu je označení pro nádor slinivky břišní, který patří k nejzávažnějšímu onemocnění trávicího systému, jelikož je často rezistentní na léčbu. Celosvětově se jedná o 12. nejčastěji se vyskytující nádor ještě společně s leukémií a rakovinou ledvin z 27 hodnocených typů nádorového onemocnění (URL:<<http://www.globocan.iarc.fr>>[cit. 2016-10-15]). V České republice do roku 2011 jeho incidence stále narůstala, nicméně od roku 2012 se ustálila - zhruba na 9,5 případech na 100 000 obyvatel (**Obr. 2**). Stejně jako u kolorektálního

karcinomu je zřejmé, že tímto onemocněním jsou více postiženi muži, než ženy a je častější u lidí starších 55 let. V České republice v roce 2014 incidence u mužů dosahovala 11,24 případů na 100 000 mužů, kdežto u žen to bylo pouze 8,07 případů na 100 000 žen. Mortalita je u rakoviny slinivky břišní, vzhledem ke špatné prognóze, téměř shodná s její incidencí (URL:<<http://www.svod.cz>>[cit. 2016-10-15]).



Obr. 2: Vývoj incidence a mortality karcinomu pankreatu v letech 1977 – 2014 v České republice

(URL:<<http://www.svod.cz>>[cit. 2016-10-16])

Etiologie karcinomu pankreatu není jasná, stejně jako u většiny typů nádorových onemocnění. Řada studií však uvádí rizikové faktory, mezi něž patří věk, kouření, cukrovka, dědičné predispozice a chronické zánětlivé onemocnění slinivky břišní. Lidé, kteří mají některý z těchto faktorů, často se však jedná o kombinaci několika z nich, mají větší pravděpodobnost, že mohou onemocnět nádorem slinivky břišní (Lowenfels *et* Maisonneuve, 2006).

2.3 Staging a léčba kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu

Pomocí skriningových metod, v případě kolorektálního karcinomu např. kolonoskopie a sigmoidoskopie, v případě karcinomu pankreatu např. CT (Computed Tomography; výpočetní tomografie) vyšetření břicha nebo ultrasonografie břicha, je možné odhalit onemocnění u postiženého a také stanovit rozsah onemocnění, klinické stádium a vhodný způsob léčby. Pro určení klinického stádia u obou typů onemocnění je používána mezinárodní TNM klasifikace (**Tab. 1** a **Tab. 2**). Pro stanovení klinického stádia u kolorektálního karcinomu se dříve používala Dukesova klasifikace, která však byla nahrazena TNM klasifikací. Nicméně jednotlivá stádia obou klasifikací si vzájemně odpovídají. Systém TNM je založen na třech informacích – T, N a M a definuje klinické stádium 0 - IV. Rozsah primárního nádoru je charakterizován písmenem T. N podává informaci o tom, zda se nádor rozšířil do lymfatických uzlin a M popisuje přítomnost či absenci vzdálených metastáz (URL:<<http://www.cancer.org>>[cit. 2016-10-11]). Dukesova klasifikace pak rozděluje klinická stádia kolorektálního karcinomu na A – D (Zavoral *et al.*, 2013).

Chirurgická léčba je základní léčebnou metodou, jak u kolorektálního karcinomu, tak u karcinomu pankreatu. Ta se však často provádí v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií. Z důvodu pokročilejšího onemocnění často nelze použít výše zmíněné přístupy a aplikuje se alespoň paliativní léčba pro potlačení bolesti způsobené nádorem. Chemoterapie používaná v onkologii označuje léčiva, jejichž účinky jsou pro nádorové buňky, ale často i pro zdravé buňky toxické. S ohledem na období, kdy je chemoterapie podána pacientovi ji lze rozdělit na adjuvantní a neoadjuvantní. Neoadjuvantní chemoterapie je zpravidla podávána před chirurgickým zákrokem s cílem zmenšit nádor, kdežto adjuvantní chemoterapie (zajišťovací) je podávána po operaci s cílem zničit zbývající nádorové buňky a zabránit tak návratu nádoru.

Velmi malé nádory tlustého střeva, které mají formu polypu, lze v některých případech odstranit pouze za pomoci skriningové metody (kolonoskopie). Nádory většího rozsahu je nezbytné odstranit chirurgicky i s okolní zdravou tkání tlustého střeva a přilehlými spádovými lymfatickými uzlinami.

U karcinomu pankreatu je chirurgický přístup často komplikovanější. V závislosti na rozsahu nádoru se provádí buď částečná, nebo úplná resekce slinivky břišní (Watanabe *et al.*, 2012; Ghaneh *et al.*, 2007).

Tab. 1: Modifikovaná klasifikace stádií kolorektální karcinomu podle Dukese a TNM
ve vztahu k léčbě

(URL:<<http://www.cancer.gov>>[cit. 2016-10-18])

Stádium TNM	Stádium Dukes	Hloubka invaze	Léčba
0	-	Tumor intraepitální	chirurgická
I	A	Tumor ohraničen střešní stěnou	chirurgická
II	B	Tumor zasahuje nebo proniká všemi vrstvami střešní sliznice	chirurgická + může být použita adjuvantní chemoterapie
III	C	Tumor pozitivní + pozitivní lymfatické uzliny	chirurgická + adjuvantní chemoterapie
IV	D	Vzdálené metastázy	chirurgická + adjuvantní/neoadjuvantní chemoterapie

Tab. 2: Klasifikace stádií karcinomu pankreatu dle TNM klasifikace

Převzato od Sobin *et al.*, 2011

Stádium TNM	Nádor (T)	Uzliny (N)	Metastázy (M)
Stádium 0	Tis	N0	M0
Stádium IA	T1	N0	M0
Stádium IB	T2	N0	M0
Stádium IIA	T3	N0	M0
Stádium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stádium III	T4	jakékoliv N	M0
Stádium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Vysvětlivky:

Tis	Karcinoma in situ	N0	Regionální uzliny bez nádoru
T1	Tumor omezen na pankreas ≤ 2 cm	N1	Nádorem postiženy regionální uzliny
T2	Tumor omezen na pankreas > 2 cm	M0	Nepřítomnost vzdálených metastáz
T3	Tumor mimo pankreas	M1	Přítomnost vzdálených metastáz
T4	Tumor zasahuje truncus coeliacus nebo mesenterica superior		

2.4 Vznik kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni

Předpokládá se, že většina kolorektálních karcinomů vzniká z adenomatózních polypů, které vyrůstají z normální sliznice tlustého střeva (Mohamed *et* Schofield, 2014). Maligní transformace kolorektálního karcinomu je sled několika událostí od sekvence adenomu po sekvenci karcinomu, viz **Obr. 3** (Fearon *et* Vogelstein, 1990, Miyaki *et al.*, 1990). Chromozómová nestabilita (CIN - chromosomal instability), mikrosatelitní nestabilita (MSI - microsatellite instability) a hypermetylace promotorů v oblasti CpG ostrovů jsou typické molekulární aspekty kolorektální karcinogeneze (Michor *et al.*, 2005, Fearon, 2011).

Většina případů kolorektálních karcinomů vzniká při chromozómové nestabilitě, která se vyznačuje chromozómovou změnou (aneuploidií) a ztrátou heterozygoty. To může mít za následek vady v chromozómové segregaci, stabilitě telomer a v odpovědi na poškození DNA. Ve spojení s karyotypickými abnormalitami u CIN nádorů jsou známy typické mutace v určitých tumor supresorových genech (TSG) a onkogenech, které aktivují dráhy zapojené do iniciace a progresu kolorektálního karcinomu, viz **Obr. 3** (Pino *et* Chung, 2010). U sporadických forem CRC dochází k mutacím, jak v TSG, tak i v onkogenech ale pouze v somatických buňkách, kdežto u hereditární formy CRC dochází k mutaci v TSG (nikoli v onkogenech) také v zárodečných liniích vznikajícího karcinomu (Fearon, 2011; Groden *et al.*, 1991).

Mikrosatelitní nestabilita je zvýšená schopnost fenotypu podléhat častějším mutacím způsobená ztrátou aktivity mismatch opravy DNA. MSI je detekovaná u 15 % pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří mají zpravidla lepší prognózu, než pacienti bez MSI (Boland *et* Goel, 2010).

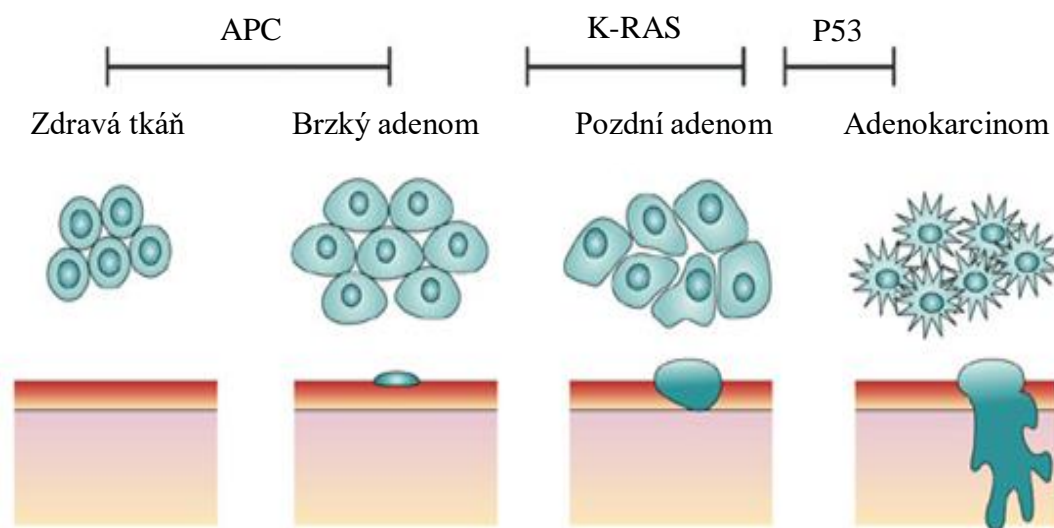
Mutace v tumor supresorovém genu APC (adenomatous polyposis coli) je prvotní genetická změna zapojená do progresu kolorektálního karcinomu (Sieber *et al.*, 2003).

FAP (Familial adenomatous polyposis) je onemocnění charakteristické vývojem stovek polypů (adenomů) v tlustém střevě a konečniku způsobené zárodečnými mutacemi v genu APC na chromozomu 5q21. APC/Wnt/ β -kateninová signální dráha hraje významnou roli v kolorektální karcinogenezi, jak u sporadických, tak dědičných forem. Většina APC mutací (98 %) jsou mutace s posunutým čtecím rámcem nebo nonsense (nesmyslné) mutace, které vedou k syntéze zkráceného proteinu (Cottrell *et al.*, 1992; De Filippo *et al.*, 2002). APC tumor supresorový gen při běžném fungování blokuje přechod z G1 fáze do S fáze během buněčného cyklu. Wnt signální dráha udržuje nativní kmenové buňky v nediferenciovaném stavu v základu střevních krypt, což přispívá nejen k přežití normálních kmenových buněk, ale také k přežití nádorových kmenových buněk. β -katenin je významným členem ve Wnt signální dráze. Nemutovaný APC indukuje degradaci β -kateninu, funguje tedy jako negativní regulátor této signální dráhy (Polakis, 1997; Kinzler *et Vogelstein*, 1996). Stálá hladina intracelulárního β -kateninu je důsledkem prodloužené aktivace Wnt signální dráhy v APC mutovaných nádorových buňkách CRC. V případě normální sliznice tlustého střeva migrují diferencující se kmenové buňky z epiteliálních krypt a následně jsou během 3 – 7 dní posílány do post-apoptózy. β -katenin řídí toto migrační chování. Jelikož jsou buňky obvykle zlikvidovány za méně než týden, nemají možnost vyvolat nádor. Akumulace β -kateninu do prekursorů enterocytů (cylindrické buňky, které tvoří většinu buněk sliznice střeva) během APC inaktivace vede k retenci fenotypu kmenových buněk. Těmto buňkám je zabráněno migrovat v důsledku zvýšené hladiny β -kateninu. Akumulace nediferenciovaných buněk v kryptách tlustého střeva nakonec vede k vytvoření polypu (Morin *et al.*, 1997).

Mutace v onkogenu K-RAS (The Kirsten Ras), jež je součástí signální dráhy RAS/RAF/MAPK, přispívá k přechodu z malého adenomu do velkého (pozdního) adenomu nebo karcinomu (Schields *et al.*, 2000). Produkt genu K-RAS, 21kDa protein se nachází na vnitřní plazmatické membráně a podílí se na přenosu mitogenních signálů. RAS protein je aktivován přechodně jako odpověď na extracelulární signály, jako jsou růstové faktory, cytokiny a hormony, které stimulují buněčné povrchové receptory (Campbell *et al.*, 1998). Funkce proteinu RAS je přepínání mezi neaktivním stavem, ve kterém jsou proteiny vázané na guaosindifosfát (GDP) a aktivním stavem, v němž došlo k přeměně GDP na guanosintrifosfát (GTP). Tato přeměna je řízena dvěma typy regulačních proteinů: GDP – GTP výměnné faktory a GTPasa-aktivující proteiny. GTPasa-aktivující proteiny zvyšují schopnost RAS proteinů hydrolyzovat GTP zpět na GDP a dostat se tak zpět do neaktivního stavu (Crespo *et Leon*, 2000). Mutovaná forma RAS proteinu má obvykle nefunkční GTPasovou aktivitu (Bos, 1989). Přibližně 90 % mutací je způsobených v kodonech 12 a 13

exonu 1. Nejčastěji pozorované mutace v těchto kodonech jsou tranverze G>A a G>T (Brink *et al.*, 2003).

Tumor supresorový gen TP53 se významně podílí na regulaci buněčného cyklu a apoptóze (Lane *et* Benchimol, 1990). Produkt genu TP53 je protein p53, který indukuje zástavu G1 fáze buněčného cyklu a usnadňuje opravu DNA ještě před vstupem buňky do procesu replikace. V případě, že se nezdaří oprava DNA, p53 indukuje apoptózu (buněčnou smrt). Mutace v genu TP53 způsobuje přechod z adenomu ke kolorektálnímu karcinomu, ale je zodpovědná také za spoustu dalších onemocnění jako např. syndrom Li-Fraumeni nebo nádorová onemocnění mozku a další (Armaghany *et al.*, 2012).

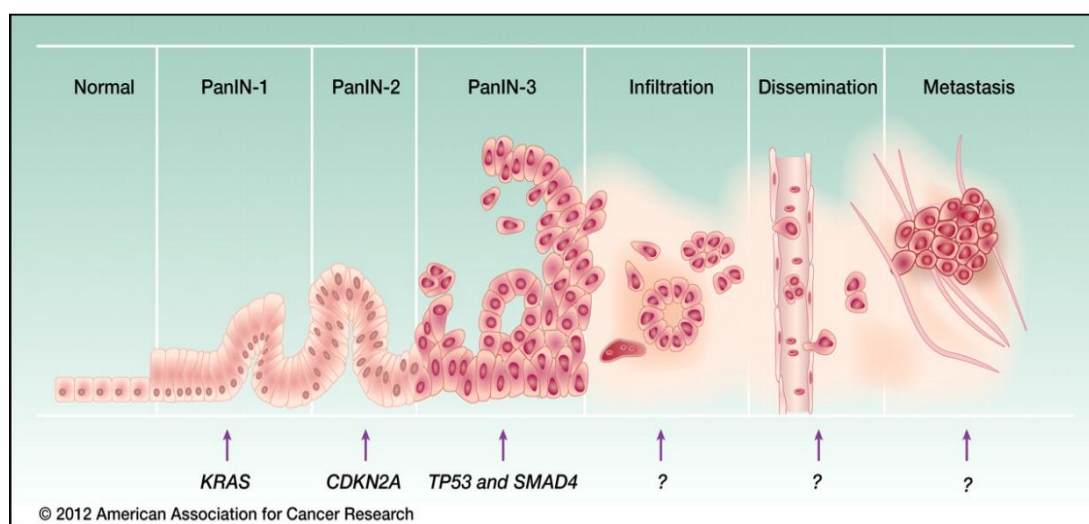


Obr. 3: Model důležitých defektních genů v kolorektální karcinogenezi od sekvence adenomu po sekvenci karcinomu (Převzato od Kerr, 2003)

2.5 Vznik karcinomu pankreatu na molekulární úrovni

Karcinom pankreatu je primárně genetické onemocnění. Většina případů karcinomu pankreatu se objeví sporadicky, pouze 5 % případů je dědičného původu (Hruban *et al.*, 1993). Dle typu buněk, ze kterých nádor vzniká a struktury a chování těchto buněk, lze nádory pankreatu klasifikovat na exokrinní a endokrinní. Slinivka břišní je multifunkční orgán tvořený mnoha typy odlišných buněk. Exokrinní část slinivky břišní je tvořena acinárními a duktálními buňkami, které produkují kombinaci žaludečních enzymů potřebných pro trávení. Endokrinní část slinivky tvoří β buňky a další endokrinní buňky, které produkují hormony, včetně inzulínu (Hollingsworth, 1999; Fesinmeyer *et al.*, 2005). Existuje mnoho histologických podtypů

karcinomu pankreatu, nicméně nejčastějším typem jsou adenokarcinomy, konkrétně duktální adenokarcinomy pankreatu (pancreatic ductal adenocarcinoma – PDAC), (až 90 % případů), u nichž byla popsána většina genetických změn. PDAC jsou exokrinního původu a vznikají z epitelálních buněk, které tvoří výstelku pankreatického vývodu, jež tvoří strukturu podobající se žláze (Hruban *et al.*, 2000; Cowgill *et Muscarella*, 2003; Li *et Jiao*, 2003). Mucinózní nádory pankreatu (MCT) jsou druhým nejčastějším histologickým typem s exokrinním původem (Lichtenstein *et Carr-Locke*, 1995). Nádory endokrinního původu jsou méně časté, <5 % všech případů (Hruban *et al.*, 2000). K vývoji zhoubných nádorů slinivky břišní dochází z normální tkáně prostřednictvím neinvazivních prekursorových lézí nazývaných pankreatická intraepiteliální neoplazie - PanIN, intraduktální papilární mucinózní neoplazie - IPMN nebo mucinózní cystická neoplazie - MCN (Maitra *et Hruban*, 2008). Duktální adenokarcinomy pankreatu vznikají nejčastěji z PanINs při získání určitých genových mutací a postupují od PanIN-1 k PanIN-3 (Vincent *et al.*, 2011). PanINs se od sebe liší na základě cytologického stupně a tkáňově architektonické atypie (Maitra *et Hruban*, 2008). Genetické mutace se vyskytují již u PanIN-1, kde dochází k aktivaci K-RAS onkogenu. Když tyto časné neoplazie přecházejí do PanIN-2 a později také do PanIN-3 dochází velmi často k inaktivaci nebo delecii tumor supresorových genů jako jsou CDKN2A (p16/Ink4A), TP53 (p53), a Smad4 (DPC4), které jsou zapojené do karcinogeneze pankreatu, viz **Obr. 4** (Vincet *et al.*, 2011).



Obr. 4: Model progrese karcinomu pankreatu z normální tkáně ke zhoubnému nádoru spolu s genetickými změnami ve specifických genech (Převzato od Lacobuzio-Donahue *et al.*, 2012)

K-RAS je nejčastěji mutovaný onkogen v somatických liniích u duktálních adenokarcinomů. Tato genetická změna je přítomna u 95 % všech PDAC. K-RAS kóduje malé GTPázy, které zprostředkovávají buněčnou signalizaci receptorů pro růstové faktory (Wood *et Hruban*, 2012). Jelikož role K-RAS onkogenu v buněčné signalizaci byla popsána v kapitole **2.4 Vznik kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni** (viz str. 15) nebude jí v této části dále věnována pozornost.

CDKN2A (p16 nebo Ink4) je nejčastěji inaktivovaný tumor supresorový gen u PDAC (až u 90 % případů) a k této inaktivaci dochází během PanIN-2. Gen CDKN1A kóduje protein p16 s klíčovou rolí v regulaci buněčného cyklu a je lokalizován na krátkém rameni chromozomu 9. Mutace v genu CDKN2A je zprostředkována několika mechanismy, včetně supresorové mutace spolu se ztrátou druhé alely, homozygotní delecí a promotorovou metylací. Za normálního stavu se protein p16 váže k cyklin dependentní kináze 4 (CDK4), čímž dochází k inhibici fosforylace různých růstových a regulačních faktorů, které kontrolují proliferaci v G1 fázi buněčného cyklu. Mutaci v genu CDKN2A způsobí zvýšenou aktivaci CDK4 a hyperfosforylaci Rb proteinu, což vede k výrazné progresi buněčného cyklu z G1 fáze do S fáze a nekontrolovatelné buněčné proliferaci (Wood *et Hruban*, 2012; Jeong *et al.*, 2005).

Druhým nejčastěji inaktivovaným tumor supresorovým genem je TP53 a dochází k ní v pozdějších stádiích vývoje karcinomu pankreatu. Protein p53 hraje klíčovou roli v odezvě na buněčný stres a indukuje apoptózu (Wood *et Hruban*, 2012), viz kapitola **2.4 Vznik kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni** (viz str. 15).

SMAD4/DPC4 tumor supresorový gen je inaktivován u 55 % adenokarcinomů pankreatu. Stejně jako TP53, i mutace SMAD4 patří k pozdějším událostem v karcinogenezi pankreatu (Li *et al.*, 2004). SMAD4 se nachází na dlouhém rameni chromozomu 18 a jeho delece je typická pro karcinom pankreatu, zřídka pak i pro kolorektální karcinom. Produkt SMAD4 zprostředkovává TGF- β signální dráhu potlačující růst buněk epitelu. Poškození SMAD4 vede k nádorovému bujení (Miyaki *et Kuroki*, 2003).

3 OPIOIDNÍ RECEPTORY

Opioidní receptory patří do rodiny sedmi transmembránových proteinů (7TM) spřažených s G-proteinem (GPCRs – G protein couples receptors). Jako třída jsou GPCRs fyziologicky významné, jelikož zprostředkovávají činnost většiny známých neurotransmiterů a hormonů. Opioidní receptory mohou být aktivovány dvěma typy ligandů, endogenními a exogenními ligandy. Aktivace opioidních receptorů prostřednictvím opioidních peptidů, které jsou produkovány přímo (přirozeně) v těle jedince se nazývá endogenní aktivace. V případě, že jsou opioidy podány exogenně ve formě opiátových sloučenin, jako je např. morfin, který je často používán jako analgetikum, nazývá se tento způsob exogenní aktivace (Hughes *et al.*, 1983)

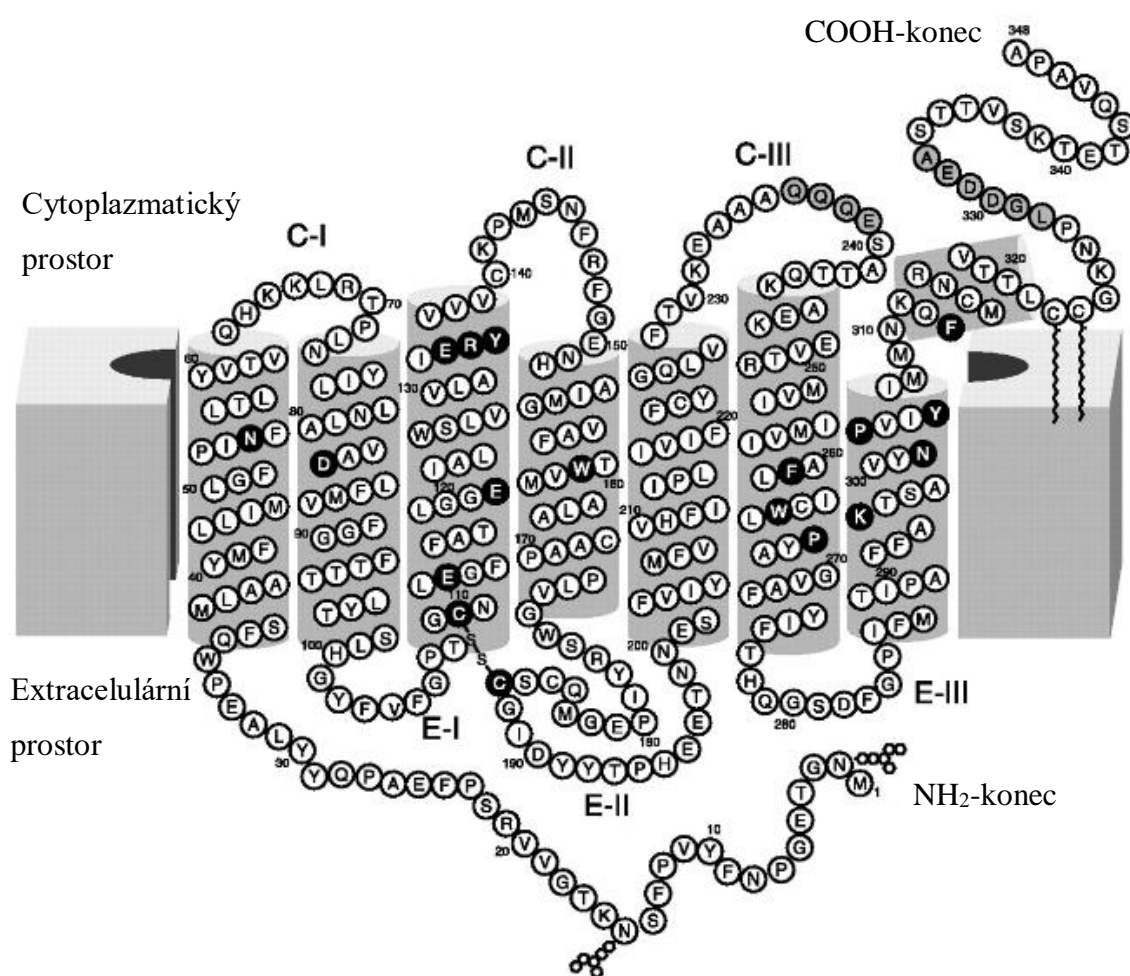
Opioidní receptory se rozdělují do 4 skupin, dle jejich distribuce a afinity k různým ligandům. První tři hlavní skupiny - μ (mí), δ (delta) a κ (kappa) byly klonovány dříve, než poslední čtvrtý člen skupiny opioidních receptorů – nociceptin/orfanový receptor ORL (opioid receptor-like orphan receptor), (Feng *et al.*, 2012). Kromě klasifikovaných 4 genů pro výše zmíněné skupiny opioidních receptorů, existují farmakologické důkazy pro další možné fenotypy. Zůstává tedy otázkou, zda možné posttranslační modifikace, alternativní sestřih mRNA, tkáňová distribuce více než jednoho receptorového genu a scaffolding dalších proteinů nebo homo- či heterodimerizace již existujících μ , δ , κ a ORL receptorových proteinů, by mohly vytvořit další možné farmakologické fenotypy (Pasternak, 2001; Jordan *et al.*, 1999). Mnoho farmakologických studií také poukazuje na existenci dalších podtypů každého ze tří hlavních typů receptorů, ačkoli jejich molekulární podstata nebyla doposud objasněna (Evans *et al.*, 1992).

Opioidní receptory jsou mimo nervový systém přítomny také v jiných periferních orgánech jako jsou plíce, játra, srdce a orgány trávicího a reprodukčního systému. Nicméně exprese a distribuce těchto receptorů se u jednotlivých orgánů liší, stejně tak se liší u různých živočišných druhů (Feng *et al.*, 2012).

3.1 Struktura opioidních receptorů

Opioidní receptory patří do třídy A (Rhodopsin) rodiny G_i/G_o proteinů spřažených s receptory. Všechny opioidní receptory mají N-terminální doménu zasahující do extracelulárního prostoru, která je spojená se sedmi transmembránovými helikálními doménami ležící ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčné membrány. Těchto sedm transmembránových domén je na druhém konci spojených s C-terminální doménou zasahující

do cytoplazmy. Tři extracelulární a tři intracelulární smyčky lišící se svojí délkou vzájemně propojují jednotlivé transmembránové domény (Palczewski *et al.*, 2000). Tyto extracelulární smyčky jsou zodpovědné za sílu signálu a vazbu ligandu. Naopak intracelulární smyčky zprostředkovávají přenos signálu k heterotriméřnímu G proteinu a substráty jsou dále fosforylovány pomocí protein kináz (Morris *et Malbon*, 1999), viz **Obr. 5**. Opioidní receptory jsou navzájem identické zhruba v 60 %, přičemž největší homologii vykazují v aminokyselinové sekvenci transmembránových domén. Největší diverzita mezi opioidními receptory se vyskytuje v N a C terminální doméně, stejně tak v extracelulárních smyčkách (Chen *et al.*, 1993).



Obr. 5: Schéma struktury opioidních receptorů

(COOH-konec – karboxylovaná C doména; NH₂-konec – glikosylovaná N doména; C-I, C-II, C-III – intracelulární smyčky; E-I, E-II, E-III – extracelulární smyčky)

Převzato od Palczewski *et al.*, 2000

3.2 Aktivace a deaktivace G proteinu

G proteiny jsou heterotrimery skládající se z α podjednotky a $\beta\gamma$ dimeru. G proteiny vykazující GTPázovou aktivitu, tedy jsou schopné vázat a hydrolyzovat guanosintrifosfát - GTP a hrají další role v mnoha aspektech při buněčné regulaci (Gilman, 1995).

Po vazbě ligandu (agonisty) k opioidním receptorům dochází k aktivaci G proteinu prostřednictvím uvolnění GDP (guanosindifosfát), který je navázán na $G\alpha$ podjednotku.

Disociace GDP je nahrazena vazbou GTP, přičemž dojde ke konformační změně a disociaci heterotrimeru na α podjednotku a $\beta\gamma$ dimer. Vnitřní GTPázová aktivita α podjednotky určuje životnost tohoto aktivního (disociovaného) stavu G proteinu. Za hydrolyzu vázaného GTP zpět na GDP je zodpovědná opět α podjednotka, která se spojuje s $\beta\gamma$ dimerem a společně se připojují zpět k receptoru připravenému pro další kolo aktivace (Bourne *et al.*, 1989). Obě podjednotky mohou regulovat efekty spřažené s G proteinem selektivním způsobem, který může být nezávislý, synergický nebo antagonistický (Neer *et Clapham*, 1988). GTPázová aktivita $G\alpha$ podjednotky a její asociace s $\beta\gamma$ dimerem je regulována doplňkovými proteiny (RGS – regulators of G protein signaling). RGS proteiny se mohou vázat na $G\alpha_i$ podjednotky, například pro rychlejší proces hydrolyzy GTP.

Oba komplexy aktivního G proteinu ve spojení s efekty mohou aktivovat nebo inhibovat celou řadu signálních drah: i) adenylát cyklázy, ii) fosfolipázy, iii) cyklické nukleotidové fosfodiesterázy, iv) iontové kanály (Berman *et Gilman*, 1998).

3.3 Geny pro opioidní receptory

Opioidní receptory jsou lokalizovány na různých chromozomech, jak u myší, tak lidí. Gen kódující δ receptor (DOR) se nachází na krátkém rameni chromozomu 1, gen kódující μ receptor (MOR) je lokalizovaný na dlouhém rameni chromozomu 6 a gen pro κ receptor (KOR) leží na dlouhém rameni chromozomu 8 (Zaki *et al.*, 1996).

3.3.1 MOR - μ opioidní receptor

Z člověka a několika druhů živočichů byl klonován gen MOR pro opioidní receptor μ a jako jediný ze všech typů receptorů byl také izolován (Waldhoer *et al.*, 2004). MOR receptor byl intenzivně studován, jelikož hraje významnou roli ve zprostředkování morfinové analgezie a jiných klinicky využitelných analgetik, např. drog. Na základě tohoto pozorování byl zaveden pojem mnohonásobné μ receptory s křížovou tolerancí k odlišným μ -ligandům (Wolozin *et Pasternak*, 1981). Genetické a fyziologické změny ovlivňují, jak citlivost MOR

k různým μ opioidním ligandům, tak rozdíly v jejich účinku (účinnosti – potence) u různých živočišných druhů, což vedlo k návrhu, že MOR receptor by mohl být rozdělen na více subtypů - MOR1, MOR2 a MOR3 (Pasternak, 2004).

MORs obsahují více než 15 serinových, treoninových a tyrosinových reziduí, které jsou dostupné protein kinázám, jež fosforylují receptor. Tato místa obsahují všechny tři intracelulární smyčky a C terminální konec (Chavkin *et al.*, 2001). U krys jsou MORs fosforylovány na Ser375 a při podání ligandů, ať už morfinu či DAMGO (syntetický agonista pro μ opioidní receptor - [D-Ala2N -Me-Phe4, Gly5-ol]-enkefalin), dochází k silné fosforylaci tohoto zbytku (Kouhen *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2004). Nicméně některé studie uvádějí, že morfin a DAMGO mohou vyvolat různý stupeň fosforylace (Schulz *et al.*, 2004), což naznačuje, že Ser375 není pravděpodobně jediný fosforylovaný aminokyselinový zbytek zapojený v regulaci MORs. Na regulaci účinnosti agonistů se podílí vysoce konzervativní „DRY motiv“ GPCR v druhé intracelulární smyčce μ opioidního receptoru. Fosforylace na Tyr166 zprostředkovaná aktivací G-proteinu snižuje účinnost DAMGO (Clayton *et al.*, 2010). Nedávná studie prokázala, že selektivní rozdíly agonistů v regulaci MOR jsou ve skutečnosti určeny nejen samotným začleněním fosfátů do populace receptorů jako celku, ale také přítomností velkého množství fosforylovaných zbytků (multifosforylací) v C-terminální doméně jednotlivých receptorů (Lau *et al.*, 2011).

3.3.2 DOR – δ opioidní receptor

Dle farmakologických studií byly objeveny dva subtypy δ receptorů – DOR1 a DOR2. DOR byl klonován u několika druhů savců, včetně myši, krys a člověka, ale nebyla nalezena žádná cDNA odpovídající jednotlivým subtypům DOR1 nebo DOR2 (Feng *et al.*, 2012).

Stejně jako u MOR a KOR je desenzitizace DOR řízena fosforylací. Fosforylace DOR byla prokázána, jak s malými molekulami organických ligandů, tak s peptidovými ligandy užívanými pro léčbu. Jak již bylo zmíněno výše u MOR, pro regulaci opioidních receptorů je zásadní fosforylace v C-terminální doméně. V případě DORs je klíčovým místem fosforylace Ser363 (Guo *et al.*, 2000; Bradbury *et al.*, 2009). Tato fosforylace je zprostředkovaná G-protein receptor kinázou 2 (GRK2), (Pei *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 2000). Nicméně další studie ukazují, že do regulace DORs jsou zapojeny i jiné amino-kyselinové zbytky (Cvejic *et al.*, 1996).

3.3.3 KOR – κ opioidní receptor

KOR receptor byl klonován z mnoha živočišných druhů jako je krysa, morče, ale také z člověka (Waldhoer *et al.*, 2004). Klonovaný KOR má vysokou afinitu k endogennímu peptidu dynorfinu A (1-17), (Chavkin *et al.*, 1982), ale byla také vyvinuta celá řada selektivních syntetických agonistů a antagonistů pro KOR. Stejně jako pro další členy opioidních receptorů, byly i pro KOR popsány κ subtypy. Na základě farmakologických studií byly navrženy subtypy κ_1 , κ_2 a κ_3 , dle odlišné aktivity vazebných míst k různým ligandům (Akil *et Watson*, 1994).

3.3.4 NOP receptor – Nociceptinový/orfanový receptor FQ

NOR byl poprvé identifikován v roce 1994 a od té doby byl nalezen u mnoha živočišných druhů (Waldhoer *et al.*, 2004), přičemž tyto proteiny byly z 90 % identické a navíc vykazovaly 60% homologii s ostatními třídami opioidních receptorů - DOR, MOR a KOR. Mimo to, byly popsány sestříhové varianty proteinu NOR ve tkáni mozku u laboratorního potkana a myši (Wang *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1998). Protože počáteční ligand-vazebné studie klonovaného NOR odhalily velmi nízkou afinitu ke všem známým opioidním ligandům, byl tento receptor považován za orfanový (sirotčí) receptor a někdy také označován jako nociceptin nebo ORL-1. Později byl identifikován endogenní ligand pro tento sirotčí receptor a byl nazván nociceptin/orfanin FQ (Meunier *et al.*, 1995; Reinscheid *et al.*, 1995).

3.4 Opioidy jako analgetika

Opioidy byly používány po staletí a zůstaly až do dnešního dne nejučinnějšími a nejspolehlivějšími analgetiky. Používají se běžně pro léčbu akutní nebo chronické bolesti po traumatu, rozsáhlých popáleninách nebo po operaci. Jsou také užívány pacienty s bolestivým terminálním onemocněním jako je rakovina. Mimo silnou analgezii, opioidy zmírňují úzkost, poskytují mírný pocit sedace a citelný pocit pohody. Problémem je, že nejsilnější opioidní analgetika jsou také nejvíce zneužívána a mohou tedy způsobovat závislost (Fields, 2011).

S podáváním opioidů souvisí opioidní tolerance. Opioidní tolerance se užívá v klinické praxi jako potřeba zvýšit dávku k udržení analgetických účinků. Nicméně toto zvýšení může vyvolat vedlejší nežádoucí účinky jako jsou zácpa, retence moči, nevolnost, respirační deprese a další. Vzhledem k těmto omezením, může opioidní tolerance vést v konečném důsledku ke snížení pohodlí pacienta a přerušení léčby. Dávka analgezie je tedy u každého pacienta individuální (Al-Hasani *et Bruchas*, 2011).

Typický agonista μ opioidního receptoru užívaný pro analgezií je morfin, extrahovaný a purifikovaný z opia (McDonald *et al.*, 2005). Morfin je nejvyužívanější opioid pro tlumení silné bolesti, ačkoli se často vyskytují negativní vedlejší účinky jako nevolnost a zvracení (Wiffen *et al.*, 2016).

Piritramid je syntetické opioidní analgetikum s účinností 0,65x - 0,75x vyšší, než morfin. Běžně se používá k léčbě pooperační bolesti, stejně tak jako k léčbě chronické bolesti. Jedná se o silný opioid, který může způsobovat respirační depresi, avšak v menší míře, než morfin (URL:<<http://www.hmdb.ca/metabolites>>[cit. 2017-1-17]). Při použití piritramidové analgezie nebyla pozorována závislost, ani opioidní tolerance (Saarne, 1969).

3.5 Role opioidních receptorů v nádorové progresi

V posledních letech se objevuje rostoucí zájem o roli analgetik a opioidů v souvislosti s relapsem nádorů a metastáz. Epidemiologické studie naznačují, že pacienti, kteří dostávají celkovou anestezii s opioidy mají větší rychlost rekurence nádoru než pacienti, kteří dostávají lokální nebo regionální anestezii (Bovill, 2010). Několik retrospektivních studií prokázalo sníženou incidenci relapsu nádoru po podání regionální anestezie (epidurální, intratekální, paravertebrální) a snížení dávek podávaných opioidů po chirurgickém odstranění karcinomu prsu, karcinomu prostaty, kolorektálního karcinomu a melanomu (Schlagenhauff *et al.*, 2000; Exadaktylos *et al.*, 2006; Christopherson *et al.*, 2008), i když jiné skupiny uvádějí méně robustní asociaci (Gottschalk *et al.*, 2010; Tavaré *et al.*, 2012). Epidemiologický výzkum se převážně zaměřil na potencionální pozitivní účinky regionálních anestetik, avšak rozdíly v rychlosti rekurence nádoru mohou být výsledkem přímých či nepřímých účinků anestetik nebo opioidů na růst nádorových buněk a metastáz. Mezi přímé účinky patří stimulace proliferace nádorových buněk, invaze a inhibice apoptózy, nepřímé účinky pak zahrnují imunopresi (Lennon *et al.*, 2012).

3.5.1 Nepřímé účinky

Analgesie u pacientů s nádorovým onemocněním je zprostředkována především centrálními μ opioidními receptory (Pasternak, 2010), nicméně periferní opioidní receptory hrají také klíčovou roli (Stein *et al.*, 2009). Jedna z nejrozšířenějších hypotéz týkající se nepřímých účinků říká, že některá analgetika, či způsob jejich podání potlačují aktivitu NK buněk (natural killer) nebo mohou interferovat s imunitní odpovědí. NK buňky jsou součástí imunitního systému a fungují jako prvotní obrana proti nádorovým buňkám, které rozpoznají a lyzují je (Welden *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2010). Celková anestezie vykazuje

účinek, který vede ke snížení koncentrace cirkulujících NK buněk a opioidy mohou mít na dávce závislý efekt na cytotoxicitu NK buněk (Snyder *et* Greenberg, 2010). Opioidní analgesie může mít také další efekty na imunitní odpověď: morfin inhibuje produkci protizánětlivých cytokinů prostřednictvím monocytů a inhibuje transkripci interleukinu-2 v aktivovaných T-lymfocytech (Gach *et al.*, 2011). Klinické studie na potlačení imunity opioidy během operace jsou složité, protože bolest sama o sobě může imunitu taktéž potlačovat. Důkaz o imunosupresi prostřednictvím opioidů je zřejmý, ale neexistuje dostatek důkazů *in vivo*, že nádorová progresse je ovlivněna tímto mechanismem. Nicméně i přes současný nedostatek klinických důkazů, využití regionálních anestetik, pokud je to možné, minimalizuje imunosupresi (Bovill, 2011; Tavare *et al.*, 2012; Welden *et al.*, 2009; Snyder *et* Greenberg, 2010).

3.5.2 Přímé účinky

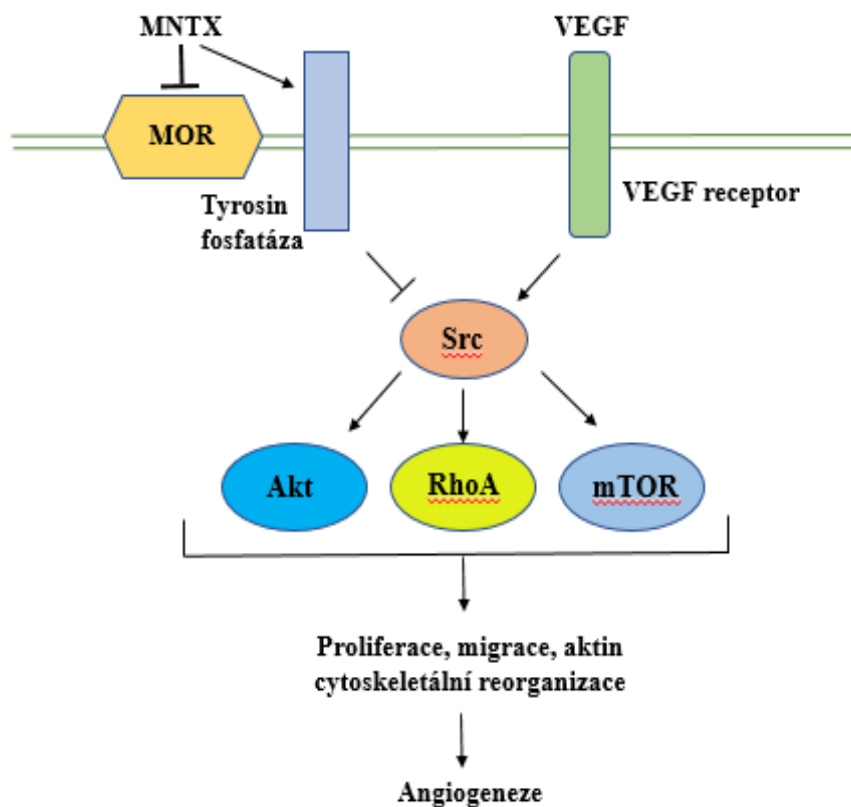
Existují také důkazy o přímém účinku opioidů na nádorovou progresi nebo rekurenci nádoru. Angiogeneze je klíčovou událostí ve vaskulárním vývoji a remodelaci tkání, zvláště při vzniku nádorů a metastáz. Nádorová angiogeneze je nutná pro progresi nádoru z hlediska příjmu živin a kyslíku, stejně jako pro vylučování metabolitů a oxidu uhličitého (Folkman, 1971; Carmeliet *et* Baes, 2008). Narušení rovnováhy mezi angiogenními aktivátory a inhibitory vede k patogenní angiogenezi. Zejména při nádorové angiogenezi dochází k převaze aktivátorů, především vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), jež je vysoce exprimován v nádorovém mikroprostředí a silně indukuje nádorovou angiogenezi. Pro obnovení rovnováhy mezi angiogenními aktivátory a inhibitory je rozhodující strategie léčby (Bergers *et* Benjamin, 2003). VEGF hraje klíčovou roli v neovaskularizaci prostřednictvím receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR2). Bylo prokázáno, že exprese genu VEGF je stimulována hypoxií a onkogenní signalizací Ras a Myc v nádorových buňkách, což vede ke tvorbě cév a nádorové proliferaci. V důsledku toho byly vyvinuty četné léky pro inhibici nádorové angiogeneze potlačením VEGF signalizace (Ferrara, 2009; Mac Gabhann *et* Popel, 2008; Carmeliet, 2005).

MOR je hlavním cílem pro opiáty, jako jsou morfin, fentanyl a heroin, s vazebnou afinitou o dva řády vyšší, než je afinita dalších opioidních receptorů (Kasai *et* Ikeda, 2011). Zájem o přímé účinky opioidů na nádorovou progresi se objevil při vývoji periferního opioidního antagonisty metylnaltrexonu (MNTX) používaného pro léčbu zácpy vyvolanou opioidy. Metylnaltrexon neprochází hematoencefalickou bariérou, tudíž je zachována centrálně zprostředkovaná analgesie (Moss *et* Rosow, 2008).

Gupta *et al.* (2002) prokázali pro-angiogenický efekt morfinu u karcinomu prsu, když implantovali buňky karcinomu prsu (MCF-7) do myši. Vědci zjistili, že klinicky relevantní dávky morfinu (10 μ M) vedou ke zvětšení nádoru a k vyšší vaskularizaci nádoru. Tento účinek byl inhibován současným podáváním terciárního MOR antagonisty naloxonem. Dále prokázali, že morfin podporoval aktivaci receptoru 2 pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR2) a byl signálním transduktorem a aktivátorem transkripce endotelových buněk sítnice u myši. To byla jedna z prvotních studií prokazujících účinek opioidů *in vivo* na růst nádorů a angiogenezi.

Lennon *et al.* (2012) prokázali účinek opioidů na angiogenezi během laboratorních studií na lidských kožních a plicních endoteliálních buňkách. Oba, morfin i DAMGO v klinicky relevantních koncentracích stimulují migraci a proliferaci endoteliálních buněk (typické znaky angiogeneze) vzájemnou transaktivací VEGF receptoru. Tento účinek by mohl být blokován periferním MOR antagonistou metylnaltrexonem (Singleton *et al.*, 2006).

Další testování buněčných a molekulárních mechanismů opioidů na angiogenezi ukázalo, že vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a morfin stimulují aktivaci malé GTPázy rodiny Ras (RhoA) a nerekceptorové tyrosinkinázy (Src) (Singleton *et al.*, 2006). Toto zjištění bylo také potvrzeno Zhang *et al.* (2009), kteří prokázali, že fosforylace Src může fungovat jako přepínač v MOR signalizaci od inhibičního ke stimulačnímu signálu. Lennon *et al.* (2012) prokázali synergický efekt metylnaltrexonu s 5-fluorouracilem (5-FU) a bevacizumabem (protilátka proti VEGF) na inhibici VEGF indukované angiogeneze. Kromě toho, prokázali synergický efekt metylnaltrexonu s inhibítozem mTOR, nazývaným temsirolimus, na angiogenezi. Metylnaltrexon inhibuje prostřednictvím VEGF a morfinu aktivitu tyrosin fosfatázy asociované s membránou. Zvýšená aktivita fosfatázy by mohla být zodpovědná za vypínání angiogenních „přepínačů“, jež jsou aktivovány VEGF a morfinem přes Src, Akt, mTOR a RhoA (**Obr. 6**), nicméně nelze vyloučit i jiné mechanismy (Singleton *et al.*, 2010; Lennon *et al.*, 2012).



Obr. 6: Schéma reprezentující inhibici angiogeneze působením metylnaltrexonu (MNTX)

(VEGF vazaný k VEGFR indukuje Src aktivaci, Src zprostředkovává následnou aktivaci Akt, RhoA a mTOR, což vede k proliferaci a migraci endoteliálních buněk a aktin cytoskeletální reorganizaci, která je nezbytná pro angiogenezi.

X

MNTX inhibuje MOR a podporuje tyrosin fosfatázovou aktivitu, což vede k inaktivaci Src. Tato inaktivace dále podporuje další inaktivace Akt, RhoA a mTOR, což vede k následné inhibici angiogeneze.)

Překresleno podle Lennon *et al.*, 2012

4 CÍLE PRÁCE

1. Imunohistochemická detekce μ a κ opioidních receptorů ve formalínu fixovaných a do parafínu zalitých vzorcích u pacientů s kolorektálním karcinomem a detekce exprese μ a κ opioidních receptorů ze vzorku pacientů s kolorektálním karcinomem nebo karcinomem pankreatu za využití metody Real-time PCR.
2. Korelace získaných hodnot exprese opioidních receptorů s klinicko-patologickými údaji, údaji o léčbě a s přežitím pacientů.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Pacienti

Imunohistochemická detekce (IHC) opioidních receptorů μ (OPRM) a κ (OPRK) byla provedena na vzorcích 166 pacientů s kolorektálním karcinomem. 30, respektive 31, pacientů bylo z následné analýzy vyřazeno z důvodu poškození vzorku v průběhu IHC. Opioidní receptor κ byl detekován u 136 pacientů (60 žen a 76 mužů), opioidní receptor μ pak u 135 pacientů (59 žen a 76 mužů) s kolorektálním karcinomem ve stádiu I-IV. Průměrný věk vyšetřovaných pacientů byl 66 let (minimální 35, maximální 91). Charakteristika vyšetřovaných pacientů je shrnuta v **Tab. 3**

Tab. 3: Charakteristika souboru pacientů s kolorektálním karcinomem vyšetřovaných na pozitivitu OPRK a OPRM pomocí imunohistochemické detekce

Klinické parametry	Počet	Ženy/Muži	ø věk (min; max)	Stádium				Intenzita barvení		
				1	2	3	4	1+	2+	3+
OPRK	136	60/76	66 (35; 91)	27	40	32	37	4	35	97
OPRM	135	59/76	66 (35; 91)	28	39	33	35	12	64	59

Do studie hodnocení míry genové exprese OPRM a OPRK za pomoci Real-time PCR bylo zařazeno 153 pacientů s kolorektálním karcinomem, kterým byla podána piritramidová (PA), či morfinová analgezie (MA). 9 pacientům z tohoto souboru byly podány obě, jak piritramidová, tak morfinová analgezie. PA byla podána 102 pacientům (41 ženám a 61 mužům) s kolorektálním karcinomem ve stádiu I-IV, průměrný věk pacientů byl 69 let (minimální 32, maximální 88). MA byla podána 51 pacientům (16 ženám a 35 mužům) ve věku průměrně 63 let (minimální 25, maximální 79). Charakteristika pacientů je shrnuta v **Tab. 4**.

Tab. 4: Charakteristika souboru pacientů s kolorektálním karcinomem vyšetřovaných na expresi genů pro OPRM a OPRK pomocí real-time PCR

Klinické parametry	Počet	Ženy/Muži	ø věk (min; max)	Stádium				ASA			
				1	2	3	4	1	2	3	4
Piritramid	102	41/61	69 (32; 88)	22	37	26	17	7	51	29	0
Morfin	51	16/35	63 (25; 79)	13	10	23	5	6	31	7	1
Celkem	153	57/96	68 (25; 88)	35	47	49	22	13	82	36	1

ASA...klasifikace hodnotící celkový stav pacienta

Míra genové exprese výše zmíněných opioidních receptorů byla pomocí real-time PCR stanovena také u pacientů s karcinomem pankreatu, kterým byla taktéž podána piritramidová, či morfinová analgezie. Z celkového počtu 105 testovaných pacientů, byly 12 z nich podány oba typy analgezie. PA byla podána 49 pacientům (21 ženám a 28 mužům) s karcinomem pankreatu ve stádiu I-IV, průměrný věk pacientů byl 64 let (minimální 40, maximální 78). MA byla podána 56 pacientům (26 ženám a 30 mužům) ve věku průměrně 63 let (minimální 40, maximální 77). Charakteristika pacientů s karcinomem pankreatu je shrnuta v **Tab. 5**.

Tab. 5: Charakteristika souboru pacientů s karcinomem pankreatu vyšetřovaných na expresi genů pro OPRM a OPRK pomocí real-time PCR

Klinické parametry	Počet	Ženy/Muži	ø věk (min; max)	Stádium				Radikalita resekcčního výkonu		
				1	2	3	4	R0	R1	R2
Anestezie										
Piritramid	49	21/28	64 (40; 78)	9	22	5	13	30	4	15
Morfin	56	26/30	63 (40; 77)	6	40	2	8	47	3	6
Celkem	105	47/58	63,5 (40; 78)	15	62	7	21	77	7	21

5.2 Imunohistochemie

5.2.1 Biologický materiál

Pro imunohistochemickou detekci byly použity stejné patientské vzorky, které byly v rámci předchozí bakalářské práce zpracovány do tkáňových mikroarraí (TMA).

Donorové bloky pacientů se vzorky kolorektálního karcinomu byly poskytnuty z Ústavu klinické a molekulární patologie z Fakultní nemocnice Olomouc.

5.2.2 Chemikálie a roztoky

- OPRM1 Polyclonal Antibody (Thermo Fischer Scientific, PA5-26138)
- Anti-Kappa Opioid Receptor antibody (Abcam, ab113533)
- Dako EnVisionTM + Dual Link System – HRP (Dako, K4061, K4063)
- Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako, 3468) (1 ml DAB + substrate buffer s 1 kapkou DAB + chromogen)
- Pertex (Bamed, HI-00801)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- Aceton (Lachner, 20001-3T0)

- Xylen (Lachner, 20060-AT0)
- Etanol (Lachner, 20025-A96)
- 10 mM citrátový pufr (pH = 6; 1000 ml dH₂O; 2,9 g C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O)
- Zásobní 10x koncentrovaný fosfátový pufr (10x PBS, pH = 6,8) (1000ml dH₂O; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O; 2,4 g KH₂PO₄)
- 1x fosfátový pufr s Tweenem (1x PBS s Tweenem, pH = 7,4) (900 ml dH₂O; 100 ml 10x PBS; 1 ml Tween 20)
- Roztok blokace endogenní peroxidázy (3% H₂O₂) (10 ml 30% H₂O₂; 90 ml 1x PBS s Tweenem)
- Blokační mléko (100 ml 1x PBS s Tweenem; 3 g sušené odtučněné mléko; 2 g bovinní sérový albumin; 1 ml 10% NaN₃)
- Ředící roztok pro primární protilátku (0,9 ml 1x PBS s Tweenem; 0,1 ml fetální sérum; 0,01 ml 10% NaN₃)
- Ředící roztok pro sekundární protilátku (0,9 ml 1x PBS s Tweenem; 0,1 ml fetální sérum)
- Kamencový Hematoxylin (50 ml 5% KAl(SO₄)₂·12H₂O, 1 ml 10% hematoxylinu v 96% etanolu, 1 ml 2% H₅IO₆, 10 kapek 3% koncentrované HCl (35%)
 - 5% zásobní roztok KAl(SO₄)₂·12H₂O (100 ml dH₂O; 5 g KAl(SO₄)₂·12H₂O)
 - 10% zásobní roztok hematoxylinu v 96% etanolu (10 ml 96% etanolu; 1 g hematoxylinu)
 - 2% zásobní roztok H₅IO₆ (25 ml destilované dH₂O; 0,5 g H₅IO₆)
 - 3% zásobní roztok koncentrované HCl (35%) (100 ml dH₂O; 8,6 ml konc. HCl (35%))

5.2.3 Přístrojové vybavení laboratoře

mikrotom RM 2135 (Reica), termostat IP100 U (LTE), lednice C 4023 (Liebherr), vodní lázeň TW8 (Julabo), magnetická míchačka Heidolph Hei-Standard (Heidolph Instruments GmbH), vortex V-1 plus (Biosan), minicentrifuga (Thermo Scientific), váhy (Scaltec), pH metr, laboratorní digestoř (Merci), mikroskop (Olympus)

5.2.4 Materiál

barvicí vany dle Coplina s víkem, odměrné válce (0,5 – 1 l), pozitivně nabitá podložní skla (Thermo scientific), krycí skla, automatické pipety (2 – 1000 µl) a špičky, mikrozkuřavky (1,5 ml; 2 ml), odpadní láhev, vlhká komůrka, plastové stojany

na zkumavky a mikrozkuhavky, pinzeta, buničina, ochranné rukavice, parafínový fix Liquid blocker, centrofix

5.2.5 Vlastní postup

TMA bloky se vzorky, které byly vytvořeny v rámci bakalářské práce, byly nakrájeny na řezy o tloušťce 4 μm pomocí mikrotomu. Řezy byly nataženy na podložní sklo a inkubovány v termostatu při teplotě 56 $^{\circ}\text{C}$ do dalšího dne.

Následující den byla provedena deparafinizace řezů v xylenu a hydratace řezů v sestupné etanolové řadě (100% EtOH, 80% EtOH a 70% EtOH), vždy po dobu 5 minut. Po hydrataci byla skla ponechána 40 minut k inkubaci v citrátovém pufru umístěném ve vodní lázni s teplotou 95 – 99 $^{\circ}\text{C}$. Inkubace v citrátovém pufru byla provedena za účelem rozvolnění buněčného povrchu, aby mohla daná protilátka specificky nasednout. Pro zabránění aktivity endogenních peroxidáz, byla skla ponořena na 10 minut do roztoku 3% peroxidu vodíku. Pro zablokování pozadí byly preparáty přemístěny do blokačního mléka, kde probíhala inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Po osušení sklíček následovala aplikace primární protilátky. Na řezy bylo aplikováno 200 μl zředěné protilátky ve vlhké komůrce, kde zůstaly řezy přes noc. Ředění primárních protilátek je zaznamenáno v **Tab. 6**.

Další den byla sklíčka usušena a bylo na ně naneseo 200 μl sekundární protilátky (EnVisionTM + Dual Link System, Labelled Polymer – HRP). Sklíčka se sekundární protilátkou se nechala inkubovat ve vlhké komůrce po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo na preparáty napipetováno 100 μl chromogenu DAB (3,3-diaminobenzidin), aby došlo k vizualizaci sledovaných proteinů. Pro vizualizaci byl použit kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako, K3468), s kterým se nechaly preparáty 5 – 10 minut inkubovat. Mezi jednotlivými výše zmíněnými kroky byly vždy preparáty 3x opláchnuty v 1x PBS s Tweenem vždy po dobu 5 minut.

Pro podbarvení byly preparáty ponořeny na 30 sekund do nádoby s hematoxylinem a poté do nádoby s destilovanou vodou. Oplach byl prováděn 3 minuty pod tekoucí vodou. Následovalo odvodnění preparátů ve třech krocích (v acetonu – 1 minuta, v roztoku 1:1 aceton/xylen – 1 minuta a na konec v xylenu – 1 minuta). Po odvodnění byla skla zamontována do montovacího média – Pertex a pokryta krycím sklem.

Tab. 6: Přehled použitých primárních protilátek a jejich ředění

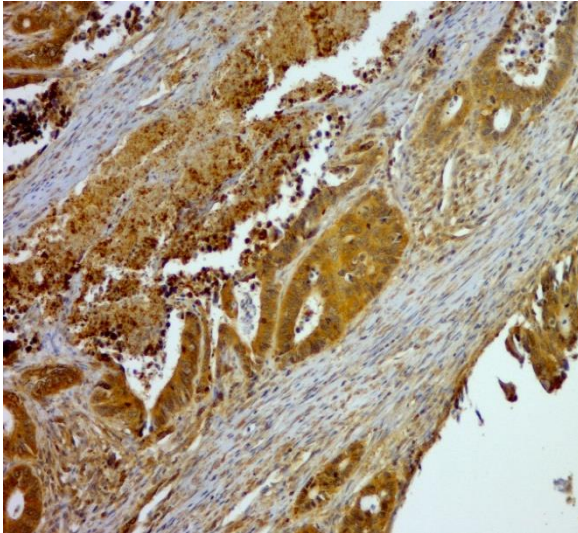
Detekovaný protein	Typ protilátky	Ředění
OPRM	polyklonální	1:20
OPRK	polyklonální	1:250

5.2.6 Hodnocení a statistická analýza

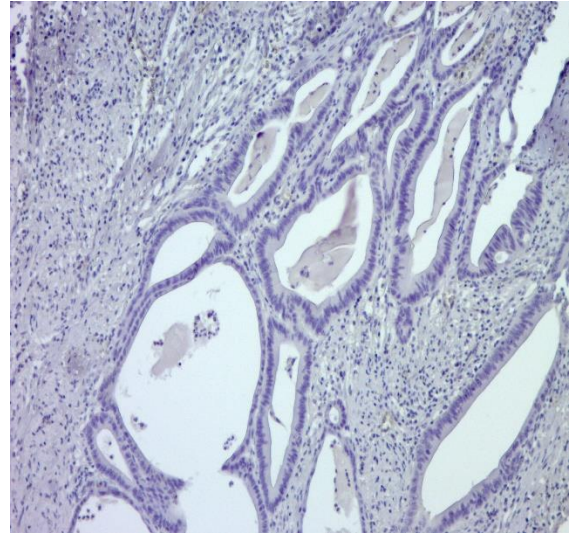
Expres sledovaných proteinů byla odečtena patologem a hodnocena pomocí H skóre, které bere v úvahu % pozitivních buněk a jejich intenzitu zbarvení (0 – negativita, 1+ - slabá pozitivita, 2+ - střední pozitivita, 3+ - silná pozitivita). Stupeň positivity byl stanoven na základě intenzity zbarvení pozitivní tkáň do hněda (**Obr. 7** a **Obr. 9**), za podmínek uvedených v **Tab. 7**. Negativní tkáň (**Obr. 8** a **Obr. 10**) byla zbarvena pouze do modra.

Tab. 7: Přehled intenzity zbarvení a odpovídajícího stupně positivity, dle hodnotící metody – H skóre

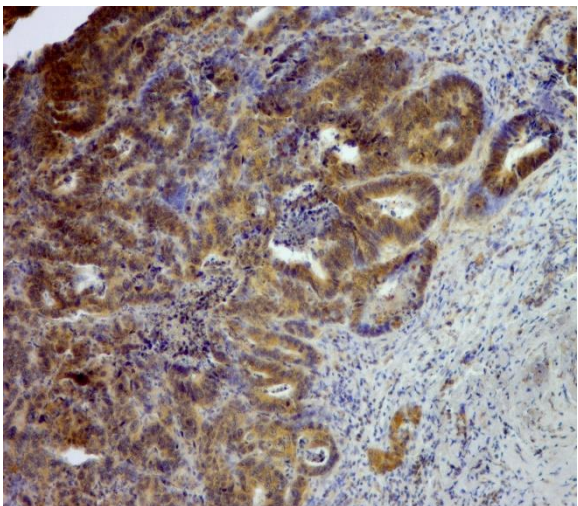
Intenzita zbarvení	Stupeň positivity	Pozitivita
0 – 9 %	0	Negativní
10 – 29 %	1+	Slabá pozitivita
30 – 60 %	2+	Střední pozitivita
61 – 100 %	3+	Silná pozitivita



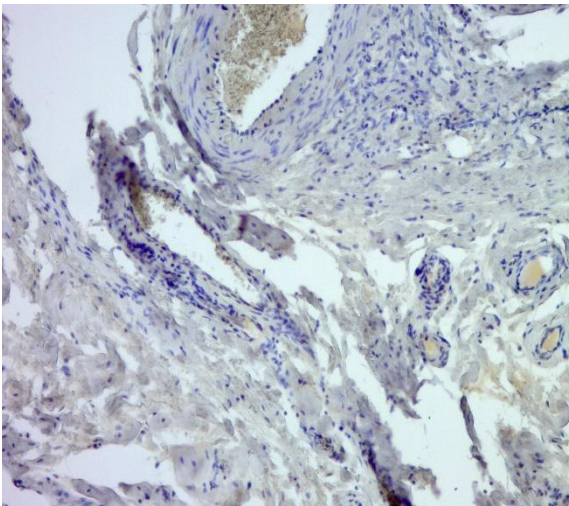
Obr. 7: Vizualizace imunohistochemické detekce OPRK v pozitivní tkáni
Zvětšení 10x



Obr. 8: Vizualizace imunohistochemické detekce OPRK v negativní tkáni
Zvětšení 10x



Obr. 9: Vizualizace imunohistochemické detekce OPRM v pozitivní tkáni
Zvětšení 10x



Obr. 10: Vizualizace imunohistochemické detekce OPRM v negativní tkáni
Zvětšení 10x

Stupeň positivity byl s dalšími daty o studovaných vzorcích zpracován v počítačovém statistickém softwaru R. Prostřednictvím log-rank testu byla provedena analýza vlivu jednotlivých faktorů (histologického typu a stádia) na celkové přežívání (OS – overall survival) a délku bezpříznakového období (DFS – disease free survival). Přežívání (DFS, OS) byla následně modelována prostřednictvím univariátního Coxova regresního modelu a multivariátního Coxova regresního modelu, tj. s adjustací vzhledem ke gradingu, velikosti

nádoru, postižení uzlin, stádu a věku. Křivky přežívání byly odhadnuty metodou Kaplan-Meiera. Hladina signifikance byla u všech analýz stanovena 5 %. Nezávislost kategoriálních proměnných (pohlaví, diagnóza, grading, velikost nádoru, postižení uzlin, vzdálené metastázy, skóre dle Dukese, stádium, typ operace – paliativní/radikální, neoadjuvance, radioterapie, adjuvantní chemoterapie vs. kategorie intenzity zbarvení) byla otestována prostřednictvím Fisherova exaktního testu nezávislosti. Věková distribuce v jednotlivých podskupinách pacientů dle intenzity zbarvení byla porovnána využitím Kruskalova-Wallisova neparametrického testu.

5.3 Reverzně-transkriptázová PCR v reálném čase (Real-time RT-PCR)

5.3.1 Biologický materiál

Pro analýzu genové exprese pomocí real-time PCR byly použity vzorky nádorové tkáně 153 pacientů s kolorektálním karcinomem a 105 pacientů s karcinomem pankreatu uložené v RNA lateru v – 80 °C.

5.3.2 Chemikálie a roztoky

- RNA later: RNA Stabilization Reagent (Qiagen, 76106)
- TRI reagent (Molecular Research Center, TR118)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, I9516)
- Chloroform (Serva, 45627)
- Etanol (Lachner, 20025-A96)
- DEPC treated water (Ambion, AM9916)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- Random Primer (Promega, C1181)
- RNA inhibitor 30 U/μl (Promega, N2111)
- dNTP 10mM (Promega; dATP (U1202), dGTP (U1212), dCTP (U1222), dTTP (U1232)) (4x 0,1 ml zásobních dNTP doplněno DEPC vodou do 1 ml)
- Reverzní transkriptáza RevertAid H Minus M-MuLV a reakční pufr 5x (Thermo Fischer Scientific, EP0451)
- TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies; OPRK (Hs00175127_ml), OPRM (Hs01053957), ACTB (Hs99999903_ml))

5.3.3 Přístrojové vybavení laboratoře

kombinovaná chladnička (Gorenje), vortex (Scientific Industries), minicentrifuga (Eppendorf), váhy (Scaltec), laminární box (BioAir), termocykler PTC 100 (MJC), chlazená centrifuga (Hermle), termoblok (Eppendorf), homogenzátor Mixer Mill 300 (Retsch), nanodrop ND 1000 (Nanodrop), speedVac Eppendorf 5031 (Eppendorf), lightCycler 1536 (Roche), echo Liquid Handler (Roche), skleněný PCR box, Biohazard box HERASAFE KS 18 (Thermo Scientific)

5.3.4 Materiál

automatické pipety (2 – 1000 µl) a špičky, multikanálové pipety (0,5 – 100 µl), mikrozkušavky (1,5 ml; 2 ml), epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf), 0,2ml Thermo-Tube (ABgene), skleněné homogenizační kuličky, odpadní láhev, LC1536 multiwell plate, 384 jamková destička, fólie na PCR destičky, plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky, pinzeta, nůžky, buničina, ochranné rukavice, centrofix

5.3.5 Vlastní postup

Izolace totální RNA z tkání a stanovení koncentrace RNA

Z 20 - 40 mg nádorové tkáně uskladněné v RNA lateru byla fenol-chloroformovou metodou izolována totální RNA. Fenol-chloroformová extrakce RNA je založena na separaci fází, kdy vznikají 3 fáze: 1. spodní fáze obsahující detrit, lipidy, proteiny a DNA; 2. prostřední mezivrstva je tvořena prstencem DNA a 3. horní fáze obsahuje RNA.

Nádorová tkáň byla rozstříhána na malé kousky do 2ml zkumavky a k ní byly přidány 2 sterilní skleněné kuličky a 1 ml komerčního TRI reagentu (směs guanidinu thiokyanátu a fenolu). Mikrozkušavky byly homogenizovány při 30 Hz na homogenizéru po dobu 4 minut. Poté bylo ke každému vzorku TRI lyzátu přidáno 200 µl chloroformu a směs byla centrifugována 15 minut při 12 000 g, 4 °C. Po centrifugaci došlo k separaci fází, byla odebrána horní vodná vrstva obsahující RNA a přenesena do čisté zkumavky. Do zkumavky s RNA byl přidán stejný objem isopropanolu jako byl objem RNA a následovala precipitace RNA při pokojové teplotě. Centrifugací vzorků 10 minut při 12 000 g, 4 °C byla získána RNA peletka na dně zkumavky. Supernatant nad peletou byl odpipetován a peleta byla promyta 1,5 ml 75% etanolu. Následovala centrifugace 5 minut při 12 000 g, 4 °C, opět byl odpipetován supernatant a nově vzniklá peleta se nechala sušit na vzduchu 3 - 5 minut. RNA peleta byla resuspendována v cca 25 µl DEPC treated vody a vzorek byl zahříván 10 minut na 60 °C v termobloku. Poté byly vzorky ochlazeny v chladícím stojanu.

Ze vzorků bylo odebráno 1,2 μl RNA a byla změřena koncentrace a čistota RNA na přístroji Nanodrop ND 1000 dle návodu.

Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci dochází pomocí enzymu reverzní transkriptázy k přepisu RNA do komplementární jednovláknové DNA (cDNA).

Reverzní transkripce byla provedena ze 3 μg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 μl za použití random primerů a reverzní transkriptázy RevertAid H Minus M-MuLV. Objem použité RNA byl spočítán z její koncentrace a doplněn vodou na objem 19,5 μl . K objemu RNA s vodou bylo vždy přidáno 0,6 μl random primerů. Vzorky byly inkubovány 5 minut při 70 $^{\circ}\text{C}$. Dále byla připravena reakční směs (viz **Tab. 8**), která byla rozpipetována po 9,75 μl do každé PCR zkumavky a následně bylo ke vzorkům přidáno 0,75 μl reverzní transkriptázy RevertAid H Minus M-MuLV. Podmínky reverzní transkripce jsou zaznamenány v **Tab 9**. Získaná cDNA byla uchována při -20 $^{\circ}\text{C}$ a následně použita pro real-time PCR.

Tab. 8: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Reagencie	Objem pro 1 vzorek [μl]
5x reakční pufr	6
10 nM dNTP	3
30 U/ μl RNA inhibitor	0,75

Tab. 9: Podmínky reverzní transkripce

Kroky	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [min]
1. krok	42	60
2. krok	70	10
Chlazení	4	-

Real-time PCR

Míra exprese opioidních receptorů μ a κ a housekeepingového genu aktinu β (ACTB) byla vyšetřena na přístroji LightCycler 1536.

Vzorky cDNA byly napipetovány po 10 μ l na 384 jamkovou destičku a byly opakovaně použity na jednotlivé PCR se specifickými markery. Destička se vzorky byla uchována v -20 °C. Dle rozpisu (viz **Tab. 10**) byla připravena reakční směs pro jednotlivé markery (vždy pouze pro jeden vyšetřovaný gen) a rozpipetována do 30 jamek (6x5 jamek) na novou 384 jamkovou destičku. Pomocí přístroje Echo Liquid Handler byla reakční směs rozpipetována na 1536 jamkovou destičku po 882,5 nl, dle schématu přednastaveného v přístroji. Následně byly k reakční směsi přidány vzorky po 117,5 nl/jamku. Každý vzorek byl na destičku nanesen ve 4 opakováních. Celkový reakční objem na jednu jamku činil 1 μ l. Postup byl opakován celkem třikrát, pro každý sledovaný marker zvlášť.

Tab. 10: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem pro 1536 vzorků [μl]
Voda	720
LC 1536 Probes Master 5x	1114
TaqMan Assay	132

Připravená 1536 jamková destička byla pokryta a zatavena fólií a následně umístěna do LightCycleru 1536, kde byla spuštěna PCR. Teplota a délka amplifikace byly nastaveny dle podmínek uvedených výrobcem TaqMan Gene Expression Assay, viz **Tab. 11**.

Tab. 11: Podmínky PCR reakce

Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Aktivace	95	10 min	1
Amplifikace	95	15 s	50
	60	1 min	
Chlazení	37	1 s	1

5.3.6 Hodnocení a statistická analýza

Ze 4 hodnot získaných z téhož vzorku PCR analýzou byl spočítán aritmetický průměr, který byl dále použit pro hodnocení míry genové exprese. Míra genové exprese opioidních receptorů μ a κ byla stanovena na základě relativní kvantifikace. Expresie studovaných markerů byla normalizována na expresi referenčního genu pro aktin β . Pro stanovení genové exprese opioidních receptorů μ a κ a normalizaci této hodnoty u jednotlivých vzorků byla použita metoda $\Delta\Delta C_t$ (delta delta C_t), kdy se postupovalo, dle následujícího vzorce:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{ø hodnot vzorku}) - \Delta C_t (\text{referenční gen})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{normalizovaný expresní poměr}$$

Výsledkem pro nás tedy byl normalizovaný expresní poměr, který nám určoval relativní množství genové exprese sledovaného markeru ve vzorku v porovnání s referenčním genem. V případě, že nebyl vzorek amplifikován během PCR reakce ani v 1 ze 4 reakcí, byla mu přidělena C_t hodnota 50, protože amplifikace probíhala v 50 amplifikačních cyklech.

Z normalizovaného expresního poměru byly pro každý soubor pacientů spočítány specifické cut off hodnoty pro jednotlivé markery (**Tab. 12**) pomocí maxstat funkce ze stejnojmenného balíčku v R softwaru. Na základě těchto cut off hodnot byla exprese kategorizována jako negativní (hodnota exprese menší nebo rovna cut offu) a pozitivní (hodnota exprese větší než odpovídající cut off). Pro takto kategorizovanou hodnotu exprese byla provedena analýza přežívání. Analýza celkového přežívání (OS – overall survival), délky bezpříznakového období (DFS – disease free survival), přežívání bez relapsu (RFS – relaps free survival) a nádorově specifického přežívání (CSS – cancer specific survival) pro každý marker byla provedena univariátní analýzou log-rank testem a Coxovou regresní analýzou.

Tab. 12: Kritéria pro hodnocení vzorků (cut off hodnoty)

Marker	Kolorektální karcinom	Karcinom pankreatu
Cut off hodnota pro OPRM	10,4	7,4
Cut off hodnota pro OPRK	11,5	12,6

6 VÝSLEDKY

6.1 Imunohistochemie

Na tkáních kolorektálního karcinomu byla testována exprese proteinů OPRK a OPRM (Tab. 3), za použití komerčně dostupných protilátek, pomocí nepřímé dvojstupňové imunohistochemické metody. Intenzita exprese proteinů OPRK a OPRM byla hodnocena v cytoplazmatické membráně nádorových buněk. Výsledná data o expresi proteinů OPRK a OPRM byla korelována s klinicko-patologickými údaji a jejich možném vlivu na celkové přežívání (OS) a délku bezpříznakového období (DFS) ve statistickém počítačovém softwaru R.

Z multivariátní Coxovy regresní analýzy (při adjustaci vzhledem ke gradingu, velikosti nádoru, postižení uzlin, stádiu a věku) je patrné, že pacienti s novotvarem C20 (zhoubný novotvar konečníku) mají vyšší riziko úmrtí pro OS HR = 1,8, 95%CI = (1.02-3.24), p-value = 0,043, než pacienti s novotvarem C18 (zhoubný novotvar tlustého střeva). Totéž platí pro DFS HR = 1,9, 95%CI = (1.1-3.4), p-value = 0,023 viz Tab. 13. V univariátní analýze přežívání však vliv diagnózy není statisticky významný.

Na základě univariátní analýzy přežívání jednoznačně ovlivňuje stádium (log-rank test, p-value < 0.001 pro OS i DFS), velikost tumoru (log-rank test, p-value (OS) = 0.017, resp. p-value (DFS) = 0.006), postižení uzlin (log-rank test, p-value < 0.001 pro OS i DFS) a vzdálené metastázy (log-rank test, p-value (OS) = 0.001, resp. p-value (DFS) < 0.001), proto byly tyto parametry použity v multivariátní analýze přežívání.

Tab. 13: Vliv histologického typu na celkové přežívání a délku bezpříznakového období testovaný prostřednictvím log-rank testu (p-value) a HR spolu s 95% konfidenčním intervalem z odpovídajícího Coxova regresního modelu pro jednotlivé kategorie (vztaženo k histologickému typu C18)

Histologický typ	N	Events pro OS	HR (95% CI) pro OS	Events pro DFS	HR (95% CI) pro DFS
C18	76	38 (50 %)		42 (55.3 %)	
C19	26	11 (42.3 %)	1.1 (0.49-2.28)	14 (53.8 %)	1.1 (0.51-2.33)
C20	63	33 (52.4 %)	1.8 (1.02-3.24) *	35 (55.6 %)	1.9 (1.1-3.4) **

* test významnosti regresního parametru, p-value = 0,043

** test významnosti regresního parametru, p-value = 0,023

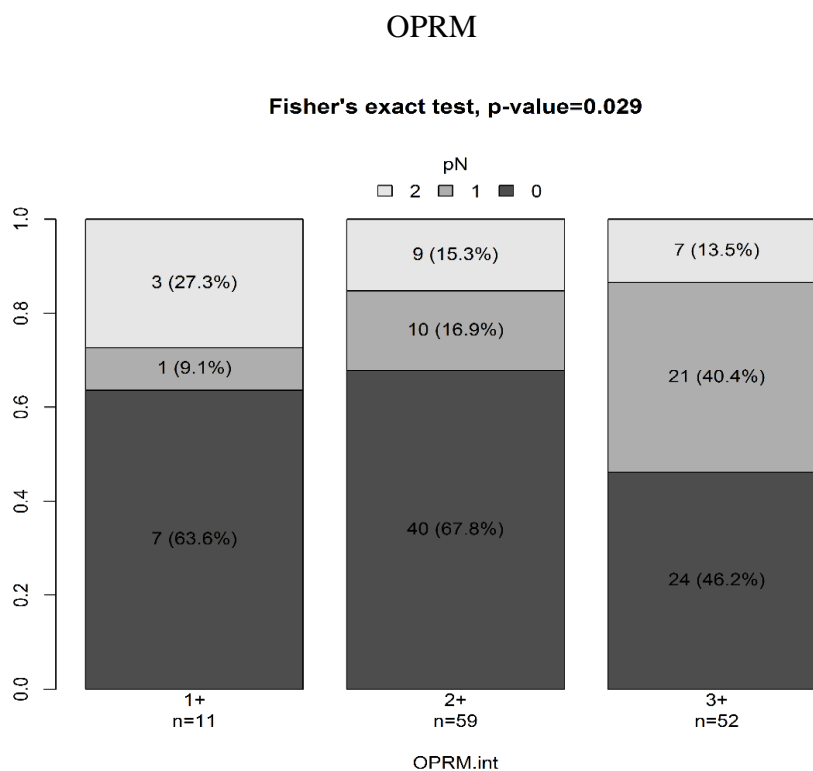
N...celkový počet pozorování v dané kategorii

Events...počet událostí (úmrtí) i s procentuálním vyjádřením

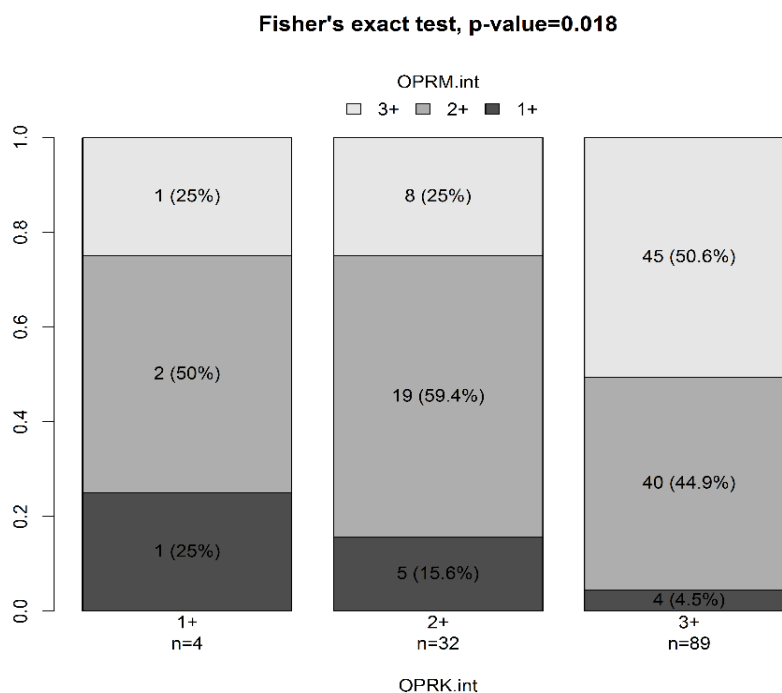
Z **grafu 1** – srovnání distribuce postižení uzlin v podskupinách dle intenzity barvení (Fisherův exaktní test, p-value = 0,029) je patrné, že mezi pacienty se silnou pozitivitou (3+) OPRM je větší zastoupení těch s pozitivními uzlinami, než mezi pacienty se slabou (1+) a střední (2+) pozitivitou OPRM. Z toho vyplývá, že vyšší exprese proteinu OPRM by mohla souviset s počtem postižených lymfatických uzlin, tedy schopností nemoci se rozšiřovat.

Porovnáme-li intenzitu barvení obou receptorů je zřejmé, že s rostoucí pozitivitou jednoho receptoru roste pozitivita receptoru druhého (Fisherův exaktní test, p-value = 0,018), i když více, než polovina vzorků s intenzitou 2+ pro OPRM vykazovala již intenzitu 3+ pro OPRK, viz **Tab. 14 a Graf 2**.

Graf 1: Srovnání distribuce positivity/postižení uzlin vzhledem k expresi (intenzitě zbarvení)



Graf 2: Srovnání distribuce intenzity barvení OPRK vzhledem k pozitivitě OPRM



Tab. 14: Četnost intenzity barvení pro OPRK vs. pro OPRM

		OPRM			
		1+	2+	3+	sum
OPRK	1+	1	2	1	4
	2+	5	19	8	32
	3+	4	40	45	89
	sum	10	61	54	125

Hodnoty exprese OPRM a OPRK byly analyzovány vzhledem k přežívání OS a DFS pomocí log-rank testu a Coxova regresního modelu s adjustací vzhledem ke gradingu, velikosti nádoru, postižení uzlin, stádiu a věku. Jako referenční kategorie byla stanovena intenzita barvení 3+. V rámci univariátní analýzy nebyl zjištěn statisticky významný vliv exprese OPRK na OS (log-rank test, p-value = 0,327), resp. DFS (log-rank test, p-value = 0,531). V případě OPRK je v multivariátním regresním modelu hodnota DFS HR = 0,5, 95%CI = (0.25-1.07), p-value = 0,073 pro kategorii 2+ (tzn. 0,5x menší riziko událostí pro kategorii 2+) vůči referenční kategorii 3+, viz **Tab. 15** a **Graf 3**. Ačkoli jde o nesignifikantní vliv (na hladině 5 %), dalo by se uvažovat o trendu pro kategorii 2+ (vzhledem k 3+ jako referenční kategorii) při hladině 10 %. Pacienti se stejnými faktory (stejným stádiem, postižením uzlin, věkem atd. a „méně pozitivním“ OPRK) by mohli mít lepší DFS. Dále nebyl zjištěn statisticky významný vliv imunohistochemické exprese OPRM na OS ani DFS v našem souboru pacientů (log-rank test, p-value (OS) = 0,771; p-value (DFS) = 0,742).

Tab. 15: Vliv intenzity exprese OPRM na OS (p-value = 0,771) a DFS (p-value = 0,742) testovaný prostřednictvím log-rank testu (p-value) a HR spolu s 95% konfidenčním intervalem z odpovídajícího multivariátního Coxova regresního modelu adjustovaného vzhledem ke gradingu, velikosti nádoru, postižení uzlin, stádiu a věku (vztaženo k referenční kategorii 3+)

Intenzita exprese OPRK	N	Events pro OS	HR (95% CI) pro OS	Events pro DFS	HR (95% CI) pro DFS
3+	97	50 (51.5 %)		55 (56.7 %)	
2+	35	14 (40 %)	0.6 (0.28-1.22)	17 (48.6 %)	0.5 (0.25-1.07) *
1+	4	3 (75 %)	1 (0.22-4.49)	3 (75 %)	0.8 (0.18-3.54)

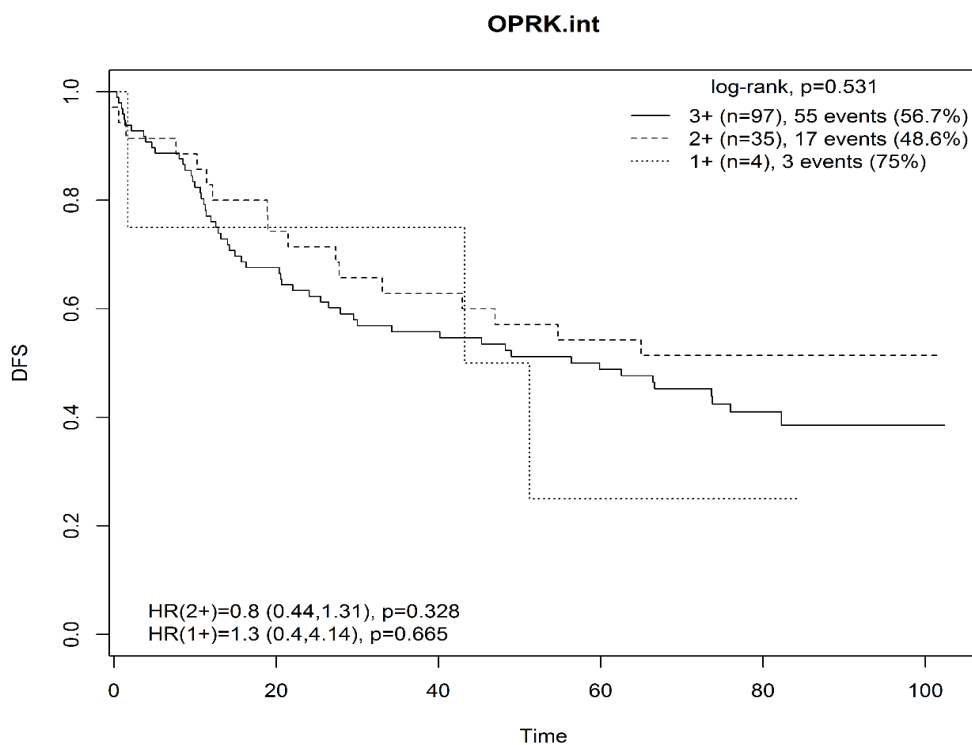
* test významnosti regresního parametru (Waldův test), p-value = 0,073

N...celkový počet pozorování v dané kategorii

Events...počet událostí (úmrtí) i s procentuálním vyjádřením

Events pro OS...počet událostí (úmrtí/relapsů) i s procentuálním vyjádřením

Graf 3: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) DFS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle stupně positivity exprese OPRK v cytoplazmatické membráně nádorových buněk

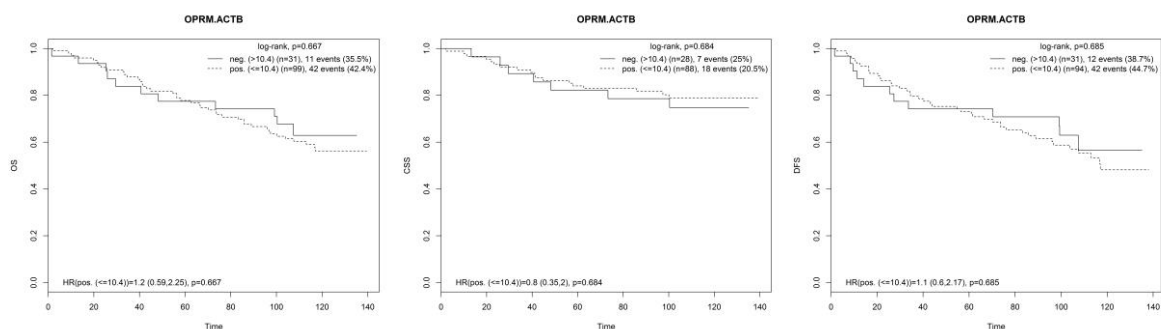


6.2 Reverzně transkriptázová PCR v reálném čase

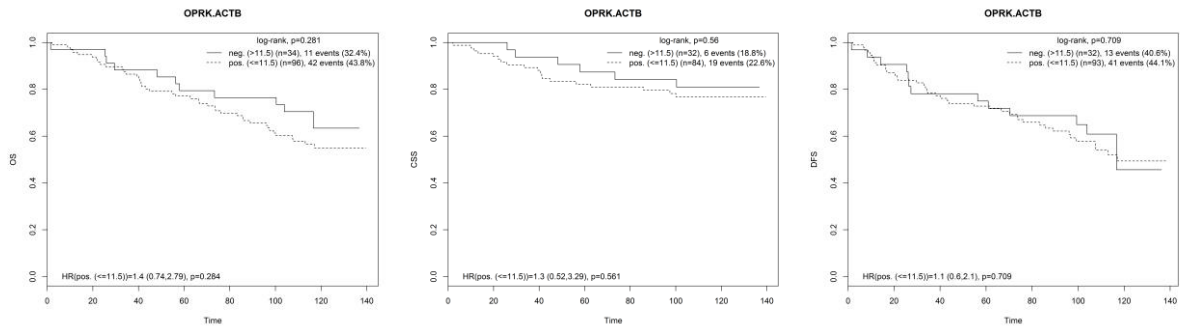
Ze vzorků tkání kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu byla stanovena míra exprese genů OPRK a OPRM (Tab. 4 a Tab. 5). Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými znaky a přežíváním pacientů (OS, DFS, RFS a CSS).

Dle získaných hodnot o expresi OPRM a OPRK ve vzorcích kolorektálního karcinomu, byly vzorky vyhodnoceny jako pozitivní nebo negativní vůči expresi OPRM a OPRK dle stanovených cut-off hodnot, kdy cut off hodnota pro OPRM byla 10,4 a pro OPRK 11,5. Byl vyhodnocen vliv takto kategorizovaných hodnot OPRM a OPRK na přežívání, který se ukázal jako nevýznamný (log-rank test pro OPRM, p-value (OS) = 0,667; p-value (CSS) = 0,684; p-value (DFS) = 0,685), viz Graf 4 – 6, (log-rank test pro OPRK, p-value (OS) = 0,281; p-value (CSS) = 0,56; p-value (DFS) = 0,6709), viz Graf 7 – 9. Dále byla provedena univariátní analýza přežívání u pozitivních pacientů (vzhledem k expresi OPRM a OPRK) dle podané analgezie (morfinové či piritramidové). Pacienti, kterým byla podávána piritramidová analgezie a vykazovali pozitivitu OPRK, mají lepší CSS (p-value = 0,045), než pacienti, kterým byla podávána morfinová analgezie, viz. Graf 10. Nebyl ovšem zjištěn statisticky významný vliv analgezie v souvislosti s pozitivitou exprese OPRM na OS, DFS, ani CSS a ani vliv analgezie v podskupině pozitivních OPRK na OS a DFS v našem souboru pacientů s kolorektálním karcinomem.

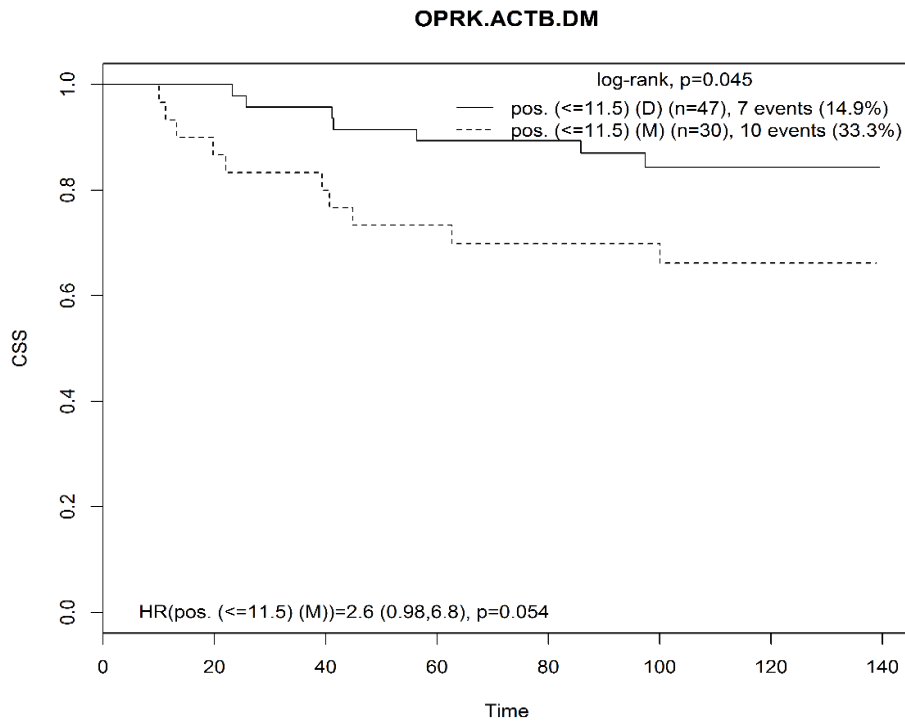
Graf 4 - 6: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) OS, CSS a DFS pacientů dle pozitivivity či negativity vůči expresi OPRM u pacientů s CRC



Graf 7 - 9: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) OS, CSS a DFS pacientů dle positivity či negativity vůči expresi OPRK u pacientů s CRC

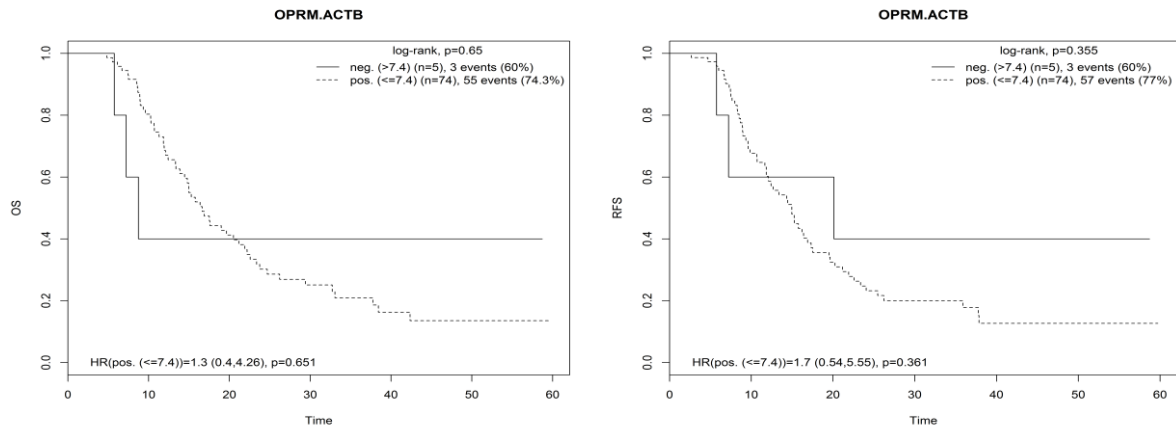


Graf 10: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) CSS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle exprese OPRK a podané analgezie u pacientů s CRC



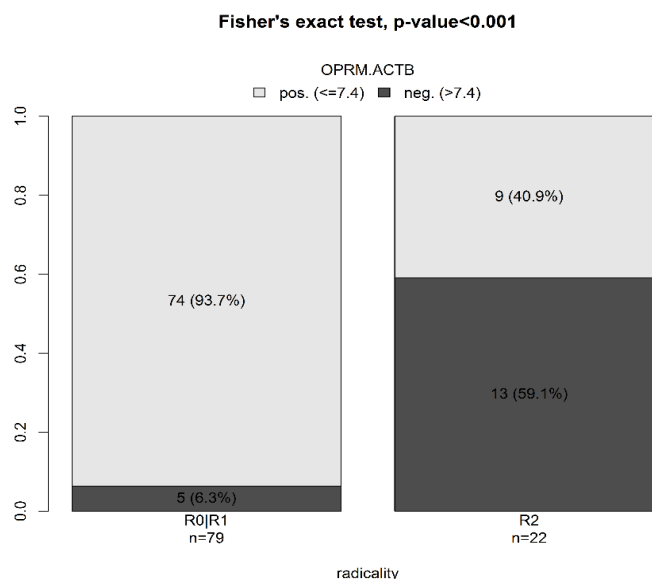
Taktěž pacienti s karcinomem pankreatu byli, dle předem stanovených cut-off hodnot, rozdělení na pozitivní a negativní vůči expresi OPRM a OPRK, kdy cut off hodnota pro OPRM byla 7,4 a pro OPRK 12,6. Byl vyhodnocen vliv takto kategorizovaných hodnot OPRM a OPRK na přežívání. Pro OPRM se ukázal jako nevýznamný (log-rank test pro OPRM, p-value (OS) = 0,65; p-value (RFS) = 0,355), viz **Graf 11** a **Graf 12** a pro OPRK jako významný (log-rank test, p-value (OS) = 0,042; p-value (RFS) = 0,038), viz dále str. 50 - 51, **Graf 17** a **Graf 18**.

Graf 11 - 12: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) OS a RFS pacientů dle positivity či negativity vůči expresi OPRM u pacientů s karcinomem pankreatu

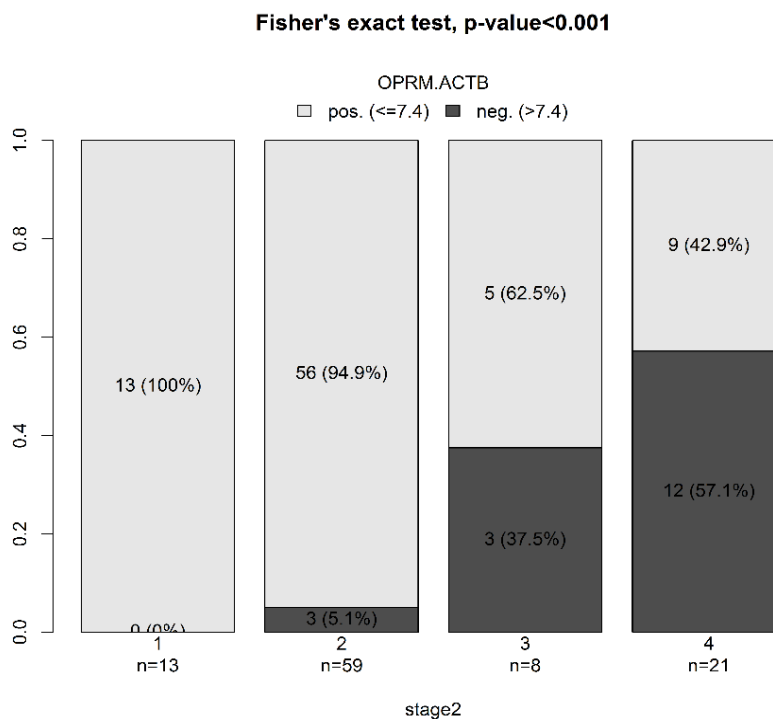


Z **grafu 13** – podílu pozitivních pacientů dle exprese OPRM vzhledem k radikalitě operačního výkonu je patrné, že mezi pacienty, kteří podstoupili chirurgický zákrok s radikalitou 0 a 1 (R0+R1) bylo více než 90 % těch s pozitivní expresí OPRM, zatímco mezi pacienty s radikalitou chirurgického zákroku 2 (R2), byl tento podíl jen necelých 41 % (Fisherův exaktní test, p-value < 0.001). Z toho vyplývá, že mezi operabilními pacienty (radikalita R0+R1) jednoznačně převažují ti s pozitivitou OPRM, zatímco u paliativně léčených pacientů je tento podíl méně než poloviční. Stejně tak klesá signifikantně podíl OPRM pozitivních pacientů se zvyšujícím se stádiem onemocnění (Fisherův exaktní test, p-value < 0.001), viz **Graf 14**.

Graf 13: Podíl pozitivních pacientů dle exprese OPRM vzhledem k radikalitě operačního výkonu (Fisherův exaktní test, p-value < 0.001)

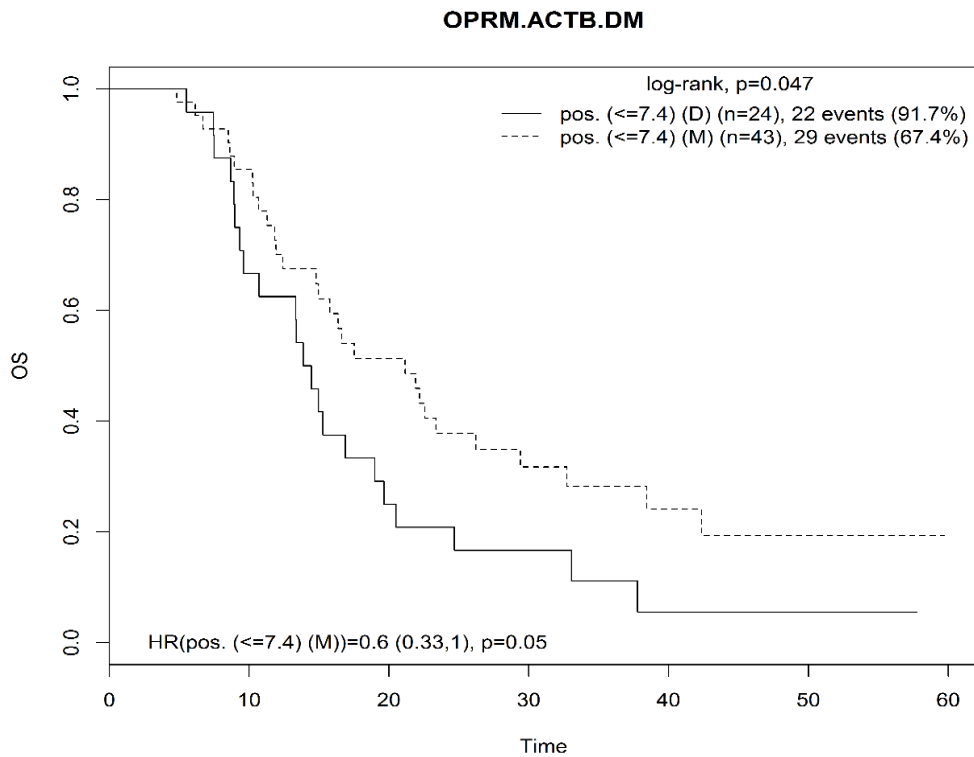


Graf 14: Podíl pozitivních pacientů dle exprese OPRM vzhledem ke stádiu onemocnění
(Fisherův exaktní test, p-value < 0.001)

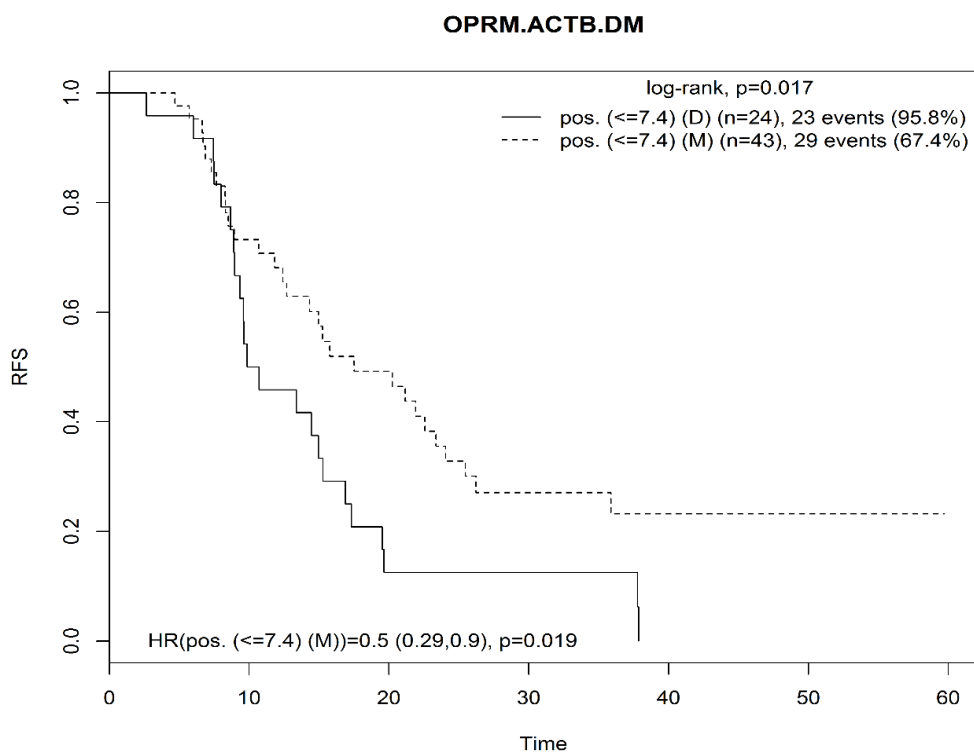


Stejně jako u pacientů s kolorektálním karcinomem, také u pacientů s karcinomem pankreatu byla provedena univariátní analýza přežívání, a to pro podskupinu pacientů operovaných radikálně (R0+R1), s pozitivní expresí OPRM, resp. OPRK vzhledem k podané analgezi (morfinové či piritramidové). Pacienti s pozitivní expresí OPRM, kterým byla podávána morfinová analgezie mají lepší přežívání (p-value (OS) = 0,047; p-value (RFS) = 0,017), než pacienti, kterým byla podávána piritramidová analgezie, viz **Graf 15** a **Graf 16**. Pacientů s negativní expresí OPRM bylo pouze 5, proto nebyl vliv analgezie na přežívání v této podskupině vyšetřován.

Graf 15: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) OS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle exprese OPRM a podané analýzie u pacientů s karcinomem pankreatu

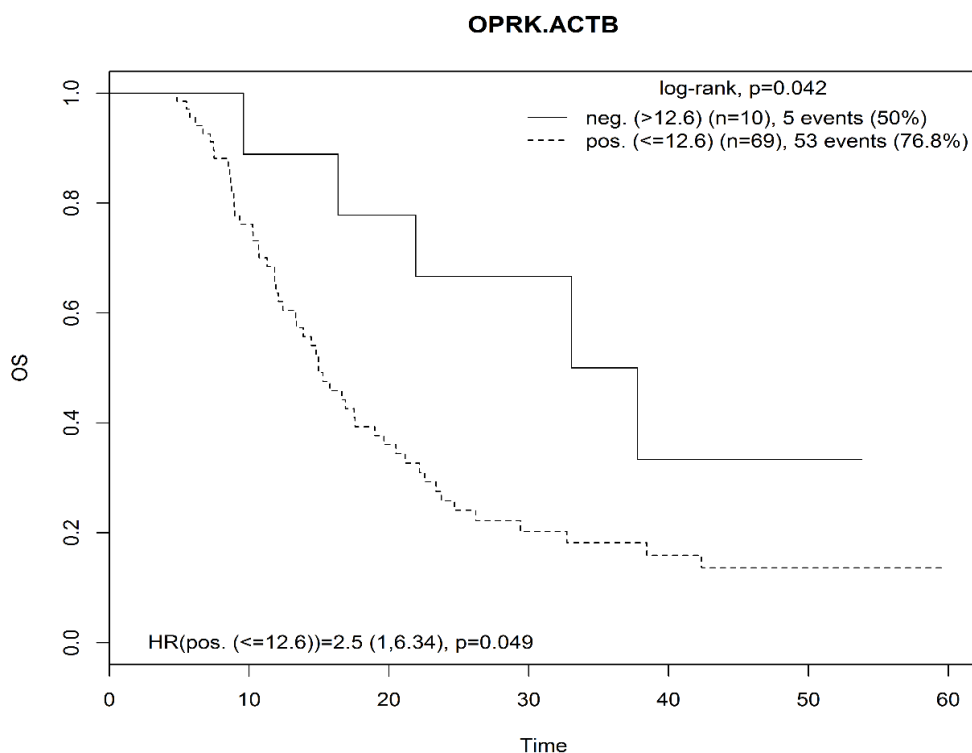


Graf 16: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) RFS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle exprese OPRM a podané analýzie u pacientů s karcinomem pankreatu

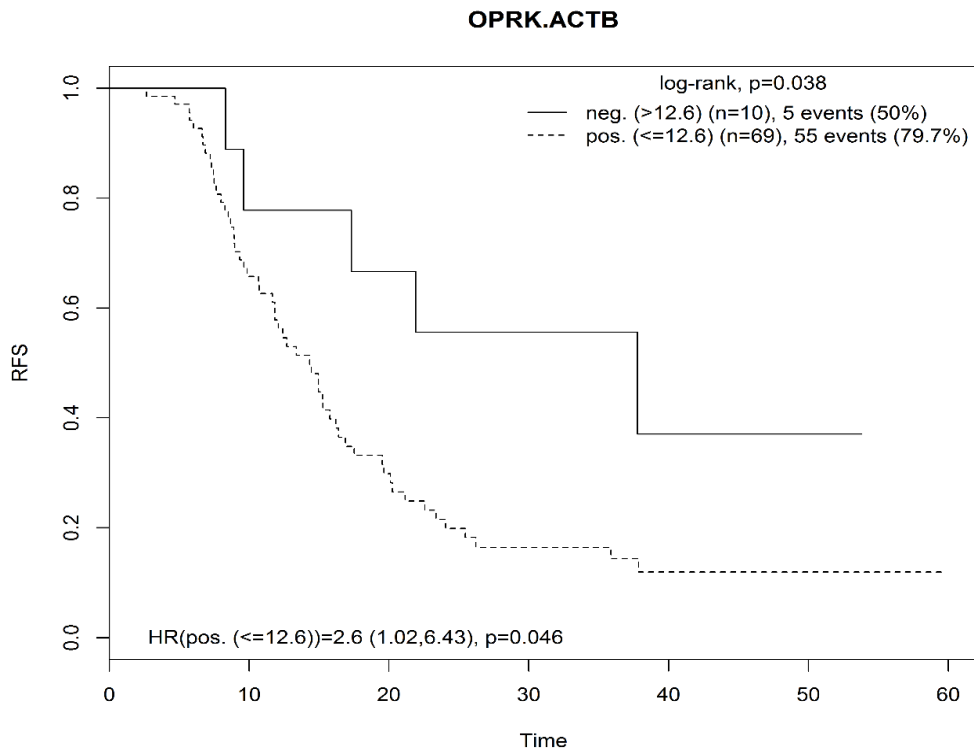


Z univariátní analýzy je vidět, že pacienti s negativní expresí OPRK mají lepší OS a RFS (log-rank test, p-value (OS) = 0,042; p-value (RFS) = 0,038), než pacienti s pozitivní expresí OPRK, viz **Graf 17** a **Graf 18**. Nicméně tato analýza může být ovlivněna malým počtem negativních pacientů, proto by bylo potřeba toto tvrzení ověřit na větším souboru pacientů. Při srovnání pacientů s pozitivní expresí OPRK dle podané analgezie vzhledem k přežívání je zřejmé, že pacienti, kterým byla podávána morfinová analgezie mají lepší OS a RFS (log-rank test, p-value (OS) = 0,026; p-value (RFS) = 0,003), než pacienti, kterým byla podávána piritramidová analgezie, viz **Graf 19** a **Graf 20**. Podobné srovnání pro podskupinu pacientů s negativní expresí OPRK nemá opět z důvodu malého počtu pacientů (10, resp. 9 pacientů s udanou analgezií) význam.

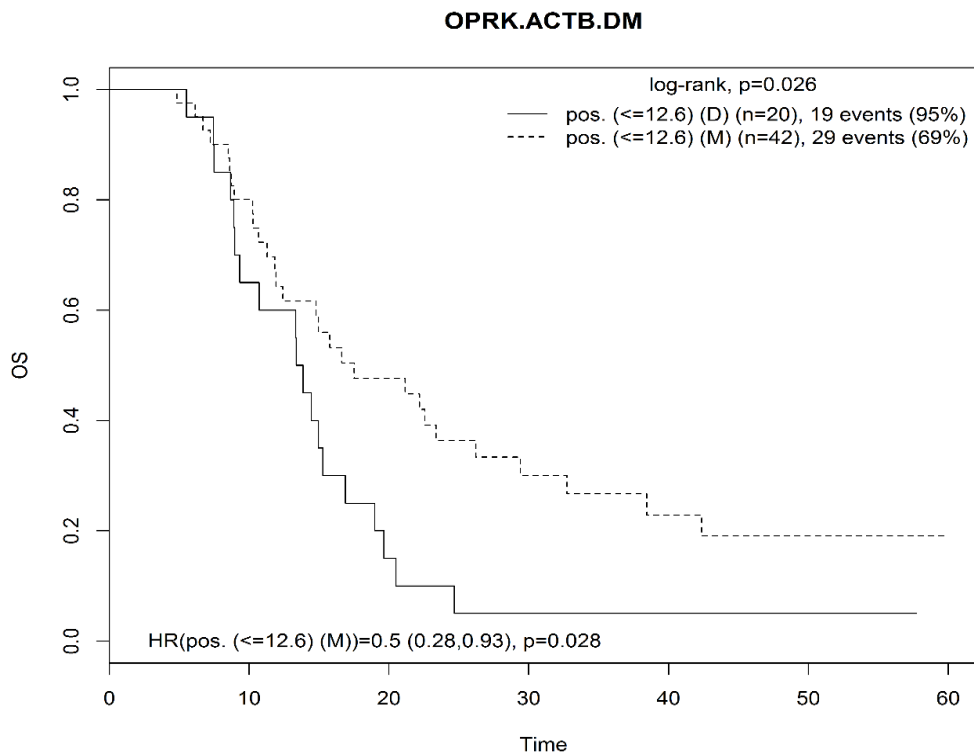
Graf 17: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) OS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle positivity či negativity OPRK u pacientů s karcinomem pankreatu



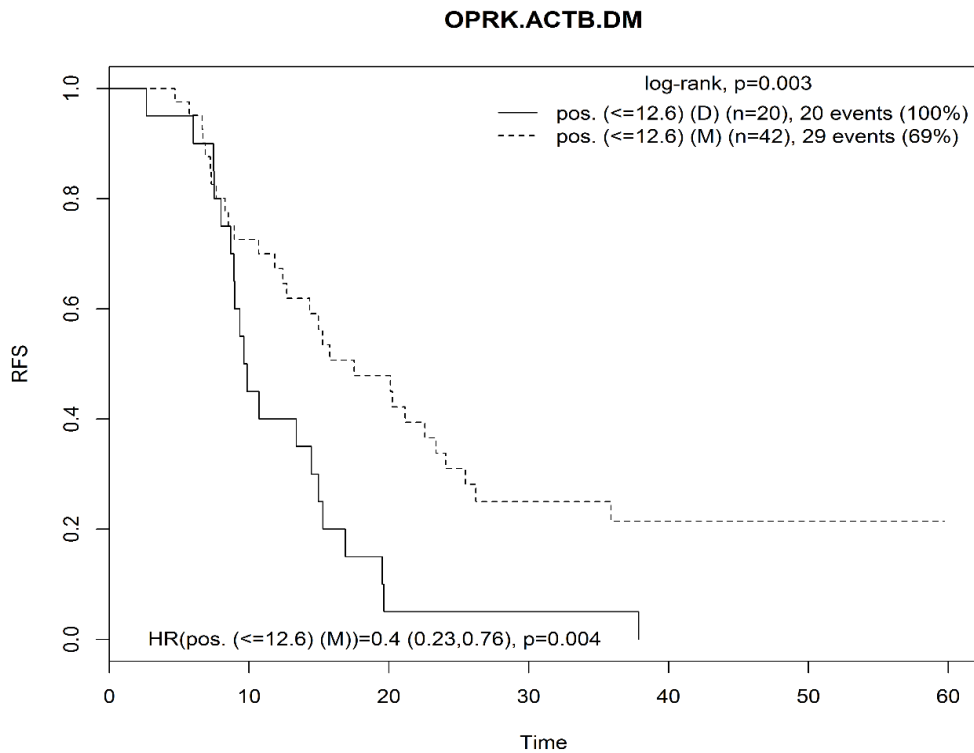
Graf 18: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) DFS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle positivity či negativity OPRK u pacientů s karcinomem pankreatu



Graf 19: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) OS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle exprese OPRK a podané analgezie u pacientů s karcinomem pankreatu



Graf 20: Křivky přežívání (Kaplan-Meierův odhad) DFS a výsledky univariátní analýzy přežívání pacientů dle exprese OPRK a podané analgezie u pacientů s karcinomem pankreatu



Vysvětlivky ke grafům s křivkami přežívání:

n – počet testovaných pacientů

events – počet událostí (úmrť, relapsů) i s procentuálním vyjádřením

D – dipidorol = piritramidová analgezie

M – morfinová analgezie

Osa „y“ – podíl pacientů

Osa „x“ – čas (počet měsíců)

7 DISKUZE

Cílem předkládané diplomové práce bylo detekovat expresi genů OPRM a OPRK pomocí real-time PCR a expresi jejich proteinů pomocí imunohistochemie ve tkáních kolorektálního karcinomu, resp. karcinomu pankreatu. Poté zjistit vliv jednotlivých faktorů, vliv exprese OPRM a OPRK a vliv podané analgezie na přežívání pacientů.

Z výsledků z multivariátní analýzy vyplývá, že pacienti s karcinomem konečnicku (C19-C20) mají horší OS a DFS, než pacienti s karcinomem tlustého střeva (C18). Toto tvrzení však nebylo potvrzeno univariátní analýzou. Ve studii Seigel *et al.* (2014) uvádí, že celkové 5leté přežívání je mírně lepší u karcinomu konečnicku (66,5 %), než u kolorektálního karcinomu (64,2 %). Naopak Lee *et al.* (2013) pozorovali přežívání ve vztahu k histologickému typu a stádiu onemocnění a zjistili, že pacienti s kolorektálním karcinomem a stádiem onemocnění IIB měli o 4 měsíce delší přežívání než pacienti s karcinomem konečnicku ve stejném stádiu. Je velmi pravděpodobné, že rozdíly jsou dány různou strukturou souboru pacientů.

V našem souboru pacientů jsme pozorovali, že stádium a další faktory s ním související (velikost tumoru, postižení uzlin a vzdálené metastázy) jednoznačně ovlivňují přežívání u pacientů s kolorektálním karcinomem. S vyšším stádiem onemocnění souvisí horší OS i DFS. Tyto výsledky jsou v souladu se studii mnoha dalších autorů jako Musil (2003) nebo Oh *et al.* (2007).

Dále jsme zjistili, že vyšší exprese OPRM ve tkáních kolorektálního karcinomu by mohla souviset se šířením nádoru (stádiem onemocnění) a tedy horším přežíváním. Naši hypotézu potvrzuje studie Yao *et al.* (2015), která prokázala kratší OS u pacientů s vyšší expresí OPRM ve tkáních kolorektálního karcinomu. Mimo-to pozorovali vyšší expresi OPRM ve tkáních karcinomu tlustého střeva než karcinomu pankreatu. Také vyšší exprese OPRK ve tkáních kolorektálního karcinomu souvisí s horším DFS. Tomuto faktu odpovídá naše zjištění, že s rostoucí pozitivitou jednoho receptoru signifikantně roste pozitivita receptoru druhého. Vliv exprese OPRK, detekované pomocí imunohistochemie na tkáních kolorektálního karcinomu, na přežívání pacientů, prozatím nebyl publikován v odborné literatuře.

Hlavním cílem metodické části PCR bylo zjistit hladinu exprese genů OPRM a OPRK a vliv morfinové a piritramidové analgezie na přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem pankreatu. Taková rozsáhlá studie, která by srovnávala vliv více druhů analgezie u různých typů nádorů současně, nebyla doposud publikována. Jsou však známy studie, kdy jejich autoři sledovali vliv morfinu a exprese opioidních receptorů na přežívání pacientů (Yang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).

Z výsledných dat vyplývá, že pacienti s kolorektálním karcinomem pozitivní na expresi OPRK, kterým byla podána piritramidová analgezie, mají lepší CSS než pacienti, jimž byla podána analgezie morfinová. Je zajímavé, že u pacientů s karcinomem pankreatu byl prokázán efekt opačný. Tedy pacienti pozitivní na expresi genu OPRK měli lepší OS a RFS po podání morfinové analgezie než po podání analgezie piritramidové.

Rozdílný efekt může být způsoben mírou exprese opioidních receptorů u jednotlivých nádorů, způsobem jejich aktivace, vlivem na signální dráhy řídící nádorovu proliferaci a angiogenezi a v neposlední řadě také možnosti vzájemných interakcí mezi receptory. Toto tvrzení částečně podporuje jiný experiment provedený v naší laboratoři, kdy byla testována aktivita OPRM a OPRK po stimulaci různými opioidy. Zjistili jsme, že morfin aktivuje pouze OPRM, zatímco piritramid pouze OPRK, tudíž by zde mohla významnou roli hrát vzájemná interakce mezi receptory a aktivace obou signálních drah současně.

V mnoha dalších studiích můžeme pozorovat negativní vliv exprese OPRM na přežívání pacientů. Singleton *et al.* (2014) prokázali výrazně zvýšenou expresi OPRM u metastázujících pacientů s karcinomem plic, což souvisí s kratší dobou přežívání a poukazují tak na přímé účinky OPRM v nádorové progresi. Z klinické studie autorů Zylla *et al.* (2013), kteří provedli restrospektivní analýzu pacientů s pokročilým nádorem prostaty, také vyplývá souvislost mezi zvýšenou expresí OPRM a kratším OS a PFS (Progression free survival – přežívání bez progresu). Studie dalších autorů (Afsharimani *et al.*, 2011; Mathew *et al.*, 2011) uvádějí, že μ opioidy stimulují angiogenezi a nádorovou progresi prostřednictvím OPRM receptoru. Gupta *et al.* (2002) pozorovali angiogenní efekt morfinu na karcinom prsu v myším modelu při podávání klinicky relevantních dávek μ opioidů. Angiogenní efekt byl zprostředkovaný aktivní MAP kinázou (mitogen-activated protein kinase), která byla fosforylována pomocí receptorů spřažených s G proteinem. Tyto výsledky ukazují, že klinické použití morfinu by mohlo být škodlivé u pacientů s nádory závislými na angiogenezi. Významnou roli by mohl hrát také typ nádoru a způsob podané analgezie, což prokázal Gupta *et al.* (2011), jež sledovali vztah mezi perioperační analgezií (epidurální nebo intravenózní) a rekurencí kolorektálního karcinomu a získali statisticky významný výsledek pro karcinom konečníku, nikoli pro karcinom tlustého střeva.

Z našich výsledků dále vyplývá, že pacienti s negativní expresí OPRK přežívají bez ohledu na podanou analgezi lépe než pacienti s pozitivní expresí OPRK, což svědčí o tom, že OPRK hraje významnou roli v nádorové progresi, ale na rozdíl od OPRM není prozatím jeho vliv doložen v literatuře.

U pacientů s karcinomem pankreatu jsme také zjistili pokles exprese OPRM s vyšší radikalitou chirurgického výkonu a vyšším stádiem onemocnění. Navíc pacienti pozitivní na expresi OPRM přežívají lépe po podání morfinové analgezie než po podání piritramidu, podobně jako v případě OPRK pozitivity. Jak bylo zmíněno výše, důvodem by mohla být vazba morfinu na OPRM a piritramidu na OPRK, jejich vzájemné interakce a jimi aktivované signální dráhy.

Nicméně, rozdílný efekt může být také způsoben odlišným mechanismem působení morfinu a piritramidu na imunitní systém u různých typů nádorů. U morfinu jsou prokázány přímé účinky, zatímco u piritramidu pouze nepřímé účinky. Koch *et al.* (2005 a 2009) pozorovali mechanismus působení piritramidu na lidských buněčných liniích a zjistili, že ovlivňoval produkci reaktivních forem kyslíku. V případě, že by takto ovlivňoval buňky imunitního systému je velmi pravděpodobné, že by zvyšoval jejich schopnost eliminovat nádorové buňky.

Expresí OPRM a OPRK v kombinaci s typem podané analgezie (ať už morfinové či piritramidové) jednoznačně ovlivňuje přežívání u pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem pankreatu, ačkoli není zatím jasné, jakým mechanismem. Tato zjištění odкрývají řadu otázek a možností dalšího výzkumu. Do budoucna máme v plánu zaměřit se na působení opioidní analgezie v signálních drahách a jejich možné interakce u těchto nádorů. Taková informace by mohla být klíčovým bodem pro anesteziology a pro zlepšení výsledků v onkologické praxi.

8 ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci jsem se zaměřila na detekci exprese genů a proteinů opioidních receptorů μ a κ ve tkáních kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu. Byla sledována korelace mezi celkovým přežíváním (OS) a délkou bezpříznakového období (DFS) s histopatologickými znaky kolorektálního karcinomu a také s expresí detekovaných proteinů. Dále byla sledována exprese těchto proteinů ve tkáních kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu a hodnocena ve vztahu k podané analgezií a jejím možným vlivu na přežívání (OS, DFS, CSS a RFS) pacientů.

V teoretické části jsem zpracovala literární rešerši zaměřenou na problematiku kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu, opioidních receptorů, opioidů používaných jako analgetika a roli opioidů v nádorové progresi.

V experimentální části jsem popsala použité molekulárně-biologické metody, které nám umožnily detekovat expresi již výše zmíněných proteinů.

Z výsledků statistické analýzy, která byla provedena na základě imunohistochemických dat o expresi OPRM a OPRK ve tkáních kolorektálního karcinomu, bylo zjištěno, že OS i DFS je horší u pacientů s karcinomem konečníku než u pacientů s karcinomem tlustého střeva. Také stádium onemocnění a s ním spojené další znaky ovlivňují přežívání pacientů. Byla zjištěna asociace mezi pozitivitou OPRM a OPRK ve tkáních kolorektálního karcinomu. Dále byl pozorován vztah mezi zvýšenou expresí OPRM a vyšším počtem postižených uzlin, a zvýšenou expresí OPRK a horším DFS.

Ze statistické analýzy dat získaných pomocí real-time PCR jasně vyplývá, že exprese opioidních receptorů v kombinaci s typem podané analgezie ovlivňuje přežívání pacientů. Byl prokázán pozitivní vliv piritramidu na CSS u pacientů s kolorektálním karcinomem a pozitivní expresí OPRK. Dále bylo prokázáno, že exprese OPRK bez ohledu na druh podané analgezie negativně ovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu. Nicméně exprese OPRK a OPRM v kombinaci s morfinovou analgezií má pozitivní vliv na délku přežívání u pacientů s karcinomem pankreatu.

Všechny stanovené cíle byly tedy splněny a z naší studie vyplývá, že piritramid je vhodnější analgetikum pro pacienty s kolorektálním karcinomem, zatímco morfin je vhodnější pro pacienty s karcinomem pankreatu. Do budoucna je v plánu další studie vlivu analgetik, jejich působení na opioidní receptory a možné interakce signálních drah, do nichž jsou tyto receptory zapojeny. Tyto informace by mohly být přínosem pro budoucí onkologickou praxi.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- AFSHARIMANI, B., CABOT, P., PARAT, M. O. (2011): Morphine and tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 30: 225 - 238
- AKIL, H., WATSON, S. J. (1994): Cloning of kappa opioid receptors: functional significance and future directions. *Progress in Brain Research.* 100: 81 – 86
- AL-HASANI, R., BRUCHAS, M. R. (2011): Molecular Mechanisms Of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behaviour. *Anesthesiology.* 115: 1363 - 1381
- ARMAGHANY, T., WILSON, J. D., CHU, Q., MILLS, G. (2012): Genetic Alternations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 5: 19 – 27
- BERGERS, G., BENJAMIN, L. E. (2003): Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 401 – 410
- BERMAN, D. M., GILMAN, A. G. (1998): Mammalian RGS Proteins: Barbarians at the Gate. *The Journal of Biological Chemistry.* 273: 1269 - 1272
- BOLAND, C. R., GOEL, A. (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138: 2073 – 2087
- BOS, J. L. (1989): ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682 - 4689
- BOSTICK, R. M., POTTER, J. D., KUSHI, L. H., SELLERS, T. A., STEINMETZ, K. A., MCKENZIE, D. R., GAPSTUR, S. M., FOLSOM, A. R. (1994): Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women. *Cancer Cases & Control.* 5: 38 - 52
- BOURNE, H. R., LANDIS, C. A., MASTERS, S. B. (1989): Hydrolysis of GTP by the α -chain of G_s and other GTP binding proteins. *Proteins: Structure, Funktion, and Bioinformatics.* 6: 215 – 340
- BOVILL, J. G. (2010): Surgery for cancer: Does anesthesia matter? *Anesth Analg.* 110: 1524 – 1526
- BRADBURY, F. A., ZELNIK, J. C., TRAYNOR, J. R. (2009): G protein independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor. *J Neurochem.* 109: 1526 - 1535
- BRINK, M., de GOEIJ, A. F., WEIJENBERG, M. P., ROEMEN, G. M., LENTJES, M. H., PACHEN, M. M., SMITS, K. M., de BRUÏNE, A. P., GOLDBOHM, R. A., van den BRANDT, P. A. (2003). *K-ras* oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis.* 24: 703 – 710

- CAMPBELL, S. L., KHOSRAVI-FAR, R., ROSSMAN, K. L., CLARK, G. J., DER, C. J. (1998): Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 17: 1395 - 1413
- CARMELIET, P. (2005): VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 69: 4 – 10
- CARMELIET, P., BAES, M. (2008): Metabolism and therapeutic angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 358: 2511 – 2512
- CHAVKIN, C., JAMES, I. F., GOLDSTEIN, A. (1982): Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science*. 215: 413 – 415
- CHAVKIN, C., McLAUGHLIN, J. P., CELVER, J.P. (2001): Regulation of Opioid Receptor Function by Chronic Agonist Exposure: Constitutive Activity and Desensitization. *Molecular Pharmacology*. 60: 20 – 25
- CHEN, Y., MESTEK, A., LIU, J., YU, L. (1993): Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem. J.* 295: 625 – 628
- CHRISTOPHERSON, R., JAMES, K. E., TABLEMAN, M., MARSHALL, P., JOHNSON, F. E. (2008): Long-term survival after colon cancer surgery: A variation associated with choice of anesthesia. *Anesth Analg.* 107: 325 – 332
- CLAYTON, C. C., BRUCHAS, M. R., LEE, M. L., CHAVKIN, C. (2010): Phosphorylation of the mu-opioid receptor at tyrosine 166 (Tyr3.51) in the DRY motif reduces agonist efficacy. *Mol Pharmacol.* 77: 339 - 347
- COTTRELL, S., BICKNELL, D., KAKLAMANIS, L., BODMER, W. F. (1992): Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *The Lancet*. 340: 626 – 630
- COWGILL, S. M., MUSCARELLA, P. (2003): The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg.* 186: 279 – 286
- CRESPO, P., LEON, J. (2000): Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1613 - 1636
- CVEJIC, S., TRAPAIIDZE, N. CYR, C., DEVI, L. A. (1996): Thr353, located within the COOH-terminal tail of the delta opiate receptor, is involved in receptor down-regulation. *J Biol Chem.* 271: 4073 - 4076
- DE FILIPPO, C., LUCERI, C., CADERNI, G., PACINI, M., MESSERINI, L., BIGGERI, A., MINI, E., TONELLI, F., CIANCHI, F., DOLARA, P. (2002): Mutations of the APC gene in human sporadic colorectal cancers. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 37: 1048 – 1053

- EKBOM, A., HELMICK, C., ZACK, M., ADAMI, H. O. (1990): Ulcerative colitis and colorectal cancer: A population-based study. *New England Journal of Medicine*. 323: 1228 - 1233
- EVANS, C. J., KEITH D. E. Jr., MORRISON, H., MAGENDZO, K., EDWARDS, R. H. (1992): Cloning of a Delta Receptor by Functional Expression. *Science*. 258: 1952 - 1955
- EXADAKTYLOS, A. K., BUGGY, D. J., MORIARTY, D. C., MASCHA, E., SESSLER, D. I. (2006): Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Anesthesiology*. 105: 660 – 664
- FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759 – 767
- FEARON, E. R. (2011): Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Pathology: Mechanisms of Disease*. 6: 479 – 507
- FENG, Y., HE, X., YANG, Y., CHAO, D., LAZARUS, L. H., XIA, Y. (2012): Current Research on Opioid Receptor Function. *Curr Drug Targets*. 13: 230 – 246
- FERRARA, N. (2009): Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. 29: 789 – 791
- FESINMEYER, M. D., AUSTIN, M. A., LI, C. I., De ROOS, A. J., BOWEN, D. J. (2005): Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14: 1766 - 1773
- FIELDS, H. L. (2011): The Doctor's Dilemma: opiate analgesics and chronic pain. *Neuron*. 69: 591 – 594
- FOLKMAN, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med*. 285: 1182 – 1186
- GACH, K., WYREBSKA, A., FICHNA, J., JANECKA, A. (2011): The role of morphine in regulation of cancer cell growth. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 384: 221 – 230
- GHANEH, P., COSTELLO, E., NEOPTOLEMOS, J. P. (2007): Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*. 56: 1134 – 1152
- GILMAN, A. G. (1995): G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Bioscience Reports*. 15: 65 – 97

- GOTTSCHALK, A., FORD, J. G., REGELIN, C. C., YOU, J., MASCHA, E. J., SESSLER, D. I., DURIEUX, M. E., NEMERGUT, E. C. (2010): Association between epidural analgesia and cancer recurrence after colorectal cancer surgery. *Anesthesiology*. 113: 27 – 34
- GRODEN, J., THLIVERIS, A., SAMOWITZ, W., CARLON, M., GELBERT, L., ALBERTSEN, H., STEVENS, J., SPIRIO, L., ROBERTSON, M., SERGEANT, L., KRAPCHO, K., WOLFF, E., BURT, R., HUGHES, J. P., WARRINGTON, J., MCPHERSON, J., WASMUTH, J., LE PASTIER, D., ABDERRAHIM, H., COHEN, D., LEPPERT, M., WHITE, R. (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 66: 589 – 600
- GUO, J., WU, Y., ZHANG, W., ZHAO, J., DEVI, L. A., PEI, G. MA, L. (2000): Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation. *Mol Pharmacol*. 58: 1050 - 1056
- GUPTA, A., BJORNSSON, A., FREDRIKSSON, M., HALLBÖÖK, O., EINTREI, C. (2011): Reduction in mortality after epidural anaesthesia and analgesia in patients undergoing rectal but not colonic cancer surgery: a retrospective analysis of data from 655 patients in central Sweden. *Br J Anaesth*. 107: 164 - 170
- GUPTA, K., KSHIRSAGAR, S., CHANG, L., SCHWARTZ, R., LAW, P. Y., YEE, D., HEBBEL, R. P. (2002): Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res*. 62: 4491 – 4498
- HOLLINGSWORTH, M. A. (1999): Proteins expressed by pancreatic duct cells and their relatives. *Ann N Y Acad Sci*. 880: 38 – 49
- HRUBAN, R. H., GOGGINS, M., PARSONS, J., KERN, S. E. (2000): Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*. 6: 2969 – 2972
- HRUBAN, R. H., van MANSFELD, A. D., OFFERHAUS, G. J., van WEERING, D. H., ALLISON, D. C., GOODMAN, S. N., KENSLER, T. W., BOSE, K. K., CAMERON, J. L., BOS, J. L. (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. *American Journal of Pathology*. 143: 545 - 554
- HUGHES, J., KOSTERLITZ, H. W. (1983): Opioid Peptides: Introduction. *Brit Med Bull*. 39: 1 - 3

- JEONG, J., PARK, Y. N., PARK, J. S., YOON, D., CHI, H. S., KIM, B. R. (2005): Clinical Significance of p16 Protein Expression Loss and Aberrant p53 Protein Expression in Pancreatic Cancer. *Yonsei Medical Journal*. 46: 519 - 525
- JORDAN, B. A., DEVI, L. A. (1999): G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*. 399: 697 -700
- KASAI, S., IKEDA, K. (2011): Pharmacogenomics of the human μ -opioid receptor. *Pharmacogenomics*. 12: 1305 – 1320
- KERR, D. (2003): Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3: 615 – 622
- KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. (1996): Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*. 87: 159 – 170
- KOCH T., SEIFERT A., WU D. F., RANKOVIC M., KRAUS J., BÖRNER C., BRANDENBURG L. O., SCHRÖDER H., HÖLLT V. (2009) μ -opioid receptor-stimulated synthesis of reactive oxygen species is mediated via phospholipase D2. *Journal of Neurochemistry*. 110: 1288 - 1296
- KOCH T., WIDERA A., BARTZSCH K., SCHULZ S., BRANDENBURG L. O., WUNDRACK N., BEYER A., GRECKSCH G., HÖLLT V. (2005): Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular Pharmacology*. 67: 280 - 287
- KOUHEN, R. E., KOUHEN, O. M., LAW, P. Y., LOH, H. H. (1999): The Absence of a Direct Correlation between the Loss of [D-Ala², MePhe⁴, Gly⁵-ol]Enkephalin Inhibition of Adenylyl Cyclase Activity and Agonist-induced μ -Opioid Receptor Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 9207 - 9215
- Lacobuzio-DONAHUE, C. A., VELCULESCU, V. E., WOLFGANG, C. L., HRUBAN, R. H. (2012): Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. *Clin Cancer Res*. 18: 4257 - 4265
- LANE, D. P., BENCHIMOL, S. (1990): p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev*. 4: 1 - 8
- LAU, E. K., TRESTER-ZEDLITZ, M., TRINIDAD, J. C., KOTOWSKI, S. J., KRUTCHINSKY, A. N., BURLINGAME, A. L., von ZASTROW, M. (2011): Quantitative encoding of the effect of a partial agonist on individual opioid receptors by multisite phosphorylation and threshold detection. *Sci Signal*. 4: 52
- LEE, Y. C., LEE, Y. L., CHUANG, J. P., LEE, J. C. (2013): Differences in Survival between Colon and Rectal Cancer from SEER Data. *PloS One*. 8

- LENNON, F. E., MOSS, J., SINGLETON, P. A. (2012): The μ -Opioid Receptor in Cancer Progression: Is There a Direct Effect? *Anesthesiology*. 116: 940 - 945
- LI, D., JIAO, L. (2003): Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J. Gastrointest Cancer*. 33: 3 – 14
- LI, D., XIE, K., WOLFF, R., ABBRUZZESE, J. L. (2004): Pancreatic cancer. *The Lancet*. 363: 1049 - 1057
- LICHTENSTEIN, D. R., CARR-LOCKE, D. L. (1995): Mucin-secreting tumors of the pancreas. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 5: 237 - 258
- LOWENFELS, A. B., MAISONNEUVE, P. (2006): Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practise & Research Clinical Gastroenterology*. 20: 197 – 209
- MAC GABHANN, F., POPEL, A. (2008): S. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*. 15: 715 – 738
- MAITRA, A., HRUBAN, R. H. (2008): Pancreatic cancer. *Annu. Rev. Pathol*. 3: 157 - 188
- MATHEW, B., LENNON, F. E., SIEGLER, J., MIRCAPOIAZOVA, T., MAMBETSARIEV, N., SAMMANI, S., GERHOLD, L. M., LaRIVIERE, P. J., CHEN, C. T., GARCIA, J. G., SALGIA, R., MOOS, J., SINGLETON, P. A. (2011): The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory investigation. *Anesth Analg*. 112: 558 - 567
- McDONALD, J., LAMBERT, D. G. (2005): Opioid receptors. *Medicine and Health*. 5: 22 – 25
- MEUNIER, J. C., MOLLEREAU, C., TOLL, L., SUAUDEAU, C., MOISAND, C., ALVINERIE, P., BUTOUR, J. L., GUILLEMOT, J. C., FERRARA, P., MONSARRAT, B., MAZARGUIL, H., VASSART, G., PARMENTIER, M., COSTENTIN, J. (1995): Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 377: 532 – 535
- MICHOR, F., IWASA, Y., LENGAUER, C., NOWAK, M. A. (2005): Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 15: 484 – 493
- MIYAKI, M., SEKI, M., OKAMOTO, M., YAMANAKA, Y., MAEDA, Y., TANAKA, K., KIKUCHI, Y., IWAMA, T., IKEUCHI, T., TONOMURA, A., NAKAMURA, Y., WHITE, R., MIKI, Y., UTSUNOMIYA, J., KOIKE, M. (1990): Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Research*. 50: 7166 – 7173
- MIYAKI, M., KUROKI, T. (2003): Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 306: 799 - 804

- MOHAMED, M., SCHOFIELD, J. B. (2014): The pathology of colorectal polyps and cancers (including biopsy). *Surgery*. 32: 165 – 171
- MORIN, P. J., SPARKS, A. B., KORINEK, V., BARKER, N., CLEVERS, H., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 275: 1787 - 1790
- MORRIS, A. J., MALBON, C. C. (1999): Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiological Reviews*. 79: 1373 – 1430
- MOSS, J., ROSOW, C. E. (2008): Development of peripheral opioid antagonists' new insights into opioid effects. *Mayo Clin Proc*. 83: 1116 – 1130
- MUSIL, D. (2003): Populační skrining kolorektálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi*. 3: 126 – 130
- NEER, E. J., CLAPHAM, D. E. (1988): Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*. 333: 129 – 134
- OH, H. S., CHUNG, H. J., KIM, H. K., CHOI, J. S. (2007): Differences in Overall Survival When Colorectal Cancer Patients are Stratified into New TNM Staging Strategy. *Cancer Res Treat*. 39: 61 - 64
- PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C. A., MOTOSHIMA, H., FOX, B. A., TRONG, I. L., TELLER, D. C., OKADA, T., STENKAMP, R. E., YAMAMOTO, M., MIYANO, M. (2000): Crystal Structure of Rhodopsin A G Protein-Coupled Receptor. *Science*. 289: 739 – 745
- PAN, Y. X., XU, J., WAN, B. L., ZUCKERMAN, A., PASTERNAK, G. W. (1998): Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. *FEBS Letters*. 435: 65 – 68
- PASTERNAK, G. W. (2001): Insights into mu opioid pharmacology: The role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sciences*. 68: 2213 – 2219
- PASTERNAK, G. W. (2004): Multiple opiate receptors: déjà vu all over again. *Neuropharmacology*. 47: 312 – 323
- PASTERNAK, G. W. (2010): Molecular insights into μ opioid pharmacology: From the clinic to the bench. *Clin J Pain*. 10: 3 - 9
- PEI, G., KIEFFER, B. L., LEFKOWITZ, R. J., FREEDMAN, N. J. (1995): Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol Pharmacol*. 48: 173 - 177

- PINO, M. S., CHUNG, D. C. (2010): The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 138: 2059 - 2072
- POLAKIS, P. (1997): The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochem Biophys Acta*. 1332: 127 – 147
- REINSCHEID, R. K., NOTHACKER, H. P., BOURSON, A., ARDATI, A., HENNINGSEN, R. A., BUNZOW, J. R., GRANDY, D. K., LANGEN, H., MONSMA, F. J. Fr., CIVELLI, O. (1995): Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science*. 270: 792 - 794
- SAARNE, A. (1969): Clinical evaluation of the new analgesic piritramide. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 13: 11 – 19
- SCHIELDS, J. M., PRUITT, K., McFALL, A., SHAUB, A., DER, C. J. (2000): Understanding ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell. Biol.* 10: 147 – 154
- SCHLAGENHAUFF, B., ELLWANGER, U., BREUNINGER, H., STROEBEL, W., RASSNER, G., GARBE, C. (2000): Prognostic impact of the type of anaesthesia used during the excision of primary cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 10: 165 – 169
- SCHULZ, S., MAYER, D., PFEIFFER, M., STUMM, R., KOCH, T., HÖLLT, V. (2004): Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *EMBO J*. 23: 3283 - 3289
- SIEBER, O. M., HEINIMANN, K., TOMLINSON, I. P. (2003): Genomic instability – the engine of tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 3: 701 – 708
- SIEGEL, R., DeSANTIS, C., JEMAL, A. (2014): Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 64: 104 – 117
- SINGLETON, P. A., LINGEN, M. W., FEKETE, M. J., GARCIA, J. G., MOSS, J. (2006): Methylnaltrexone inhibits opiate and VEGF-induced angiogenesis: Role of receptor transactivation. *Microvasc Res*. 72: 3 – 11
- SINGLETON, P. A., GARCIA, J. G., MOSS, J. (2008): Synergistic effects of methylnaltrexone with 5-fluorouracil and bevacizumab on inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 7: 1669 – 1679
- SINGLETON, P. A., MAMBETSARIEV, N., LENNON, F. E., MATHEW, B., SIEGLER, J. H., MORENO-VINASCO, L., SALGIA, R., MOSS, J., GARCIA, J. G. (2010): Methylnaltrexone potentiates the anti-angiogenic effects of mTOR inhibitors. *J Angiogenesis Res*. 2: 5

- SINGLETON, P. A., MIRCAPOIAZOVA, T., HASINA, R., SALGIA, R., MOOS, J. (2014): Increased μ -opioid receptor expression in metastatic lung cancer. *British Journal of Anaesthesia*. 113: 103 - 108
- SNYDER, G. L., GREENBERG, S. (2010): Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *Br J Anaesth*. 105: 106 – 115
- STEIN, C., CLARK, J. D., OH, U., VASKO, M. R., WILCOX, G. L., OVERLAND, A. C., VANDERAH, T. W., SPENCER, R. H. (2009) Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res Rev*. 60: 90 - 113.
- TAVARE, A. N., PERRY, N. J., BENZONANA, L. L., TAKATA, M., MA, D. (2012): Cancer recurrence after surgery: Direct and indirect effects of anesthetic agents. *Int J Cancer*. 130: 1237 – 1250
- VINCENT, A., HERMAN, J., SCHULICK, R., HRUBAN, R. H., GOGGINS, M. (2011): Pancreatic cancer. *The Lancet*. 378: 607 - 620
- WALDHOER, M., BARTLETT S. E., WHISTLER, J. L. (2004): Opiod Receptors. *Biochemistry*. 73: 953 – 990
- WANG, J. B., JOHNSON, P. S., IMAI, Y., PERSICO, A. M., OZENBERGER, B. A., EPPLER, C. M., UHL, G. R. (1994): cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Letters*. 348: 75 – 79
- WANG, K., QU, X., WANG, Y., SHEN, H., LIU, Q., DU, J. (2015): Effect of mu Agonists on Long-Term Survival and Recurrence in Nonsmall Cell Lung Cancer Patients. *Medicine*. 94: 1333
- WATANABE, T., ITABASHI, M., SHIMADA, Y., TANAKA, S., ITO, Y., AJIOKA, Y., HAMAGUCHI, T., HYODO, I., IGARASHI, M., ISHIDA, H., ISHIGURO, M., KANEMITSU, Y., KOKUDO, N., MURO, K., OCHIAI, A. (2012): Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 17: 1 - 29
- WELDEN, B., GATES, G., MALLARI, R., GARRETT, N. (2009): Effects of anesthetics and analgesics on natural killer cell activity. *AANA J*. 77: 287 – 292
- WIFFEN, P. J., WEE, B., MOORE, R. A. (2016): Oral morphine for cancer pain. *Cochrane Database Syst Rev*. Publikováno online:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003868.pub4/abstract>
- WOLOZIN, B. L., PASTERNAK, G. W. (1981): Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 6181 – 6185

- WOOD, L. D., HRUBAN, R. H. (2012): Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. *Cancer J.* 18: 492 – 501
- YAO, Y., YAO, R., ZHUANG, L., QI, W., LV, J., ZHOU, F., QIU, W., YUE, L. (2015): MOR1 Expression in Gastric Cancer: A Biomarker Associated With Poor Outcome. *CTS.* 8: 137 – 142
- YANG, Y., LI, Y., HUANG, X. E., LU, Y. Y., WU, X. Y. (2011): Exploration of Cancer Pain Treatment by Morphine Infusion through an Embedded Device. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 12: 3151- 3153
- ZAKI, P. A., BILSKY, E. J., VANDERAH, T. W., LAI, J., EVANS, C. J., PORRECA, F. (1996): Opioid Receptor Types and Subtypes: The δ Receptor as a Model. *Annual Reviews.* 36: 379 – 401
- ZALI, H., REZAEI-TAVIRANI, M., AZODI, M. (2011): Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 4: 175 - 185
- ZAVORAL, M., VOJTECHOVA, G., SUCHANEK, S. (2013): Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie.* 4: 172 – 175
- ZHANG, L., ZHAO, H., QIY, Y., LOH, H. H., LAW, P. Y. (2009): Src phosphorylation of micro-receptor is responsible for the receptor switching from an inhibitory to a stimulatory signal. *J Biol Chem.* 284: 1990 – 2000

9.1 Knihy

- DUŠEK L a kol. *Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat.* Praha: Fakultní nemocnice v Motole, 2012. ISBN 978-80-87347-07-2
- SOBIN, L. H., GOSPODAROWICZ, M. K. a WITTEKIND, Ch. *TNM - klasifikace zhoubných novotvarů.* Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2011. ISBN 978-80-904259-6-5

9.2 Použité internetové zdroje

- <http://www.linkos.cz>
- <http://www.wcrf.org>
- <http://www.svod.cz>
- <http://www.globocan.iarc.fr>
- <http://www.cancer.org>
- <http://www.cancer.gov>
- <http://www.hmdb.ca/metabolites>

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
7TM receptor	Sedmi transmembránový receptor
ACTB	Aktin β
APC	Adenomatous polyposis coli
ASA	Americká společnost anesteziologická
CDK4	Cyklin dependentní kináza 4
CDKN2A	Inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A
cDNA	Genomická deoxyribonukleová kyselina
CIN	Chromozomální nestabilita
CRC	Kolorektální karcinom
CSS	Nádorově specifické přežívání
CT	Výpočetní tomografie
CTC	Cirkulující nádorové buňky
DAMGO	Syntetický agonista pro μ opioidní receptor [D-Ala ² N -Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enkefalin
DEPC	Dietylpyrokarbonát - nescifický inhibitor RNáz k ošetření vody
DFS	Délka bezpříznakového období
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
DOR	δ opioidní receptor
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
FQ receptor	Nociceptin/orphanin FQ receptor
GDP	Guanosindifosfát
GPCRs	Receptory spřažené s G proteinem
GRK2	Receptorová kináza spřažená s G proteinem
GTP	Guanosintrifosfát
HR	Odhad rizika
IHC	Imunohistochemie
IPMN	Intraduktální papilární mucinozní neoplazie
KOR	κ opioidní receptor
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog
MA	Morfinová analgezie

MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináz
MCN	Mucinózní cystická neoplazie
MCT	Mucinózní nádory pankreatu
MNTX	Metynaltrexon
MOR	μ opioidní receptor
mRNA	mediátorová RNA
MSI	Mikrosatelitní nestabilita
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Myc	Gen kódující transkripční faktor
NK cells	Natural killer cells
OPRK	Opioidní receptor κ
OPRM	Opioidní receptor μ
ORL	Opioid receptor-like 1
OS	Celkové přežívání
PA	Piritramidová analgezie
PanIN	Pankreatická intraepiteliální neoplazie
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDAC	Duktální adenokarcinomy pankreatu
PFS	Přežívání bez progresse
RAF	Raf kinase
RFS	Přežívání bez relapsu
RGS	Regulators of G protein signaling
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Reverzní transkripce
SMAD4	Gen zapojený do signální dráhy TGF- β
Src	Nereceptorická tyrosinkináza
TGF- β	Transformující růstový faktor β
TMA	Tkáňová mikroarray
TNM	Systém klasifikace stádia nádorových onemocnění
Tp53	Tumor-supresorový gen p53
TSG	Tumor-supresorový gen
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR2	Receptor 2 pro vaskulární endoteliální růstový faktor