

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta



DIZERTAČNÍ PRÁCE

2018

MUDr. Radmila Lemstrová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta



MUDr. Radmila Lemstrová

Studium prediktivních a prognostických markerů

karcinomu pancreatu

Doktorský studijní program: Onkologie

Školitel: Doc. MUDr. Beatrice Mohelníková-Duchoňová, Ph.D.

Olomouc 2018

PALACKY UNIVERSITY OLMOUC

Faculty of Medicine



Radmila Lemstrová, M.D.

Study of predictive and prognostic biomarkers of pancreatic cancer

Doctoral Study Programme in Clinical Oncology

Supervisor: Associate prof. Beatrice Mohelníková-Duchoňová, M.D., Ph.D.

Olomouc 2018

Místopřísežně prohlašuji, že jsem doktorskou dizertační práci na téma „Prediktivní a prognostické markery karcinomu pankreatu“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně tímto dávám souhlas k zařazení své práce do Lékařské knihovny Lékařské fakulty UP v Olomouci, kde může být užívána ke studijním účelům za předpokladu, že v případě použití pro publikační či přednáškové účely bude tento zdroj řádně citován.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze své práce v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, dne 30. 3. 2018

MUDr. Radmila Lemstrová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce doc. MUDr. Beatrici Mohelníkové-Duchoňové za odborné vedení dizertační práce, mnoho cenných rad, které mi v průběhu zpracování poskytla, za velkou pomoc při sběru dat v praktické části této práce a za její nesmírnou trpělivost.

Dále mé poděkování patří všem spolupracovníkům na Onkologické klinice FNOL, kteří mi v průběhu zpracování této práce poskytli svou podporu, především přednostovi onkologické kliniky prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D.

Mé velké díky patří mé rodině, která mě v práci neustále podporovala a trpělivě snášela nedostatek společného času.

Tato práce vychází a úzce souvisí s grantem AZV 16-28375A Ministerstva zdravotnictví České Republiky.

Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
1.1	Karcinom pankreatu.....	9
1.1.1	Etiologie a onkogeneze	10
1.1.2	Terapie a prognóza.....	17
1.2	Postavení taxanů v terapii karcinomu pankreatu	19
1.2.1	Mechanismus účinku	19
1.2.2	Farmakokinetika	20
1.2.3	Formy taxanů	21
1.2.4	Taxany v léčbě PDAC.....	22
1.2.5	Mechanismus chemoresistence nádorových buněk PDAC k léčbě taxany.....	28
1.3	Prognostické a prediktivní biomarkery karcinomu pankreatu	30
1.3.1	Membránové transportéry významné pro terapii karcinomu pankreatu	32
2	CÍLE PRÁCE	35
3	PACIENTI A METODY	37
3.1	Stanovení expresních profilů hlavních signálních drah onkogeneze karcinomu pankreatu	37
3.1.1	Pacienti.....	37
3.1.2	Buněčné linie a xenografty	38
3.1.3	Izolace nukleotidových kyselin.....	39
3.1.4	Stanovení genetických mutací	43
3.1.5	Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR metody	44
3.1.6	Statistická analýza.....	44
3.2	Studium SLC22A3 jako potencionálního rizikového faktoru a prognostického biomarkeru karcinomu pankreatu	45
3.2.1	Pacienti.....	45
3.2.2	Izolace DNA	48
3.2.3	Stanovení genetických polymorfismů.....	48
3.2.4	Statistická analýza.....	49
3.3	Retrospektivní analýza pacientů s karcinomem pankreatu léčených v našem centru	50
3.3.1	Pacienti.....	50
3.3.2	Statistická analýza.....	52
4	VÝSLEDKY	52
4.1	Stanovení expresních profilů hlavních signálních drah onkogeneze karcinomu pankreatu	52
4.1.1	Charakteristika studované populace.....	52
4.1.2	Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR metody	53
4.1.2.1	Expresní profily KRAS a Hedgehog signálních drah v nádorové tkáni PDAC pacientů	53
4.1.2.2	Expresní profily Hedgehog signální dráhy v nádorové tkáni PDAC xenograftů—efekt SB-T-1216 léčby.....	67
4.2	Studium SLC22A3 jako potencionálního rizikového faktoru a prognostického biomarkeru karcinomu pankreatu	70

4.2.1	Asociace SLC22A3 SNPs s rizikem vzniku karcinomu pankreatu.....	70
4.2.2	Asociace SLC22A3 SNPs s celkovým přežíváním pacientů s PDAC	76
4.3	Retrospektivní analýza pacientů s karcinomem pankreatu léčených v našem centru	79
4.3.1	Charakteristika studované populace.....	79
4.3.2	Pacienti s metachronními pulmonálními metastázami.....	83
5	DISKUSE A ZÁVĚR	85
6	REFERENCE.....	92
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	103
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	108
9	PŘÍLOHY	110

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Karcinom pankreatu

Česká republika zaujímá přední místo v incidenci karcinomu pankreatu, která v roce 2012 dosáhla 18 případů na 100 000 obyvatel. Zároveň je toto onemocnění 3. nejčastější příčinou úmrtí na zhoubné nádory. I přes usilovný výzkum, značné pokroky v diagnostice a léčbě zhoubných nemocí, zůstává prognóza karcinomu pankreatu stále infaustní. Jen u 20 % případů je onemocnění zachyceno v časném, operabilním stádiu, jež je prognosticky příznivější. Pacienti v tomto stádiu nemoci dosahují 5letého celkového přežívání 31,5 %. Nicméně 80 % pacientů je diagnostikováno ve stádiu pokročilé choroby, kdy celkové 5leté přežití dosahuje pouze 2,7 %.(1)

Makroskopicky se karcinom pankreatu jeví jako špatně ohraničená žluto-bílá masa v prostředí atrofické tkáně s fibrózou a dilatací pankreatických vývodů. Mikroskopicky se jedná o škálu dobře diferencovaných karcinomů se zachovalou duktální strukturou až po nízece diferencované sarkomatosní karcinomy diagnostikovatelné pouze díky imunohistochemii. 85 % histologických nálezů tvoří infiltrující duktální adenokarcinom (PDAC), který je obecně označován obecným termínem karcinom pankreatu.(2) Skládá se jednak z kompartmentu diferencovaného glandulárního epitelu, tak z kompartmentu nádorových kmenových buněk, které jsou zodpovědné za invazivitu, diseminaci a radiochemorezistenci tohoto nádoru. Kromě toho je karcinom pankreatu charakteristický desmoplastickým stromatem, bohatým na myofibroblasty, lymfocyty a extracelulární kolagen. Toto hypovaskularizované stroma vytváří hypoxické prostředí, potlačuje imunitní odpověď a tvoří bariéru proti průniku cytostatik do nádorových buněk.(3)

1.1.1 Etiologie a onkogeneze

Příčiny vzniku karcinomu pankreatu jsou spojovány jednak s environmentálními riziky, ale rovněž s řadou okupačních rizik a genetických faktorů. Mezi environmentální rizika související s nezdravým životním stylem se řadí např. sedavý způsob života a zvýšený body mass index (BMI), které vedou ke vzniku karcinomu pankreatu.(4) V řadě epidemiologických studií byla rovněž potvrzena významná souvislost mezi diabetem mellitem a karcinomem pankreatu, k jehož karcinogenezi přispívá hyperinsulinémie, hyperglykémie a zvýšená hladina volných mastných kyselin.(5) Dalším nezanedbatelným rizikovým faktorem je zvýšená konzumace alkoholu (více než 60 ml etanolu/den).(6) Toto zvýšené riziko pravděpodobně souvisí s metabolickými pochody, které rovněž vedou ke vzniku alkohol-asociované chronické pankreatitidy. Na podkladě oxidace etanolu alkohol dehydrogenázou a cytochromem P450 E1 vzniká řada toxických metabolitů, jako je acetaldehyd nebo volné kyslíkové radikály. Tyto metabolity způsobují zánětlivé změny jak exokrinní, tak endokrinní složky pankreatu, s uvolněním prozánětlivých mediátorů jako jsou cytokiny, NF- κ B, COX-2, indukující chronickou pankreatitidu. Poškození buněčných organel, genetické mutace a poškození DNA pak přispívá ke vzniku karcinomu pankreatu. Stejně tak osobní anamnéza pankreatitidy byla potvrzena jako významný rizikový faktor vzniku karcinomu pankreatu.(7) Rovněž kouření významně zvyšuje riziko vzniku karcinomu pankreatu, především pokud je ve spojitosti s pozitivní rodinnou anamnézou karcinomu pankreatu anebo s anamnézou diabetu mellitu.(8) Pacienti s periodontální nemocí a ztrátou zubů mají zvýšené riziko karcinomu pankreatu, poukazující na možnou spojitost s orálním mikrobiomem.(9) Nicméně výsledky výzkumu asociace orálního mikrobiomu se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu pankreatu jsou zatím protichůdné.

Z okupačních rizik pro vznik karcinomu pankreatu jsou v popředí především expozice chemikáliím a těžkým kovům v pracovním prostředí, jako je beta-naphthylamin, benzidin, pesticidy, asbest, benzen a chlorované uhlovodíky.(10)

Až u 10 % karcinomu pankreatu je popisována dědičná forma nemoci.(11) Riziko karcinomu pankreatu vzrůstá hlavně u pozitivní rodinné anamnézy karcinomu pankreatu ve věku pod 50 let. Genetický základ této predispozice je většinou neznámý. V 80 % případů pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou není

identifikován genetický podklad, nicméně karcinom pankreatu je spojen s celou řadou dědičných syndromů.(12) Jedná se např. o Peutz-Jeghersův syndrom způsobený zárodečnou mutací *STK11*. Tito jedinci mají zvýšené riziko nejen karcinomu pankreatu, ale rovněž kolorektálního karcinomu. U Familiárního atypického névového syndromu se jedná o zárodečnou mutaci *CDKN2A*. Riziko karcinomu pankreatu je zvýšeno 20-47krát oproti běžné populaci.(13) Typický je začátek nemoci v mladém věku. Lynchův syndrom je nejčastější forma geneticky podmíněného kolorektálního karcinomu. Jedná se o zárodečnou mutaci genů DNA mismatch repair (MMR), a to *LHI, MSH2, MSH6, PMS2*. Tito pacienti mají zvýšené riziko karcinomu pankreatu 9-11krát.(14) Familiární pankreatitida je spojena s mutacemi genů *PRSSI, SPINK1* a *CFTR*. Odhadované riziko vzniku karcinomu pankreatu je zvýšen 26 až 87krát.(15) Nicméně jedna z dominantních mutací identifikovaná u pacientů s hereditárním karcinomem pankreatu je zárodečná mutace genů *BRCA1* a *BRCA2*. Oba dva geny jsou zapojeny do reparačních procesů dvojitého zlomu šroubovice DNA cestou homologní rekombinace. Mutace těchto genů způsobuje akumulaci dvojitého zlomu DNA, jež vede ke genomové instabilitě a maligní transformaci. Zárodečné mutace těchto genů predisponují ke karcinomu prsu, ovariálnímu karcinomu, karcinomu pankreatu, ale rovněž ke karcinomu prostaty. U neselektovaných pacientů s karcinomem pankreatu se tato mutace vyskytuje ve 4-7 %.(16) Pro onemocnění je typický začátek v mladším věku. *BRCA1/2* jsou součástí signální dráhy Fanconiho anémie. Zárodečné mutace dalších genů této dráhy jako např. *PALB2, FANCC* a *FANCG* rovněž zvyšují riziko vzniku karcinomu pankreatu.(17)

Onkogeneze karcinomu pankreatu je složitým a komplexním procesem, kterému je věnován intenzivní výzkum. Díky rozsáhlým genomovým analýzám bylo identifikováno 32 rekurentních genů, které jsou součástí 10 signálních drah aktivovaných u PDAC. Jedná se o signální dráhy KRAS, TGF- β , WNT, NOTCH, ROBO/SLIT, G1/S transici, SWI-SNF, DNA opravy a RNA procesy.(18)

90 % PDAC vykazuje aktivující bodovou mutaci onkogenu *KRAS2* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) na chromosomu 12p, a to hlavně v kodonu 12 a 13. Tato aktivující mutace vede k nepřetržité aktivaci signálních drah, které jsou důležité pro iniciaci, růst a diseminaci nádoru. KRAS signální dráha je velmi

komplexní a dynamická, spojená s dalšími efektorovými dráhami na různých úrovních, které jsou dále napříč propojeny a regulovány zpětnými kličkami.(19) Čtyři hlavní efektorové dráhy nacházející se pod KRAS proteinem (downstream) uváděné u PDAC jsou RAF/MAPK, PI3K/PDK1/AKT, RAL guanine nucleotide exchange factor a RIN1/ABL signální dráha. Aktivace těchto drah způsobuje zvýšenou proliferaci, přežívání nádorových buněk a inhibici apoptózy.(20-23)

Signální dráha TGF- β je iniciována aktivací a uvolněním TGF- β 1. TGF- β 1 je aktivován signály, které vedou k podpoře buněčného růstu a proliferace. TGF- β 1 se váže na receptor TGF β RII, který se nachází na buněčném povrchu. Tento komplex pak reguluje aktivaci Smad signální dráhy. Dochází k fosforylaci Smad2 a 3 proteinů, které společně se Smad4 regulují transkripci. Aktivovaný Smad komplex je translokován do buněčného jádra, kde se váže na DNA sekvence, známé jako Smad vazebné elementy (SBEs). TGF- β může být rovněž aktivována signálními dráhami PI3K/proteinkináza B (AKT), JNK/p38, MAPK a Rho GTPázou. Jedná se o velmi komplexní dráhu, která v případě PDAC hraje dvojí roli. TGF- β má supresivní roli v časných stádiích karcinogeneze, nicméně v pokročilém stádiu získává pro-onkogenní a pro-metastatický charakter, kdy rovněž dochází ke zvýšené sekreci TGF- β . Dochází ke stromální aktivaci a indukcii epiteliálně-mezenchymální transice (EMT), dále ke zvýšené angiogenezi a supresi protinádorové imunitní odpovědi. Navíc je tato dráha významně aktivována u pankreatických kmenových buněk, které jsou charakteristické resistencí k jakýmkoliv modalitám onkologické léčby.(24)

Wnt/ β -katenin signální dráha reguluje buněčnou diferenciaci a proliferaci. Ve zdravých tkáních je inaktivována a β -katenin je degradován. V cytosolu buněk je formován komplex proteinu adenomatózní polypózy tlustého střeva (APC), axinu, kasein kinázy 1 a glykogen syntéza kinázy 3 (GSK3 β). Tento komplex fosforyluje β -katenin, který je tak připraven k ubiquitinaci a degradován v proteasomu. Při aktivaci Wnt signální dráhy se Wnt váže na Frizzled and low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) a LRP6 receptory, čímž dochází k inhibici degradace β -kateninu, který se hromadí v jádru buňky, kde společně s transkripčními faktory T-cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/LEF) způsobí transkripci cílových genů Wnt signální dráhy, jako jsou *c-myc*

a *cyclin D1*, *fibronectin*, *COX 2*, *kyselina retinoová*, *MMP-7*. Wnt signální dráha se řadí k embryonálním signálním drahám, které jsou nutné pro řádnou organogenezi během vývoje plodu. Wnt společně s Hedgehog signální dráhou je zapojena do organogeneze pankreatu. Obě dráhy se navzájem regulují. Aktivace Hedgehog signální dráhy může způsobit aberantní aktivaci Wnt u karcinomu pankreatu. Aktivace, zvýšená transkripce β -katenin cílových genů a zvýšená lokalizace β -kateninu v jádře i v cytoplazmě vede ke zvýšené buněčné proliferaci a inhibici apoptózy.(25)

U karcinomu pankreatu je rovněž aktivována Hedgehog signální dráha. Zvýšená exprese Sonic hedgehog (SHH), secernovaného hedgehog ligandu, je zřejmá jak v PDAC, kde vede ke zvýšené diseminaci nádoru, tak i v jeho prekursorových lézích, jako je intraepiteliální neoplázie. Exprese Hedgehog ligandů není detekovatelná ve zdravé pankreatické tkáni. Hedgehog ligandy se váží na Patched transmembránový protein (PTC), čímž dochází k aktivaci proteinu SMO a transdukci signálu na transkripční regulátory GLI rodiny. Některé práce poukazují na propojenost Hedgehog a KRAS signální dráhy u pankreatických buněčných linií. Onkogen *KRAS2* inhibuje degradaci *GLI* transkripčních faktorů přes MAPK signální dráhu a tím dochází k neustálé aktivaci Hedgehog signální dráhy.(26)

Rovněž signální dráha NOTCH hraje důležitou roli v organogenezi pankreatu. Tato dráha ovlivňuje buněčnou diferenciaci, proliferaci a apoptózu. Jedna z charakteristik Notch dráhy je indukce laterální inhibice, kdy jedna buňka je aktivována k diferenciaci, zatímco ostatní sousedící buňky zůstávají v nediferencovaném stavu, v závislosti na jejich ligandech a mikroprostředí. Při interakci ligandu a receptoru dochází k štěpení Notch proteinů v transmembránové doméně a uvolnění Notch intracelulární domény (Notch-IC). Tato aktivní forma Notch-IC je translokována do nukleu a participuje v neoplastické buněčné transformaci. V pankreatické karcinogenezi Notch signál vede ke zvýšené expresi TGF- α a expanzi nediferencovaných prekursorových buněk. Notch je rovněž aktivován EGF receptorem a vede ke změnám v buněčné diferenciaci. Členové Notch rodiny jsou rovněž různě exprimovány v tkáni karcinomu pankreatu v porovnání se zdravou tkání. Jedná se především o zvýšenou expresi Notch-3 a Notch-4. Notch-3 byl zvýšeně zaznamenán v intratumorálních nervech, což

objasňuje, proč je karcinom pankreatu typický vysokým stupněm neuroinvaze. Notch má rovněž vliv na zvýšenou expresi VEGF a angioinvazi.(27)

Proangiogenní efekt má také signální dráha SLIT/ROBO. Navíc tato dráha podporuje u karcinomu pankreatu diseminaci lymfatickými cestami. Robo geny kódují transmembránový receptor, jehož ligandem je SLIT protein. Tyto proteiny jsou exprimovány především v nervové tkáni, ale i v dalších orgánech. Mají vliv na buněčnou migraci, proliferaci, adhesi a smrt. ROBO receptor patří k superrodině imunoglobulinů. Interakce SLIT/ROBO vede např. aktivaci malých GTPáz jako jsou členové rodiny Rho- RhoA, Rac1 a Cdc42, které jsou hlavními regulátory cytoskeletální remodelace. Dále je aktivována dráha WNT/B-catenin s transkripční catenin target genů. Naopak dochází k inhibici signální dráhy AKT-mTOR. Role této dráhy v tumorigenezi je kontroverzní. Zastává jak kancerogenní signál, tak funguje jako tumor supresor inhibicí buněčné invaze a migrace např. u karcinomu prsu.(28)

G1/S transice je stádiem v buněčném cyklu, kdy buňka přechází z fáze G1, což je fáze růstu do fáze S, kdy dochází k replikaci DNA. Jedná se o kontrolní bod DNA integrity. Při poruchách replikace DNA dochází v tomto bodu k zastavení buněčného cyklu. Během transice buňka buď přechází do klidového stádia G0, nebo se diferencuje. Probíhají DNA opravy a buňka dále proliferuje. Při poruše regulace tohoto kontrolního bodu dochází k buněčné transformaci v maligní buňku. Během transice Cyklin dependentní kinázy 4 a 6 (CDK 4/6) fosforylují Rb protein (retinoblastoma protein) a uvolní transkripční factor E2F, který spouští transici z G1 do S fáze. Negativními regulátory G1/S transice jsou tumor supresorové geny jako p53 a p16. Pokud buňka projde transicí z G1 do S fáze, pak dochází k jejímu dělení bez ohledu na další mitogenní faktory. Inhibitor cyclin dependentní kinázy 2A (*CDKN2A*) je gen přítomný v mnoha tkáních a buněčných typech. Tento gen kóduje protein p16, který inhibuje CDK4 a CDK6, čímž blokuje transici z G1 do S fáze. Dále kóduje p14ARF, který aktivuje p53. Somatické mutace *CDKN2A* jsou běžné u většiny lidských nádorů. Odhaduje se, že *CDKN2A* je druhý nejčastější inaktivovaný gen po p53.(29)

V onkogenezi karcinomu pankreatu hrají důležitou roli i mechanismy remodelace chromatinu. Jedná se např. o SWI/SNF, což je nukleosom remodelující komplex. Tento komplex vykazuje ATP-ázovou aktivitu a může destabilizovat histon-DNA interakci v rekonstituovaném nukleosomu a regulovat transkripci genů důležitých pro buněčnou diferenciaci a růst. SWI/SNF komplex se skládá ze 2 hlavních podjednotek BRM a BRG1. Jejich exprese a roli jako tumor supresorového genu je věnován rozsáhlý výzkum.(30)

Karcinom pankreatu se vyznačuje mutacemi genů, které jsou součástí opravy DNA - DNA damage repair (DDR). Zárodečné mutace některých DDR genů jako jsou *BRCA1*, *BRCA 2*, *PALB 2*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2* a *MSH 6* jsou spojeny se zvýšenou predispozicí k PDAC. Defekt v DDR vede ke genetickým alteracím, které aktivují onkogeny a eliminují tumor supresory. U PDAC je nacházena spojitost mezi *BRCA 1/2* mutací, *KRAS* mutací a deficiencí p 53. Dochází ke genomické instabilitě a potenciální terapeutické resistenci. Přibližně 24 % PDAC splňuje kritéria defektní DDR. Nicméně nádory s mutací *BRCA 1/2* a poruchou homologní rekombinace jsou zvýšeně senzitivní k agens poškozující DNA, jako jsou alkylační látky a platinové deriváty. Novou možností v léčbě těchto nádorů se jeví PARP inhibitory, blokující opravu DNA pomocí base excision repair.(31)

V neposlední řadě mají důležitou roli v onkogenezi PDAC nekódující RNA. Jsou to RNA molekuly, které se účastní translace, DNA replikace, RNA splicing a epigenetické regulace. Nejsou translatovány do proteinů. Řadí se k nim transfer RNA (tRNA), ribozomální RNA (rRNA), small interfering RNA (siRNA), Piwi interacting RNA (piRNA), microRNA (miRNA), Y-RNA a small Cajal body specific RNA (scaRNA). Tyto RNA regulují genovou expresi a DNA replikaci. Jejich 5 x více než kódujících RNA. Nekódující RNA mohou být transkribovány do intergenetických regionů nebo regionů zasahujících do genů kódujících proteiny. Mutace v nekódujících RNA vedou k rozvoji neoplázie stejně jako mutace kódujících genů.(32)

Rozsáhlé expresní analýzy umožnily nejen nový pohled na karcinogenezi pankreatu, ale rovněž pochopení karcinomu pankreatu jako heterogenního onemocnění. Na podkladě výskytu jednotlivých mutací byly definovány 4

molekulární subtypy PDAC, které také korelují s histopatologickou charakteristikou nádoru. Prvním molekulárním subtypem je squamózní PDAC, charakteristický mutacemi TP53 a KDM6, upregulací TP63, hypermetylací pankreatických endodermálních cell-fate genů. Celkově se jedná o genetickou síť, která je důležitá pro zánětlivou odpověď, reakci na hypoxii, metabolické přeprogramování, aktivaci TGF- β signální dráhy, MYC a autofagii. Vysoká exprese TP63 spolu s mutací TP 53 podporuje mezenchymální transformaci nádoru. Kromě toho tento subtyp nádoru je spojen s downregulací genů, které řídí pankreatickou endodermální diferenciaci (např. PDX1, MNX1, GATA6, HNF1B), což vede ke ztrátě endodermální identity nádoru. Prognóza squamózního subtypu nádoru je velmi nepříznivá, stejně jako u histologie squamózního karcinomu pankreatu, proto tedy i stejný název. Druhým subtypem je pankreatický progenitorový PDAC. Tento subtyp má především zvýšenou expresi genů, které hrají roli ve vývoji pankreatu a geny pro metabolismus nádorové buňky. Z genů důležitých ve vývoji pankreatu se jedná o transkripční faktory *FOXA2/3*, *PDX 1* a *MNX1*. Co se týká metabolismu nádorové buňky, jsou to především genetické programy regulující oxidaci mastných kyselin, biosyntézu steroidů, metabolismus léčiv a glykosylaci mucinů. Progenitorový molekulární subtyp PDAC je charakteristický co-exprimací apomucinů MUC5AC a MUC1, které mohou sloužit jako biomarkery tohoto subtypu. Třetím subtypem je imunogenní PDAC s upregulací imunitních drah účastnících se získané imunitní suprese. V mnohém se podobá progenitorovému subtypu, je však spojen se značným imunitním infiltrátem. Genová exprese souvisí se signální dráhou B buněk, buněk prezentujících antigen, CD4 T buněk, CD8 T buněk a Toll like receptorů. Predominantní expresní profily se vztahují hlavně na infiltrující B a T lymfocyty, jak cytotoxické tak regulující. Upregulace CTLA4 a PD1 může být potenciálním cílem pro léčbu novými imunomodulátory, které zatím u karcinomu pankreatu neprokázaly účinnost. Čtvrtým subtypem je aberantně diferencovaný endokrinní exokrinní nádor (ADEX). Tento subtyp nádoru vykazuje upregulaci genů, které jsou důležité v pozdějších stádiích pankreatického vývoje a diferenciaci. Regulují KRAS aktivaci, exokrinní (NR5A2 a RBPJL) a endokrinní diferenciaci (NEUROD1 a NKX2-2).(18)

1.1.2 Terapie a prognóza

Jediným kurativním přístupem v léčbě PDAC je radikální resekce. Pacienti jsou indikováni k radikální resekci, pokud dle zobrazovacích metod není potvrzena přítomnost vzdálených metastáz, nedochází k šíření tumoru do truncus coeliacus a není postižena arteria mesenterica superior. Základní radikální operací karcinomu hlavy pankreatu je hemipankreatoduodenektomie odvozená od operace podle Whipple-Kausche, pylorus zachovávající varianta pak podle Traverso-Longmire. Operačně je resekován pravý oddíl pankreatu s duodenem a krátkým orálním úsekem jejunu, žlučníkem a ductus choledochus při zachování těla a ocasu slinivky, v případě Whippleovy operace i antrum žaludku. Součástí výkonu je odpovídající lymfadenektomie a nově i resekce mesopankreatu (tuková tkáň s lymfatiky a nervovými pleteněmi kolem arteria mesenterica superior a truncus coeliacus). Další možností operačního výkonu je v případě centrální lokalizace, difúzního či multilokulárního tumoru totální pankreatektomie s lymfadenektomií. Tento výkon je ovšem zatížen okamžitým vznikem diabetu mellitu při kompletní endokrinní a exokrinní insuficienci. U tumorů v levé části pankreatu je možno provést distální pankreatektomii se splenektomií a lymfadenektomií. Operační mortalita karcinomu pankreatu se pohybuje mezi 1-16 %.(33) Operační léčbu však podstupuje jen kolem 20 % nemocných vzhledem k pozdní diagnostice a celkovému stavu nemocných.(34)

Pooperačně je indikována adjuvantní chemoterapie na bázi nukleosidových analog, jako je gemcitabin a 5-fluorouracil v monoterapii. Adjuvantní chemoterapie prodlužuje medián celkového přežití pacientů o několik měsíců.(35) Postavení radioterapie v adjuvantní léčbě není zcela jednoznačné. Výsledky studií s adjuvantní radioterapií jsou protichůdné. Nicméně ve studiích byly hodnoceny jak různé techniky prováděné radioterapie, tak celkové ložiskové dávky, které v řadě studií nedosahovaly dostatečné intenzity. V současné době se upřednostňuje adjuvantní radioterapie především u nádorů s mikroskopicky pozitivními resekčními okraji.(36)

Neoadjuvantní léčba je podávána v rámci potenciálně resekabilního onemocnění s cílem zvýšení pravděpodobnosti dosažení R0 resekce, to je negativních resekčních okrajů. Jednotlivé chemoterapeutické režimy s nebo bez

kombinace s radioterapií jsou nyní předmětem probíhajících klinických studií. Standardní neoadjuvantní režim dosud nebyl stanoven. Nicméně i přes tuto radikální onkologickou terapii se u většiny pacientů rozvine recidiva nemoci do 2 let.(37) Navíc 80 % pacientů přichází ve stádiu inoperabilní nebo metastatické nemoci, vyžadující systémovou terapii, jejíž možnosti jsou zatím velmi omezené.(38)

Základem systémové léčby jsou opět nukleosidová analoga podávána buď v monoterapii nebo v kombinačních režimech. Gemcitabin v první linii paliativní terapie metastatického PDAC prodloužil celkové přežívání pacientů o 3 měsíce oproti placebo, a dosáhl mediánu celkového přežívání 6 měsíců.(39) Zvýšení účinnosti léčby první linie přinesl až kombinovaný režim FOLFIRINOX (oxaliplatina, irinotekan, a 5-fluorouracil). Nicméně medián celkového přežití pacientů s inoperabilním, či metastatickým karcinomem pankreatu dosahuje stále pouze 11 měsíců za cenu podstatného navýšení toxicity.(40)

FOLFIRINOX je spojen především s četnější hematologickou toxicitou grade 3 a 4, včetně febrilní neutropenie, s diareou a periferní senzickou neuropatií. Vzhledem k toxicitě je proto považován především za režim vhodný pro mladší pacienty, v dobrém výkonnostním stavu (ECOG 0-1), bez vážnějších komorbidit a s fyziologickou hladinou bilirubinu. Druhým kombinačním režimem, který přináší zvýšení účinnosti paliativní terapie první linie je kombinace poměrně nového agens nab-paklitaxelu a gemcitabinu. Nab-paklitaxel je paklitaxel vázaný na nanočástici albuminu. Vazba paklitaxelu na nanočástici albuminu vede k transcytóze pomocí albumin-specifického receptoru, a tím k vyšším koncentracím tohoto cytostatika v nádorové tkáni. K vyšší koncentraci cytostatika v nádorové tkáni rovněž přispívá vazba nab-paklitaxelu na SPARC proteiny (secreted protein acidic and rich in cysteine), vyskytující se v mikroprostředí nádorových buněk. Kombinace nab-paklitaxel a gemcitabin vede k prodloužení celkového přežívání pacientů o 1,8 měsíce (medián OS 8.5 vs. 6,7 měsíců) a zvyšuje odpověď na léčbu ORR (23 % vs. 7 %) oproti monoterapii gemcitabinem. Léčba je dobře tolerována a nejčastějším typem toxicity grade 3/4 je hematologická toxicita, především neutropenie.(41)

1.2 Postavení taxanů v terapii karcinomu pankreatu

1.2.1 Mechanismus účinku

Taxany patří mezi protinádorová léčiva poškozující funkci mikrotubulů cytoskeletu jejich zvýšenou stabilizací s následným zastavením mitózy. Hlavní sloučeniny používané v klinické praxi jsou paklitaxel a docetaxel. Paklitaxel byl poprvé izolován z kůry tisu *Taxus brevifolia* v roce 1962. Jeho protinádorová aktivita byla prokázána v práci autorů Horvitz et al. v roce 1969. O 20 let později byl syntetizován z jehličí *Taxus baccata* L analog paklitaxelu – docetaxel, který má shodnou protinádorovou aktivitu jako paklitaxel, potvrzenou v řadě prací.(42)

Taxany se s vysokou afinitou reversibilně vážou na β podjednotky tubulinu a podporují jejich polymerizaci. Výsledný mikrotubulinový polymer je velmi stabilní a odolný vůči depolymerizaci. Tato inhibice mikrotubulinové dynamiky způsobuje poruchy mitotických funkcí jako je např. tvorba mitotického vřeténka nebo segregace chromosomů, což vede k mitotickému bloku a zástavě buněčného cyklu ve fázi G2/M s vyvoláním následné apoptózy. Přesný mechanismus taxany indukované apoptózy ještě nebyl zcela objasněn. Je zřejmé, že se na něm podílí jak vnější (extrinická) signální dráha aktivací TNF α , tak vnitřní (intrinická) signální dráha aktivací p53. Styčným bodem obou drah je Bcl-2/Bax rheostat. Taxany stimulují Raf-1 kinázu, která aktivuje RAS protein, což je centrální komponenta signální dráhy mitogen aktivované protein kinázy (MAP kináza). Aktivace Raf-1 kinázy vede k fosforylaci Bcl-2, který ztrácí antiapoptotickou funkci.(43)

Navíc aktivace Raf-1 kinázy způsobuje akumulaci cyklinového inhibitoru p21, který hraje důležitou roli v intrinické dráze apoptózy. Existují rovněž důkazy poukazující na podíl dalších drah indukujících buněčnou smrt, jako je např. NFkB/kB signální dráha, která může být aktivována paklitaxelem. Je zřejmé, že ačkoliv nebyly zcela objasněny veškeré detailní mechanismy cytotoxicity taxanů, jedná se o velmi komplexní proces.(44)

1.2.2 Farmakokinetika

Taxany používané v klinické praxi jsou podávány intravenózně. Farmakokinetické studie prokázaly vysokou vazebnou kapacitu taxanů (více než 90 %) na plasmatické proteiny, včetně lipoproteinů, alfa-1-glykoproteinů a albuminu.(45) Paklitaxel a docetaxel jsou hydrofobní sloučeniny, které difundují přes buněčnou membránu. Nicméně existují důkazy o průniku taxanů do buňky pomocí solubilních membránových transportérů (SLCs). SLC21A8 (OATP1B3/SLCO1B3; OMIM: 605495) byl identifikován jako nejefektivnější transportér pro docetaxel a hlavní regulátor jeho absorpce v játrech.(46) SLC22A7 (OAT2; OMIM: 604995) prokázal svou aktivitu v *in vitro* experimentech jako hlavní transportér paklitaxelu.(47) Vylučování taxanů z buňky je regulováno řadou membránových transportérů nadrodiny ATP-binding cassette transporters (ABCs), včetně proteinů spojovaných s mnohočetnou lékovou rezistencí (MDR1/ABCB1, MDR3/ABCB4, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, MRP7/ABCC10, ABCG2).(48, 49)

Taxany jsou metabolizovány v játrech cytochromem P450, především podrodinami izoenzymů CYP2C8, CYP3A4 a CYP3A.(50) Eliminace taxanů probíhá z větší části exkrecí do žluče. Exkrece močí tvoří jen 5 % celkové eliminace.(51) Clearance taxanů se pohybuje mezi 87 a 503 ml/min/m². K signifikantnímu snížení clearance taxanů dochází věkem, zvýšením hladiny alfa-1-kyselých glykoproteinů, zvýšenou koncentrací albuminu a zvýšenou aktivitou jaterních enzymů. Clearance taxanů je rovněž úměrná ploše tělesného povrchu.

Synergický efekt taxanů a jiných cytotoxických látek je dobře znám. Jedná se především o kombinaci taxanů a nukleosidových analog. Paklitaxel inhibuje cytidin deaminázu, což je enzym katalyzující deaminaci gemcitabinu a tím i jeho degradaci. Podání paklitaxelu v kombinaci s gemcitabinem tedy může zvyšovat akumulaci gemcitabinu intratumorálně.(52) Navíc taxany zvyšují hladinu tymidinfosforylázy, což je enzym důležitý pro konverzi kapecitabinu na aktivní metabolit 5-fluorouracil. Tento synergismus tvoří teoretický základ pro kombinaci taxanu a nukleosidových analog v režimu GTX (gemcitabin, docetaxel, kapecitabin), jehož účinnost byla studována v léčbě PDAC a je detailně popsána níže.(53)

1.2.3 Formy taxanů

Jelikož paklitaxel má velmi omezenou rozpustnost ve vodě, byl vyvinut polyoxyethylenový ricinový olej (Cremaphor) k intravenózní aplikaci (Cremaphor; Taxol, Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA). Docetaxel (Taxotere, RP 56976, NSC 62850) je k dispozici jako koncentrát v rozpouštědle polysorbátu 80, a může být kombinován jak s fyziologickým roztokem, tak s 5% glukózou. Obě rozpouštědla, polyethylovaný ricinový olej i polysorbát 80, přispívají k toxicitě ve formě alergických infusních reakcí při aplikaci paklitaxelu i docetaxelu.(54) Zdá se, že vlivem rozpouštědel může rovněž dojít k vytvoření micel v plasmatickém kompartmentu pacienta, které obklopí aktivní látku a změní tak její farmakokinetiku včetně protinádorové aktivity.(55)

Z výše popsaných důvodů byly navrženy nové strategie pro intravenosní aplikaci taxanů, které by vedly ke zmírnění toxicity a zvýšení jejich protinádorové aktivity, na podkladě změn farmakokinetických vlastností taxanů. Mezi tyto strategie řadí vazba taxanů na nosiče, jako např. nanočástice albuminu a liposomy, či jejich emulgace.

Paklitaxel vázaný na nanočástici albuminu (nab-paklitaxel) může být jednoduše ředěn prostým fyziologickým roztokem. Nanočástice albumin vázaného paklitaxelu (nab-paclitaxel; ABI 007 nebo Abraxane®; Celgene Inc, Odenton, MD) jsou koloidní suspenzí, která je připravena homogenizací lidského sérového albuminu v podobné koncentraci jako je koncentrace albuminu v krvi (3 % – 4 %). Vyšší účinnost této látky je spojena s vyšší koncentrací v tumorózní tkáni, což je umožněno následujícími mechanismy:

1. transcytózou závislou na albumin-specifických receptorech,
2. zvýšenou perfuzí taxanů do nádorové tkáně a jejich retencí v nádorové tkáni,
3. vazbou na SPARC proteiny (secreted protein acidic and rich in cysteine) ve stromatu tumoru.

Nab-paclitaxel se váže na albumin specifické receptory buněčné membrány, které podporují transcytózu nab-paklitaxelu endotelem do intersticiálního prostoru

nádorových buněk. Zde je vázán na SPARC proteiny a dále difunduje do nádorové buňky.(56)

V polymerických micelách (Genexol-PM) je paklitaxel obklopen polymery, které se skládají z vnitřní hydrofobní a vnější hydrofilní části.(57) V kationtových liposomech, Endo-Tag paklitaxel (ET-paklitaxel), je paklitaxel zakotven v pozitivně nabitě liposomální membráně, která se preferenčně váže na negativně nabitý endotel nádoru.(58) Zatímco nab-paklitaxel v kombinaci s gemcitabinem se již stal standardem léčby PDAC, polymerické micely a ET-paklitaxel jsou zatím předmětem probíhajících studií.

1.2.4 Taxany v léčbě PDAC

Taxany prokazují vysokou účinnost v léčbě širokého spektra typů nádorů. Taxany byly testovány rovněž v léčbě pacientů s karcinomem pankreatu, a to jak v monoterapii, tak v kombinačních režimech. Přehled studií uvádí Tabulky č. 1 - 4.

Tabulka č. 1: Aktivita paklitaxelu v klinických studiích

Klinická studie (rok)	Design	Pacienti (N)	Stádium nemoci	Populace pacientů	Režim	ORR (%)	OS (měsíce)
Gebbia, 1996	Fáze II	14,00	III, IV	První linie	Paklitaxel 175 mg/m ² každé 3 w	0,00	7,20
Whitehead, 1997	Fáze II	39,00	III, IV	První linie	Paklitaxel 250 mg/m ² každé 3 w, G-CSF	8,00	5,00
Kim, 2008	Fáze II	28,00	III, IV	Gem-refrakterní	Paklitaxel 175 mg/m ² D1 + 5-FU 1000 mg /m ² každé 4 w	10,00	7,60
Lam, 2009	Fáze II	19,00	III, IV	První linie	Paklitaxel 90 mg /m ² týdně x 3 každé 4 týdny + bryostatín	0,00	1,90
Oettle, 2000	Retrospekt	18,00	IV	Druhá nebo třetí linie	Paklitaxel 55-88 mg/m ² týdně	5,00	4,30
Shukuya, 2010	Retrospekt	23,00	III, IV	Gem-refrakterní	Paklitaxel 80 mg/m ² týdně x 3 každé 4 w	0,00	3,40
Maeda, 2012	Retrospekt	30,00	III, IV	Gem-refrakterní	Paklitaxel 80 mg/m ² týdně x 3 každé 4 w	10,00	6,70
Saab, 2014	Fáze II	35,00	III, IV	První linie	Paklitaxel 175 mg /m ² + CBDCA AUC 5 každé 3 w	21,00	

Poznámky: Retrospekt. – retrospektivní, N- počet pacientů, ORR- objektivní odpověď, OS- celkové přežívání, CBDCA- karboplatina, Gem-gemcitabin, G-CSF-granulocyte-colony stimulating factor, AUC-area under curve, w-týden

Tabulka č. 2: Aktivita nab-paklitaxelu v klinických studiích

Klinická studie (rok)	Design	Pacienti (N)	Stádium nemoci	Populace pacientů	Režim	ORR (%)	OS (měsíce)
von Hoff, 2011	Fáze I/II	67	IV	První linie	Nab-paklitaxel 100, 125, 150 mg/m ² + gem 1000 mg/m ² týdně x 3 každé 4w	46,00	12,20
Ko, 2012	Fáze I	15	IV	První linie	Nab-paklitaxel 100 mg/m ² D4 + gem 750 mg/m ² D4 + cap 750 mg/m ² 2x denně D1-7 každé 2w	14,00	7,50
Hosein, 2012	Fáze II	19	III, IV	Druhá nebo třetí linie	Nab- paklitaxel 100 mg/m ² týdně x 3 každé 4 w	5,00	7,30
Isacoff, 2012	Fáze I	40	IV	První linie	Nab-paklitaxel 100 mg/m ² + leukovorin 20 mg /m ² + oxaliplatina 75 mg/m ² týdně x 3 4w + kont. 5-FU 180mg/m ² D1-D14 + bevacizumab 5mg/kg D1,15	50,00	17,00
Leichman, 2012	Fáze Ib	19	III, IV	První linie	Nab-paklitaxel 125 mg/m ² + gem1000 mg/m ² 3x 4w+ erlotinib 100 mg denně	43,00	9,30
MPACT, 2013	Fáze III	842	IV	První linie	Nab-paklitaxel 125 mg/m ² + gem 1000 mg/m ² týdně x 3 každé 4 w	23,00	8,50
De Jesus-Acosta, 2014	Fáze II	59	IV	První linie	Nab-paklitaxel 125 mg/m ² + gem 1000 mg/m ² týdně x 3 každé 4 w + vismodegib 150 mg denně	43,00	10,0

Poznámky: N-počet pacientů, ORR- objektivní odpověď, OS-celkové přežívání, gem-gemcitabin, cap-kapecitabin, kont-kontinuálně, D-den, w-týden

Tabulka č. 3: Aktivita nových forem paklitaxelu v klinických studiích

Klinická studie, (rok)	Design	Pacienti (N)	Stádium	Populace pacientů	Režim	ORR (%)	OS (měsíce)
Lohr, 2012	Fáze II	200	III, IV	First-line	ET-paklitaxel 11/ 22/ 44 mg/m ² 2xtýdně + gem 1000 mg/m ² vs. gem	14, 14, 16,14,	4,1/4,6/4,4/2,7
Saif, 2010	Fáze II	56	III, IV	First-line	GPM-paklitaxel 435/300/350 mg/m ² každé 3 týdny	7,00	6,50

Poznámky: N-počet pacientů, ORR- objektivní odpověď, OS-celkové přežívání, gem-gemcitabin

Tabulka č. 4: Aktivita docetaxelu v klinických studiích

Klinická studie (rok)	Design	Pacienti (N)	Stádium nemoci	Populace pacientů	Režim	ORR (%)	OS (měsíce)
Androulakis, 1999	Fáze II	33	III, IV	První linie	Docetaxel 100 mg/m ² 3w	6,00	8,50
Rougier, 2000	Fáze II	43	III, IV	První linie	Docetaxel 100 mg/m ² 3w	15,00	7,00
Okada, 1999	Fáze II	21	III, IV	První linie	Docetaxel 60 mg/m ² 3-4w	0,00	3,90
Syrgos, 2002	Fáze II	21	III, IV	První linie	Docetaxel 80 mg/m ² + liposomální doxorubicin 30 mg /m ² každé 3 w	28,00	10,00
Schneider, 2003	Fáze II	38	III, IV	První linie	Docetaxel 35mg/m ² + gem 750 mg/m ² 3 x každé 4 w	27,00	7,00
Lutz, 2005	Fáze II	49	III, IV	První linie	Docetaxel 85mg/m ² D8 + gemcitabine 800 mg/m ² D1,D8 každé 3 w	19,40	7,40
Lutz, 2005	Fáze II	47	III, IV	První linie	Docetaxel 75 mg/m ² + cisplatina 75 mg/m ² 3w	23,50	7,10

Cereda, 2008	Retrosp.	10	Gem-refrakterní	Druhá linie	Docetaxel 30 mg/m ² týdně	0,00	4,00
Matthew, 2009	Fáze II	57	IV	První linie	Gem 1000 mg/m ² D1D8 + docetaxel 40 mg/m ² D1D8 každé 3 w	12,00	6,40
Saif, 2010	Retrosp.	17	Gem-refrakterní	Druhá linie	Docetaxel 25 mg/m ² týdně, docetaxel 75 mg/m ² 3w, docetaxel 35 mg/m ² + gem 750 mg/m ² 3x4w	6,00	4,00
Fine, 2012	Fáze II	44	IV	První linie	Docetaxel 30 mg /m ² D4 D11 + gem 750 mg/m ² D4,11 + cap 750 mg/m ² D1-14 každé 3 w	38,00	14,50
Xenidis, 2012	Fáze II	40,00	III, IV	První linie	Docetaxel 50 mg /m ² D1 D15 + cap 2250 mg/m ² D1-7 D15-21 , gemcitabin 1500 mg/m ² D1,15 každé 4 w	40,00	9,00
Reni, 2012	Fáze II	35,00	III, IV	První linie	Docetaxel 25-30mg/m ² D1 D15 + gem 800 mg/m ² D1 D15 + cap. 1250 mg/m ² D1-28 + Cis DDP 30 mg/m ² D1 D15 každé 4 w	57,00	5,80
Acosta, 2012	Retrosp.	154,00	III, IV	První linie Druhá linie	Docetaxel 30 mg /m ² D4 D11 + gem 750 mg/m ² D4D11 + cap 750 mg/m ² D1-14 každé 3 w	11,00	11,60
Dakik, 2012	Retrosp.	59,00	IV	Druhá linie Třetí linie	Docetaxel 30 mg /m ² D4 D11 + gem 750 mg/m ² D4D11 + cap 750 mg/m ² D1-14 každé 3 w	0,00	5,20

Poznámky: N-počet pacientů, ORR- objektivní odpověď, OS-celkové přežívání, gem-gemcitabin, Cap-kapecitabin, kont-kontinuálně, D-den, w-týden, Retrosp.-retrospektivní

Paklitaxel v monoterapii byl hodnocen ve studii fáze II, do které bylo zahrnuto 14 chemoterapií nepředléčených pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým PDAC. Paklitaxel byl podáván v dávce 175mg/m² každé 3 týdny. Nebyla pozorována žádná objektivní odpověď (ORR) a medián celkového přežití (OS) dosáhl 7,2 měsíců.(59) Vyšší dávka paklitaxelu (250mg/m² v 3 týdenním režimu) s podporou G-CSF byla testována v jiné studii fáze II, nicméně i při dosažení kompletní remise u jednoho z 39 pacientů, nedošlo k prodloužení mediánu OS.(60) Dle výsledků těchto studií paklitaxel prokázal jen marginální efekt v 1. linii léčby PDAC. Eskalace dávky vedla pouze k navýšení toxicity, bez významného ovlivnění efektivity léčby.

Úloha paklitaxelu v léčbě gemcitabin-refrakterní nemoci byla studována v několika retrospektivních studiích (Tabulka č. 1). Oettle et al. hodnotil paklitaxel (80 mg/m² v týdenním režimu) ve skupině 18 pacientů, z nichž jeden dosáhl kompletní klinické odpovědi. Medián OS dosáhl 4.3 měsíce a toxicita byla i přes předchozí léčbu gemcitabinem nízká.(61) Shukuya et al. hodnotil účinnost týdně podávaného paklitaxelu ve skupině 23 pacientů s maligním ascitem. U žádného z pacientů nebyla zaznamenána objektivní odpověď na léčbu, nicméně medián OS dosáhl 3,4 měsíce. Osm pacientů vykazovalo stabilizaci choroby a sedm pacientů sníženou tvorbu maligního ascitu.(62) Jediná studie prokazující mírné prodloužení

OS s mediánem 6,7 měsíce a s ORR 10 % (3/30) je studie autorů Maeda et al., která hodnotila týdně podávaný paklitaxel 80 mg/m² u chemoterapií předléčených pacientů.(63) Tyto studie však neprokázaly dostatečnou účinnost monoterapie paklitaxelem v léčbě pokročilého PDAC.

Kombinace paklitaxelu s 5-fluorouracilem byla testována studií autorů Kim et al. Paklitaxel byl podáván v dávce 175 mg/m² jednou za 4 týdny v kombinaci s 5-fluorouracilem v dávce 1000 mg/m² podávaným v den 1, 2 a 3 u gemcitabin-refrakterní choroby. Dva z 28 pacientů dosáhli parciální odpovědi (PR) s mediánem OS 7,6 měsíců. Vážná toxicita grade 3/4 byla především hematologická, včetně neutropenie u šesti pacientů (21,4 %), anémie a trombocytopenie u jednoho pacienta (3,6 %). Jeden pacient trpěl neuropatií grade 4 (3,5 %). (64)Paklitaxel v kombinaci s jinými cytotoxickými látkami vykazuje tedy určitou účinnost u gemcitabin-refrakterní choroby při akceptovatelné toxicitě.

Docetaxel prokázal slibnou protinádorovou aktivitu v preklinických modelech a byl dále testován jako monoterapie cestou klinických studií fáze II u nepředléčených pacientů s PDAC (Tabulka č.4). Povzbudivé výsledky přinesla především vyšší dávka docetaxelu (100 mg /m²). ORR dle RECIST kritérií dosahovala 6 až 15 % a celkové přežití pacientů 7-8,5 měsíce.(65, 66) Na výsledky nutno pohlížet s obezřetností, neboť se jednalo o malé soubory pacientů, které zahrnovaly jak lokálně pokročilý PDAC tak i metastatickou formu nemoci. Nižší dávky docetaxelu (60 mg/m²) neprokázaly žádnou účinnost. Je zřejmé, že intenzita dávkování docetaxelu hraje důležitou roli.(67) Kombinace docetaxelu a jiných cytostatik byla rovněž testována v několika klinických studiích. Existuje několik důkazů o synergismu docetaxelu, kapecitabinu, 5-fluorouracilu, gemcitabinu a cisplatinu. Jednoramenná studie fáze II testovala kombinaci docetaxelu, gemcitabinu a kapecitabinu (GTX režim) v první linii léčby metastatického PDAC. Výsledky této studie byly velmi povzbudivé s ORR 38% a mediánem OS 14,5 měsíce.(68) Tato léčba byla doprovázena především hematologickou toxicitou-neutropenií grade 3/4 u 29 % pacientů. Podobné výsledky publikovali autoři Xenidis et. al ve studii fáze II u režimu GTX podávaného ve čtyřtýdenních cyklech u 40 pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým PDAC. ORR dosahovala 40 % a medián OS 9 měsíců.(69) Dvě retrospektivní studie režimu GTX

u chemoterapií nepředléčených pacientů stejně jako u pacientů s předchozí onkologickou systémovou léčbou potvrzují výsledky předešlých prospektivních studií. Medián OS se pohybuje mezi 5,2 a 11,6 měsíci.(70, 71) Přidání cisplatinu k režimu GTX sice zvyšuje ORR na 57 %, nicméně nepřináší prodloužení mediánu OS, který dosahuje pouze 5,8 měsíce. Tento kombinační režim je doprovázen podstatně vyšší toxicitou, jak dokládá práce autorů Remi et al.(72)

Kombinace paklitaxelu a docetaxelu s nukleosidovými analogy se na podkladě výše uvedených prací sice jeví jako účinná a vhodná volba pro pacienty s PDAC, nicméně tyto kombinace nebyly nikdy testovány v randomizovaných klinických studiích fáze III. Kombinace taxanů a platinových derivátů, jež je využívána v léčbě mnoha typů solidních nádorů, prokázala v léčbě PDAC velmi protichůdné výsledky. Studie fáze II hodnotila aktivitu kombinace docetaxelu a cisplatinu, která sice dosáhla ORR 23 %, ale neprodloužila medián OS při srovnání s kombinací docetaxel a gemcitabin.(73) Navíc tato kombinace vykazuje vyšší hematologickou toxicitu. Z tohoto pohledu jsou však zajímavé výsledky klinické studie fáze II testující onkolytický virus Reolysin v kombinaci s paklitaxelem ($175\text{mg}/\text{m}^2$) a karboplatinou ($5\text{mg}/\text{AUC}$) proti kombinaci paklitaxelu a karboplatiny. Tato studie neprokázala účinnost Reolysinu v léčbě PDAC, ale na druhé straně překvapivě poukázala na účinnost kombinace paklitaxelu a karboplatiny u kontrolní skupiny, v které ORR dosáhla 21 % a PFS 5,1 měsíce.(74) Tyto výsledky jsou srovnatelné s kombinací nab-paklitaxelu a gemcitabinu, která je standardem léčby první linie metastatického PDAC.

Přidání nového agens nab-paklitaxelu ke gemcitabinu v první linii léčby metastatického PDAC přineslo signifikantní zlepšení přežívání pacientů. Výše maximální tolerované dávky nab-paklitaxelu $125\text{ mg}/\text{m}^2$ v kombinaci s gemcitabinem $1000\text{ mg}/\text{m}^2$ podávaná v den 1,8,15 každých 28 dní byla stanovena ve studiích fáze I/II.(75) Tato dávka prokázala významnou protinádorovou aktivitu a byla následně testována v randomizované studii fáze III (MPACT). Kombinace nab-paklitaxelu a gemcitabinu statisticky významně prodloužila medián OS (8,5 vs. 6,7 měsíců) a zvýšila ORR (23 % vs. 7 %) oproti monoterapii gemcitabinem u nepředléčených pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým PDAC. Nejčastější závažná toxicita této kombinace (grade 3/4) se týkala neutropenie (38 % vs. 27 %)

a periferní neuropatie (17 % vs. 1 %).(41) Na podkladě výsledků této studie se stala kombinace nab-paklitaxelu a gemcitabinu novým standardem léčby první linie paliativní chemoterapie lokálně pokročilého a metastatického PDAC. Další pokusy o zvýšení účinnosti této léčby pomocí kombinace nab-paklitaxelu s dalšími protinádorovými léčivými včetně kapecitabinu, desulfovaného heparinu, vismodegibu a bevacizumabu přinesly pouze zklamání (Tabulka č. 2).(76-78) Isacoff et al. hodnotil kombinaci nab-paklitaxelu, který byl podáván formou nízkodávkované kontinuální chemoterapie a anti-VEGF terapie v otevřené studii fáze II. Celkem 40 pacientů bylo léčeno kombinací kontinuálního 5-fluorouracilu, leucovorinu, oxaliplatinu, nab-paklitaxelu a bevacizumabu. Tato kombinace dosáhla mediánu OS více než 17 měsíců a ORR 50 %, nicméně přibližně polovina pacientů (18/40) musela léčbu přerušit pro závažnou toxicitu.(79) Přidání dalších cytotoxických látek nebo cílené terapie ke kombinaci gemcitabinu a nab-paklitaxelu nezvyšuje účinnost léčby, ale jen navyšuje toxicitu u pacientů trpících PDAC.

Polymerické micely a paklitaxel ve formě kationtových liposomů byl rovněž testován v některých klinických studiích (Tabulka č. 3). Polymerické micely paklitaxelu v monoterapii prokázaly stejnou účinnost jako monoterapie gemcitabinem u lokálně pokročilého PDAC ve studii fáze II.(80) Kombinační režimy polymerických micel paklitaxelu jsou zatím předmětem probíhajících klinických studií. (*ClinicalTrials.gov* NCT00882973).

Kombinace kationtových liposomů ET-paklitaxelu a gemcitabinu prodloužila medián OS z 6,8 měsíců na 9,3 měsíců a zvýšila ORR z 15 % na 33 % v porovnání s monoterapií gemcitabinem v randomizované studii fáze II, v které bylo zařazeno celkem 212 pacientů s metastatickým nebo lokálně pokročilým PDAC.(81) Pro další testování formy liposomálního ET-paklitaxelu je plánována studie fáze III.

1.2.5 Mechanismus chemoresistence nádorových buněk PDAC k léčbě taxany

Jeden z hlavních limitujících faktorů účinnosti chemoterapie v léčbě PDAC je přítomnost mnohočetné lékové resistance (MDR). MDR je komplexní mechanismus, na němž se podílí řada faktorů. Tyto faktory se týkají především lékově specifického transportu a biotransformace.(82) MDR je rovněž ovlivněn resistencí tumorových buněk k apoptóze i jejich komplexní propojeností s extracelulárním prostředím a stromatem tumoru.(83) Co se týče resistance nádorových buněk k léčbě taxany, byly popsány celkem tři hlavní mechanismy, které se na ni podílí. První mechanismus zahrnuje lékové transportéry a molekuly spojené s biotransformací taxanů. Druhý mechanismus se týká odchylek v konformaci tubulinu a jeho dynamiky. Třetí mechanismus je spojen s proteiny a signálními dráhami, které jsou klíčové pro průběh apoptózy.

Co se týče prvního mechanismu resistance, jedná se především o zvýšenou expresi transportérů, které exportují léky z nádorových buněk, a sníženou expresi transportérů, které se podílejí na transportu léků do nádorové buňky. Eflux taxanů (vypumpování ven z nádorové buňky) je spojován s funkcí dvou hlavních členů ABCs; ABCB1 a ABCC1 (OMIM: 171050 and 158343).(84) Další členové ABC, kteří jsou uváděni s efluxem taxanů jsou ABCB4, ABCC2, ABCC10 a ABCG2(48, 49, 85, 86). Zatímco většina těchto transportérů je zvýšeně exprimována u PDAC, tak k obecně malé léčebné odpovědi na léčbu taxany u PDAC jsou zodpovědné především transportéry ABCB4, ABCC1, ABCC10 a ABCG2.(87) Exprese jednoho z klíčových transportérů, který je zodpovědný za průnik paklitaxelu do buněk *in vitro* ABC22A7 však nebyla nalezena jak na mRNA úrovni tak na proteinové úrovni u PDAC.(88)

Druhý mechanismus je spojen s konformací tubulinu. β -podjednotka tubulinu je vazebným místem taxanů. Byly publikovány mnohočetné bodové mutace, změny v expresi tubulinových isomer a post-translační modifikace tubulinu, které ovlivňují sensitivitu k léčbě taxany. β III-tubulin je zvýšeně exprimován ve tkáních PDAC.(89) Navíc potlačení exprese β III-tubulinu snižuje buněčný růst a tumorigenní potenciál PDAC, dále zpomaluje růst nádoru

a diseminaci nádoru *in vivo*.(90) Zvýšená exprese isoform β III-tubulinu je nacházena rovněž u buněčných linií rezistentních na paklitaxel.(91)

Třetím mechanismem je indukce apoptózy. Jakékoliv změny v expresi proteinů, které mají úlohu v kontrole buněčného cyklu nebo apoptózy, mohou ovlivňovat sensitivitu k taxanům. Jedním z hlavních mechanismů apoptózy indukované taxany je fosforylace Bcl-2, proto jakékoliv změny v expresi členů Bcl-2 rodiny mají vliv na senzitivitu k taxanům. Kaspázy jsou esenciální enzymy apoptotické dráhy. Inicijace kaskádové reakce je regulována proteiny, které se nazývají inhibitory apoptotických proteinů (IAPs), mezi které se řadí survivin. Je uváděno, že survivin lokalizován u mitotického aparátu působí proti taxany indukované apoptóze. Vysoké hladiny survivinu byly nalezeny u pokročilého ovariálního karcinomu, resistantního na terapii kombinací paklitaxel a karboplatina.(92) Survivin jako inhibitor apoptózy je zvýšeně exprimován u PDAC a jeho exprese, v tumorové tkáni stejně jako v séru, je spojena se špatnou prognózou.(93, 94)

Navíc existuje řada dalších faktorů, které mají vliv na rozvoj MDR, jako např. tumorové stroma a jeho vliv na chemoresistenci, nebo mutace klíčových genů pro průběh karcinogeneze. PDAC je charakteristický denzním desmoplastickým stromatem, které může být příčinou selhání terapeutických strategií zaměřených na nádorové buňky. Interakce mezi tumorovými buňkami a okolního desmoplastickým stromatem jsou velmi komplexní. Stelátové buňky sekretují řadu faktorů, jako např. PDGF, stromal-derived faktor 1, epidermální růstový faktor, insulin-like růstový faktor 1, růstový faktor fibroblastů, matrix metaloproteinázy, malé proteoglykany bohaté na leucin, kolagen typu I a periostin, které mají vliv na růst tumoru, jeho invazi a diseminaci, ale rovněž na jeho chemoresistenci.(95)

Genový expresní profil PDAC, jak již zmíněno, odpovídá omezené sensitivitě PDAC k léčbě taxany a chemoterapeutiky vůbec. Nicméně výjimku tvoří PDAC nesoucí *BRCA* mutaci. *BRCA* mutace je prediktivním biomarkerem účinnosti alkylačních látek, platinových derivátů a PARP inhibitorů napříč jednotlivými typy nádorů.(96) U karcinomu pankreatu se *BRCA* mutace vyskytuje přibližně u 6 % případů.(97) Nicméně na systému opravy DNA se podílí až 84

genů. Mutace jednoho z nich podporuje podobné chování nádoru jako při mutaci genu *BRCA*, hovoříme tedy o tzv. *BRCA*-ness. *BRCA*-ness u PDAC se vyskytuje až u 17 % případů, tvoří tak zajímavý prediktivní marker.(98) Kombinační režim paklitaxel + karboplatina, jehož zvýšená účinnost je popisována v léčbě jiných *BRCA* mutovaných nádorů jako je např. karcinomu prsu nebo karcinomu ovária, tvoří tak novou možnost léčby pro *BRCA* mutované PDAC.

Závěrem lze tedy říci, že i přes četné pokroky v léčbě metastatického PDAC zůstává jeho prognóza stále velmi nepříznivá. Testování různých cytostatických režimů přineslo většinou zklamání. Hlavní překážku v kombinované léčbě tvoří její toxicita a léková rezistence PDAC.

Taxany jsou široce používaná cytostatika napříč různými typy nádorů, včetně ovariálního karcinomu, karcinomu prsu a plic. Účinnost léčby taxany u PDAC v kombinovaném režimu s nukleosidovými analogy nebo platinovými deriváty vyjádřena v ORR se pohybuje od 20-57 %. Tato léčba rovněž zlepšuje celkové přežívání těchto pacientů. I běžně používaný kombinovaný režim paklitaxel a karboplatina prokázal aktivitu u PDAC. Jeho účinnost je srovnatelná se standardními režimy první linie metastatického PDAC. Navíc jeho nízká toxicita jej činí potenciálním vhodným režimem do dalších linií léčby metastatického PDAC, kde možnosti léčby jsou zatím velmi omezené. Tato léčba může být dále individualizována dle přítomnosti *BRCA* mutace a biomarkerů spojených s resistencí k taxanům tak, aby jednotlivý pacient z této léčby, co nejvíce profitoval.

1.3 Prognostické a prediktivní biomarkery karcinomu pankreatu

Prediktivním a prognostickým markerům karcinomu pankreatu je věnován intenzivní výzkum. V literatuře je zmiňováno asi 2000 markerů, které jsou předmětem výzkumu. Prognostické markery korelují s délkou přežití pacientů bez ohledu na podávanou terapii a určují tak rizikové pacienty s agresivní biologii nádoru. Prediktivní markery naopak korelují s léčebnou odpovědí a umožňují identifikaci pacientů s vyšší pravděpodobnou odpovědí na danou léčbu. Jednotlivé

markery lze dále dělit na morfologické, klinické, biochemické nebo molekulárně genetické. Co se týká prognostických markerů PDAC, jsou v klinické praxi využívány především markery morfologické, hodnocené patologem, a markery biochemické.

Z morfologických znaků je negativním prognostickým markerem velikost primárního tumoru větší než 2 cm, rozšíření nádoru do okolních lymfatických uzlin, nízký stupeň diferenciacie nádoru, lymfovaskulární invaze, perineurální šíření, invaze do portálního systému a přítomnost vzdálených metastáz.(99-102) Rozsah nádoru při iniciální diagnostice tedy úzce koreluje s prognosou pacientů. U části pacientů se iniciálně vyskytuje icterus, který následně vede k časnější diagnostice karcinomu pankreatu. Iniciální icterus je tedy považován za pozitivní prognostický marker.(103) Jedním z nejvíce využívaných biochemických prognostických markerů u PDAC je hladina tumorového markeru CA 19-9. Jedná se o tumorový marker ze skupiny glycidových antigenů. Jeho prognostická role spočívá především v hodnocení jeho hladiny po resekci PDAC. Vysoké hladiny CA 19-9 nad 180 kU/l přetrvávající déle než 3 měsíce po resekci jsou prognosticky velmi nepříznivé. Vysoké hladiny CA 19-9 rovněž upozorňují na možnost přítomnosti vzdálených metastáz.(104) Další prognostické markery především ze skupiny molekulárně genetické jsou předmětem dalšího výzkumu a jejich role v prognóze pacientů nebyla stanovena.

Ještě složitější situace se vyskytuje u prediktivních markerů, které jsou důležitým článkem optimalizace léčby a individualizované terapie. V současné době není schválen k využití v klinické praxi žádný specifický biomarker. Jako potenciální prediktivní biomarker se jeví mutace genů *BRCA1/2*. Signální dráha *BRCA1/2* se účastní reparativních procesů DNA. Při poruše této dráhy vzniká vysoká genomová instabilita. Tyto nádory, jak již hodnoceno ve studiích ovariálního karcinomu a karcinomu prsu, jsou velmi citlivé k léčbě alkylačními látkami a platinovými deriváty. Rovněž u PDAC byla prokázána odpověď na platinové deriváty u *BRCA* mutovaných nádorů. Nově jsou v léčbě PDAC testovány PARP inhibitory. Jedná se o látky účinné u tumorů s poruchou homologní rekombinace DNA, což jsou nádory nesoucí *BRCA1/2* mutaci. *BRCA1/2* mutace je

potenciálním prediktivním biomarkerem pro léčbu platinovými deriváty a PARP inhibitory.(16)

Dalším potenciálním biomarkerem je MSI (mikrosatelitová instabilita). Mikrosatelity jsou krátké opakující se DNA sekvence, umístěné na různých místech v genomu. Počet opakujících se sekvencí je vždy stejný. O mikrosatelitové instabilitě hovoříme, pokud se u buňky v jedné či ve dvou alelách objeví různý počet opakujících se sekvencí. MSI je charakteristická vysokou mutační náloží, která vytváří mnoho tumor specifických neoantigenů. Tyto nádory mají vysoký stupeň tumor infiltrujících lymfocytů, dále zvyšují expresi mnohých imunitních kontrolních bodů včetně PD-1, PD-L1, CTLA-4. Jsou tedy vhodnými kandidáty pro imunoterapii, která prokázala vysokou účinnost v léčbě melanomu, renálního karcinomu a karcinomu plic. Anti PD-1 protilátky byly testovány na malém souboru pacientů i u PDAC s MSI, kde u všech pacientů došlo k odpovědi na léčbu, což činí tento marker potenciální prediktivní marker pro imunoterapii PDAC. Nicméně MSI se vyskytuje u PDAC pouze ve 2 %, což ukazuje na nutnost hledání dalších možných prediktivních markerů k optimalizaci léčby pacientů s PDAC.(105)

1.3.1 Membránové transportéry významné pro terapii karcinomu pankreatu

Účinnost systémové léčby je ovlivněna řadou faktorů. Jedním z významných faktorů je přítomnost mnohočetné lékové rezistence nádorové tkáně. Podílí se na ni jednak snížený průnik terapeutik do nádorových buněk (uptake), jejich zvýšený eflux ven z nádorových buněk, metabolická aktivace a deaktivace chemoterapeutik a v neposlední řadě rovněž mechanismy nádorové buňky zabraňující léky indukované buněčné apoptóze. Další důležitou roli hraje interakce nádorových buněk a stromatu nádoru, jenž vede k uvolnění řady mitogenních faktorů, potlačení imunitní odpovědi a hormonální nerovnováze. Na podkladě těchto změn dochází k ovlivnění exprese intracelulárních enzymů, nutričních a environmentálních interakcí.(82)

Klíčovou rolí v mnohočetné lékové resistenci hrají membránové transportéry. Jedná se o membránové proteiny, které zprostředkovávají translokaci

substrátu přes biologické membrány. Různé druhy transportérů jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně i v membránách jednotlivých organel. Regulují přísun substrátů a zajišťují homeostázu. Transportéry jsou specificky orgánově exprimovány a umožňují vstup i eliminaci různých endogenních substrátů a xenobiotik.(106)

Dvě hlavní nadrodiny transportérů jsou ATP-binding cassette (ABC) transportéry a solute carrier (SLC) transportéry. ABC transportéry získávají energii z ATP hydrolyzy, a podílí se především na efluxu chemoterapeutik, tedy umožňují jejich pumpování ven z buňky. Jeden z nejčastěji studovaných proteinů je multidrug resistance protein 1 (MDR1), rovněž označován jako P-glykoprotein, nebo ABCB1, jenž má širokou diversitu substrátů. (107)

SLC transportéry jsou primárně zapojeny do uptake malých molekul. Jedná se o nadrodinu čítající přibližně 300 transmembránových proteinů. Hlavní cytotoxické látky, které jsou používány v léčbě karcinomu pankreatu (gemcitabin a 5-fluorouracil) jsou substrátem dvou podrodin SLC, a to SLC28 a SLC29 podrodiny. Tyto podrodiny jsou předmětem zájmu rozsáhlého výzkumu, týkajícího se mechanismů rezistence PDAC. (108, 109) V současnosti bylo popsáno 7 nukleosidových transportérů těchto podrodin. Jedná se o SLC 28A1 (CNT1; OMIM: 606207), SLC28A2 (CNT2; OMIM: 606208), SLC28A3 (CNT3; OMIM: 608269), SLC 29A1 (ENT1; OMIM 602193), SLC 29A2 (ENT2; OMIM: 602110), SLC29A3 (ENT3; OMIM: 612373) a SLC29A4 (ENT4; OMIM 609149).(110, 111) Především SLC29A1, SLC29A2, SLC28A1 a SLC28A3 prokázaly aktivitu v transportu gemcitabinu v *in vitro* studiích.(112) Senzitivita PDAC k nukleosidovým analogům je ovlivněna mírou exprese jednotlivých transportérů, jejich genetickými alteracemi a genovou regulací. Co se týká exprese, PDAC vykazuje zvýšenou expresi SLC29A1, zatímco SLC28A1 je exprimován pouze přechodně.(108) Dvě prospektivní randomizované studie fáze III rovněž potvrdili vztah mezi expresí SLC29A1 a prodloužením celkového přežití (OS) u pacientů léčených gemcitabinem v adjuvantním podání.(113, 114) Tento vztah však nebyl potvrzen v případě pokročilé či metastatické choroby. Nicméně jednotlivé studie v rámci metastatického PDAC se lišily jak designem, tak i různou metodikou analýzy exprese SLC29A1, což pravděpodobně vedlo k inkonzistentním

výsledkům.(115, 116) Ohledně ostatních členů této podrodiny SLC a jejich prediktivního významu v léčbě PDAC máme k dispozici jen velmi omezená data. Zvýšená exprese *SLC29A3* mRNA intratumorálně vedla sice k signifikantnímu prodloužení celkového přežití pacientů léčených nukleosidovými analogy, nicméně buněčné linie s vysokou expresí *SLC29A3* a *SLC29A4* vykazují *in vitro* chemorezistenci k nukleosidovým analogům.(88, 117)

Nejen účinnost ale i toxicita chemoterapie je ovlivněna expresí a genetickými alteracemi SLC transportérů. Např. *SLC29A1* vykazuje vyšší transportní kapacitu u nosičů G alely v -706G>C SNP oproti nosičům CC genotypu.(118) Rovněž rozsáhlá genotyp-fenotypová studie poukázala na spojitost SNPs *SLC29A1* a *SLC28A3* s koncentrací gemcitabinu (IC_{50}) v lymfoblastických buněčných liniích.(119) Tento prediktivní význam se zatím nepodařilo potvrdit v klinických studiích. Při testování různých genetických polymorfismů v genu *SLC29A1*, pouze u jednoho SNP (rs 3778504) byl prokázán vztah k prodloužení doby do progresu nemoci u pacientů léčených chemoterapií na bázi gemcitabinu, nicméně bez vlivu na celkové přežití pacientů.(120) Několik prací se rovněž zabývalo SNPs, jenž hrají roli při transportu gemcitabinu a jeho metabolismu, s jejich možným vlivem na hematologickou toxicitu chemoterapie. I když bylo studováno více než 15 SNPs, nebyl identifikován žádný z nich jako prediktivní rizikový faktor hematologické toxicity. Jednotlivé práce se však lišily jak designem, tak hodnocením toxicity a především heterogenní skupinou pacientů a různými modalitami léčby.(121, 122) Navíc mechanismus vlivu SNP na funkci transportéru může rovněž souviset s regulací genové transkripce a jiných posttranskripčních mechanismů, poukazující na nutnost komplexního hodnocení genetického a epigenetického pozadí populace pacientů oproti hodnocení pouze izolované exprese jednoho proteinu či výskytu SNP.

Další významnou podrodinou SLC transportérů u PDAC je *SLC22A*. Jedná se o transportéry, které jsou zapojeny hlavně do transportu různých kationtů, a to jak exogenních tak i endogenních.(123, 124) Z endogenních substrátů se např. jedná o neurotransmitery, jako jsou katecholaminy. Z exogenních substrátů jsou to především platinové deriváty. Exprese *SLC22A* se liší mezi tkání PDAC a zdravou pankreatickou tkání. Zatímco *SLC22A1* a *SLC22A2* jsou v PDAC sniženy

exprimovány, v případě *SLC22A3* je jeho exprese v nádorové tkáni výrazně zvýšena oproti nenádorové tkáni slinivky břišní, stejně jako množství *SLC22A3* mRNA transkriptů.(88) Vysoký stupeň mRNA transkriptů je silným prediktorem prodloužení celkového přežívání chemoterapií léčených pacientů. Dále se ukazuje, že genetická variabilita *SLC22A3* je spojena i se zvýšeným rizikem vzniku jiných typů nádorů jako např. kolorektálního karcinomu a karcinomu prostaty.(125, 126)

2 CÍLE PRÁCE

Karcinom pankreatu je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění s velmi vysokou mortalitou, která ho v ČR řadí na čtvrtou příčku v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění. Cytostatika ze skupiny nukleosidových analog – gemcitabin a 5-fluorouracil patří v současné době mezi široce užívané preparáty v onkologické léčbě, a to zejména u karcinomu pankreatu. Existují však významné inter-individuální rozdíly ve farmakokinetice a farmakodynamice těchto preparátů, které mohou významně ovlivnit výsledek terapie u takto léčených pacientů. Tyto změny podle současných znalostí souvisí mimo jiné i s genetickým polymorfismem enzymů metabolizujících a transportujících léčiva (127), či změnou v expresi membránových transportérů těchto léčiv.(83) Změny v expresi transportních proteinů jsou považovány v současnosti za jeden z klíčových faktorů způsobujících fenotyp mnohočetné lékové rezistence. Vstup nukleosidových analog do buněk je zprostředkován zejména proteiny rodiny SLC (solute carrier transporters), naopak jejich eflux (vypumpování ven z buněčného kompartmentu) zajišťují ve velké míře proteiny rodiny ABC (ATP-binding cassette transporters).

V našich předchozích projektech byla zjištěna řada zajímavých souvislostí, na které tato práce přímo tématicky navazuje. V nádorových buňkách adenokarcinomu pankreatu byla zjištěna vysoká exprese mRNA *SLC22A3*, (88) stejně jako proteinu (nepublikovaná data). *SLC22A3* se tedy jeví být novým nádorovým markerem tohoto onemocnění. Jeho exprese rovněž souvisela i s celkovým přežíváním pacientů.(128) Jedním z hlavních cílů této práce je bližší

studium úlohy tohoto kandidátního genu v procesu patogeneze PDAC a v ovlivnění výsledků terapie.

Jak je zřejmé z teoretického úvodu, pochopení heterogenity karcinomu pankreatu je jednou z cest k zvýšení účinnosti jeho terapie. V současné době je nutná individualizace léčebného přístupu, která ovšem vyžaduje znalost prediktivních a prognostických biomarkerů této nemoci. Krom obecných prognostických markerů jako je rozsah nádoru, lymfovaskulární invaze, špatná diferenciaci, squamózní typ nádoru a portální infiltrace, které jsou vesměs negativními prognostickými markery, jsou v současnosti známy jen dva molekulárně genetické prediktivní faktory karcinomu pankreatu. Prvním prediktivním faktorem je *BRCA 1/2* mutace, vzhledem k možnosti léčby platinovými deriváty a nově i PARP inhibitory. Druhým prediktivním faktorem je vysoká mikrosatelitová instabilita (MSI-H), která se vyskytuje u PDAC ve 2 %, a je prediktivním faktorem pro léčbu novými druhy Check point inhibitorů, jako je např. pembrolizumab.

Dalším cílem naší práce bylo detailní studium klíčových drah karcinogeneze PDAC z hlediska možných prognostických a prediktivních faktorů *in vitro* a *in vivo*. *In vitro* bylo cílem práce porovnání expresních hladin klíčových genů signálních drah PDAC onkogeneze (KRAS a SHH) mezi jednotlivými buněčnými liniemi, lišícími se jak genetickým profilem, tak i biologickým chováním, agresivitou a přežíváním. *In vivo* bylo cílem následné porovnání těchto expresních profilů mezi nádory neléčených i taxany léčených xenograftů. Pochopení významu těchto signálních drah pro průběh PDAC může otevřít nové léčebné možnosti pro pacienty. Zároveň byla provedena i studie expresních profilů těchto signálních drah, jako potenciálních prognostických biomarkerů u pacientů s PDAC, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon.

Naše práce tedy dále rozšiřuje hledání jednotlivých prognostických a prediktivních biomarkerů jak v oblasti klíčových drah PDAC onkogeneze jako je dráha onkogenu KRAS a Hedgehog signální dráha, tak v oblasti membránových SLC transportérů, které mohou přispět k optimalizaci léčby této zákeřné nemoci s nalezením prognosticky odlišných skupin s individualizovanou léčebnou strategií.

3 PACIENTI A METODY

3.1 Stanovení expresních profilů hlavních signálních drah onkogeneze karcinomu pankreatu

3.1.1 Pacienti

Během let 2008-2012 byly získány vzorky párových tkání nádoru a okolního pankreatu od 45 pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu, kteří podstoupili chirurgickou léčbu ve dvou onkologických centrech (Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze a Fakultní nemocnici v Brně).

Vzorky byly ihned po resekci transportovány za sterilních podmínek z operačního sálu na oddělení patologie k dalšímu zpracování a vyšetření. Histologicky verifikované párové vzorky tumoru a nenádorové tkáně pankreatu byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby RNA extrakce. Histologická diagnóza PDAC byla provedena dle standardní klasifikace atestovanými patology. U všech vzorků byly získány následující klinické informace: pohlaví a věk pacientů, datum diagnózy, typ nádorů, stav okolní nenádorové tkáně (zdravý pankreas, chronická pankreatitida apod.), lokalizace, rozsah a velikost nádorů (stádium dle TNM klasifikace), stupeň diferenciací (grade), přítomnost eventuální angioinvaze, lymfangioinvaze, perineurální invaze, počet postižených uzlin v okolní tukové tkáni, typ a radikalita resekce, následná onkologická léčba a její efektivita (PFS a OS).

Všichni pacienti ve studii byli požádáni, aby si přečetli a podepsali informovaný souhlas dle požadavků etických komisí Institutu klinické a experimentální medicíny Praha a Fakultní nemocnice Brno.

3.1.2 Buněčné linie a xenografty

Xenografty byly připraveny podkožní aplikací suspenze níže popsanou buněčnou linií dospělým imunodeficientním nude myším jedincům na spolupracujícím pracovišti (dr. Kočík, Institut klinické a experimentální medicíny - IKEM). Nádory byly chirurgicky vyjmuty za sterilních podmínek a zmrazeny na -80°C do doby izolace RNA. RNA byla připravena pracovníky Laboratoří toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu v Praze dle dříve zavedené a popsané metodiky.(129)

Studie byla schválena Etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Etické schválení experimentů týkajících se myši bylo provedeno Státním zdravotním ústavem v Praze. Myši byly léčeny experimentálním SBT (Stony Brook Taxane) taxanem SBT-1216, který byl podáván v dávce 10 mg/kg intraperitoneálně jednou za týden po dobu 2 týdnů (2 dávky). Den po aplikaci druhé dávky byly myši zahubeny. SB-T-1216 byl syntetizován a charakterizován Prof. I. Ojimou (State University of New York at Stony Brook, NY, USA;).(130) Samice atymické nude myši (nu/nu), věku 4 až 6 týdnů, byly získány z Charles River Laboratories, Düsseldorf, Německo. Lidská buněčná linie karcinomu Paca-44 (testována na kontaminaci mykoplazmat), jejíž charakteristika je popsána v Tabulce č. 5, byla dodána z Leibniz Institute DSMZ — Německá sbírka mikroorganismů a buněčných linií, Braunschweig, Německo, a kultivována dle protokolu výrobce. Tato buněčná linie byla vybrána vzhledem k přítomnosti mutace G12V v genu *KRAS*, která se často vyskytuje u PDAC pacientů.(131) Tato linie je rovněž charakteristická rychlým homogenním růstem v subkutánních nádorech ve srovnání s jinými PDAC buněčnými liniemi.(132)

V den 0 bylo zvířatům subkutánně injektováno 200 μl buněčné suspenze, která obsahovala 5×10^6 buněk v PBS (Phosphate Buffered Saline). Léčba byla zahájena v době, kdy tumor dosáhl velikosti $\sim 100 \text{ mm}^3$. Celkově bylo připraveno 12 Paca-44 xenograftů. Paca-44 xenografty byly rozděleny do 2 skupin: (A) SB-T-1216-léčená skupina ($n = 5$) a (B) kontrolní skupina ($n = 7$). Skupině A byly podány intraperitoneálně dvě dávky 10 mg SB-T-1216 na kg váhy jednou týdně, to znamená podání první dávky v den jedna a podání druhé dávky v den sedm. Skupina B nedostala žádnou léčbu. Zvířata byla zabita osmý den po první dávce.

Objem tumoru byl měřen kaliperem v týdenních intervalech a vyčíslen v mm³ za použití standardního vzorce, $(W^2 \times L)/2$, v němž L a W jsou velké a malé rozměry tumoru v milimetrech.

Tabulka č. 5: Charakteristika buněčné linie Paca-44

Gen	Alterace *
<i>KRAS</i>	G12V
<i>TP53</i>	c.526T>A
<i>CDKN2A</i>	Divoký typ
<i>SMAD4</i>	Divoký typ

Poznámky: *dle Moore et al. 2001

3.1.3 Izolace nukleotidových kyselin

Vzorky tkání k izolaci RNA byly homogenizovány mechanickou disrupcí v 1ml Trizolu (Invitrogen, Carlsbad, CA) pomocí přístroje Precellys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) při rychlosti 6500 15 sec. Následně bylo přidáno 200 µl chloroformu, vzorky krátce zvortexovány a 3 minuty inkubovány při pokojové teplotě a centrifugovány 15 minut při 12 000 RPM a 4°C, kdy došlo k rozdělení směsi na 3 vrstvy. Horní vodná fáze obsahující RNA byla přepitována do čisté 1,5 ml zkumavky s isopropanolem v poměru 1:1. Po 10 minutách inkubace při pokojové teplotě následovala centrifugace 15 minut při 12 000 RPM a 4°C, při které vznikla bělavá peleta RNA při dolním pólu zkumavky. Vzorky byly promyty v 500 µl 70% etanolu a znovu 5 minut centrifugovány za stejných podmínek. Poté byl etanol odebrán pipetou a peleta vysušena v suchém bloku při 60°C (Techne, Staffordshire, UK). Dle velikosti pelety bylo přidáno adekvátní množství sterilní vody (40-100 µl), aby došlo k jejímu rozpuštění. Získaná RNA byla zkontrolována stran kvality a kvantity přístrojem Nanodrop 2000 (Life Technologies) a zamražena při -80°C.(88, 133) Komplementární DNA (cDNA) byla syntetizována za použití 0.5 µg celkové cDNA pomocí RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kitu s hexamer primery (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).(134) cDNA byla pak preamplifikována pomocí TaqMan PreAmp Master Mix pro analýzu genové exprese použitím TaqMan Gene Expression Assays (Tabulka č. 6, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Preamplifikace

cDNA byla provedena s 5 μ l cDNA využitím 14 preamplifikačních cyklů. Preamplifikační uniformita cDNA byla zkontrolována procedurou doporučenou výrobcem (Life Technologies Corp.).

Tabulka č. 6: Přehled použitých sond pro stanovené geny Hedgehog a Kras signální dráhy

Gen	Jméno genu (OMIM)	Assay ID
ARRB1	BETA ARESTIN 1 (107940)	Hs00244533_m1
ARRB2	BETA ARESTIN 2 (107941)	Hs01034127_m1
BTRC	BETA-TRANSDUCINREPEAT-CONTAINING PROTEIN (603482)	Hs01046329_m1
CSNK1A1	KASEIN KINÁZA I α (600505)	Hs01077962_m1
DHH	DESERT HEDGEHOG (605423)	Hs00368306_m1
GAS1	GROWTHARREST-SPECIFIC 1 (139185)	Hs00266715_s1
GLI1	GLIOMA-ASSOCIATEDONCOGENE HOMOLOG (165220)	Hs01110766_m1
GLI2	GLI- KRUPPELFAMILYMEMBER 2 (165230)	Hs01119974_m1
GLI3	GLI-KRUPPELFAMILYMEMBER 3 (165240)	Hs00609233_m1
GNAI1	GUANIN NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN, α -INHIBITINGACTIVITY POLYPEPTIDE 1 (139210)	Hs01053355_m1
GNAI2	GUANIN NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN, α -INHIBITINGACTIVITY POLYPEPTIDE 2 (139360)	Hs01064686_m1
GNAI3	GUANIN NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN, α -INHIBITINGACTIVITY POLYPEPTIDE 3 (139370)	Hs01020866_m1
GSK3A	GLYKOGENSYNTÁZYKINÁZA 3- α (606784)	Hs00997942_m1
GSK3B	GLYKOGENSYNTÁZYKINÁZA 3- β (605004)	Hs00275656_m1
HHAT	HEDGEHOGACYLTRANSFERÁZA (605743)	Hs00911326_m1
HHIP	HEDGEHOG-INTERACTING PROTEIN (606178)	Hs01011008_m1
IHH	INDIANHEDGEHOG (600726)	Hs01081801_m1
KCTD11	POTASSIUMCHANNELTETRAMERIZATIONDOMAIN-CONTAINING PROTEIN 11 (609848)	Hs00922550_s1
KIF3A	KINESISFAMILYMEMBER 3A (604683)	Hs00199901_m1
KIF7	KINESISFAMILYMEMBER 7 (611254)	Hs00419527_m1
LRP2	LOWDENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 2 (600073)	Hs00189742_m1
PRKACA	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, CATALYTIC, α (601639)	Hs00427274_m1
PRKACB	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, CATALYTIC, β (176892)	Hs01086757_m1
PRKACG	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, GAMMA (176893)	Hs01033925_s1
PRKAR1A	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, TYPE I, α (188830)	Hs00267597_m1
PRKAR1B	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, TYPE I, β (176911)	Hs00406762_m1
PRKAR2A	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, TYPE II, α (176910)	Hs00177760_m1
PRKAR2B	PROTEIN KINÁZA, cAMP-DEPENDENT, REGULATORY, TYPE II, β (176912)	Hs00176966_m1

PTCH1	PATCHED, DROSOPHILA, HOMOLOG 1 (601309)	Hs00181117_m1
PTCH2	PATCHED, DROSOPHILA, HOMOLOG 2 (603673)	Hs01085642_m1
SHH	SONICEDGEHOG (600725)	Hs03454385_m1
SMO	SMOOTHENED HOMOLOG (601500)	Hs01090242_m1
STK36	SERIN/TREONINE PROTIEN KINAZA 36 (607652)	Hs01036839_m1
SUFU	SUPPRESSOR OF FUSED HOMOLOG (607035)	Hs00960524_m1
ELF1*	E74-LIKE FAKTOR 1 (189973)	HS00152844_m1
EIF2B1*	EUCARYOTICTRANSLATIONINITIATION FAKTOR 2B, SUBUNIT 1 (606686)	Hs00426752_m1
MRPL19*	MITOCHONDRIALRIBOSOMAL PROTEIN L19 (611832)	Hs00608519_m1
AKT1	V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	Hs00178289_m1
AKT2	V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2	Hs01086102_m1
ARAF	V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	Hs00176427_m1
BRAF	V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1	Hs00269944_m1
GRB2	GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2	Hs00257910_s1
GSK3B	GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3-BETA	Hs00275656_m1
KRAS	V-KI-RAS2 KIRSTEN RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG	Hs00364284_g1
MAP2K1	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 1	Hs00983247_g1
MAP2K2	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 2	Hs04194606_gH
MAP2K7	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 7	Hs00178198_m1
MAP3K1	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 1	Hs00394890_m1
MAP3K2	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 2	Hs01109981_m1
MAP3K4	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 4	Hs00245958_m1
MAP3K7	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 7	Hs01105682_m1
MAPK1	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1	Hs01046830_m1
MAPK10	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 10	Hs00373455_m1
MAPK14	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 14	Hs01051152_m1
MAPK3	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3	Hs00946872_m1
MAPK7	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 7	Hs00611114_g1
MAPK8	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 8	Hs00177083_m1
MAPK9	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 9	Hs00177102_m1
MKNK1	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE-INTERACTING SERINE/THREONINE KINASE 1	Hs00374376_m1
MKNK2	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE-INTERACTING SERINE/THREONINE KINASE 2	Hs01046586_g1
MTOR	MECHANISTIC TARGET OF RAPAMYCIN	Hs00234508_m1
PAK1	p21 PROTEIN-ACTIVATED KINASE 1	Hs00176815_m1
PDPK1	3-PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1	Hs00176884_m1
PIK3CA	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA	Hs00907966_m1

PIK3CG	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE, CATALYTIC, GAMMA	Hs00277090_m1
PLK3	POLO-LIKE KINASE 3	Hs00177725_m1
PRKACA	PROTEIN KINASE, cAMP-DEPENDENT, CATALYTIC, ALPHA	Hs00427274_m1
PRKCA	PROTEIN KINASE C, ALPHA	Hs00925195_m1
PTEN	PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOLOG	Hs02621230_s1
PTK2	PROTEIN-TYROSINE KINASE, CYTOPLASMIC	Hs01056457_m1
PTK2B	PROTEIN-TYROSINE KINASE 2, BETA	Hs01559708_m1
RAC1	RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 1	Hs01025984_m1
RAF1	V-RAF-1 MURINE LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	Hs00234119_m1
RALA	V-RAL SIMIAN LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG A	Hs01564991_g1
RALBP1	RALA-BINDING PROTEIN 1	Hs01034988_g1
RALGDS	RAL GUANINE NUCLEOTIDE DISSOCIATION STIMULATOR	Hs00325141_m1
RAP1A	RAS-RELATED PROTEIN 1A	Hs01092205_g1
RASA1	RAS p21 PROTEIN ACTIVATOR 1	Hs00963555_m1
RASA2	RAS p21 PROTEIN ACTIVATOR 2	Hs01003325_m1
RHOA	RAS HOMOLOG GENE FAMILY, MEMBER A	Hs00357608_m1
RINI	RAS AND RAB INTERACTOR 1	Hs00182870_m1
RPS6KA2	RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE, 90-KD, 2	Hs00179731_m1
RPS6KA4	RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE, 90-KD, 4	Hs00177670_m1
RPS6KA5	RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE, 90-KD, 5	Hs01046594_m1
SHC1	SHC TRANSFORMING PROTEIN	Hs01050699_g1
SOS1	SON OF SEVENLESS, DROSOPHILA, HOMOLOG 1	Hs00362316_m1
SOS2	SON OF SEVENLESS, DROSOPHILA, HOMOLOG 2	Hs00412876_g1
SRC	V-SRC AVIAN SARCOMA (SCHMIDT-RUPPIN A-2) VIRAL ONCOGENE	Hs01082238_g1
STAT3	SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3	Hs01047580_m1
ELF1[†]	E74-LIKE FACTOR 1	Hs00152844_m1
EIF2B1[†]	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2B, SUBUNIT 1	Hs00426752_m1
MRPL19[†]	MITOCHONDRIAL RIBOSOMAL PROTEIN L19	Hs00608519_m1
POP4[†]	PROCESSING OF PRECURSOR 4, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF	Hs00198357_m1

Poznámky: [†] Referenční geny

Pro izolaci DNA byla zmražená tkáň drcena ručně za použití keramického tloučku v předem vychlazené třecí misce s malým množstvím tekutého dusíku. Ke zhomogenizované tkáni bylo přidáno 200 µl sterilní vody, 180 µl lyzačního pufru (0,32 M sacharóza; 1% Triton; 50 mM MgCl₂; 12 mM Tris; pH=7,5), 200 µl pufru pro proteinázu K (0,375 M NaCl, 0,12 M EDTA; pH=8), 20 µl proteinázy K (20mg/ml MQ) a 4 µl Rnázy A (100 mg/ml MQ). Poté byla směs umístěna na rotační extraktor, kde probíhala lyzace do následujícího dne. Druhý den bylo

ke vzorkům přidáno 200 μ l 5 M NaCl, 20 μ l 10% SDS a vzorky byly umístěny na 10 minut na rotační extraktor. Poté bylo přidáno 0,5 ml extrakční směsi fenol/chloroform (v poměru 1:1) a vzorky byly opět promíchávány 15 minut na rotačním extraktoru, a centrifugovány 15 minut při 8000 RPM a 4°C. Vrchní čirá fáze obsahující DNA byla přenesena do sterilní 2 ml zkumavky s 1 ml 99% vychlazeného etanolu ČSL2, kde se za opatrného promíchávání utvořil precipitát DNA. DNA byla srážena v mrazicím boxu při -20°C 30 minut, centrifugována 5 min. při 8000 RPM a 4°C s následným odstraněním supernatantu. DNA byla promyta 0,5 ml vychlazeného 70% etanolu a centrifugována 5 minut za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byla DNA sušena při pokojové teplotě 15-30 minut. Vysušená peleta byla rozpouštěna ve 100 - 500 μ l sterilní vody a poté byla změřena koncentrace získané DNA. Vzorky byly uchovávány při -20°C.

3.1.4 Stanovení genetických mutací

Genová mutační analýza *KRAS* byla provedena za použití *KRAS/BRAF/PIK3CA* (KBP) Array (EV3799A/B; Randox Laboratories, Crumlin, UK) spolupracujícím pracovištěm Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK. Tato analýza je založena na kombinaci mnohonásobné PCR a biochipové array hybridizaci za účelem vysokého rozlišení mezi mnohočetnými divokými a mutovanými DNA regiony v genech *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA*. Za předpokladu dostatečného množství kopií DNA může být snadno detekováno ~ 1 % mutací v pozadí divoké genomové DNA. Unikátní primer je navržen pro každý mutační cíl (a kontrolu). Tento primer hybridizuje s komplementárním diskretním testovacím regionem na biochipovém array. Každý diskretní testovací region koresponduje s určitým mutačním cílem. Jeden z cíl-specifických primerů v každém páru obsahuje biotinovou značku, která přidáním streptavidin-křenové peroxidázy umožňuje chemoiluminiscenční detekci hybridizovaných produktů na biochip array. Příslušný software zpracovává výsledky automaticky.

3.1.5 Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR metody

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) byla provedena za použití ViiA7 Real-Time PCR systému a TaqMan Gene Expression Assays s optimalizovanými sety primerů a sond (viz. Tabulka č. 6), s TaqMan Gene Expression Master Mix (LifeTechnologies). *POP4*, *ELF1* a *EIF2B1* byly použity jako referenční geny pro studium lidského karcinomu pankreatu na podkladě našich dříve publikovaných dat.(129) PCR reakce probíhala za následujících podmínek: 2 min. při 50°C, následovala iniciální denaturace 10 minut při 95°C, a 50 cyklů střídavé denaturace 15 sec při 95°C a annealing s elongací 60 sec při teplotě 60°C. Každý vzorek byl analyzován duplicitně a hodnota mediánu použita pro statistické hodnocení. Vzorky s variací větší než 0.5 Ct byly reanalyzovány. K vyloučení kontaminace byly použity non-templátová kontrola bez cDNA a negativní kontrola cDNA syntézy (RNA transkripce bez přítomnosti reversní transkriptázy). Šesti bodová kalibrační křivka (5násobné ředění) připravená z jednoho vzorku nenádorové tkáně byla použita k výpočtu efektivity qPCR každé analýzy dle následujícího vzorce: $E=10^{-1/Slope-1}$. Hladiny transkriptu byly analyzovány pomocí ViiA7 System Software.

qPCR studie byla provedena dle směrnice MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments).(135)

3.1.6 Statistická analýza

Rozdíly v profilech genové exprese mezi nádorovou a párovou kontrolní nenádorovou tkání mezi skupinami pacientů rozdělených dle klinických dat (velikost tumoru, grade tumoru, přítomnost metastáz lymfatických uzlin, angioinvasiv, perineurální invaze, resekcční okraje a přítomnost *KRAS* mutace) byly hodnoceny pomocí programu RT² Profiler PCR Assay Data Analysis v3.5 (Qiagen, Hildesheim, Německo), který v porovnání s klasickou metodou pomocí $\Delta\Delta Ct$ (popsanou Livakem a Schmittgenem (136) umožňuje srovnání míry exprese sledovaných genů vzhledem k většímu počtu referenčních genů a při hodnocení rozdílu mezi tkání nádoru a kontrolní nenádorovou tkání kalkuluje i s procentuální

úspěšností PCR reakce (E). Podobně byly vyhodnoceny i rozdíly v genové expresi ve tkáni nádoru u léčených a kontrolních myších xenograftů.

Celkové přežívání PDAC pacientů (OS) bylo definováno jako doba od data chirurgické léčby do data úmrtí pacienta. Přežívající pacienti byli censorováni při poslední dispenzární kontrole v říjnu 2014. Pacienti byli rozděleni do tří skupin: (A) dlouhodobě přežívající pacienti s OS delším než 3 roky (B) středně době přežívající pacienti s OS mezi 1 a 3 roky (C) krátkodobě přežívající pacienti s OS menším než 1 rok. Rozdíly v profilech genové exprese mezi těmito skupinami pacientů byly hodnoceny výše zmíněným programem RT² Profiler PCR Assay Data Analysis v3.5. Všichni pacienti byli rovněž rozděleni do dvou skupin dle mediánu intratumorální genové exprese jednotlivých genů a hodnoceni dle Kaplan – Meierovy metody. Statistická významnost byla hodnocena log-rank testem SPSS v16.0 Softwarem. Jako statisticky významná byla považována hodnota p menší než 0,05.

3.2 Studium SLC22A3 jako potencionálního rizikového faktoru a prognostického biomarkeru karcinomu pankreatu

3.2.1 Pacienti

Ve studii bylo využito dvoustupňové strategie. V první fázi byly stanoveny genotypy v pilotním souboru, který zahrnoval 245 vzorků pacientů s PDAC (případy) a 442 zdravých kontrol původem z České republiky. Pacienti byli zařazeni do retrospektivní studie, pokud splňovali alespoň jedno z následujících kritérií: a) histologicky nebo cytologicky potvrzený PDAC nebo b) výskyt nejméně 3 klinických znaků PDAC (ERCP, EUS s FNAB, léze potvrzená CT nebo MRI, váhový úbytek, anorexie/kachexie, obstrukční ikterus). Klinicko patologická data pacientů (datum diagnózy, stádium, grading, histologická diagnóza pokud byla stanovena) a epidemiologická data (osobní anamnéza, pracovní anamnéza a nutriční stav) byla získána ze zdravotní dokumentace. (podrobněji viz reference (87, 137)). Druhá validační fáze probíhala na rozsáhlém souboru 1273 případů a 3466 kontrol

zařazených do PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) konsorcia ze tří evropských států (Německo, Itálie a Polsko). U všech případů i kontrol byl k dispozici vzorek DNA získaný z krve a/nebo pankreatické tkáně a rovněž základní klinické údaje (např. věk v době diagnózy, pohlaví, stádium nemoci) i základní epidemiologické údaje týkající se rizikových faktorů vzniku PDAC.. Relevantní základní charakteristiky studovaných populací jsou uvedeny v Tabulce č. 7. Informovaný souhlas byl podepsán všemi účastníky studie v souladu s Helsinskou deklarácí. Všechny vzorky byly kódovány k zajištění ochrany anonymity pacientů. Studie byla schválena Etickou komisí Univerzity v Heidelbergu (referenční číslo S-565/2015). Všechny metody byly prováděny v souladu se směrnicemi a nařízeními zmíněné etické komise.

Tabulka č. 7: Charakteristiky studované populace u pacientů s karcinomem pankreatu a zdravých kontrol

Český soubor	Kontroly		Případy		Hodnota-p†
	N	%	N	%	
Věk (medián ±S.D.) *	51,4±14,5		62,8 ±10,2		<0,001
Pohlaví*					0,860
Muži	229	60,7	128	61,5	
Ženy	148	39,3	80	38,5	
Body mass index * (medián ±S.D.)	30,0±4,2		25.4 ± 4.9		0,001
Neuvedeno	89		62		
Kouření					0,257
Nekuřáci	130	45	56	38,9	
Kuřáci včetně dřívějších kuřáků	159	55	88	61,1	
Neuvedeno	88	-	64	-	
Konsumpce alkoholu					0,466
Abstinenti	118	40,5	53	39,2	
Konzumenti alkoholu včetně dřívějších konzumentů	173	59,5	92	60,8	
Neuvedeno	86	-	63	-	

Klinické stádium					
Stádium I	NA		7	7,4	
Stádium IIA	NA		12	12,8	
Stádium IIIB	NA		15	16,0	
Stádium III	NA		13	13,8	
Stádium IV	NA		47	50,0	
Neuvedeno	NA		114	-	
Vitální stav					
Zemřelí	NA		172	95,5	
Žijící	NA		8	4,5	
Neuvedeno	NA		28	-	
Soubor PANDoRA					
Věk (medián ±S.D.)[#]	60,5±12,2		64,1 ±11,1		<0,001
Pohlaví[#]					0,334
Muži	1702	56,6	590	56,6	
Ženy	1303	43,4	453	43,4	
Země a region					
Německo	1032	34,3	94	9,0	
Heidelberg	0		94	-	
Mannheim	1032		0	-	
Itálie	1651	53,2	862	80,7	
Bologna	0		70	-	
Carrara	0		209	-	
Florence	435		0	-	
Padua	608		188	-	
Pisa	0		74	-	
Roma	89		109	-	
San Giovanni Rotondo	519		106	-	
Verona	0		106	-	
Polsko, Lodz	167	5,5	56	5,3	
Česká republika, Praha	160	7,0	34	5,0	

Klinické stádium				
Stádium I	NA		26	4,5
Stádium IIA	NA		64	11,0
Stádium IIB	NA		207	35,7
Stádium III	NA		104	17,9
Stádium IV	NA		179	30,9
Neuvedeno	NA		466	-
Vitální stav				
Mrtví	NA		611	25,5
Živí	NA		209	74,5
Neuvedeno	NA		226	-

Poznámky: Celkem, po provedení hodnocení kvality kontrol, bylo analyzováno 208 případů a 381 kontrol v pilotní fázi a 1046 případů a 3010 kontrol ve validační fázi.

*chybějící informace u 4 kontrol

#chybějící informace u pěti kontrol a tří případů

†Rozdíly ve statistické významnosti mezi případy a kontrolami byly hodnoceny Mann-Whitney testem (pohlaví, kouření a konzumace alkoholu) a Fisherovým exaktním testem (věk, body mass index)

NA=neaplikovatelné

3.2.2 Izolace DNA

DNA případů a kontrol v případě pilotního souboru vzorků byla izolována z periferních lymfocytů za použití BioSprint 15 DNA Blood kitu (Qiagen, Valencia, CA) a automatizovaného systému KingFisher mL (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) dle protokolu výrobce. DNA kohorty PANDoRA byla izolována z plné krve za použití Qiagen-mini kitu nebo AllPrep izolačního kitu (oba kity značky Qiagen) dle protokolu poskytovatele. DNA byla kvantifikována kitem Quant-iT PicoGreen DNA Assay (Invitrogen).

3.2.3 Stanovení genetických polymorfismů

Na začátku projektu bylo analýzou haplotypu vybráno pomocí programu Haplo View 4. 2. 23 SNPs (SNP z angl. single nucleotide polymorphism) pro naši pilotní studii, a to jmenovitě: rs420038, rs512077, rs4708867, rs17593921, rs7758229, rs2504938, rs675162, rs572149, rs1397168, rs2504926, rs7745775,

rs884742, rs394487, rs1567441, rs2504956, rs12527649, rs3004079, rs316174, rs3120137, rs10455871, rs3088441, rs9364554, a rs2457571. Tento výběr SNPs pokrývá celou oblast genu SLC22A3 včetně promotoru a regulačních oblastí.

Následně byl pilotní soubor genotypován pomocí *KASPar* technologie LGC (Genomics, Hoddesdon, UK). Během validační fáze bylo na souboru PANDoRA verifikováno 6 kandidátních SNPs, které byly vyhodnoceny jako potenciální biomarkery pro riziko vzniku karcinomu pankreatu (rs2457571, rs2504938, rs2504956, rs9364554), rozvoje (rs77582229), či potenciálními prognostickými biomarkery (rs512077, rs7758229, rs2504956). Genotypování bylo provedeno ve Státním zdravotním ústavu v Praze, v České republice. K alelické diskriminaci bylo využito TaqMan technologie (Life Technologies Corp., Foster City, CA) a přístroje ViiA7 real-time s 384-jamkovými destičkami (Life Technologies). Reakční směs (celkový objem 10 μ l) pro real-time PCR obsahovala 5 μ l 2x TaqMan Universal PCR Master mixu (Applied Biosystems), 0,25 μ l TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (primery a sondy navržené výrobcem, Applied Biosystems) a 4,75 μ l DNA templátu. DNA do reakční směsi byla naředěna na koncentraci 0,7 ng/ μ l. V každé reakci byla přítomna negativní kontrola, kde DNA templát byl nahrazen sterilní vodou, k vyloučení možnosti kontaminace reakční směsi. 10 % vzorků bylo reanalyzováno se 100% shodou ve výsledném hodnocení genotypů. PCR reakce probíhala za následujících podmínek: iniciační denaturace 10 minut při 95°C, a 40 cyklů střídavé denaturace 15 sec při 95°C a annealing s elongací 60 sec při teplotě 60°C.

3.2.4 Statistická analýza

Na kontrolní skupině byla ověřena Hardy Weinbergerova rovnováha (HWE) pro každý stanovovaný polymorfismus. Genotypová distribuce studovaných SNPs nevykazovala deviace od HWE ($p > 0.05$) s výjimkou rs3004079, který byl tudíž vyloučen z další analýzy. Ke zhodnocení vztahu zbývajících 22 SNPs s rizikem vzniku PDAC byla použita metoda nepodmíněné logistické regrese s adjustací na vybrané epidemiologické a rizikové faktory (věk, pohlaví, body mass index, anamnéza kouření a konzumace alkoholu). Asociace SNP s prognostickými

klinickými daty (velikost tumoru, přítomnost pozitivních lymfatických uzlin a vzdálených metastáz) byla hodnocena Cochran's and Mantel-Haenszel testem. Celkové přežívání (OS) bylo definováno jako doba od data určení diagnózy do data úmrtí, nebo poslední kontroly pacienta. Pacienti bez záznamu sledování po ukončení léčby (follow up) byli vyloučeni z analýzy. Funkce přežívání byly vypočítány Kaplan-Meier metodou a hodnota statistické významnosti byla hodnocena Log-rank testem. K výpočtu poměru rizik dle stádia nemoci byl použit Coxův model proporcionálních rizik. Hodnota p menší než 0,05 byla považována za statisticky významnou. Rozdíly a vztahy dosahující hladiny významnosti nižší než 0,05 ($p \leq 0,05$) byly považovány jako statisticky významné a prezentovány ve výsledkové části. Analýzy byly provedeny statistickým programem SPSS v15.0 (SPSS, Chicago, IL).

Funkční relevance polymorfismu se statisticky významným vztahem k prognóze PDAC pacientů (rs2504938) byla analyzována *in silico* testem HaploReg v2 a v3.(138) Informace o sledované asociaci tohoto SNP s klinickým fenotypem PDAC byla podána k zapsání do NCBI (The National Center for Biotechnology Information) ClinVar databáze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

3.3 Retrospektivní analýza pacientů s karcinomem pankreatu léčených v našem centru

3.3.1 Pacienti

Do retrospektivní analýzy byla zahrnuta kohorta 159 pacientů s PDAC, kteří podstoupili radikální chirurgický výkon v našem centru v letech 2006 až 2013. Histopatologická diagnóza PDAC byla provedena dle předešlé standardní klasifikace a radikalita výkonu byla hodnocena před zavedením Leedsova protokolu. Klinická data jako věk, pohlaví, stupeň diferenciacce, lokalizace primárního tumoru, pTNM stádium, infiltrace lymfatických uzlin, mikroangioinvaze, perineurální invaze, lymfovaskulární invaze, podávaná léčba

a dispenzarizace, byla získána ze zdravotní dokumentace či doplněna z dat Českého národního onkologického registru. Doba do progrese nemoci (DFS) byla definována jako doba od data chirurgického výkonu do doby diagnózy rekurence nemoci. Kritéria rekurence nemoci byla určena dle definice dříve publikovaných prací.(139, 140) Pacienti byli sledováni v 3měsíčních intervalech s fyzikálním vyšetřením a hodnocením hladiny CA 19-9, CT nebo pozitronová emisní tomografie (PET/CT) v 6měsíčních intervalech, nebo v případě elevace nádorových markerů, či klinické suspekce na relaps nemoci dříve.(141)

Oligometastatická choroba byla definována jako přítomnost limitovaných systémových metastáz, potenciálně vyléčitelných lokální ablativní metodou.(142, 143) Vzhledem k tomu, že studie byla zaměřena na metachronní metastatický PDAC, pacienti kteří zemřeli v pooperačním období (90 dnů) bez známek vzniku rekurence, nebo pacienti s R2 resekcí a pacienti s inkompletními daty, byli z analýzy DFS vyloučeni. Thomfordova kritéria pro pulmonální metastasektomii včetně kontroly primární léze, nepřítomnosti jiných extrapulmonálních metastáz, a pulmonálních metastáz omezených pouze na jednu plíci byla aplikována, stejně jako posouzení schopnosti pacienta podstoupit chirurgický výkon.(144) Chirurgický výkon byl proveden dle konsensu multidisciplinárního týmu. Celkové přežití (OS) bylo definováno jako čas mezi primárním chirurgickým výkonem a datem úmrtí pacienta. Přežívající pacienti byli cenzorováni dle data posledního sledování (31. prosince 2016). Následné analýzy se týkaly pouze pacientů s metachronními metastázami. Klinická data (věk, pohlaví, lokalizace primárního tumoru, stádium pTNM, infiltrace lymfatických uzlin, mikroangioinvaze, perineální invaze, lymfovaskulární invaze, podávaná léčba, dispenzarizace) byla statisticky hodnocena jak u pacientů s metachronními nepulmonálními metastázami, tak u pacientů s metachronními pulmonálními metastázami (MPM). Pacienti s MPM byli vstupně rozděleni do dvou skupin: pacienti s metachronními izolovanými pulmonálními metastázami a pacienti s metachronními pulmonálními metastázami s přítomností metastáz i jiných orgánů.

3.3.2 Statistická analýza

K analýze věku a dalších parametrů bylo použito Wilcoxonova a χ^2 testu. Přežití bylo vypočítáno dle Kaplan-Meierovy metody. Hodnocení statistické významnosti bylo provedeno dle log-rank testu použitím SPSS. Hodnota p menší než 0.05 byla považována za statisticky významnou. Tato studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení expresních profilů hlavních signálních drah onkogeneze karcinomu pankreatu

4.1.1 Charakteristika studované populace

Do studie (Tabulka č. 8) bylo zahrnuto 45 pacientů s resektabilním PDAC (bez známek klinicky detekovatelných metastáz, cM0). 91 % pacientů podstoupilo chirurgickou resekci R0 bez předchozí léčby neoadjuvantní chemoterapií. KBP-cílený mutační screeningový test detekoval přítomnost *KRAS* mutace v 80 % vyšetřených nádorů (N=36/45), zatímco *BRAF* mutace nebyly zjištěny v žádném z vyšetřovaných vzorků. Většina pacientů (76 %; N=34/45) podstoupila adjuvantní chemoterapii na bázi nukleosidových analog (gemcitabin a 5-fluorouracil). Medián OS dosáhl 23,7 měsíce. V době ukončení sledování (prosinec 2015) bylo 18 % pacientů (N=7) stále žijících.

Tabulka č. 8: Klinická data pacientů

Proměnné	N*	%
Věkový průměr (roky); [rozsah]	63.9 [46-80]	
Pohlaví		
Muži	20	44
Ženy	25	56
Histologická diferenciac		
G1+G2 (dobrá až střední)	30	66
G3+G4 (nízká)	15	34

Lokalizace		
Hlava	39	87
Ocas	6	13
Rozsah invaze primárního tumoru		
pT1 nádor omezen na pankreas ≤2cm	1	2
pT2 nádor omezen na pankreas >2cm	5	11
pT3 nádor se šíří mimo pankreas	39	87
pT4 nádor postihuje arteria coeliaca nebo arteria mesenterica superior	0	0
Regionální lymfatické uzliny		
pN0	17	38
pN1	28	62
Angioinvaze		
pA0	25	56
pA1	20	44
Perineurální šíření		
pP0	10	22
pP1	35	88
Resekční linie		
R0 negativní resekční linie	41	91
R1 pozitivní resekční linie	4	9
KRAS mutace v kodonu 12 a 13		
Divoký typ (GGTGGC)	9	20
G12V (GTTGGC)	10	22
G12D (GATGGC)	15	34
G12R (CGTGGC)	6	13
Jiné (G13D, Q61R, Q61H)	3	7
Nehodnoceno	2	4
Adjuvantní terapie		
Ano	34	76
Ne	11	24
Stav v dispenzarizaci		
Zemřelí	33	73
Živí	12	27

Poznámky: *N-počet pacientů

4.1.2 Relativní kvantifikace míry exprese genů pomocí real-time PCR metody

4.1.2.1 Expresní profily KRAS a Hedgehog signálních drah v nádorové tkáni PDAC pacientů

KRAS a Hedgehog signální (HH) dráhy patří k hlavním řídicím drahám karcinogeneze u PDAC. V rámci této práce byly stanoveny transkripční profily 52 genů KRAS signální dráhy a 34 genů HH dráhy v homogenním souboru 45 PDAC pacientů, kteří podstoupili radikální chirurgickou léčbu. HH signální dráha byla statisticky významně zvýšeně exprimována v tumoru oproti okolní nenádorové

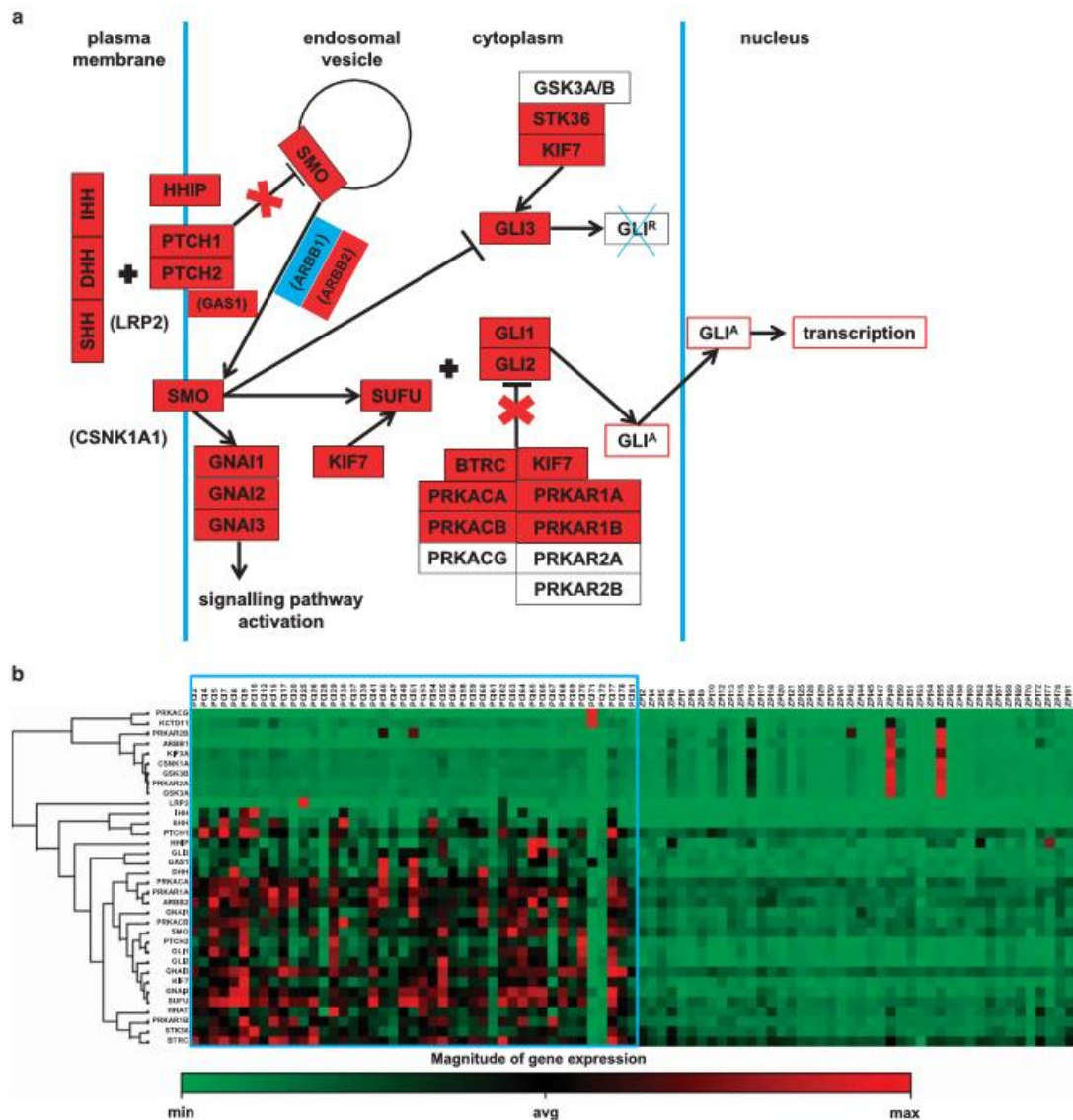
tkáni. Tyto výsledky byly rovněž potvrzeny FDR korekcí (Tabulka č. 9, Obrázek č. 1).

Tabulka č. 9: Rozdíly v expresi genů HH signální dráhy v nádorové tkáni PDAC při srovnání s okolní nenádorovou tkáni slinivky břišní

Gen	Poměr hladiny nádor/kontrola	95% konfidenční interval	Hodnota-p	Hodnota-q
SHH	15.9	5.56 - 26.28	<0.001	0.001
DHH	5.1	3.12 - 7.01	<0.001	0.003
IHH	54.8	8.68 - 101.00	<0.001	0.004
HHAT	2.1	1.59 - 2.65	<0.001	0.006
PTCH1	1.9	1.39 - 2.51	<0.001	0.007
PTCH2	6.3	3.43 - 9.09	<0.001	0.009
SMO	2.2	1.59 - 2.83	<0.001	0.010
GNAI1	3.1	2.00 - 4.13	<0.001	0.012
GNAI2	3.7	3.09 - 4.40	<0.001	0.013
GNAI3	2.8	2.17 - 3.46	<0.001	0.015
KIF7	5.1	3.68 - 6.50	<0.001	0.016
STK36	2.6	1.92 - 3.35	<0.001	0.018
SUFU	3.5	2.75 - 4.34	<0.001	0.019
GLI1	8.3	4.67 - 11.94	<0.001	0.021
GLI2	11.9	7.25 - 16.57	<0.001	0.022
GLI3	4.0	2.97 - 4.97	<0.001	0.023
PRKACB	2.8	2.02 - 3.50	<0.001	0.025
PRKACG	3.2	1.06 - 5.27	0.351	0.044
PRKAR1A	2.6	2.16 - 3.08	<0.001	0.027
PRKAR1B	3.2	2.40 - 3.94	<0.001	0.028
PRKAR2A	2.0	0.92 - 3.02	0.311	0.043
PRKAR2B	1.2	0.29 - 1.35	0.172	0.041
CSNK1A	2.7	1.24 - 4.16	0.868	0.048
GSK3A	2.7	1.25 - 4.15	0.624	0.046
GSK3B	3.0	1.40 - 4.55	0.991	0.050
KCTD11	4.1	1.80 - 6.34	0.130	0.040
KIF3A	3.6	1.39 - 5.80	0.766	0.047
ARRB1	0.4	0.30 - 1.03	<0.001	0.029
ARRB2	3.1	2.21 - 3.97	<0.001	0.031
GAS1	3.7	2.21 - 5.09	<0.001	0.032
HHP	2.2	0.79 - 3.71	<0.001	0.034
LRP2	10.8	5.30 - 16.27	0.071	0.038
BTRC	2.0	1.43 - 2.62	<0.001	0.035
PRKACA	2.6	1.75 - 3.43	<0.001	0.037

Poznámky: -p hodnoty byly vypočítány pomocí programu RT2 Profiler PCR Assay Data Analysis v3.5. (Qiagen, Hildesheim, Německo). FDR test byl vypočítán dle Benjaminiho a Hochberga (1995), hodnoty-q byly uvedeny pro každé srovnání. Výsledky, které prošly FDR testem, jsou označeny šedou barvou

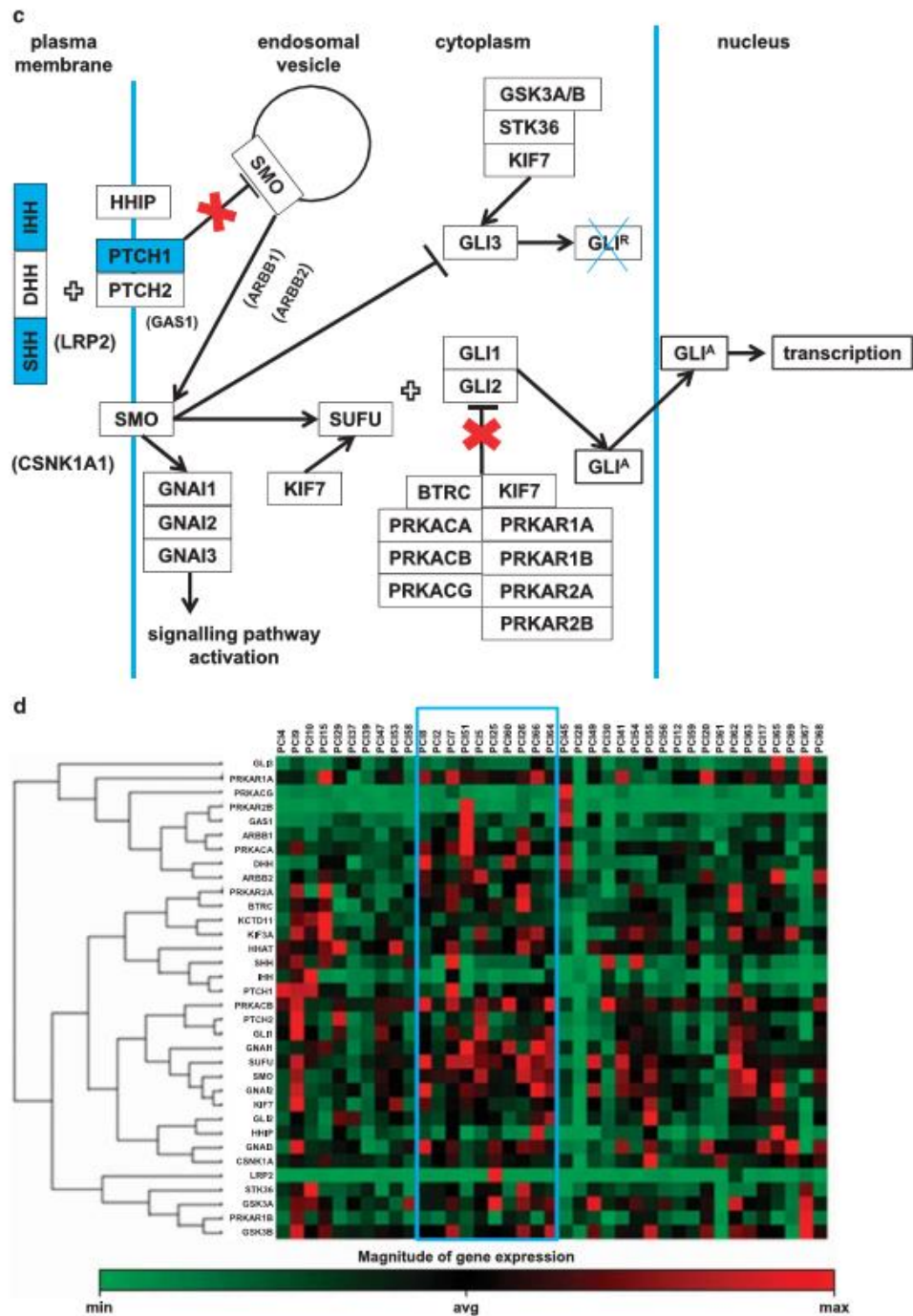
Obrázek č. 1: Deregulace HH signální dráhy v nádorové tkáni PDAC oproti párové nenádorové tkáni okolního pankreatu



a/ Heat-mapa HH signální tkáni poukazuje na její výraznou deregulaci v PDAC tkáních. Zvýšeně exprimované geny v nádorové tkáni jsou označeny červeně a sniženě exprimované geny jsou označeny modrou barvou. Geny beze změny exprese jsou bezbarvé.

b/ Heat mapa exprese HH signální dráhy PDAC. Nádorová tkáň je označena vlevo, nenádorová pankreatická tkáň je vpravo.

Obrázek č. 2: Deregulace HH signální dráhy v nádorové tkáni PDAC mezi krátkodobě a dlouhodobě přežívajícími pacienty



c/ Heat mapa HH signální dráhy ukázala sníženou expresi některých genů u PDAC pacientů s OS delším než 3 roky oproti krátkodobě přežívajícím pacientům. Geny se sníženou expresí jsou označeny modře, geny beze změny exprese jsou bez barvy.

d/ Heat mapa HH signální dráhy ukazující rozdíly v genové expresi PDAC pacientů s OS delším než 3 roky oproti krátkodobě přežívajícím pacientům. Nádorová tkáň dlouhopřežívajících pacientů je označena modrým obdélníkem a porovnávána s krátkodobě přežívajícími pacienty (ostatní pacienti).

Při analýze exprese genů HH signální dráhy vzhledem ke klinicko-patologickým charakteristikám nádorové tkáně byla pozorována statisticky signifikantně zvýšená exprese několika genů u tumorů s vyšším stupněm diferenciací nádorových buněk (grade 1 nebo 2) oproti tumorům grade 3 nebo 4, a také u lokálně méně pokročilých tumorů (T1/2 a bez postižení lymfatických uzlin) (Tabulka č. 10). Nicméně tyto asociace nebyly potvrzeny FDR testem. *KRAS* mutované PDAC měly statisticky signifikantně nižší genovou expresi *DHH*, *PRKAR2A*, *PRKAR2B*, *ARRB1*, *ARRB2* a vyšší expresi *HHP* než tumory s divokou alelou *KRAS* (Tabulka č. 11). Z těchto zmíněných asociací však byla potvrzena FDR testem pouze snížená regulace *PRKAR2A* u *KRAS* mutovaných nádorů. Čtyři klíčové geny HH signální dráhy (*SHH*, *IHH*, *HHAT* a *PTCH1*) byly statisticky významně sníženy exprimovány u prognosticky příznivých PDAC pacientů (žijících déle než 3 roky) v porovnání s pacienty s krátkým OS. Nicméně exprese následujících efektorových (downstream) genů této signální dráhy nebyla signifikantně deregulována. (Tabulka č. 12, Obrázek č. 2). Porovnávané skupiny pacientů se signifikantně nelišily v distribuci klinických dat ($P > 0.05$, Tabulka č. 13). Žádná z pozorovaných asociací nebyla potvrzena FDR korekcí ($q = 0.001$). Kaplan- Meierovy křivky neprokázaly statisticky významné rozdíly v OS mezi pacienty rozdělenými dle mediánu intratumorálních hladin mRNA jednotlivých genů ($P < 0.05$), gradingu, velikosti tumoru (pT), postižení lymfatických uzlin (pN), angioinvaze (pA), perineurální invaze (pP), přítomnosti tumorových buněk v resekcčních okrajích (pR) a ani přítomnosti *KRAS* mutace.

Tabulka č. 10: Expresse HH signální dráhy stratifikovaná dle klinických dat pacientů Mann-Whitney U test)

Gen	Grade		Velikost tumoru		Metastázy lymfatických uzlin		Angioinvas		Perineurální invase		Resekční okraje	
	P-hodnota	Trend	P-hodnota	Trend	P-hodnota	Trend	P-hodnota	Trend	P-hodnota	Trend	P-hodnota	Trend
<i>SHH</i>	0.896	-	0.131	-	0.223	-	0.355	-	0.772	-	0.406	-
<i>DHH</i>	0.176	-	0.757	-	0.566	-	0.157	-	0.572	-	0.954	-
<i>IHH</i>	0.779	-	0.106	-	0.323	-	0.878	-	0.356	-	0.373	-
<i>HHAT</i>	0.462	-	0.732	-	0.673	-	0.560	-	0.499	-	0.863	-
<i>PTCH1</i>	0.785	-	1.000	-	0.282	-	0.545	-	0.299	-	0.715	-
<i>PTCH2</i>	0.420	-	0.160	-	0.842	-	0.293	-	0.206	-	0.139	-
<i>SMO</i>	0.217	-	0.181	-	0.640	-	0.918	-	0.286	-	0.577	-
<i>GNAI1</i>	0.109	-	0.257	-	0.734	-	0.560	-	0.151	-	0.631	-
<i>GNAI2</i>	0.448	-	0.525	-	0.788	-	0.936	-	0.730	-	0.175	-
<i>GNAI3</i>	0.669	-	0.884	-	0.266	-	0.063	-	0.499	-	0.363	-
<i>KIF7</i>	0.209	-	0.708	-	0.925	-	0.500	-	0.261	-	0.056	-
<i>STK36</i>	0.104	-	0.546	-	0.320	-	0.479	-	0.669	-	0.250	-
<i>SUFU</i>	0.569	-	0.301	-	0.550	-	0.639	-	0.858	-	0.118	-
<i>GLI1</i>	0.308	-	0.074	-	0.953	-	0.537	-	0.143	-	0.342	-
<i>GLI2</i>	0.291	-	0.404	-	0.640	-	0.309	-	0.261	-	0.923	-
<i>GLI3</i>	0.129	-	0.637	-	0.543	-	0.230	-	0.572	-	0.715	-
<i>PRKACB</i>	0.469	-	0.732	-	0.468	-	0.424	-	0.669	-	0.744	-
<i>PRKACG</i>	0.141	-	0.038	pT1/2 > pT3/4	0.797	-	0.784	-	0.901	-	0.406	-
<i>PRKAR1A</i>	0.420	-	0.757	-	0.842	-	0.298	-	0.447	-	0.525	-
<i>PRKAR1B</i>	0.577	-	0.217	-	0.907	-	0.599	-	0.136	-	0.056	-
<i>PRKAR2A</i>	0.349	-	0.021	pT1/2 > pT3/4	0.017	pN0 > pN1	0.361	-	0.669	-	0.099	-
<i>PRKAR2B</i>	0.135	-	0.935	-	0.475	-	0.404	-	0.710	-	0.303	-
<i>PRKACA</i>	0.325	-	0.243	-	0.590	-	0.758	-	0.534	-	0.128	-
<i>CSNK1A</i>	0.033	G1/2 > G3/4	0.884	-	0.406	-	0.500	-	0.572	-	0.577	-
<i>GSK3A</i>	0.255	-	0.386	-	0.925	-	0.672	-	0.772	-	0.744	-
<i>GSK3B</i>	0.767	-	0.114	-	0.833	-	0.424	-	0.121	-	0.773	-
<i>KCTD11</i>	0.022	G1/2 > G3/4	0.935	-	0.898	-	0.689	-	0.136	-	0.285	-
<i>KIF3A</i>	0.009	G1/2 > G3/4	0.568	-	0.137	-	0.909	-	0.901	-	0.715	-
<i>ARRB1</i>	0.022	G1/2 > G3/4	0.935	-	0.044	pN0 > pN1	1.000	-	0.447	-	0.303	-
<i>ARRB2</i>	0.188	-	0.525	-	0.797	-	0.991	-	0.880	-	0.342	-
<i>GAS1</i>	0.617	-	0.374	-	0.172	-	0.437	-	0.702	-	0.107	-
<i>HHP</i>	0.638	-	0.113	-	0.656	-	0.991	-	0.628	-	0.768	-
<i>LRP2</i>	0.271	-	0.751	-	0.273	-	0.053	-	0.215	-	0.012	pR0 > pR1
<i>BTRC</i>	0.400	-	0.858	-	0.574	-	0.248	-	0.591	-	0.203	-

Poznámky: FDR test $q=0.001$

Tabulka č. 11: Expresse HH signální dráhy stratifikovaná dle KRAS mutace (Mann-Whitney U test)

Gen	Hodnota-p	Trend
<i>SHH</i>	0.194	
<i>DHH</i>	0.010	KRAS divokého typu > KRAS mutovaný
<i>IHH</i>	0.161	
<i>HHAT</i>	0.362	
<i>PTCH1</i>	0.976	
<i>PTCH2</i>	0.952	
<i>SMO</i>	0.395	
<i>GNAI1</i>	0.282	
<i>GNAI2</i>	0.097	
<i>GNAI3</i>	0.473	
<i>KIF7</i>	0.455	
<i>STK36</i>	0.988	
<i>SUFU</i>	0.601	
<i>GLI1</i>	0.438	
<i>GLI2</i>	0.054	
<i>GLI3</i>	0.092	
<i>PRKACB</i>	0.165	
<i>PRKACG</i>	0.464	
<i>PRKARIA</i>	0.502	
<i>PRKAR1B</i>	0.160	
<i>PRKAR2A</i>	0.039	KRAS divokého typu > KRAS mutovaný
<i>PRKAR2B</i>	0.001	KRAS divokého typu > KRAS mutovaný
<i>PRKACA</i>	0.160	
<i>CSNK1A</i>	0.238	
<i>GSK3A</i>	0.263	
<i>GSK3B</i>	0.881	
<i>KCTD11</i>	1.000	
<i>KIF3A</i>	0.530	
<i>ARRB1</i>	0.025	KRAS divokého typu > KRAS mutovaný
<i>ARRB2</i>	0.007	KRAS divokého typu > KRAS mutovaný
<i>GAS1</i>	0.917	
<i>HHP</i>	0.029	KRAS divokého typu < KRAS mutovaný
<i>LRP2</i>	0.976	
<i>BTRC</i>	0.050	

Poznámky: FDR test $q=0.001$

Tabulka č. 12: Rozdíly v expresi genů HH signální dráhy mezi pacienty rozdělenými dle OS

Gen	Poměr hladiny nádor/kontrola	95 % konfidenční Interval	Hodnota-p	Hodnota-q
SHH	0.2	0.02 - 0.43	0.050	0.006
DHH	1.2	0.47 - 1.90	0.529	0.026
IHH	0.1	<0.00 - 0.27	0.022	0.004
HHAT	0.6	0.35 - 0.91	0.021	0.003
PTCH1	0.6	0.32 - 0.81	0.015	0.002
PTCH2	0.7	0.30 - 1.06	0.101	0.009
SMO	1.0	0.54 - 1.45	0.571	0.032
GNAI1	0.8	0.38 - 1.23	0.695	0.037
GNAI2	1.0	0.85 - 1.26	0.516	0.023
GNAI3	1.0	0.88 - 1.22	0.538	0.028
KIF7	0.9	0.50 - 1.38	0.803	0.041
STK36	0.9	0.54 - 1.16	0.257	0.013
SUFU	1.0	0.80 - 1.25	0.604	0.034
GLI1	0.6	0.24 - 1.00	0.225	0.010
GLI2	0.9	0.49 - 1.25	0.725	0.038
GLI3	1.2	0.56 - 1.83	0.398	0.019
PRKACB	0.9	0.58 - 1.15	0.624	0.035
PRKACG	1.2	0.43 - 1.91	0.357	0.016
PRKAR1A	1.1	0.84 - 1.41	0.396	0.018
PRKAR1B	0.9	0.62 - 1.24	0.846	0.044
PRKAR2A	1.0	0.79 - 1.22	0.877	0.047
PRKAR2B	1.1	0.47 - 1.66	0.510	0.022
CSNK1A	1.0	0.79 - 1.18	0.788	0.040
GSK3A	1.0	0.74 - 1.27	0.850	0.046
GSK3B	1.0	0.81 - 1.11	0.819	0.043
KCTD11	0.8	0.45 - 1.20	0.243	0.012
KIF3A	0.9	0.72 - 1.12	0.528	0.025
ARRB1	0.9	0.71 - 1.10	0.567	0.029
ARRB2	1.0	0.78 - 1.28	0.568	0.031
GAS1	1.5	0.63 - 2.38	0.063	0.007
HHP	0.3	0.01 - 0.64	0.509	0.021
LRP2	1.5	0.23- 2.69	0.324	0.015
BTRC	1.0	0.80 - 1.26	0.900	0.049
PRKACA	1.0	0.74 - 1.16	0.978	0.050

Poznámky: 95% konfidenční interval a hodnota-p byly vypočítány pomocí programu RT2 Profiler PCR Assay Data Analysis v3.5. (Qiagen, Hildesheim, Německo). FDR test byl vypočítán dle Benjaminiho a Hochberga (1995), hodnoty-q byly uvedeny pro každé srovnání

Tabulka č. 13: Porovnání klinicko-patologických charakteristik pacientů rozdělených dle OS

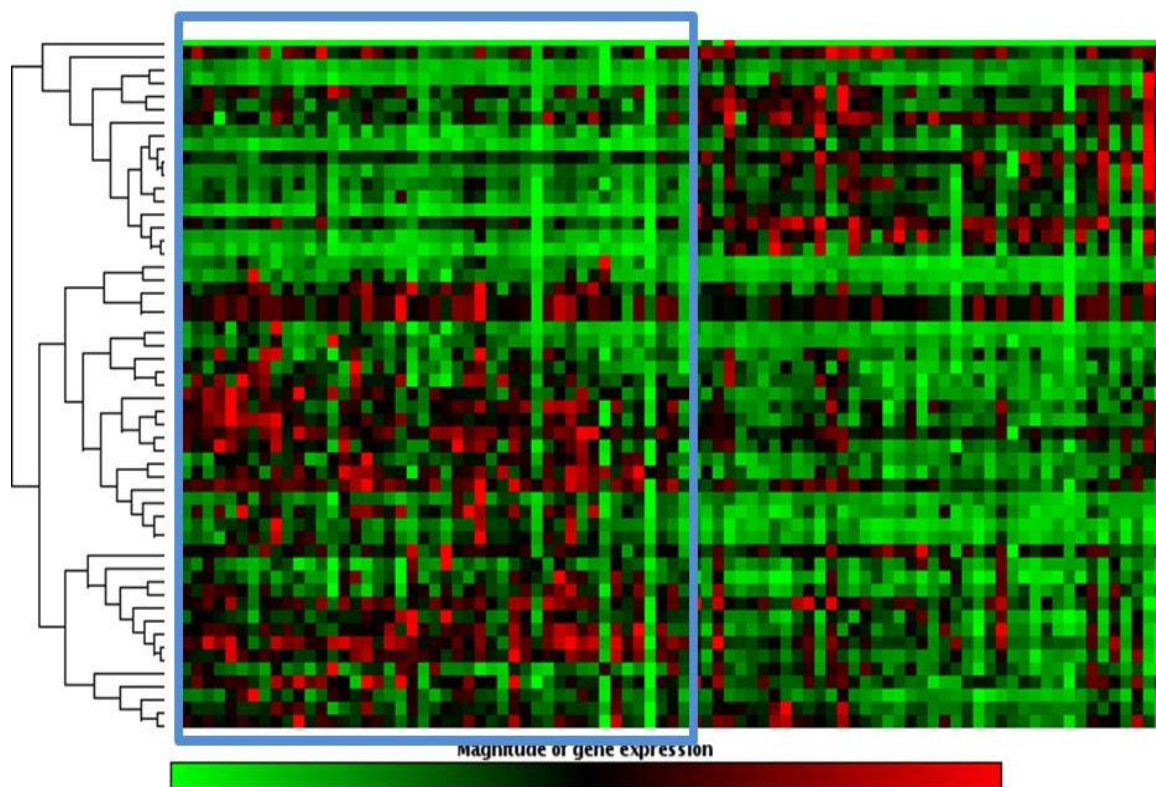
OS	Dlouhé		Střední		Krátké		Hodnota -p [#]
	N*	%	N*	%	N*	%	
<i>Proměnné</i>							
<i>Histologická diferenciac</i>							
G1+G2 (dobře až středně)	5	17	4	14	20	69	0.554
G3+G4 (špatně)	5	31	2	13	9	56	
<i>Rozsah invaze primárního tumoru</i>							
pT1 nebo pT2	0	0	1	83	5	17	0.372
pT3 nebo pT4	10	26	5	13	24	61	
<i>Regionální lymfatické uzliny</i>							
pN0	3	18	3	18	11	64	0.727
pN1	7	25	3	11	18	64	
<i>Angioinvaze</i>							
pA0	7	28	2	8	16	64	0.359
pA1	3	15	4	20	13	65	
<i>Perineurální invaze</i>							
pP0	1	10	1	10	8	80	0.451
pP1	9	25	20	59	5	15	
<i>Resekční okraje</i>							
R0 negativní	9	22	6	15	26	63	0.713
R1 pozitivní	1	25	0	0	3	75	
<i>KRAS mutace v kodonech 12 a 13</i>							
Divoký typ (GGTGGC)	4	44	1	12	4	44	0.238 [†]
G12V (GTTGGC)	4	40	2	20	4	40	
G12D (GATGGC)	1	7	1	7	13	86	
G12R (CGTGGC)	0	0	0	0	6	100	
Jiné (G13D, Q61R, Q61H)	1	33	2	67	0	0	
Nehodnoceno	0	0	0	0	2	100	

Poznámky: *OS- celkové přežívání pacientů, N - počet pacientů, [#]hodnota-p vypočítána dle chi-square testu, [†]všechny typy mutací KRAS v kodonech 12 a 13 versus divoký typ

Také druhá ze studovaných signálních drah, KRAS signální dráha, byla významně dysregulována v nádorové tkáni při srovnání s okolní pankreatickou nenádorovou tkání slinivky břišní (Obrázek č. 3, Tabulka č. 14). Geny 4 signálních drah, které se nacházejí níže pod protoonkogenem KRAS, byly velmi odlišně exprimovány v tumorech při srovnání s nenádorovou tkání slinivky. Byla prokázána statisticky významně zvýšená exprese 3 z těchto 4 drah, a to *PI3K/PDK1/AKT*, *RAL* guanine nucleotide exchange factor, a *RINI/ABL* (*PIK3CA/G*, *PAK1*, *RALA*, *RALBP1*, *RAC1*, *RINI*, *PTK2*, and *SRC*) dráhy, které jsou v přímém kontextu s remodelací cytoskeletu buněk a endocytózou a jsou zodpovědné za migraci

nádorových buněk a šíření nemoci. Naopak geny *RAF/MAPK* dráhy byly v nádorové tkáni exprimovány méně. Všechny tyto výsledky prokázaly signifikanci i po prověření FDR testem a většina si zachovala signifikanci i v Bonferroniho korekci (Tabulka č. 14, Obrázek č. 4). Naopak žádná asociace mezi genovou expresí *KRAS* downstream signálních drah a kliko-patologickou charakteristikou tumoru včetně velikosti tumoru, diferenciací, angioinvazí, metastáz lymfatických uzlin nebo perineurální invazí, nedosáhla hladiny významnosti v Bonferiho korekčním testu.

Obrázek č. 3: Deregulace *KRAS* signální dráhy v nádorové tkáni PDAC oproti párové pankreatické nenádorové tkáni



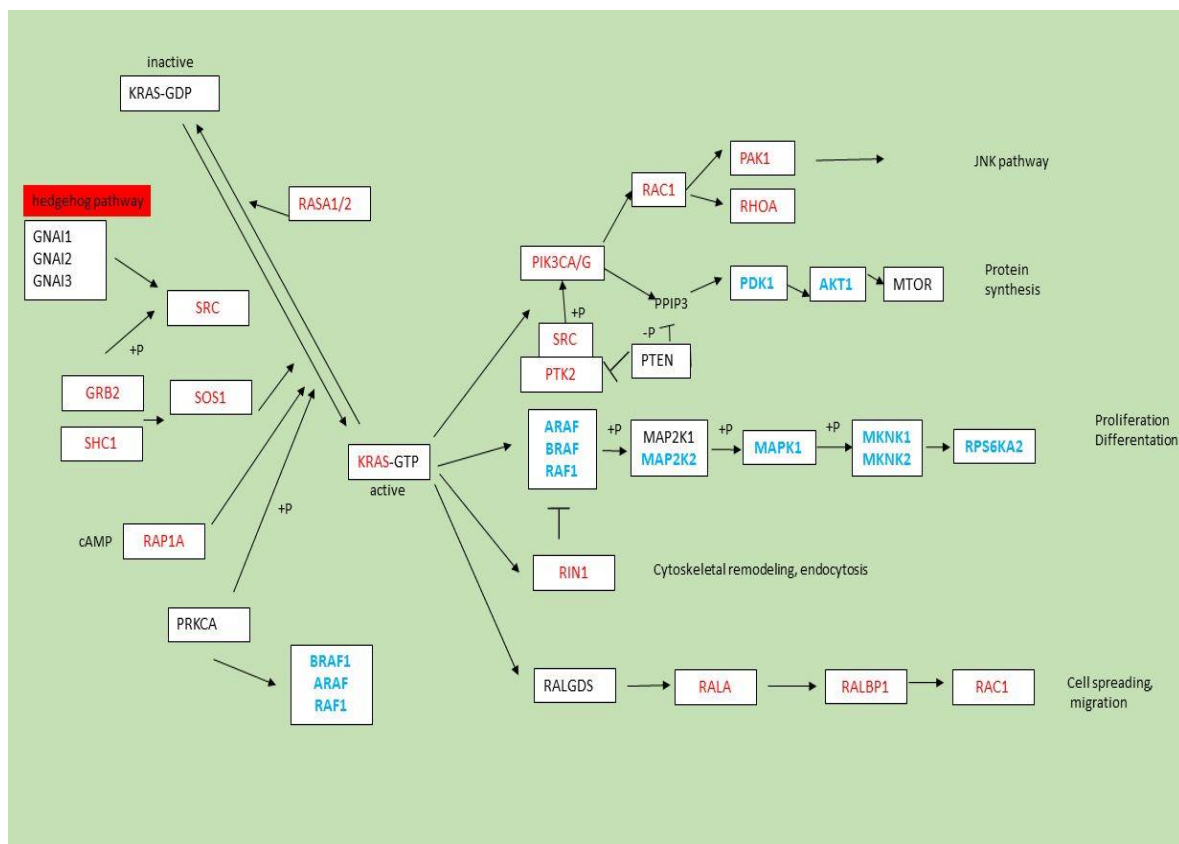
Poznámky: Nádorová tkáň je označena modrým obdélníkem vlevo a nenádorová pankreatická tkáň je na pravé straně

Tabulka č. 14: Rozdíly v expresi genů KRAS signální dráhy v nádorové tkáni PDAC při srovnání s okolní nenádorovou tkáni slinivky břišní

Gen	Poměr hladiny nádor/kontrola	95 % konfidenční interval ^a	Hodnota-p ^a
AKT1	0.73	(0.63- 0.83)	<0.001 ^b
ARAF	0.72	(0.63- 0.81)	<0.001 ^b
BRAF	0.84	(0.74- 0.93)	0.001
GRB2 ^c	1.37	(1.04- 1.69)	<0.001 ^b
KRAS ^c	2.04	(1.67- 2.41)	<0.001 ^b
MAP2K2	0.64	(0.46- 0.82)	<0.001 ^b
MAP2K7	0.52	(0.39- 0.65)	<0.001 ^b
MAP3K1	0.85	(0.75- 0.95)	0.010
MAP3K2 ^c	1.24	(1.13- 1.36)	<0.001 ^b
MAP3K7 ^c	1.28	(1.14- 1.41)	<0.001 ^b
MAPK1	0.77	(0.59- 0.94)	<0.001 ^b
MAPK14 ^c	1.27	(1.14- 1.40)	<0.001 ^b
MAPK3 ^c	1.71	(1.26- 2.15)	<0.001 ^b
MAPK7 ^c	1.20	(1.01- 1.38)	0.006
MAPK8	0.81	(0.74- 0.88)	<0.001 ^b
MAPK9	0.47	(0.38- 0.55)	<0.001 ^b
MKNK1	0.31	(0.25- 0.38)	<0.001 ^b
MKNK2	0.35	(0.26- 0.44)	<0.001 ^b
PAK1 ^c	1.27	(1.08- 1.45)	0.001
PDPK1	0.73	(0.64- 0.81)	<0.001 ^b
PIK3CA ^c	1.46	(1.25- 1.68)	<0.001 ^b
PIK3CG ^c	2.22	(1.61- 2.82)	<0.001 ^b
PLK3 ^c	1.56	(1.23- 1.88)	<0.001 ^b
PTEN ^c	1.29	(1.05- 1.53)	0.006
PTK2B ^c	1.68	(1.44- 1.91)	<0.001 ^b
RAC1 ^c	1.65	(1.34- 1.96)	<0.001 ^b
RAF1	0.62	(0.54- 0.69)	<0.001 ^b
RALA ^c	1.43	(1.27- 1.59)	<0.001 ^b
RALBP1 ^c	1.60	(1.39- 1.81)	<0.001 ^b
RAP1A ^c	1.18	(1.07- 1.29)	<0.001 ^b
RASA1 ^c	1.28	(1.12- 1.43)	<0.001 ^b
RASA2 ^c	1.87	(1.51- 2.23)	<0.001 ^b
RHOA ^c	1.23	(1.13- 1.34)	<0.001 ^b
RIN1 ^c	1.39	(1.10- 1.67)	0.002
RPS6KA2	0.65	(0.49- 0.81)	0.001 ^b
RPS6KA4 ^c	1.76	(1.45- 2.08)	<0.001 ^b
SHC1 ^c	1.24	(1.09- 1.38)	0.001 ^b
SOS1 ^c	1.32	(1.14- 1.50)	<0.001 ^b
SOS2	0.68	(0.59- 0.77)	<0.001 ^b
SRC ^c	1.43	(1.16- 1.71)	<0.001 ^b

Poznámky: 95% konfidenční interval a hodnoty –p byly počítány pomocí RT2 Profiler PCR Assay Data analysis v3.5 program; ^b výsledek potvrzený Bonferroniho korekcí u 52 analyzovaných genů (hranice signifikantnosti P=0.001); ^c zvýšeně regulované geny. Seznam 14 dalších genů, jejichž změna exprese nebyla statisticky signifikantní, a proto nejsou uvedeny v tabulce: *AKT2*, *GSK3B*, *MAP2K1*, *MAP3K4*, *MAPK10*, *MTOR*, *PRKACA*, *PRKCA*, *PTEN*, *PTK2*, *RALGDS*, *RAP1A*, *RPS6KA* a *STAT3*

Obrázek č. 4: Dysregulace KRAS signální dráhy v nádorové tkáni PDAC oproti okolní nenádorové tkáni slinivky břišní



Poznámky: Schema KRAS signální dráhy ukazující rozdíly v genové expresi v nádorové tkáni PDAC oproti okolní nenádorové tkáni pankreatu. Geny se zvýšenou expresí v nádorové tkáni jsou označeny červeně, geny se sníženou expresí jsou označeny modře. Geny beze změny exprese jsou označeny černě

U 80 % vzorků nádorové tkáně, kde byla nalezena přítomnost *KRAS* mutace, byla nejčastěji se vyskytující mutací *KRAS*^{G12D}, a to ve 33 % (n=15) vzorků nádorové tkáně. Pouze u jednoho z tumorů byla nalezena mutace v kodonu 13 a ve dvou případech byla nalezena mutace v kodonu 61 (Tabulka č. 8). Pacienti rozdělení dle přítomnosti *KRAS* mutace se signifikantně lišili v expresi 5 z 52 analyzovaných genů (*BRAF*, *MAP3K4*, *MAPK8*, *MKNK1* a *SOS2*; $P < 0.05$; Tabulka č. 15), ale žádná z těchto asociací nebyla potvrzena korekcí mnohočetného testování (FDR testem). Nicméně stejně jako v případě Hedgehog signální dráhy, ani zde se neprokázal vztah efekt *KRAS* signální dráhy na celkové přežívání pacientů. Pacienti s nádory *KRAS*- divokého typu dosáhli medián OS 22.3 měsíce a pacienti s *KRAS*-mutovanými nádory mediánu OS 21 měsíců ($p=0.182$). Nebyla rovněž nalezena asociace mezi transkripčními hladinami *KRAS* mRNA a celkovým OS.

Nicméně oproti zbytku studované signální dráhy, deregulace genové exprese *RAF1* byla prokázána jako slibný potenciální prognostický marker PDAC pacientů po radikální chirurgické resekci. Pacienti s nižšími expresními hladinami *RAF1* dosahovali delšího času OS než pacienti s vyššími expresními hladinami *RAF1* ($p=0.030$) (Obrázek č. 6). Nicméně tato asociace nebyla potvrzena Bonferroniho korekcí mnohočetného testování.

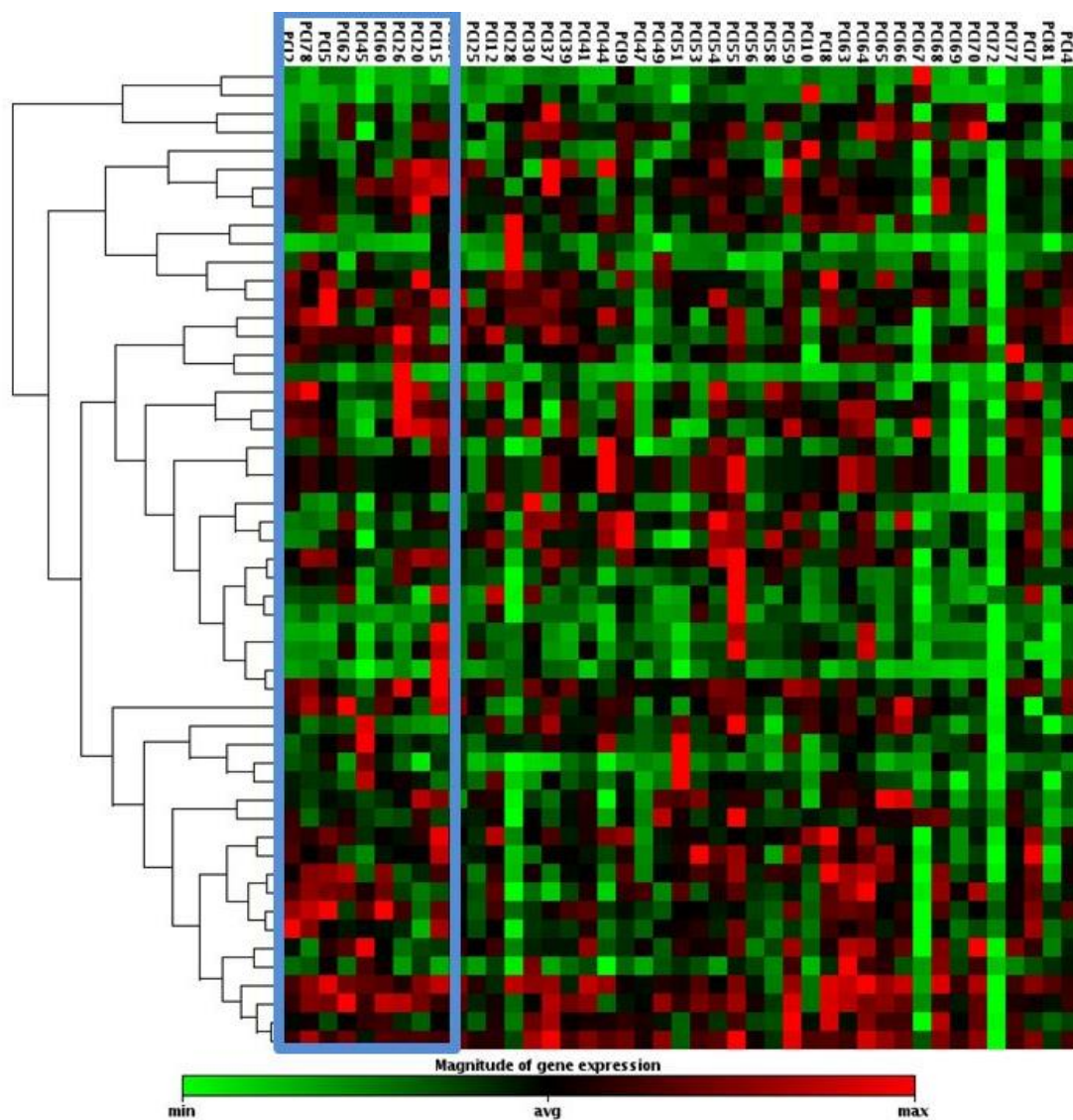
Zajímavé je, že dráha *KRAS* je stejně deregulována v případě přítomné *KRAS* mutace, jako i v tumorech bez mutace v genu *KRAS*. (Obrázek č. 5).

Tabulka č. 15: Snížená regulace genů *KRAS* signální dráhy u *KRAS* mutovaných PDAC v porovnání s nádory bez přítomné *KRAS* mutace

Gen	Poměr hladiny <i>KRAS</i> mut nádor/ <i>KRAS</i> wt kontrola	95% konfidenční interval ^a	hodnota-p ^a
BRAF	0.84	(0.72- 0.95)	0.021
MAP3K4	0.79	(0.67- 0.91)	0.035
MAPK8	0.84	(0.71- 0.97)	0.027
MKNK1	0.72	(0.45- 0.99)	0.033
SOS2	0.77	(0.59- 0.94)	0.003

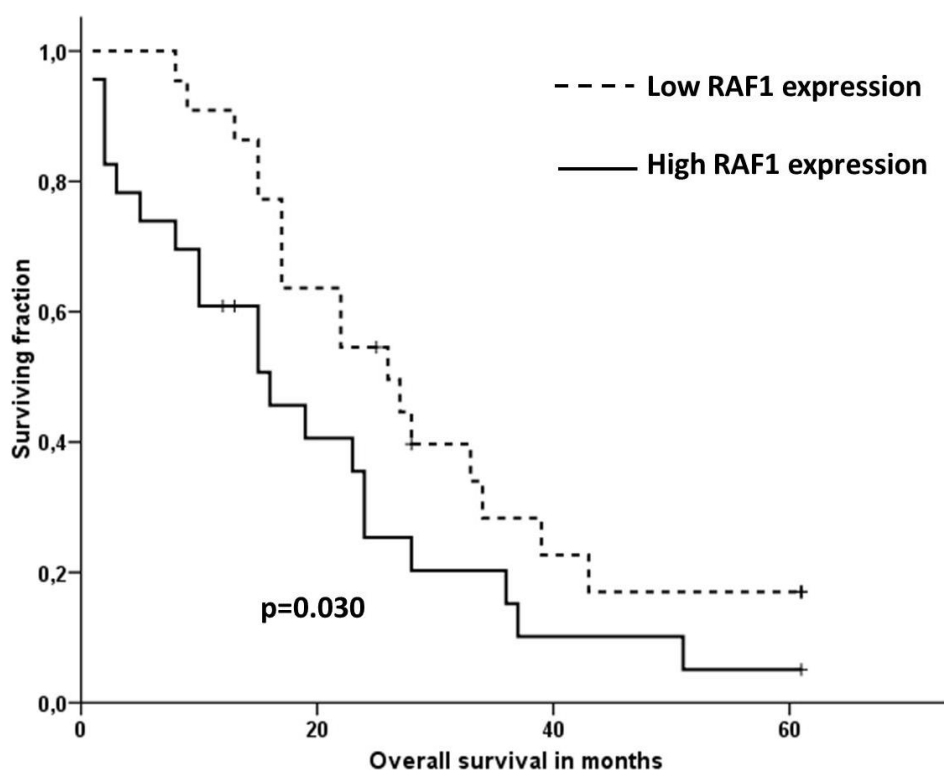
Poznámky: mut- přítomna *KRAS* mutace v kodonech 12 nebo 13, wt- wild typ, tedy divoký typ
95% konfidenční interval a hodnota-p byla vypočtena pomocí programu RT2 Profiler PCR Assay Data Analysis v3.5. (Qiagen. Hildesheim, Německo)

Obrázek č. 5: Heat mapa expresního profilu KRAS signální dráhy v nádorové tkáni



Poznámky: *KRAS* nádory divokého typu jsou označeny modrým obdélníkem vlevo a vzorky s *KRAS* mutací jsou na pravé straně

Obrázek č. 6: Kaplan-Meierovy křivky celkového přežívání PDAC pacientů dle míry exprese *RAF1*



Expression	Total, N	Events, N	Median OS	95% CI
Low RAF1	22	17	26	15-37
High RAF1	23	20	16	7-25

Poznámky: Low RAF1 expression-nízká exprese RAF1, High RAF1 exprese-vysoká exprese RAF1, surviving fraction-přežívající frakce, overall survival in months-OS v měsících, Total N-celkový počet pacientů, Events,N-celkový počet příhod, 95% CI-95% konfidenční interval

4.1.2.2 Expresní profily Hedgehog signální dráhy v nádorové tkáni PDAC xenograftů—efekt SB-T-1216 léčby

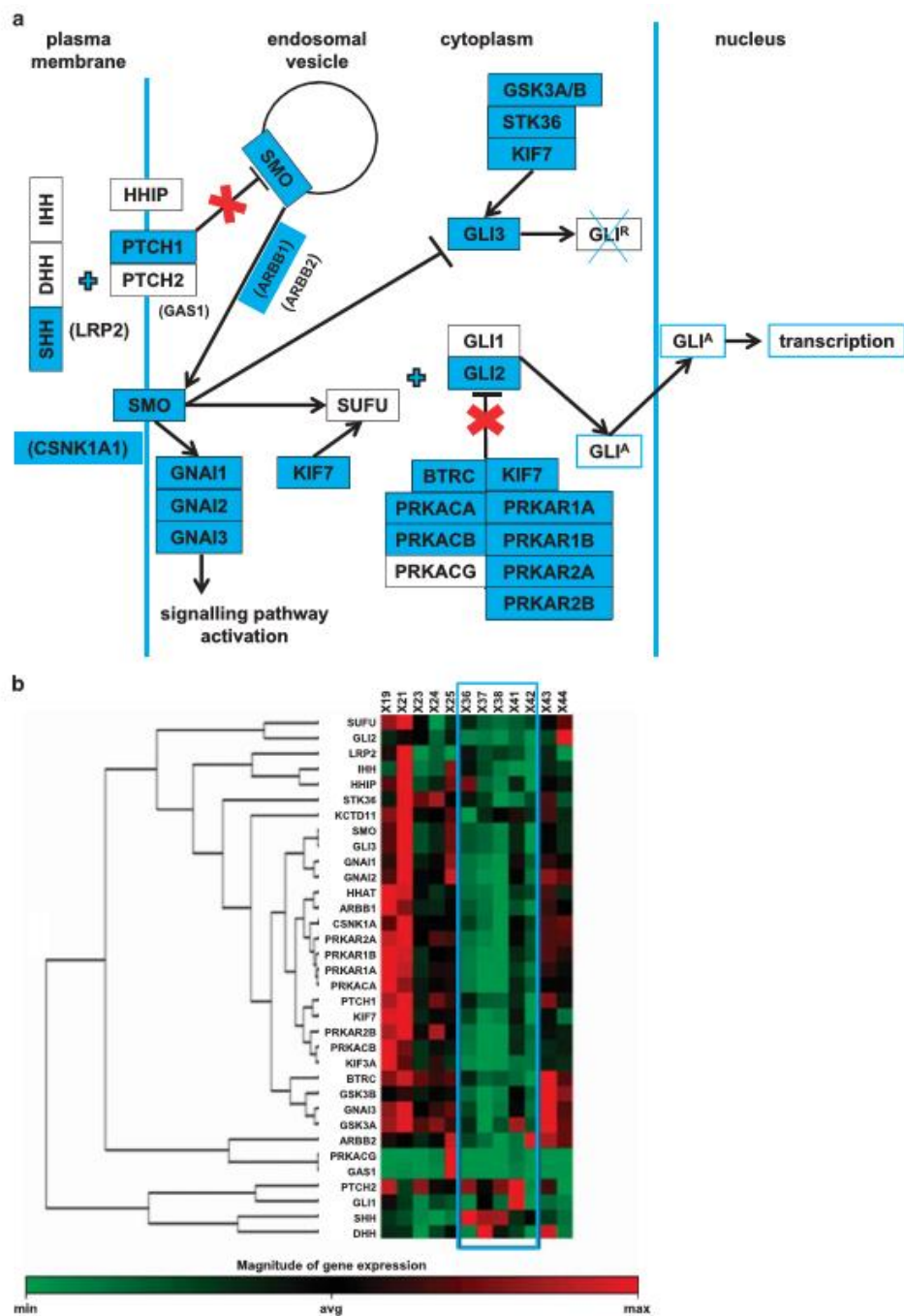
Myší xenografty byly připraveny z Paca-44 buněčné linie (Tabulka č. 5). Myši byly léčeny *in vivo* dvěma dávkami 10 mg SB-T-1216 na kilogram váhy poté, co tumor dosáhl velikosti $\sim 100 \text{ mm}^3$. Kontrolní Paca-44 xenografty byly zabity 8 týdnů po implantaci tumoru. Léčené xenografty byly zabity 24 hodin po druhé dávce SB-T-1216. Expresse genů HH signální dráhy byla stanovena v tumorové tkáni pomocí qPCR. Expresse ligandu SHH byla indukována léčbou SB-T-1216 u Paca-44 xenograftů, ačkoliv downstream geny této dráhy byly většinou suprimovány (Tabulka č. 16, Obrázek č. 7).

Tabulka č. 16: Rozdíly v genové expresi HH signální dráhy mezi kontrolami a Paca - 44 xenografty léčenými SB-T-1216

Gen	Poměr hladiny nádorová tkáň po SB-T terapii/kontrola	95 % konfidenční interval	Hodnota-p	Hodnota-q
SHH	2.7	1.53-3.88	0.001	0.001
DHH	1.0	0.21-1.69	0.969	0.050
IHH	0.5	0.14-0.87	0.156	0.041
HHAT	0.5	0.36-0.69	0.008	0.025
PTCH1	0.5	0.33-0.69	0.003	0.016
PTCH2	1.1	0.34-1.88	0.656	0.047
SMO	0.6	0.45-0.79	0.014	0.031
GNAI1	0.5	0.28-0.68	0.005	0.021
GNAI2	0.5	0.34-0.63	<0.001	0.003
GNAI3	0.6	0.43-0.71	<0.001	0.004
KIF7	0.5	0.30-0.75	0.025	0.034
STK36	0.8	0.65-0.89	0.011	0.028
SUFU	0.9	0.78-0.97	0.062	0.037
GLI1	1.0	0.23-1.86	0.544	0.046
GLI2	0.5	0.39-0.68	0.012	0.029
GLI3	0.6	0.45-0.79	0.014	0.032
PRKACB	0.4	0.27-0.63	0.010	0.026
PRKACG	0.6	<0.01-1.99	0.466	0.044
PRKAR1A	0.4	0.28-0.54	<0.001	0.006
PRKAR1B	0.4	0.23-0.57	0.002	0.015
PRKAR2A	0.5	0.33-0.61	<0.001	0.007
PRKAR2B	0.2	0.09-0.40	0.001	0.009
CSNK1A1	0.7	0.51-0.81	0.003	0.018
GSK3A	0.7	0.50-0.84	0.005	0.022
GSK3B	0.7	0.56-0.83	0.006	0.023
KCTD11	0.5	0.07-0.91	0.057	0.035
KIF3A	0.4	0.23-0.47	0.003	0.019
ARRB1	0.5	0.42-0.66	0.001	0.010
ARRB2	0.8	0.59-0.98	0.093	0.038
GAS1	0.4	<0.01-0.92	0.399	0.043
HHIP	0.7	0.42-0.95	0.095	0.040
LRP2	1.0	0.45-1.56	0.701	0.048
BTRC	0.6	0.50-0.68	<0.001	0.012
PRKACA	0.4	0.28-0.58	<0.001	0.013

Poznámky: 95% konfidenční interval a hodnota-p byly vypočítány pomocí programu RT2 Profiler PCR Assay Data Analysis v3.5. (Qiagen, Hildesheim, Německo). FDR test byl vypočítán dle Benjaminiho a Hochberga (1995), hodnoty-q byly uvedeny pro každé srovnání. Výsledky, které prošly FDR testem, jsou označeny šedou barvou

Obrázek č. 7: Downregulace HH signální dráhy u Paca-44 xenograftů léčených SB-T-1216 *in vivo*



a/ Mapa HH signální dráhy ukazující na rozdíly v genové expresi v nádorové tkáni Paca-44 xenograftů léčených SB-T-1216 v porovnání s neléčenými nádory. Geny se zvýšenou expresí jsou označeny červeně a geny se sníženou expresí jsou označeny modře. Geny bez změny exprese jsou bez barvy.

b/ Heat mapa expresního profilu HH signální dráhy Paca-44 xenograftů léčených SB-T-1216-(označeno modrým obdélníkem) a neléčených kontrol Paca-44 xenograftů (ostatní vzorky).

4.2 Studium *SLC22A3* jako potencionálního rizikového faktoru a prognostického biomarkeru karcinomu pankreatu

4.2.1 Asociace *SLC22A3* SNPs s rizikem vzniku karcinomu pankreatu

V rámci pilotní fáze projektu byla provedena genotypizace u 208 případů PDAC a 381 kontrol z České republiky.(87, 137) Tři SNPs (rs2504938, rs9364554, rs2457571) byly statisticky významně asociovány s rizikem vzniku PDAC alespoň v jednom z testovaných genetických modelů. (Tabulka č. 17). V další fázi projektu byla provedena verifikace výše zmíněných tří kandidátních SNPs na rozsáhlém souboru vzorků PANDoRA, 1 046 případů a 4 612 kontrol z šesti evropských zemí: České republiky, Německa, Řecka, Itálie, Litvy a Polska.(145) Signifikantní asociace se zvýšeným rizikem vzniku PDAC byla pozorována u nosičů variantní T alely v případě SNP rs9364554 (OR = 1.19, 95 % CI = 1.02–1.40, p = 0.030) (Tabulka č. 18), nicméně tato asociace neprošla FDR testem (q = 0.008). V závěrečném hodnocení celé kohorty, zahrnující vzorky pilotní i validační fáze, se nepodařilo prokázat žádný vztah mezi SNPs *SLC22A3* a jejich možným vlivem na riziko PDAC. Tyto výsledky naznačují, že genetická variabilita v *SLC22A3* významně nepřispívá k riziku vzniku PDAC v evropské populaci. Trendy, které byly pozorovány v univariátní analýze pilotní fáze projektu, se obecně nezměnily ani v multivariátní analýze zohledňující věk, pohlaví, body mass index (BMI), kouření a konzumaci alkoholu s výjimkou SNP rs4708867. G alela rs4708867 byla v této adjustované analýze spojena se zvýšeným rizikem PDAC (Tabulka č. 19). Tato asociace však nemohla být dále replikována ve validační fázi vzhledem k nedostatku dat týkajících se životního stylu ve validačním souboru. Jedná se o první studii zabývající se souvislostí mezi genetickou variabilitou *SLC22A3* a rizikem vzniku PDAC. Rovněž naše předchozí dvě celogenomové asociační studie (genome-wide association studies, GWAS) provedené v rámci PANDoRA konsorcia nenašly žádnou suspektní spojitost mezi genetickými variantami *SLC22A23* a mírou rizika vzniku PDAC (146, 147).

Tabulka č. 17: Výsledky pilotní fáze studie polymorfismů *SLC22A3* jako potenciálního rizikového faktoru PDAC

SNP genotype	Kontroly		Případy		OR	95% CI	p
	N	%	N	%			
rs316174 (A>G)							
AA	121	31.9	64	31.2	reference		
AG	182	48.0	107	52.2	1.11	0.76-1.64	0.591
GG	76	20.1	34	16.6	0.85	0.51-1.41	0.516
G alela	258	-	141	-	1.03	0.71-1.49	0.861
A alela*	303	-	171	-	0.79	0.51-1.23	0.307
rs2504956 (C>T)							
CC	240	63.2	115	55.8	reference		
CT	122	32.1	81	39.3	1.39	0.97-2.00	0.074
TT	18	4.7	10	4.9	1.16	0.52-2.56	0.719
T alela	140	-	91	-	1.35	0.96-1.92	0.083
C alela*	362	-	196	-	1.03	0.47-2.27	0.949
rs572149 (A>G)							
AA	153	41.6	149	42.0	reference		
AG	173	47.0	54	51.2	1.08	0.75-1.54	0.675
GG	42	11.4	5	6.8	0.59	0.31-1.15	0.121
G alela	214	-	59	-	0.98	0.69-1.39	0.930
A alela*	326	-	203	-	0.57	0.30-1.08	0.080
rs3120137 (G>A)							
GG	289	75.9	160	77.3	reference		
GA	87	22.8	42	20.3	0.87	0.57-1.32	0.519
AA	5	1.3	5	2.4	1.82	0.52-6.25	0.356
A alela	92	-	47	-	0.93	0.62-1.32	0.694
G alela*	376	-	202	-	1.85	0.53-6.67	0.330
rs512077 (A>G)							
AA	255	67.5	149	72.0	reference		
AG	113	29.9	53	25.6	0.80	0.55-1.18	0.262
GG	10	2.6	5	2.4	0.85	0.29-2.56	0.780
G alela	123	-	58	-	0.81	0.56-1.18	0.258
A alela*	368	-	202	-	0.91	0.31-2.70	0.866
rs675162 (A>G)							
AA	270	73.2	163	79.9	reference		
AG	88	23.8	40	19.6	0.75	0.50-1.15	0.187
GG	11	3.0	1	0.5	0.15	0.02-1.18	0.071
G alela	99	-	41	-	0.86	0.45-1.04	0.073
A alela*	358	-	203	-	0.16	0.02-1.25	0.081
rs394487 (C>T)							
CC	178	47.1	101	48.6	reference		
CT	170	45.0	96	46.2	0.99	0.70-1.41	0.979
TT	30	7.9	11	5.3	0.65	0.31-1.35	0.243
T alela	200	-	107	-	0.94	0.67-1.32	0.734
C alela*	348	-	197	-	0.65	0.32-1.32	0.232
rs10455871(A>T)							

AA	369	97.6	199	96.1	reference		
AT	9	2.4	8	3.9	1.64	0.63-4.35	0.312
TT	0	0	0	0	NA	NA	NA
T alela	9	-	8	-	1.64	0.63-4.35	0.312
A alela*	378	-	207	-	NA	NA	NA
rs884742 (C>A)							
CC	287	76.3	172	82.7	reference		
CA	82	21.8	35	16.8	0.71	0.46-1.10	0.129
AA	7	1.9	1	0.5	0.24	0.03-1.96	0.182
A alela	89	-	36	-	0.70	0.44-1.04	0.074
C alela*	369	-	207	-	0.25	0.03-2.08	0.202
rs420038 (C>T)							
CC	173	47.0	99	48.8	reference		
CT	165	44.8	91	44.8	0.96	0.68-1.37	0.839
TT	30	8.2	13	6.4	0.76	0.38-1.52	0.434
C alela	195	-	104	-	0.93	0.66-1.32	0.687
T alela*	338	-	190	-	0.77	0.39-1.52	0.450
rs1567441 (T>C)							
TT	201	53.2	113	54.6	reference		
TC	159	42.1	83	40.1	0.93	0.65-1.32	0.679
CC	18	4.8	11	5.3	1.09	0.50-2.38	0.835
C alela	177	-	94	-	0.94	0.67-1.33	0.743
T alela*	360	-	196	-	1.12	0.52-2.44	0.769
rs2504938 (C>T)							
CC	234	61.4	110	53.4	reference		
CT	127	33.3	88	42.7	1.47	1.03-2.08	0.032
TT	20	5.2	8	3.9	0.85	0.36-2.00	0.710
T alela	147	-	96	-	1.39	0.99-1.96	0.060
C alela*	361	-	198	-	0.73	0.32-1.69	0.460
rs7745775 (T>G)							
TT	214	56.3	131	63.3	reference		
TG	145	38.2	69	33.3	0.78	0.54-1.11	0.170
GG	21	5.5	7	3.4	0.54	0.23-1.32	0.177
G alela	166	-	76	-	0.75	0.53-1.06	0.102
T alela*	359	-	200	-	0.60	0.25-1.43	0.249
rs9364554 (C>T)							
CC	223	58.8	116	56.0	reference		
CT	144	38.0	77	37.2	1.03	0.72-1.47	0.879
TT	12	3.2	14	6.8	2.22	1.01-5.00	0.049
T alela	156	-	91	-	1.12	0.79-1.59	0.512
C alela*	367	-	193	-	2.22	1.01-5.00	0.048
rs2457571 (T>C)							
TT	103	27.5	46	22.2	reference		
TC	209	55.9	111	53.6	1.19	0.78-1.82	0.415
CC	62	16.6	50	24.2	1.82	1.09-3.03	0.023
C alela	271	-	161	-	1.33	0.89-2.00	0.160
T alela*	312	-	157	-	1.61	1.55-2.44	0.027
rs7758229 (G>T)							

GG	184	48.7	104	50.5	reference		
GT	163	43.1	83	40.3	0.90	0.63-1.28	0.567
TT	31	8.2	19	9.2	1.09	0.58-2.00	0.798
T alela	194	-	102	-	0.93	0.66-1.30	0.676
G alela*	347	-	187	-	1.14	0.63-2.08	0.673
rs12527649(G>A)							
GG	336	88.7	191	91.8	reference		
GA	41	10.8	16	7.7	0.68	0.37-1.25	0.223
AA	2	0.5	1	0.5	0.88	0.08-10.00	0.917
A alela	43	-	17	-	0.69	0.39-1.25	0.227
G alela*	377	-	207	-	0.91	0.08-10.00	0.939
rs4708867 (A>G)							
AA	307	81.6	164	78.8	reference		
AG	63	16.8	41	19.7	1.22	0.79-1.89	0.375
GG	6	1.6	3	1.4	0.93	0.23-3.85	0.926
G alela	69	-	44	-	1.19	0.78-1.82	0.412
A alela*	370	-	205	-	0.90	0.22-3.70	0.885
rs17593921 (C>T)							
CC	353	93.4	198	95.7	reference		
CT	25	6.6	9	4.3	0.64	0.29-1.41	0.266
TT	0	0	0	0	NA	NA	NA
T alela	25	-	9	-	0.64	0.29-1.41	0.266
C alela*	378	-	207	-	NA	NA	NA
rs1397168 (A>T)							
AA	263	69.2	142	68.3	reference		
AT	109	28.7	62	29.8	1.05	0.72-1.54	0.784
TT	8	2.1	4	1.9	0.93	0.27-3.13	0.902
T alela	117	-	66	-	1.04	0.72-1.52	0.814
A alela*	372	-	204	-	0.91	0.27-3.03	0.881
rs3088441 (C>T)							
CC	321	84.5	179	86.5	reference		
CT	58	15.3	28	13.5	0.86	0.53-1.41	0.561
TT	1	0.3	0	0	NA	NA	NA
T alela	1	-	0	-	0.85	0.52-1.39	0.515
C alela*	322	-	179	-	NA	NA	NA
rs2504926 (C>T)							
CC	107	28.4	63	30.6	reference		
CT	198	52.5	110	53.4	0.94	0.64-1.39	0.770
TT	72	19.1	33	16.0	0.78	0.47-1.30	0.342
T alela	270	-	143	-	0.90	0.62-1.30	0.576
C alela*	305	-	173	-	0.81	0.52-1.27	0.356

Poznámky: *Vzácné genotypy jako reference, N=počet jedinců, odds ratio- odhad relativního rizika, 95% CI = 95% konfidenční interval. Vzhledem k nevhodné kvantitě nebo kvalitě DNA některé genotypy chybějí. Statisticky významné výsledky, které byly hodnoceny ve validační fázi jsou označeny tučně

Tabulka č. 18: Výsledky validační fáze studie kandidátních polymorfismů *SLC22A3* spojených s rizikem vzniku PDAC

SNP	Kontroly		Případy		Hrubá analýza			Adjustovaná analýza*		
	N	%	N	%	OR	95% CI	p	aOR	95% CI	p
rs2504956 (C>T)										
CC	1817	61.7	632	61.4	reference			reference		
CT	986	33.5	350	34.0	0.98	0.84-1.14	0.793	1.07	0.94-1.27	0.395
TT	141	4.8	48	4.7	1.02	0.73-1.43	0.901	1.17	0.81-1.69	0.398
T alela	1127	-	398	-	0.98	0.85-1.14	0.838	1.09	0.93-1.27	0.305
C alela [†]	2803	-	982	-	0.97	0.69-1.35	0.867	1.16	0.81-1.66	0.427
rs512077 (A>G)										
AA	2101	70.5	726	70.1	reference			reference		
AG	809	27.2	280	27.0	0.99	0.85-1.18	0.984	0.95	0.80-1.13	0.596
GG	69	2.3	30	2.9	0.79	0.51-1.23	0.303	1.07	0.66-1.72	0.784
G alela	878	-	310	-	0.98	0.84-1.14	0.785	0.96	0.82-1.14	0.660
A alela [†]	2910	-	1006	-	1.26	0.81-1.92	0.301	1.08	0.67-1.74	0.755
rs2504938 (C>T)										
CC	1733	59.0	631	60.6	reference			reference		
CT	1055	35.9	358	34.4	1.07	0.92-1.25	0.359	1.01	0.86-1.19	0.929
TT	149	5.1	52	5.0	1.04	0.75-1.45	0.800	1.15	0.81-1.62	0.437
T alela	1204	-	410	-	1.07	0.93-1.23	0.364	1.02	0.88-1.20	0.771
C alela [†]	2788	-	989	-	0.98	0.71-1.35	0.921	1.15	0.77-1.52	0.433
rs9364554 (C>T)										
CC	1792	62.5	597	60.2	reference			reference		
CT	912	31.8	340	34.3	0.89	0.77-1.04	0.156	1.20	1.01-1.42	0.034[‡]
TT	162	5.7	55	5.5	0.98	0.71-1.35	0.908	1.15	0.81-1.65	0.429
T alela	1074	-	395	-	0.91	0.78-1.05	0.190	1.19	1.02-1.40	0.030[‡]
C alela [†]	2704	-	937	-	0.98	0.71-1.33	0.899	1.08	0.77-1.52	0.647
rs2457571 (T>C)										
TT	885	30.8	327	32.1	reference			reference		
TC	1431	49.8	485	47.5	1.09	0.93-1.28	0.300	1.04	0.87-1.24	0.645
CC	559	19.4	208	20.4	0.99	0.81-1.20	0.946	1.21	0.97-1.51	0.097
C alela	1990	-	693	-	1.06	0.91-1.23	0.449	1.09	0.93-1.29	0.296
T alela [†]	2316	-	812	-	1.06	0.89-1.27	0.513	1.18	0.97-1.44	0.093
rs7758229 (G>T)										
GG	1637	55.3	568	54.7	reference			reference		
GT	1121	37.8	403	38.8	0.96	0.83-1.12	0.640	1.13	0.96-1.33	0.138
TT	204	6.9	68	6.5	1.04	0.78-1.41	0.787	1.00	0.73-1.39	0.981
T alela	1325	-	471	-	0.98	0.85-1.14	0.738	1.11	0.95-1.30	0.174
G alela [†]	2962	-	971	-	0.95	0.71-1.27	0.706	0.97	0.71-1.32	0.826

Poznámky: *p-hodnota upravena s přihlédnutím k věku, pohlaví a zemi původu, #N=počet jedinců, †vzácný genotyp jako reference, ‡výsledek nepotvrzen FDR testem (q=0.008). Statisticky významné výsledky označeny tučně

Tabulka č. 19: Výsledky pilotní fáze studie polymorfismů *SLC22A3* jako potenciálního rizikového faktoru PDAC se zohledněním hlavních faktorů životního stylu

SNP genotyp	aOR	95% CI	p
rs2457571 (T>C)			
TT	reference		
TC	0.88	0.49-1.58	0.677
CC	1.85	0.91-3.74	0.089
C alela	1.11	0.64-1.93	0.711
T alela*	1.93	1.10-3.40	0.022
rs7758229 (G>T)			
GG	reference		
GT	0.86	0.52-1.41	0.542
TT	1.03	0.42-2.51	0.974
T alela	0.89	0.55-1.43	0.632
G alela*	1.10	0.47-2.56	0.825
rs12527649 (G>A)			
GG	reference		
GA	0.52	0.23-1.21	0.130
AA	0.52	0.04-6.76	0.614
A alela	0.52	0.23-1.16	0.112
G alela*	0.52	0.04-6.66	0.619
rs4708867 (A>G)			
AA	reference		
AG	2.02	1.09-3.72	0.025
GG	0.80	0.88-7.29	0.844
G alela	1.89	1.05-3.42	0.035
A alela*	0.68	0.08-6.19	0.732
rs17593921 (C>T)			
CC	reference		
CT	0.88	0.28-2.74	0.826
TT	NA	NA	NA
T alela	0.88	0.28-2.74	0.826
C alela*	NA	NA	NA
rs1397168 (A>T)			
AA	reference		
AT	1.52	0.91-2.56	0.112
TT	0.50	0.10-2.51	0.399
T alela	1.41	0.85-2.32	0.181
A alela*	0.48	0.09-2.40	0.367
rs3088441 (C>T)			
CC	reference		
CT	0.75	0.37-1.53	0.428
TT	NA	NA	NA
T alela	0.75	0.37-1.53	0.428
C alela*	NA	NA	NA
rs2504926 (C>T)			
CC	reference		
CT	0.75	0.44-1.28	0.291
TT	0.59	0.28-1.25	0.170
T alela	0.72	0.43-1.19	0.197
C alela*	0.75	0.40-1.42	0.378

Poznámky:*Vzácné genotypy jako reference, N=počet jedinců, aOR = adjustovaný poměr rizik, 95% CI = 95% konfidenční interval. Analýza provedena s přihlédnutím k věku, pohlaví, body mass indexu, kouření a konzumce alkoholu. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny tučně

4.2.2 Asociace SLC22A3 SNPs s celkovým přežíváním pacientů s PDAC

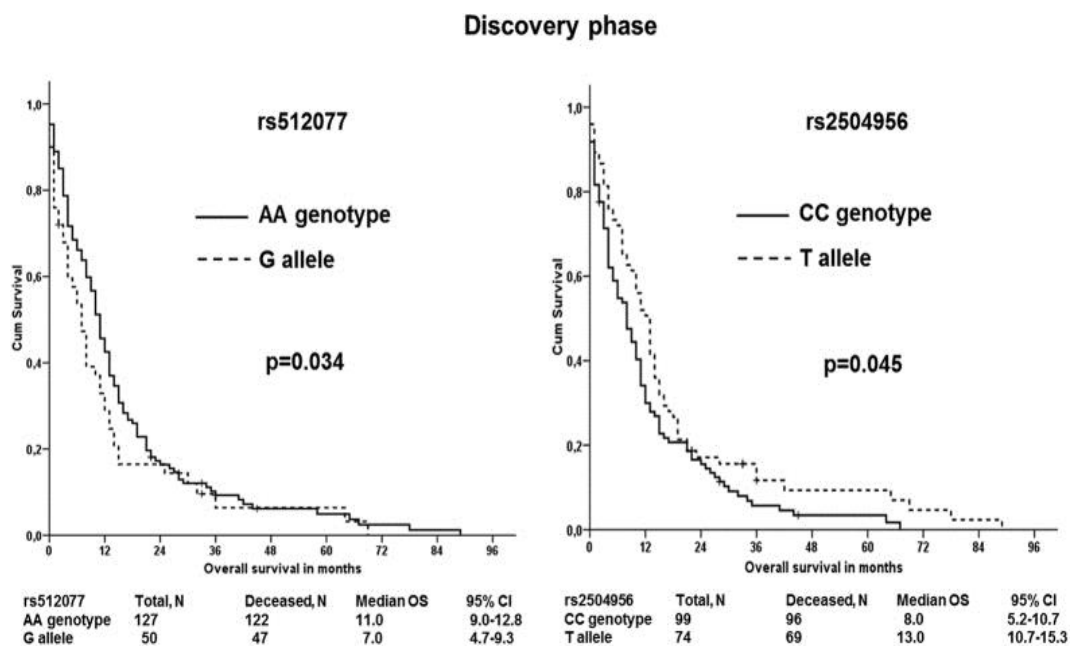
Druhým cílem této studie bylo hodnocení genetické variability *SLC22A3* ve vztahu ke klinickým údajům týkajících se stádia nemoci a celkového přežívání PDAC pacientů. V pilotní fázi projektu byl nalezen významně vyšší počet nosičů T alely rs7758229 u pacientů s metastatickou chorobou oproti pacientům bez přítomnosti vzdálených metastáz (OR = 3.63, 95% CI = 1.46–9.06, p = 0.006) u heterozygotů GT v porovnání s nosiči divokého GG genotypu a obecně u nosičů T alely, ať již v homozygotní, či heterozygotní formě (OR = 2.76, 95 % CI = 1.20–6.32, p = 0.016) (Tabulka č. 20). Dále bylo zjištěno, že nosiči AA genotypu v rs512077 nebo T alely v rs2504956 vykazovali delší OS než zbytek studované populace, nicméně oba vztahy byly na hraně statistické významnosti (p=0,034 a 0,045; Obrázek č. 8). Tyto SNPs by tedy mohly potenciálně sloužit jako prognostické biomarkery PDAC. Ve validační fázi významných výsledku pilotní studie se prokázal pouze vztah mezi SNP rs2504938 a OS pacientů. Pacienti s TT genotypem v rs2504938 genu *SLC22A3* měli statisticky významně kratší OS než pacienti s genotypem CC (p = 0.002, Obrázek č. 9). Tato asociace byla potvrzena i po FDR korekci ve validační fázi. (q = 0.008). Bohužel při kombinované analýze celého souboru zahrnující subjekty, pilotní i validační studii, nedosáhla tato asociace statistické významnosti (p = 0.073, Obrázek č. 10).

Tabulka č. 20: Pilotní studie distribuce *SLC22A3* SNPs u PDAC pacientů stratifikovaných dle přítomnosti vzdálených metastáz

SNP genotyp	M0		M1		OR	95% CI	p
	N	%	N	%			
rs7758229							
GG	33	66.0	19	41.3	reference		
GT	11	22.0	23	50.0	3.63	1.46-9.06	0.006
TT	6	12.0	4	8.7	1.16	0.29-4.63	0.836
T alela	17	-	27	-	2.76	1.20-6.32	0.016
G alela*	44	-	42	-	0.70	0.18-2.65	0.598

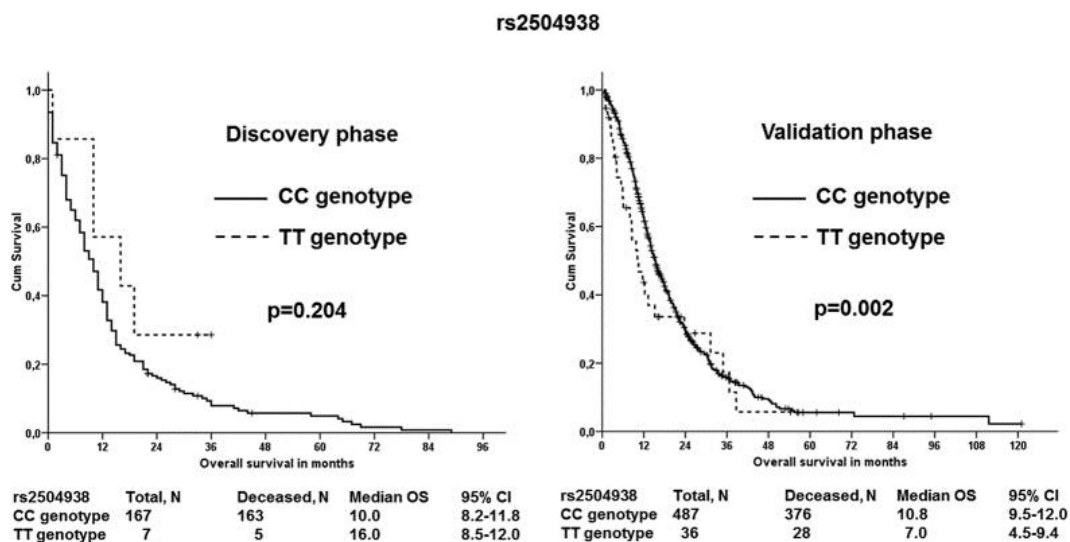
Poznámky: TT genotyp je referenční, N=počet jedinců, OR=odds ratio, 95% CI=95% konfidenční interval. Vzhledem k zachování přehlednosti a konzistence stylu jsou uvedeny pouze statisticky významné výsledky (tučně zvýrazněny)

Obrázek č. 8: *SLC22A3* polymorfismy (rs512077, rs2504956) a jejich vliv na OS pacientů s PDAC v pilotní fázi studie



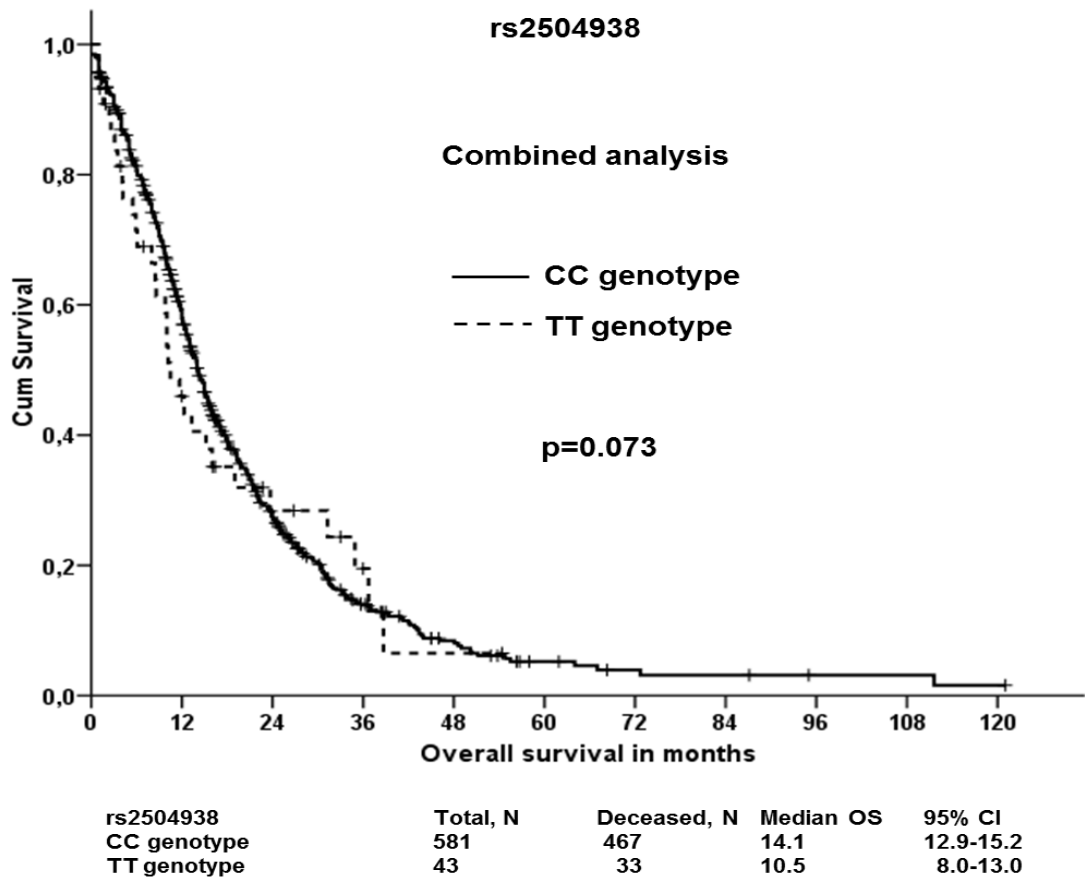
Poznámky: plná čára- divoký genotyp , přerušovaná čára- pacienti se vzácnou variantou, Discovery phase- výzkumná fáze, genotype-genotyp, allele- alela, Cum survival- kumulativní přežívání, overall survival in months –OS v měsících, Total N – celkový počet jedinců, Deceased- zemřeli

Obrázek č. 9: Polymorfismus *SLC22A3* rs2504938 a jeho vliv na OS pacientů s PDAC při hodnocení všech subjektů pilotní i validační fáze



Poznámky: Rozdíl v mediánu přežívání porovnávaných skupin pacientů byl signifikantní ($p = 0.002$) ve validačním souboru. Hazard ratio, 95% konfidenční interval a hodnota-p byly vypočteny dle stádia adjustované Cox regrese. Discovery phase- výzkumná fáze, Validation phase- validační fáze, genotype-genotyp, allele- alela, Cum survival- kumulativní přežívání, overall survival in months –OS ve měsících, Total N – celkový počet jedinců, Deceased- zemřeli

Obrázek č. 10: Asociace mezi *SLC22A3* rs2504938 SNP a OS pacientů s PDAC kombinovaně v obou fázích. Kaplan–Meierovy křivky pacientů s CC genotypem (plná čára) vs. pacienti s TT genotypem (přerušovaná čára).



Poznámky: Rozdíl v mediánu přežívání porovnávaných skupin pacientů nebyl signifikantní ($p = 0.073$). Hazard ratio, 95% konfidenční interval a hodnota-p byly vypočteny dle stádia adjustované Cox regrese. Combined analysis- kombinovaná analýza, genotype-genotyp, Cum survival- kumulativní přežívání, overall survival in months –OS ve měsících, Total N – celkový počet jedinců, Deceased- zemřelí

4.3 Retrospektivní analýza pacientů s karcinomem pankreatu léčených v našem centru

4.3.1 Charakteristika studované populace

Studovaná populace sestávala ze 159 pacientů bez klinicky detekovatelných vzdálených metastáz, kteří podstoupili resekci PDAC (Tabulka č. 21). Poměr R0 a R1 resekce nebyl hodnocen, jelikož vzorky byly histopatologicky vyšetřeny před zavedením Leedsova protokolu do klinické praxe, což by vedlo k nesprávně uváděné četnosti R0 resekce. Dva pacienti (1,3 %) podstoupili neoadjuvantní radioterapii s konkomitantně podávaným kontinuálním 5-fluorouracilem. U 111 pacientů (69,8 %) byla podána adjuvantní chemoterapie na bázi nukleosidových analog (gemcitabinu a 5-fluorouracilu). 41 pacientů (25,8 %) bylo z další analýzy vyřazeno z následujících důvodů: nepřítomnost rekurence (n = 24), nekompletní data (n = 14), úmrtí v časném pooperačním období (n = 2) nebo R2 resekce (n = 1). Celková doba přežití dosahovala 66,7 % v prvním roce po operaci, 36,6 % ve druhém roce, 28,1% ve třetím roce a 18,7 % v pátém roce. Z rizikových faktorů byla nejčastěji nalezena perineurální invaze a infiltrace lymfatických uzlin (66,7 % a 53,5 %), zatímco lymfovaskulární invaze a mikroangioinvaze se vyskytovaly méně často (32,7 % a 18,2 %). Medián DFS dosahoval v celé kohortě 10 měsíců. Většina pacientů, u kterých došlo k metachronnímu vzniku pulmonálních metastáz, podstoupila primární resekci hlavy pankreatu nebo totální pankreatektomii, vzhledem k lokalizaci nádoru v hlavě pankreatu (88,7 %).

Tabulka č. 21: Klinické a patologické charakteristiky celé kohorty

Parametry	N	%
Věk-medián (63.8 let); rozsah [40-81]	159	100
Pohlaví		
Muži	93	58
Ženy	66	42
Histologická diferenciaci		
G1+G2	88	55
G3+G4	67	42
Neuvedeno	4	3
Lokalizace		
Caput	141	89
Cauda	18	11
Primární tumor (pT)		
pT1	20	13
pT2	34	21
pT3	102	64
pT4	3	2
Regionální LU (pN)		
pN0	74	47
pN1	85	53
Mikroangioinvaze (pAI)		
pAI0	119	75
pAI1	29	18
Neuvedeno	11	7
Perineurální invaze (pPN)		
pPN0	42	26
pPN1	106	67
Neuvedeno	11	7
Lymfovaskulární invaze (pLI)		
pLI0	96	60
pLI1	52	33
Neuvedeno	11	7
Neoadjuvantní terapie		
Ano	2	1
Ne	157	99
Adjuvantní terapie		
Ano	111	70
Ne	43	27
Neuvedeno	5	3
Status v dispenzarizaci		
Živí	25	16
Zemřelí	134	84

V další analýze byli hodnoceni pouze pacienti, u kterých došlo k rozvoji metachronních metastáz. Analyzovaná data pacientů s metachronními metastázami jsou shrnuta v Tabulce č. 22. Většina pacientů s izolovanými pulmonálními metastázami byla diagnostikována pomocí PET/CT na podkladě vzestupu CA 19-9 během pooperační onkologické dispenzarizace.

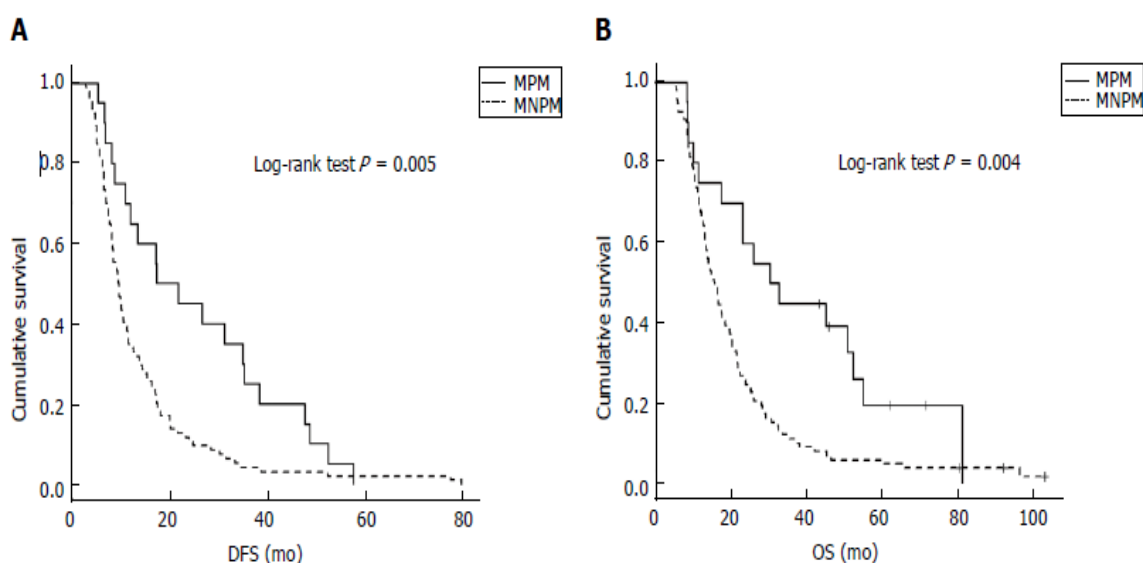
Tabulka č. 22: Klinické a patologické charakteristiky u pacientů s metachronními metastázami

Parametry	Ne-pulmonální	Pulmonální	p	Isolované pulmonální	Isolované-oligo	Isolované-mnohočetné	Pulmonální a jiné
Věk-medián	63.9	61.3	0.214	54.4	57	50.5	63.6
Pohlaví			0.012				
Mužské	59	6		0	0	0	6
Ženské	38	14		5	3	2	9
Histologická diference			0.636				
G1+G2	47	10		2	1	1	8
G3+G4	48	8		2	2	0	6
Neuvedeny	2	2		1	0	1	1
Lokalizace			0.339				
Caput	85	19		5	3	2	14
Cauda	12	1		0	0	0	1
Primární tumor (pT)			0.263				
pT1	10	4		2	1	1	2
pT2	21	2		0	0	0	2
pT3	65	13		3	2	1	10
pT4	1	1		0	0	0	1
Regionální LU (pN)			0.308				
pN0	41	6		3	2	1	3
pN1	56	14		2	1	1	12
Mikroangiinvaze (AI)			0.751				
pAI0	69	15		4	2	2	11
pAI1	23	4		1	1	0	3
Neuvedeno	5	1		0	0	0	1
Perineurální invaze (PI)			0.057				
pPI0	23	1		0	0	0	1
pPI1	69	18		5	3	2	13
Lymfovaskulární invaze(LI)			0.879				
pLI0	55	11		4	3	1	7
pLI1	37	8		1	0	1	7
Neuvedeno	5	1		0	0	0	1
Neoadjuvantní terapie							
Ano	1	1		1	0	1	0
Ne	96	19		4	3	2	15
Adjuvantní terapie			0.294				
Ano	71	17		4	2	2	13
Ne	25	3		1	1	0	2
Bez údajů	1	0		0	0	0	0
Status v dispenzarizaci			0.004				
Živí	3	4		2	2	0	2
Zemřeli	94	16		3	1	2	13

Poznámky: LU-lymfatické uzliny, p-p-hodnota

Celkem 20 pacientů (17 %) mělo v pooperačním období zjištěno metachronní pulmonální metastázy (MPM). 85 % pacientů s metachronními pulmonálními metastázemi podstoupilo adjuvantní chemoterapii po primární pankreatické resekci, v případě pacientů s jinými než pulmonálními metastázami byla adjuvance podána u 74 % pacientů. Perineurální invaze byla vyšší u MPM pacientů, nicméně rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0.057$). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami pacientů s MPM a nepulmonálními metastázami byly prokázány v případě pohlaví ($p = 0.012$) a OS ($p = 0.004$). Na Obrázku č. 11 je znázorněno DFS (disease free survival) a OS (overall survival) v obou podskupinách a jejich signifikantně významné rozdíly ($p = 0.005$ a 0.004).

Obrázek č. 11: Srovnání DFS (A) a OS (B) pacientů s metachronními pulmonálními metastázami a metachronními nepulmonálními metastázami.



Poznámky: MPM: Metachronní pulmonální metastázy, MNPM: Metachronní nepulmonální metastázy, DFS: Čas do progresu choroby, OS: Celkové přežívání, (mo): měsíce, Cumulative survival: kumulativní přežívání

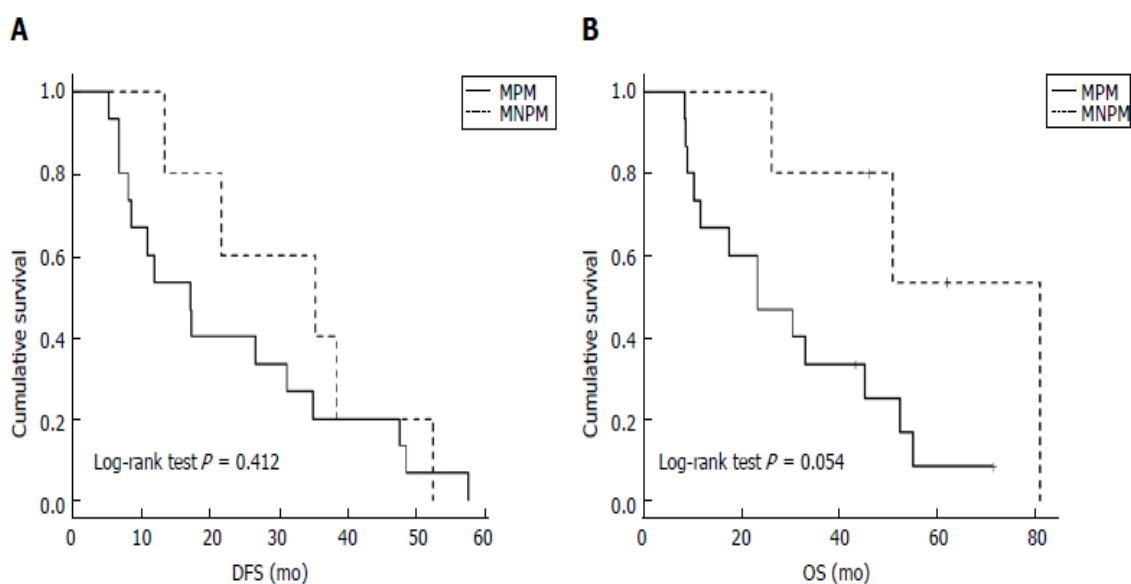
4.3.2 Pacienti s metachronními pulmonálními metastázami

Ve studovaném souboru MPM pacientů ($n=20$) se u pěti žen (25 %) vyskytly izolované metastázy plic. Plicní metastázy společně s mnohočetnými metastázami jiných orgánů byly detekovány u 15 případů (75 %). Obrázek č. 12 ukazuje DFS a OS obou skupin. Vzhledem k malému počtu pacientů s izolovanými plicními metastázami není statistická analýza zcela relevantní, nicméně prodloužení OS dosahuje hraniční statistické významnosti ($p = 0.05$). Zatímco medián OS je podobný u pacientů s nepulmonálními metastázami (16,2 měsíců) a celé kohorty (16,9 měsíců), medián OS u pacientů s MPM dosahuje dvojnásobných hodnot (31,8 měsíců). V podskupině pouze izolovaných plicních metastáz ($n = 5$) je medián DFS 35,4 měsíce a OS dokonce 81,4 měsíce. Z těchto pěti pacientů se jednalo o 2 pacienty s bilaterálními mnohočetnými metastázami a 3 pacienty s izolovanou oligometastatickou rekurencí. Pacienti s mnohočetnými bilaterálními lézemi byli léčeni systémovou chemoterapií (5-fluorouracil v kombinaci s oxaliplatinou nebo gemcitabinem). U jednoho pacienta byla provedena torakoskopická biopsie, která potvrdila metastázu PDAC 22 měsíců po primární pankreatické resekci. Všechny pulmonální léze byly relativně stabilní a progredovaly velmi pomalu během dalších linií chemoterapie. Nicméně 80 měsíců po primární resekci došlo ke vzniku mozkových metastáz a pacient zemřel 82,5 měsíců po primární resekci. U tohoto pacienta nebyla diagnostikována žádná intraabdominální rekurence. Druhý pacient s bilaterálním plicním postižením byl léčen gemcitabinem v monoterapii a zemřel v důsledku progresu choroby 50,5 měsíců od primární pankreatické resekce.

Pacienti s metachronními izolovanými oligometastázami ($n = 3$) byli považováni za kandidáty chirurgického výkonu. Jeden z těchto pacientů byl léčen mimo naší instituci a podstoupil chemoterapii gemcitabinem, při které došlo k progresi nemoci a vzniku jaterních metastáz. Pacient zemřel 12,5 měsíce od diagnózy MPM. Další dva pacienti z této skupiny podstoupili nekomplikovanou pulmonální resekci izolovaných oligometastáz, jenž se vytvořily 34 a 52 měsíců po primární pankreatické resekci. Tyto metastázy PDAC byly histologicky verifikovány. V prosinci 2016 byli tito pacienti stále naživu bez známek rekurence choroby, což je více jak jeden rok od resekčního výkonu. Další analýza pacientů s pulmonálními metastázami ($n=15$) a současnou přítomností metastáz jiných

orgánů ukázala, že pacienti s metastázami vyskytujícími se pouze v plicích a retroperitoneálních paraaortálních lymfatických uzlinách, mají podobný průběh nemoci jako pacienti s izolovanými pulmonálními metastázami. U těchto pacientů dosahoval DFS 35 měsíců a medián OS 45 měsíců, což je signifikantně déle oproti pacientům s výskytem pulmonálních metastáz a metastáz jiných orgánů (zejména jater), jejichž medián DFS činil pouze 13,5 měsíců a medián OS 19,6 měsíců. Nicméně tato data je nutno hodnotit s obezřetností vzhledem k velikosti souboru.

Obrázek č. 12: DFS (A) a OS (B) pacientů s metachronními izolovanými pulmonálními metastázami a pacientů s metachronními metastázami při současné diseminaci do jiných orgánů



Poznámky: MPM: Metachronní pulmonální metastázy, MNPM: Metachronní nepulmonální metastázy, DFS: Čas do progresu choroby, OS: Celkové přežívání, (mo):měsíce, Cumulative survival:kumulativní přežívání

5 DISKUSE A ZÁVĚR

Navzdory usilovnému výzkumu zůstává PDAC nemocí s velmi nepříznivou prognózou. Na rozdíl od jiných solidních nádorů nezaznamenala systémová léčba u PDAC v posledních desetiletích žádných velkých pokroků. Ani cílená léčba zatím neprokázala klinicky významnou účinnost.

Biomarkery hrají důležitou roli ve strategii léčby, avšak možnosti využití prediktivních či prognostických biomarkerů v léčbě PDAC jsou zatím velmi omezené. Mnoho studií s cílenou terapií PDAC skončilo v posledních letech neúspěchem.(167, 168) Vystává zde tedy urgentní potřeba porozumění patogenezi a biologii PDAC s cílem odhalit nové terapeutické možnosti a identifikovat skupiny pacientů, které budou z této léčby významně profitovat. Naše práce se soustředila na dvě klíčové signální dráhy onkogeneze PDAC (KRAS a Hedgehog) a jejich význam jako potenciálního prediktivního či prognostického markeru. Signální dráha HH je v nádorové tkáni PDAC zvýšeně exprimována a její exprese souvisí s celkovým přežíváním pacientů, což potvrzují i výsledky naší práce.(148, 149) Jako první jsme demonstrovali *in vivo* na myších modelech možnost downregulace této zvýšeně exprimované HH signální dráhy podáním chemoterapie (experimentálního taxanu SB-T-1216), čímž jsme dosáhli obnovení HH fenotypu zdravé pankreatické tkáně. Taxany stimulují polymerizaci mikrotubulů a inhibují jejich depolymerizaci. Dochází tak k zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M a následně buněčného dělení. SB-T-1216 nezpůsobuje G2/M blokádu, ale indukuje akumulaci hypodiploidních buněk.(159) Inhibice HH signální dráhy pomocí SB-T-1216 může být způsobena opožděným buněčným dělením, nebo vlivem SB-T-1216 na modulaci kmenových buněk a chemosensitivitu nádorové tkáně (160, 161, 162). Tento nově pozorovaný mechanismus účinku taxanů u PDAC související s ovlivněním HH signální dráhy přináší nové možnosti pro vývoj a využití taxanů v léčbě PDAC.

Prognostický význam proteinové exprese ligandu Hedgehog signální dráhy SHH a GLI již byl publikován dříve.(148) Vysoké hladiny SHH a GLI jsou spojeny s horším přežíváním PDAC pacientů. Naše práce rovněž potvrdila spojitost mezi

vysokou genovou expresí *SHH* a kratším přežíváním pacientů. Na rozdíl od práce Marechal et al., (149) naše studie nenachází prognostický význam *GLII* exprese, ale statisticky významné kratší celkové přežívání pacientů s vysokou expresí *PTCH1*. Rozdíl výsledků obou prací je pravděpodobně způsoben omezeným množstvím vzorků v naší studii a možnou diskrepancí mezi hladinami transkriptů a proteinů. Naše práce jako první studovala vztah mezi *KRAS* mutací a kompletním expresním profilem HH signální dráhy u PDAC pacientů. Nicméně, na rozdíl od dřívějších prací zaměřených pouze na jednotlivé geny, naše výsledky nepotvrdily interakci mezi HH a *KRAS* na úrovni celé signální dráhy.(152, 153).

KRAS mutace se vyskytuje až u 90 % PDAC. (163, 164) Mutační analýza naší studované kohorty pacientů s operabilním PDAC je v souladu s těmito daty. Geny 4 signálních drah, které se nacházejí níže pod protoonkogenem *KRAS* byly velmi odlišně exprimovány v tumorech při srovnání s nenádorovou tkání slinivky. Vysledovali jsme statisticky významnou zvýšenou expresi 3 z těchto 4 drah, a to *PI3K/PDK1/AKT*, *RAL* guanine nucleotide exchange factor, a *RINI/ABL* (*PIK3CA/G*, *PAK1*, *RALA*, *RALBP1*, *RAC1*, *RINI*, *PTK2*, and *SRC*) dráhy, které jsou v přímém kontextu s remodelací cytoskeletu buněk, a endocytózou a jsou zodpovědné za migraci nádorových buněk a šíření nemoci. Naopak, geny *RAF/MAPK* dráhy byly v nádorové tkáni exprimovány méně. Expresní profily *KRAS* downstream signálních drah významně nesouvisely s patologickou charakteristikou nádoru jako je angioinvaze, perineurální invaze, diferenciacie nádoru nebo přítomnost nodálních metastáz. Nicméně stejně jako v případě *Hedgehog* signální dráhy, ani zde se neprokázal efekt *KRAS* signální dráhy na celkové přežívání pacientů. Zajímavé je, že dráha je stejně deregulována v případě přítomné *KRAS* mutace, jako i v tumorech bez mutace v genu *KRAS*. Prokázali jsme tedy, že *KRAS* mutace neovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu, a ani výsledný fenotyp (expresi mRNA) v tkáni karcinomu pankreatu. Toto zjištění částečně objasňuje dosavadní absolutní neúspěch *KRAS* inhibitorů v cílené léčbě PDAC (170-173).

Prognóza nádorových onemocnění však nemusí souviset pouze s expresí signálních drah podílejících se na onkogenezi a potenciálně regulujících biologické chování nádoru. Důležitým mechanismem ovlivňujícím přežívání onkologických

pacientů je i jejich odpověď na podanou léčbu, která může být významně ovlivněna expresí a funkcí membránových proteinů, které ovlivňují průnik xenobiotik přes buněčnou membránu. V našich předchozích projektech byla zjištěna vysoká exprese mRNA *SLC22A3* v nádorové tkáni PDAC.(88) Tato exprese významně souvisela s celkovým přežíváním pacientů (128). Spojitost mezi genetickou variabilitou *SLC22A3* a rizikem vzniku PDAC byla jedním z dalších cílů naší práce. Navzdory dříve publikovaným výsledkům asociace rs7758229 SNP *SLC22A3* s rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (126) a rs9364554 s rizikem vzniku karcinomu prostaty (125, 175) se nám nepodařilo prokázat spojitost mezi genetickými polymorfismy *SLC22A3* a rizikem vzniku karcinomu pankreatu. Nicméně naše data jsou v souladu s nedávno publikovanými celogenomovými asociačními studii (genome-wide association studies, GWAS), které rovněž nepopsaly spojitost mezi *SLC22A3* a rizikem vzniku PDAC. Takže, přes dřívější práce, poukazující na vztah genu *SLC22A3* se vznikem jiných typů nádorů, není pravděpodobné, že by alterace v genu *SLC22A3* měly vliv na vznik karcinomu pankreatu. (146, 174).

Následným cílem naší práce bylo hodnocení souvislosti genetické variability *SLC22A3* s hlavními klinickými charakteristikami PDAC. V pilotní fázi byl zjištěn významně vyšší počet nosičů T alely nebo heterozygotního fenotypu rs7758229 v případě metastatické nemoci (OR = 3.63, 95% CI = 1.46–9.06, p = 0.006), která je prognosticky velmi nepříznivá. Naopak pacienti, kteří byli nosiči AA genotypu rs512077 nebo T alely rs2504956 dosahovali delšího celkového přežívání oproti jiným pacientům. Tyto výsledky však nebyly replikovány ve validační fázi. Ve validační fázi významných výsledků pilotní studie se prokázal pouze vztah mezi SNP rs2504938 a OS pacientů. Pacienti s TT genotypem v rs2504938 genu *SLC22A3* měli statisticky významně kratší OS než pacienti s genotypem CC.

Potenciální funkční dopad polymorfismu rs2804938 byl testován na dvou úrovních. První byla analýza pomocí *in silico* predikce využitím programu HaploReg v3, která poukázala na možnost ovlivnění Hmx_1 a NF-kappaB motivů. Dále jsme korelovali výskyt rs2804938 polymorfismu s hladinou transkriptu a proteinu *SLC22A3* v nádorových tkáních u radikálně operovaných pacientů s karcinomem pankreatu. Funkční vztah SNP rs2801938 k expresi *SLC22A3* v tkáních karcinomu pankreatu se však prokázat nepodařilo. (88) Efekt tohoto

polymorfismu na OS pacientů s nádory slinivky břišní je pravděpodobně zapříčiněn jiným mechanismem než deregulací exprese *SLC22A3* transportéru a zůstává zatím neobjasněn. Nedávné výsledky poukázaly na roli neurotransmiterů při stimulaci růstu karcinomu prostaty (176) a pankreatu, a na jejich následnou invazivitu a metastázování.(177) Z tohoto důvodu by bylo vhodné v budoucích projektech ověřit, zda *SLC22A3* hraje roli v nádorové tumorigenesi ovlivněním clearance těchto aktivních látek. Jak již naznačily výsledky naší předešlé studie, existuje asociace genové exprese *SLC22A3* a OS pouze u pacientů, kteří byli léčeni nukleosidovými analogy. Nabízí se tedy analýza OS stratifikovaná dle terapie. Nicméně hodnocený soubor, který byl získán z celoevropského konsorcia PANDoRA, zatím nedisponuje dostatečně relevantními daty k této analýze. Zároveň variace věku v obou souborech a BMI distribuce v pilotní a validační fázi projektu se jeví jako potenciální limitující faktory této studie. K objasnění korelace polymorfismu *SLC22A3* jako prognostického faktoru u PDAC je nutné další hodnocení cestou nezávislých studií.

Jak již bylo zmíněno, přítomnost vzdálených metastáz je pro PDAC pacienty prognosticky velmi nepříznivá. Diseminace PDAC probíhá jak hematogenní, lymfogenní, perineurální cestou tak přímým intrakavitárním rozsevem do různých orgánů.(142, 178, 179) Metastatická choroba je rovněž heterogenní entitou, diseminace do jednotlivých orgánů je prognosticky velmi rozdílná. Jedna z prognosticky příznivějších oblastí diseminace PDAC je plicní parenchym.

Naše práce je první ve střední Evropě, která studuje homogenní kohortu radikálně operovaných PDAC pacientů s ohledem na lokalitu rekurence a s tím spojené prognózy. Nejčastější formou extraabdominální diseminace choroby po pankreatické resekci byly metachronní pulmonální metastázy (MPM), což je v souladu s dříve publikovanými pracemi s incidencí MPM v jednotlivých souborech mezi 3 % - 22 %.(139, 140, 180-182) MPM se mohou vyskytovat ve třech různých formách. Jedná se o metachronní izolované pulmonální oligometastázy, mnohočetné izolované pulmonální metastázy a současný výskyt pulmonálních metastáz s metastázami jiných orgánů. V naší studii se vyskytovaly izolované pulmonální metastázy u 4,2 % případů s rekurencí choroby a u 3,1 % celé kohorty (včetně pacientů bez zatím prokázaného relapsu). Zajímavé je, že izolované

pulmonální metastázy se vyskytovaly v naší kohortě pouze u žen. Kamisawa et al. (178) hodnotili neselektovanou kohortu pacientů léčených chemoterapií, radioterapií, radikálním i paliativním přístupem. Udávají, že k hematogennímu rozsevu do plic dochází především při lokalizaci primárního nádoru v caudě pankreatu anebo při obstrukci lienální žíly. V naší kohortě byl výskyt primárního nádoru v caudě pankreatu menší než 5 % a obstrukce lienální žíly se vůbec nevyskytovala. Věk pacientů v době diagnózy primárního nádoru, s následnou plicní diseminací ve formě izolovaných metastáz, byl podstatně nižší než u ostatních pacientů (medián 57 let, 44-66 let).

V případě izolovaných plicních metastáz by měla být zvažována jejich chirurgická terapie (142-144, 180, 183), která významně prodlužuje celkové přežívání těchto pacientů. V naší kohortě byli k operaci vhodní pouze tři pacienti. Jeden pacient nakonec podstoupil pouze chemoterapii gemcitabinem bez další chirurgické léčby. Zemřel 12,5 měsíce po stanovení diagnózy MPM na podkladě progresu nemoci ve formě jaterních metastáz. U dvou pacientů byla provedena radikální chirurgická léčba. Tito pacienti jsou stále živi a bez známek rekurence nemoci po dobu více než jednoho roku. Další formou MPM jsou mnohočetné izolované metachronní pulmonální metastázy. Základem léčby mnohočetných MPM je systémová terapie, chirurgická ani lokální léčba formou radioterapie není indikována. Dva pacienti, kteří podstoupili tuto systémovou léčbu, dosáhli dlouhodobého přežití (50,5 a 82,5 měsíců). Třetí klinickou formou je výskyt metachronních pulmonálních metastáz společně s metastázami jiných orgánů. V naší kohortě se vyskytovala pouze malá podskupina pacientů s přítomností pulmonálních metastáz a metastáz retroperitoneálních lymfatických uzlin, jejichž DFS byl stejně příznivý jako u pacientů s izolovanými MPM.

V souladu s publikovanými daty dosahovali pacienti s MPM v naší kohortě významně delší medián DFS a OS v porovnání s pacienty s diseminací do jiných orgánů. Medián DFS, který je uváděn u pacientů s izolovanými pulmonálními metastázami, se pohybuje mezi 10,5 a 52,4 měsíci a medián OS mezi 23 a 92,3 měsíci.(181, 184, 185) . Pacienti s izolovanými pulmonálními metastázami v naší kohortě dosahovali mediánu DFS v délce 34 měsíců a odhadovaný medián OS 81,4 měsíce. Výsledky naší práce, proveditelnost chirurgické resekce plicních metastáz a

bezpečnost této procedury jsou ve shodě s publikovanými daty (186, 184, 185) Recentní evropská studie autorů Decoster et al (187) popisuje 22 pacientů s MPM, z nichž tři pacienti byli léčeni chirurgickým přístupem. Pacienti s výskytem izolovaných plicních metastáz byli rovněž predominantně ženského pohlaví. Tato spojitost je velmi zajímavá, v současné době však pro ni neexistuje jednoznačné vysvětlení. Jeden z možných mechanismů by mohl být účinek pohlavních hormonů, nicméně toto tvrzení je pouze spekulativní. Objasnění tohoto mechanismu mohou přinést jen další studie, které se zaměří na specifickou molekulární patogenezi a biologii MPM. Naše práce je velmi omezená velikostí souboru. Nicméně vzhledem k raritě výskytu MPM je naše studie srovnatelná s již dříve publikovanými daty a její výsledky jsou velmi relevantní pro klinickou praxi s ohledem na optimalizaci managementu pacientů s MPM. Základní modalitou léčby metastatické nemoci PDAC tvoří chemoterapie. Současná data však naznačují, že existuje podskupina pacientů s metastatickou chorobou, která významně profituje z chirurgické léčby. Další studie by měly identifikovat klinické parametry a molekulární biomarkery pro selekci vhodných pacientů k této terapii. Podmínkou úspěšné chirurgické terapie je rovněž včasná diagnostika, která zachytí rekurenci choroby v operabilní formě MPM. Pacienti by měli být sledováni ve 3 měsíčních intervalech s možností provedení PET/CT vyšetření.

Naše práce poukazuje na nutnost individualizovaného přístupu v léčbě PDAC, který je nutno chápat jako heterogenní biologickou entitu. Tento individualizovaný přístup je možný pouze na podkladě prognostických a prediktivních markerů, kterým se věnuje usilovný výzkum.

Z potenciálních prediktivních markerů máme zatím k dispozici BRCA1/2 mutaci, která se vyskytuje v 7 – 10 % PDAC . Tyto nádory jsou zvýšeně citlivé na systémovou terapii platinovými deriváty a alkylačními látkami (Příloha č. 5). Dalším prediktivním faktorem je vysoká mikrosatelitová instabilita, která se ovšem vyskytuje pouze u 2 % PDAC. Vysoká mikrosatelitová instabilita je prediktivním faktorem pro léčbu Check point inhibitory.

K individualizaci přístupu na podkladě prognózy pacientů máme v současnosti k dispozici klinicko-patologické prognostické markery jako rozsah

nemoci, diferenciace nádoru, přítomnost perineurální a lymfovaskulární invaze a biochemické markery, což je hodnota tumorového markeru CA 19-9. Naše práce dále rozšiřuje vědomosti v oblasti molekulárně-genetických biomarkerů a tvoří základ pro nadcházející verifikační analýzy. Jedním z příznivých prognostických markerů metastatické choroby je plicní diseminace. Pacienti s plicní diseminací ve formě izolovaných plicních metastáz významně profitují z chirurgické léčby, i když základní léčebnou modalitou u metastatické choroby zůstává systémová terapie.

Nádorová tkáň PDAC se vyznačuje vysokou expresí signálních drah Hedgehog a KRAS. Jejich zvýšená exprese sice pravděpodobně nesouvisí s prognózou pacientů s PDAC, nicméně otevírá nové terapeutické možnosti a cíle v léčbě PDAC jako je např. účinnost nové generace taxanů, a jejich možný synergický efekt s cílenou terapií.

V neposlední řadě souvisí prognóza PDAC s jeho senzitivitou k systémové onkologické terapii, na níž se mimo jiné podílí řada molekul ovlivňující farmakokinetiku a farmakodynamiku podávaných léčiv. Mezi tyto molekuly se řadí membránové transportéry. Vysoká exprese SLC22A3 v nádorové tkáni je jedním z potenciálních prognostických faktorů u PDAC, a potenciálním prediktivním faktorem u pacientů léčených nukleosidovými analogy.

Naše práce přispívá ke škále rozsáhlého výzkumu prognostických a prediktivních biomarkerů PDAC s ohledem na možnosti individualizovaného přístupu k diagnostice a léčbě tohoto onemocnění. Vzhledem k neuspokojivé prognóze PDAC je nutno v tomto výzkumu dále pokračovat, společně s rozvojem nových terapeutických možností, včetně nových chemoterapeutických režimů a cílů biologické léčby.

6 REFERENCE

1. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Populations (1969-2015) (www.seer.cancer.gov/popdata), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, released December 2016. 2016.
2. Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer*. 2002;26(4):176-275.
3. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(4):1186-97.
4. Patel AV, Rodriguez C, Bernstein L, Chao A, Thun MJ, Calle EE. Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):459-66.
5. Liao WC, Tu YK, Wu MS, Lin JT, Wang HP, Chien KL. Blood glucose concentration and risk of pancreatic cancer: systematic review and dose-response meta-analysis. *BMJ*. 2015;350:g7371.
6. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(12):2696-707.
7. Bracci PM, Wang F, Hassan MM, Gupta S, Li D, Holly EA. Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes Control*. 2009;20(9):1723-31.
8. Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, et al. A prospective cohort study of cigarette smoking and pancreatic cancer in Japan. *Cancer Causes Control*. 2002;13(3):249-54.
9. Vogtmann E, Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(3):237-42.
10. Antwi SO, Eckert EC, Sabaque CV, Leof ER, Hawthorne KM, Bamlet WR, et al. Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. *Cancer Causes Control*. 2015;26(11):1583-91.
11. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6(12):699-708.
12. Hruban RH, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP. Update on familial pancreatic cancer. *Adv Surg*. 2010;44:293-311.
13. Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer*. 2000;87(6):809-11.
14. Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(3):365-74.
15. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am*. 2000;84(3):565-73.
16. Verdaguer H, Sauri T, Macarulla T. Predictive and prognostic biomarkers in personalized gastrointestinal cancer treatment. *J Gastrointest Oncol*. 2017;8(3):405-17.
17. Slater EP, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, Habbe N, et al. PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet*. 2010;78(5):490-4.
18. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531(7592):47-52.
19. Morris JPt, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(10):683-95.

20. Collisson EA, Trejo CL, Silva JM, Gu S, Korkola JE, Heiser LM, et al. A central role for RAF-->MEK-->ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2012;2(8):685-93.
21. Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, Shipitsin M, Feig LA, Cox AD, et al. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell.* 2005;7(6):533-45.
22. Feldmann G, Mishra A, Hong SM, Bisht S, Strock CJ, Ball DW, et al. Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Res.* 2010;70(11):4460-9.
23. Dhaka A, Costa RM, Hu H, Irvin DK, Patel A, Kornblum HI, et al. The RAS effector RIN1 modulates the formation of aversive memories. *J Neurosci.* 2003;23(3):748-57.
24. Shen W, Tao GQ, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian ZQ. TGF-beta in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci.* 2017;7:39.
25. Pasca di Magliano M, Biankin AV, Heiser PW, Cano DA, Gutierrez PJ, Deramaudt T, et al. Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One.* 2007;2(11):e1155.
26. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature.* 2003;425(6960):851-6.
27. Buchler P, Gazdhar A, Schubert M, Giese N, Reber HA, Hines OJ, et al. The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer. *Ann Surg.* 2005;242(6):791-800, discussion -1.
28. Huang T, Kang W, Cheng AS, Yu J, To KF. The emerging role of Slit-Robo pathway in gastric and other gastro intestinal cancers. *BMC Cancer.* 2015;15:950.
29. McWilliams RR, Wieben ED, Rabe KG, Pedersen KS, Wu Y, Sicotte H, et al. Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: implications for genetic counseling. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(4):472-8.
30. Helming KC, Wang X, Roberts CWM. Vulnerabilities of mutant SWI/SNF complexes in cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(3):309-17.
31. Ying H, Dey P, Yao W, Kimmelman AC, Draetta GF, Maitra A, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 2016;30(4):355-85.
32. Tang YT, Xu XH, Yang XD, Hao J, Cao H, Zhu W, et al. Role of non-coding RNAs in pancreatic cancer: the bane of the microworld. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9405-17.
33. Balcom JHt, Rattner DW, Warshaw AL, Chang Y, Fernandez-del Castillo C. Ten-year experience with 733 pancreatic resections: changing indications, older patients, and decreasing length of hospitalization. *Arch Surg.* 2001;136(4):391-8.
34. Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1992;326(7):455-65.
35. Katz MH, Fleming JB, Lee JE, Pisters PW. Current status of adjuvant therapy for pancreatic cancer. *Oncologist.* 2010;15(11):1205-13.
36. Boyle J, Czito B, Willett C, Palta M. Adjuvant radiation therapy for pancreatic cancer: a review of the old and the new. *J Gastrointest Oncol.* 2015;6(4):436-44.
37. Smeenk HG, Tran TC, Erdmann J, van Eijck CH, Jeekel J. Survival after surgical management of pancreatic adenocarcinoma: does curative and radical surgery truly exist? *Langenbecks Arch Surg.* 2005;390(2):94-103.
38. Baxter NN, Whitson BA, Tuttle TM. Trends in the treatment and outcome of pancreatic cancer in the United States. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(4):1320-6.
39. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997;15(6):2403-13.

40. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1817-25.
41. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013;369(18):1691-703.
42. Qi WX, Shen Z, Lin F, Sun YJ, Min DL, Tang LN, et al. Paclitaxel-based versus docetaxel-based regimens in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(2):117-25.
43. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res.* 1996;56(8):1851-4.
44. Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W. Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60(16):4426-32.
45. Kumar GN, Walle UK, Bhalla KN, Walle T. Binding of taxol to human plasma, albumin and alpha 1-acid glycoprotein. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993;80(3):337-44.
46. Baker SD, Verweij J, Cusatis GA, van Schaik RH, Marsh S, Orwick SJ, et al. Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(2):155-63.
47. Tanino T, Nawa A, Nakao M, Noda M, Fujiwara S, Iwaki M. Organic anion transporting polypeptide 2-mediated uptake of paclitaxel and 2'-ethylcarbonate-linked paclitaxel in freshly isolated rat hepatocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(8):1029-35.
48. Woo JS, Lee CH, Shim CK, Hwang SJ. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KR30031. *Pharm Res.* 2003;20(1):24-30.
49. Brooks TA, Minderman H, O'Loughlin KL, Pera P, Ojima I, Baer MR, et al. Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Mol Cancer Ther.* 2003;2(11):1195-205.
50. Guitton J, Cohen S, Tranchand B, Vignal B, Droz JP, Guillaumont M, et al. Quantification of docetaxel and its main metabolites in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(17):2419-26.
51. Sonnichsen DS, Relling MV. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Pharmacokinet.* 1994;27(4):256-69.
52. Frese KK, Neesse A, Cook N, Bapiro TE, Lolkema MP, Jodrell DI, et al. nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* 2012;2(3):260-9.
53. Sawada N, Ishikawa T, Fukase Y, Nishida M, Yoshikubo T, Ishitsuka H. Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine efficacy by taxol/taxotere in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 1998;4(4):1013-9.
54. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer.* 2001;37(13):1590-8.
55. ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(7):665-85.
56. Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother.* 2006;7(8):1041-53.
57. Kim TY, Kim DW, Chung JY, Shin SG, Kim SC, Heo DS, et al. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3708-16.

58. Chang HI, Yeh MK. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:49-60.
59. Gebbia N, Gebbia V. Single agent paclitaxel in the treatment of unresectable and/or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 1996;32A(10):1822-3.
60. Whitehead RP, Jacobson J, Brown TD, Taylor SA, Weiss GR, Macdonald JS. Phase II trial of paclitaxel and granulocyte colony-stimulating factor in patients with pancreatic carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1997;15(6):2414-9.
61. Oettle H, Arnold D, Esser M, Huhn D, Riess H. Paclitaxel as weekly second-line therapy in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Anticancer Drugs*. 2000;11(8):635-8.
62. Shukuya T, Yasui H, Boku N, Onozawa Y, Fukutomi A, Yamazaki K, et al. Weekly Paclitaxel after failure of gemcitabine in pancreatic cancer patients with malignant ascites: a retrospective study. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(12):1135-8.
63. Maeda S, Motoi F, Onogawa T, Morikawa T, Shigeru O, Sakata N, et al. Paclitaxel as second-line chemotherapy in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer: a retrospective study. *Int J Clin Oncol*. 2011;16(5):539-45.
64. Kim YJ, Bang S, Park JY, Park SW, Chung JB, Song SY. Phase II study of 5-fluorouracil and paclitaxel in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;63(3):529-33.
65. Androulakis N, Kourousis C, Dimopoulos MA, Samelis G, Kakolyris S, Tsavaris N, et al. Treatment of pancreatic cancer with docetaxel and granulocyte colony-stimulating factor: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 1999;17(6):1779-85.
66. Rougier P, Adenis A, Ducreux M, de Forni M, Bonnetterre J, Dembak M, et al. A phase II study: docetaxel as first-line chemotherapy for advanced pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2000;36(8):1016-25.
67. Okada S, Sakata Y, Matsuno S, Kurihara M, Sasaki Y, Ohashi Y, et al. Phase II study of docetaxel in patients with metastatic pancreatic cancer: a Japanese cooperative study. Cooperative Group of Docetaxel for Pancreatic Cancer in Japan. *Br J Cancer*. 1999;80(3-4):438-43.
68. Fine RL, Fogelman DR, Schreiber SM, Desai M, Sherman W, Strauss J, et al. The gemcitabine, docetaxel, and capecitabine (GTX) regimen for metastatic pancreatic cancer: a retrospective analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(1):167-75.
69. Xenidis N, Chelis L, Amarantidis K, Chamalidou E, Dimopoulos P, Courcoutsakis N, et al. Docetaxel plus gemcitabine in combination with capecitabine as treatment for inoperable pancreatic cancer: a phase II study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(2):477-84.
70. De Jesus-Acosta A, Oliver GR, Blackford A, Kinsman K, Flores EI, Wilfong LS, et al. A multicenter analysis of GTX chemotherapy in patients with locally advanced and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(2):415-24.
71. Dakik HK, Moskovic DJ, Carlson PJ, Tamm EP, Qiao W, Wolff RA, et al. The use of GTX as second-line and later chemotherapy for metastatic pancreatic cancer: a retrospective analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(2):425-30.
72. Reni M, Cereda S, Rognone A, Belli C, Ghidini M, Longoni S, et al. A randomized phase II trial of two different 4-drug combinations in advanced pancreatic adenocarcinoma: cisplatin, capecitabine, gemcitabine plus either epirubicin or docetaxel (PEXG or PDXG regimen). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(1):115-23.
73. Lutz MP, Van Cutsem E, Wagener T, Van Laethem JL, Vanhoefer U, Wils JA, et al. Docetaxel plus gemcitabine or docetaxel plus cisplatin in advanced pancreatic carcinoma: randomized phase II study 40984 of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9250-6.
74. Noonan AM, Farren MR, Geyer SM, Huang Y, Tahiri S, Ahn D, et al. Randomized Phase 2 Trial of the Oncolytic Virus Pelareorep (Reolysin) in Upfront Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Mol Ther*. 2016;24(6):1150-8.

75. Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(34):4548-54.
76. Ko AH, Truong TG, Kantoff E, Jones KA, Dito E, Ong A, et al. A phase I trial of nab-paclitaxel, gemcitabine, and capecitabine for metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70(6):875-81.
77. De Jesus-Acosta A, ODP, Ramanathan R., et al. A Phase II study of vismodegib, a hedgehog (Hh) pathway inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel (nab-P) in patients with untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) [poster. Poster presented at: 2014 Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI) 2014; January 16-18; San Francisco, CA, USA.
78. Sigal D, Marcus SG, Rosen PJ, Cohen SJ, Lee P, Nguyen T, et al. Association of 2-O, 3-O desulfated heparin (ODSH) plus combination gemcitabine (G)/nab-paclitaxel (A) with preliminary benefit in untreated metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(4_suppl):284-.
79. Isacoff WH, Reber HA, Hines OJ, Donahue TR, Purcell FM, Clerkin BM, et al. Metronomic therapy with 5-FU, weekly nab-paclitaxel, leucovorin, and oxaliplatin, plus bevacizumab for advanced pancreatic cancer: A phase II study. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(15_suppl):e14582-e.
80. Saif MW, Podoltsev NA, Rubin MS, Figueroa JA, Lee MY, Kwon J, et al. Phase II clinical trial of paclitaxel loaded polymeric micelle in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Invest*. 2010;28(2):186-94.
81. Lohr JM, Haas SL, Bechstein WO, Bodoky G, Cwiertka K, Fischbach W, et al. Cationic liposomal paclitaxel plus gemcitabine or gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomized controlled phase II trial. *Ann Oncol*. 2012;23(5):1214-22.
82. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): do we really have a new predictive biomarker of chemotherapy outcome in pancreatic cancer patients? *Pancreatology*. 2013;13(6):558-63.
83. Lemstrova R, Soucek P, Melichar B, Mohelnikova-Duchonova B. Role of solute carrier transporters in pancreatic cancer: a review. *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1133-45.
84. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*. 2003;10(2):159-65.
85. Huisman MT, Chhatta AA, van Tellingen O, Beijnen JH, Schinkel AH. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *Int J Cancer*. 2005;116(5):824-9.
86. Su GM, Davey MW, Davey RA. Induction of broad drug resistance in small cell lung cancer cells and its reversal by paclitaxel. *Int J Cancer*. 1998;76(5):702-8.
87. Mohelnikova-Duchonova B, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, Soucek P. CYP2A13, ADH1B, and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas*. 2010;39(2):144-8.
88. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Kocik M, Oliverius M, Hlavsa J, et al. The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(3):669-82.
89. McCarroll JA, Sharbeen G, Liu J, Youkhana J, Goldstein D, McCarthy N, et al. betaIII-tubulin: a novel mediator of chemoresistance and metastases in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2015;6(4):2235-49.
90. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003;22(47):7280-95.
91. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest*. 1997;100(5):1282-93.

92. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003;22(53):8581-9.
93. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer*. 2001;92(2):271-8.
94. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery*. 2004;136(2):443-8.
95. Duner S, Lopatko Lindman J, Ansari D, Gundewar C, Andersson R. Pancreatic cancer: the role of pancreatic stellate cells in tumor progression. *Pancreatology*. 2010;10(6):673-81.
96. Lohse I, Borgida A, Cao P, Cheung M, Pintilie M, Bianco T, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations sensitize to chemotherapy in patient-derived pancreatic cancer xenografts. *Br J Cancer*. 2015;113(3):425-32.
97. Golan T, Kanji ZS, Epelbaum R, Devaud N, Dagan E, Holter S, et al. Overall survival and clinical characteristics of pancreatic cancer in BRCA mutation carriers. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1132-8.
98. Pihlak R, Valle JW, McNamara MG. Germline mutations in pancreatic cancer and potential new therapeutic options. *Oncotarget*. 2017;8(42):73240-57.
99. Liang D, Shi S, Xu J, Zhang B, Qin Y, Ji S, et al. New insights into perineural invasion of pancreatic cancer: More than pain. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865(2):111-22.
100. Agarwal B, Correa AM, Ho L. Survival in pancreatic carcinoma based on tumor size. *Pancreas*. 2008;36(1):e15-20.
101. Wasif N, Ko CY, Farrell J, Wainberg Z, Hines OJ, Reber H, et al. Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging? *Ann Surg Oncol*. 2010;17(9):2312-20.
102. Song A, Liu F, Wu L, Si X, Zhou Y. Histopathologic tumor invasion of superior mesenteric vein/ portal vein is a poor prognostic indicator in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: results from a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(20):32600-7.
103. Bilici A. Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(31):10802-12.
104. Montgomery RC, Hoffman JP, Riley LB, Rogatko A, Ridge JA, Eisenberg BL. Prediction of recurrence and survival by post-resection CA 19-9 values in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Surg Oncol*. 1997;4(7):551-6.
105. Diaz LA, Marabelle A, Delord J-P, Shapira-Frommer R, Geva R, Peled N, et al. Pembrolizumab therapy for microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer (CRC) and non-CRC. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3071-.
106. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):465-8.
107. Bellamy WT. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:161-83.
108. Garcia-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ, Mazo A, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13):5000-8.
109. Damaraju VL, Damaraju S, Young JD, Baldwin SA, Mackey J, Sawyer MB, et al. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. *Oncogene*. 2003;22(47):7524-36.
110. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):735-43.
111. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):728-34.

112. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998;58(19):4349-57.
113. Greenhalf W, Ghaneh P, Neoptolemos JP, Palmer DH, Cox TF, Lamb RF, et al. Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(1):djt347.
114. Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2009;136(1):187-95.
115. Poplin E, Wasan H, Rolfe L, Raponi M, Ikdaahl T, Bondarenko I, et al. Randomized, multicenter, phase II study of CO-101 versus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: including a prospective evaluation of the role of hENT1 in gemcitabine or CO-101 sensitivity. *J Clin Oncol.* 2013;31(35):4453-61.
116. Eto K, Kawakami H, Kuwatani M, Kudo T, Abe Y, Kawahata S, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(7):1488-94.
117. Endo Y, Obata T, Murata D, Ito M, Sakamoto K, Fukushima M, et al. Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides. *Cancer Sci.* 2007;98(10):1633-7.
118. Gusella M, Pasini F, Bolzonella C, Meneghetti S, Barile C, Bononi A, et al. Equilibrative nucleoside transporter 1 genotype, cytidine deaminase activity and age predict gemcitabine plasma clearance in patients with solid tumours. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(3):437-44.
119. Li L, Schaid DJ, Fridley BL, Kalari KR, Jenkins GD, Abo RP, et al. Gemcitabine metabolic pathway genetic polymorphisms and response in patients with non-small cell lung cancer. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(2):105-16.
120. Woo HI, Kim KK, Choi H, Kim S, Jang KT, Yi JH, et al. Effect of genetic polymorphisms on therapeutic response and clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with gemcitabine. *Pharmacogenomics.* 2012;13(9):1023-35.
121. Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer.* 2010;116(22):5325-35.
122. Soo RA, Wang LZ, Ng SS, Chong PY, Yong WP, Lee SC, et al. Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2009;63(1):121-7.
123. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 2007;24(7):1227-51.
124. Cano-Soldado P, Pastor-Anglada M. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev.* 2012;32(2):428-57.
125. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2008;40(3):316-21.
126. Cui R, Okada Y, Jang SG, Ku JL, Park JG, Kamatani Y, et al. Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population. *Gut.* 2011;60(6):799-805.
127. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30):10316-30.
128. Mohelnikova-Duchonova B, Strouhal O, Hughes DJ, Holcatova I, Oliverius M, Kala Z, et al. SLC22A3 polymorphisms do not modify pancreatic cancer risk, but may influence overall patient survival. *Sci Rep.* 2017;7:43812.

129. Mohelnikova-Duchonova B, Oliverius M, Honsova E, Soucek P. Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. *Dis Markers*. 2012;32(3):203-10.
130. Ojima I, Chen J, Sun L, Borella CP, Wang T, Miller ML, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new-generation taxoids. *J Med Chem*. 2008;51(11):3203-21.
131. Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, et al. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch*. 2001;439(6):798-802.
132. Hlavaty J, Petznek H, Holzmuller H, Url A, Jandl G, Berger A, et al. Evaluation of a gene-directed enzyme-product therapy (GDEPT) in human pancreatic tumor cells and their use as in vivo models for pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7(7):e40611.
133. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Oliverius M, Honsova E, Kala Z, Muckova K, et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas*. 2013;42(4):707-16.
134. Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M. Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 2005;23(9):1417-22.
135. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
136. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
137. Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, et al. Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas*. 2011;40(1):72-8.
138. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D930-4.
139. Katz MH, Wang H, Fleming JB, Sun CC, Hwang RF, Wolff RA, et al. Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(4):836-47.
140. Yamashita K, Miyamoto A, Hama N, Asaoka T, Maeda S, Omiya H, et al. Survival Impact of Pulmonary Metastasis as Recurrence of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Dig Surg*. 2015;32(6):464-71.
141. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer-A Comprehensive Review. *Indian J Surg Oncol*. 2011;2(2):88-100.
142. Lu F, Poruk KE, Weiss MJ. Surgery for oligometastasis of pancreatic cancer. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(4):358-67.
143. Niibe Y, Hayakawa K. Oligometastases and oligo-recurrence: the new era of cancer therapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(2):107-11.
144. Thomford NR, Woolner LB, Clagett OT. The Surgical Treatment of Metastatic Tumors in the Lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1965;49:357-63.
145. Campa D, Rizzato C, Capurso G, Giese N, Funel N, Greenhalf W, et al. Genetic susceptibility to pancreatic cancer and its functional characterisation: the PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium. *Dig Liver Dis*. 2013;45(2):95-9.
146. Wolpin BM, Rizzato C, Kraft P, Kooperberg C, Petersen GM, Wang Z, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2014;46(9):994-1000.
147. Childs EJ, Chaffee KG, Gallinger S, Syngal S, Schwartz AG, Cote ML, et al. Association of Common Susceptibility Variants of Pancreatic Cancer in Higher-Risk Patients: A PACGENE Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(7):1185-91.

148. Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, Morris JP, Lee YC, Kawaguchi Y, et al. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5103-8.
149. Marechal R, Bachet JB, Calomme A, Demetter P, Delpero JR, Svrcek M, et al. Sonic hedgehog and Gli1 expression predict outcome in resected pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1215-24.
150. Peddi PF, Cho M, Wang J, Gao F, Wang-Gillam A. Nab-paclitaxel monotherapy in refractory pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2013;4(4):370-3.
151. Jimeno A, Feldmann G, Suarez-Gauthier A, Rasheed Z, Solomon A, Zou GM, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(2):310-4.
152. Pasca di Magliano M, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M. Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev*. 2006;20(22):3161-73.
153. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galban S, Galban CJ, et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(2):639-53.
154. Sandhiya S, Melvin G, Kumar SS, Dkhar SA. The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib. *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(1):4-7.
155. Kim EJ, Sahai V, Abel EV, Griffith KA, Greenson JK, Takebe N, et al. Pilot clinical trial of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 (vismodegib) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(23):5937-45.
156. Lee JJ, Perera RM, Wang H, Wu DC, Liu XS, Han S, et al. Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(30):E3091-100.
157. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2014;25(6):735-47.
158. Otova B, Ojima I, Vaclavikova R, Hrdy J, Ehrlichova M, Soucek P, et al. Second-generation taxanes effectively suppress subcutaneous rat lymphoma: role of disposition, transport, metabolism, in vitro potency and expression of angiogenesis genes. *Invest New Drugs*. 2012;30(3):991-1002.
159. Kovar J, Ehrlichova M, Smejkalova B, Zanardi I, Ojima I, Gut I. Comparison of cell death-inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2009;29(8):2951-60.
160. Botchkina GI, Zuniga ES, Rowehl RH, Park R, Bhalla R, Bialkowska AB, et al. Prostate cancer stem cell-targeted efficacy of a new-generation taxoid, SBT-1214 and novel polyenolic zinc-binding curcuminoid, CMC2.24. *PLoS One*. 2013;8(9):e69884.
161. Botchkina GI, Zuniga ES, Das M, Wang Y, Wang H, Zhu S, et al. New-generation taxoid SB-T-1214 inhibits stem cell-related gene expression in 3D cancer spheroids induced by purified colon tumor-initiating cells. *Mol Cancer*. 2010;9:192.
162. Cochrane CR, Szczepny A, Watkins DN, Cain JE. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1554-85.
163. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res*. 1994;54(13):3568-73.
164. Bournet B, Buscail C, Muscari F, Cordelier P, Buscail L. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur J Cancer*. 2016;54:75-83.
165. Zhou L, Baba Y, Kitano Y, Miyake K, Zhang X, Yamamura K, et al. KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations, and patient prognosis in 126 pancreatic cancers: pyrosequencing technology and literature review. *Med Oncol*. 2016;33(4):32.

166. Schultz NA, Roslind A, Christensen IJ, Horn T, Hogdall E, Pedersen LN, et al. Frequencies and prognostic role of KRAS and BRAF mutations in patients with localized pancreatic and ampullary adenocarcinomas. *Pancreas*. 2012;41(5):759-66.
167. Fuchs CS, Azevedo S, Okusaka T, Van Laethem JL, Lipton LR, Riess H, et al. A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ganitumab or placebo in combination with gemcitabine as first-line therapy for metastatic adenocarcinoma of the pancreas: the GAMMA trial. *Ann Oncol*. 2015;26(5):921-7.
168. Deplanque G, Demarchi M, Hebbar M, Flynn P, Melichar B, Atkins J, et al. A randomized, placebo-controlled phase III trial of masitinib plus gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(6):1194-200.
169. Chuang HC, Huang PH, Kulp SK, Chen CS. Pharmacological strategies to target oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer. *Pharmacol Res*. 2017;117:370-6.
170. Chung V, McDonough S, Philip PA, Cardin D, Wang-Gillam A, Hui L, et al. Effect of Selumetinib and MK-2206 vs Oxaliplatin and Fluorouracil in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer After Prior Therapy: SWOG S1115 Study Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):516-22.
171. Riely GJ, Johnson ML, Medina C, Rizvi NA, Miller VA, Kris MG, et al. A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *J Thorac Oncol*. 2011;6(8):1435-7.
172. Rao S, Cunningham D, de Gramont A, Scheithauer W, Smakal M, Humblet Y, et al. Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(19):3950-7.
173. Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(8):1430-8.
174. Childs EJ, Mocci E, Campa D, Bracci PM, Gallinger S, Goggins M, et al. Common variation at 2p13.3, 3q29, 7p13 and 17q25.1 associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2015;47(8):911-6.
175. Waters KM, Le Marchand L, Kolonel LN, Monroe KR, Stram DO, Henderson BE, et al. Generalizability of associations from prostate cancer genome-wide association studies in multiple populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1285-9.
176. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science*. 2013;341(6142):1236361.
177. Kim-Fuchs C, Le CP, Pimentel MA, Shackelford D, Ferrari D, Angst E, et al. Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment. *Brain Behav Immun*. 2014;40:40-7.
178. Kamisawa T, Isawa T, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A. Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas*. 1995;11(4):345-9.
179. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(3):413-22.
180. Wangjam T, Zhang Z, Zhou XC, Lyer L, Faisal F, Soares KC, et al. Resected pancreatic ductal adenocarcinomas with recurrence limited in lung have a significantly better prognosis than those with other recurrence patterns. *Oncotarget*. 2015;6(34):36903-10.
181. Van den Broeck A, Sergeant G, Ectors N, Van Steenberghe W, Aerts R, Topal B. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2009;35(6):600-4.
182. Kruger S, Haas M, Burger PJ, Ormanns S, Modest DP, Westphalen CB, et al. Isolated pulmonary metastases define a favorable subgroup in metastatic pancreatic cancer. *Pancreatol*. 2016;16(4):593-8.

183. Nakajima M, Ueno T, Suzuki N, Matsui H, Shindo Y, Sakamoto K, et al. Novel Indications for Surgical Resection of Metachronous Lung Metastases From Pancreatic Cancer After Curative Resection. *J Clin Gastroenterol*. 2016.
184. Thomas RM, Truty MJ, Nogueras-Gonzalez GM, Fleming JB, Vauthey JN, Pisters PW, et al. Selective reoperation for locally recurrent or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma following primary pancreatic resection. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(9):1696-704.
185. Downs-Canner S, Zenati M, Boone BA, Varley PR, Steve J, Hogg ME, et al. The indolent nature of pulmonary metastases from ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol*. 2015;112(1):80-5.
186. Arnaoutakis GJ, Rangachari D, Laheru DA, Iacobuzio-Donahue CA, Hruban RH, Herman JM, et al. Pulmonary resection for isolated pancreatic adenocarcinoma metastasis: an analysis of outcomes and survival. *J Gastrointest Surg*. 2011;15(9):1611-7.
187. Decoster C, Gilabert M, Autret A, Turrini O, Oziel-Taieb S, Poizat F, et al. Heterogeneity of metastatic pancreatic adenocarcinoma: Lung metastasis show better prognosis than liver metastasis-a case control study. *Oncotarget*. 2016;7(29):45649-55.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AUC	Area under curve, plocha pod křivkou
ABCs	ATP-binding cassette transporters
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
APC	Adenomatosis polyposis coli
ARRB1	Arrestin beta 1
ARRB2	Arrestin beta 2
BRAF	V-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA	Breast cancer gene
BMI	Body mass index
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cDNA	Complementary DNA
CI	95% Confidence interval, 95% interval spolehlivosti
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN2A/p16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
COX 2	Cyclooxygenase 2
C-SHH	C-terminal protein SHH
CSNK1A1	Casein kinase I α
CT	Computed tomography, výpočetní tomografie
CTLA 4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DHH	Desert hedgehog
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epiteliálně-mezenchymální transice
ERCP	Endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ET-paclitaxel	EndoTag paclitaxel
EUS	Endoskopická ultrasonografie
FANCC	Fanconi anemia, Complementation group C
FNAB	Aspirační biopsie tenkou jehlou
FOXA2/3	Forkhead box A2/3
GAP	GTPase-activating protein
GAS1	Growth arrest-specific 1

GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanin nucleotide exchange factor
GLI1	Glioma-associated oncogene 1
GLI2	Gli-kruppel family member 2
GLI3	Gli-kruppel family member 3
GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein, α -inhibiting activity polypeptide 1
GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein, α -inhibiting activity polypeptide 2
GNAI3	Guanine nucleotide-binding protein, α -inhibiting activity polypeptide 3
GSK3A	Glycogen synthase kinase 3- α
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3- β
GPCR	G protein-coupled receptor
GRB2	Growth factor receptor bound-protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
GWAS	Genome wide association studies
HHAT	Hedgehog acetyltransferase
HHIP	Hedgehog-interacting protein
Hh	Hedgehog gene <i>Drosophila melanogaster</i>
HIF	Hypoxia-inducible factor
HH	Hedgehog gene
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1 α
IHH	Indian Hedgehog
HR	Hazard ratio, poměr rizik
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IAPs	Inhibitors of apoptosis <i>proteins</i>
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
KCTD11	Potassium channel tetramerization domain-containing protein 11
KDM6	Histone lysine demethylase
KIF3A	Kinesin family member 3A
KIF7	Kinesin family member 7
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LH 1	Lysyl hydroxylase 1

LRP2	Low density lipoprotein receptor-related protein 2
MADH4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multi drug resistance, mnohočetná léková rezistence
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
miRNA	microRNA
MMP-7	Metaloproteináza 7
MMR	Mismatch repair, korekce párování bází
MPM	Metachronní pulmonální metastázy
MRI	Magnetic resonance paging, magnetická resonance
MSH2	Muts protein homolog 2
MSH6	Muts protein homolog 6
MSI-H	High level microsatellite instability, vysoká mikrosatelitová instabilita
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
MUC5A/C	Mucin 5A/C, cell surface associated
Nab-paclitaxel	Nanoparticle albumin-bound paclitaxel
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NRAS	Neuroblastoma-RAS
N-SHH	N-terminal protein SHH
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man, online katalog lidských genů
ORR	Overall response rate, celková léčebná odpověď
OS	Overall survival, celkové přežívání
PANDoRA	Pancreatic Disease Research
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
qPCR	quantitative, real-time PCR
PD-1	Programmed death receptor 1
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma, duktální adenokarcinom pankreatu
PDGF	Platelet derived growth factor
PKD1 3	Fosfoinositol dependent protein kinase 1
PD-L1	Programmed death ligand 1

PET	Positron emission tomography, pozitronová emisní tomografie
PFS	Progression free survival, čas do progrese choroby
PHB	Prohibitin
PI3K	Fosfoinositol 3 - kinase
pi RNA	Piwi interacting RNA
PKA	cAMP-dependent proteinkinase
PMS2	Mismatch repair endonuclease
PR	Parcial response, parciální léčebná odpověď
PRAS40	Proline-rich Akt substrate 40 kDa
PRKACA	Protein kinase cAMP-dependent catalytic α (OMIM: 601639)
PRKACB	Protein kinase cAMP-dependent catalytic β (OMIM: 176892)
PRKACG	Protein kinase cAMP-dependent catalytic γ (OMIM: 176893)
PRKAR1A	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I α
PRKAR1B	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type I β
PRKAR2A	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type II α
PRKAR2B	Protein kinase cAMP-dependent regulatory, type II β
PROTOR	Proline rich 5
PRSS1	Protease, serine 1
PTC	Drosophila Patched
PTCH1	Patched homolog 1
PTCH2	Patched homolog 2
RAF1	V-RAF-1 Murine leukemia viral oncogene homolog 1
RAGE	Receptor for advanced glycation end products, receptor pro konečné produkty pokročilé glykace
RAL	Guanin nukleotid exchange faktor
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
Rb	Retinoblastoma protein
RIN1	Ras a Rab interaktor 1
rRNA	Ribosomal RNA

SBEs	SMAD binding elements, SMAD vazebné elementy
SBT	Stony Brook Taxane
SHH	Sonic Hedgehog
siRNA	Small interfering RNA
SLC	Solute carrier transporter
SMAD4/DPC4	SMAD family member 4
scaRNA	Small Cajal body specific RNA
SMO	Smoothened homolog
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOS	Son of sevenless
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SPINK1	Serine protease inhibitor Kazal-type 1
STK11	Serin/threonin kinase 11
STK36	Serine/threonine protein kinase 36
SUFU	Supressor of fused homolog
SUFU-GLI	Complex of SUFU and GLI
TGF- β	Tumor growth factor - β
TKR	Tyrosine kinase receptor
TP53	Tumor protein p53
tRNA	Transfer RNA
UBC	Ubiquitin C
VEGF	Vascular endothelial growth factor A
WT	Wild type, divoký typ

8 SEZNAM PŘÍLOH

Číslo	Název	IF
	Původní vědecké publikace v časopisech s IF	
1.	Lemstrova R , Brynychova V, Hughes DJ, Hlavac V, Dvorak P, Doherty JE, Murray HA, Crockard M, Oliverius M, Hlavsa J, Honsova E, Mazanec J, Kala Z, Lovecek M, Havlik R, Ehrmann J, Strouhal O, Soucek P, Melichar B, Mohelnikova-Duchonova B. DYSREGULATION OF KRAS SIGNALING IN PANCREATIC CANCER IS NOT ASSOCIATED WITH KRAS MUTATIONS AND OUTCOME. <i>Oncology letters</i> . 2017;14(5):5980-5988.	IF 1,4
2.	Mohelnikova-Duchonova B, Strouhal O, Hughes DJ, Holcatova I, Oliverius M, Kala Z, Campa D, Rizzato C, Canzian F, Pezzilli R, Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E, Sperti C, Federico Zambon C, Pedrazzoli S, Fogar P, Milanetto AC, Capurso G, Delle Fave G, Valente R, Gazouli M, Malleo G, Teresa Lawlor R, Strobel O, Hackert T, Giese N, Vodicka P, Vodickova L, Landi S, Tavano F, Gioffreda D, Piepoli A, Paziienza V, Mambrini A, Pedata M, Cantore M, Bambi F, Ermini S, Funel N, Lemstrova R , Soucek P. SLC22A3 POLYMORPHISMS DO NOT MODIFY PANCREATIC CANCER RISK, BUT MAY INFLUENCE OVERALL PATIENT SURVIVAL. <i>Sci Rep</i> . 2017;7:43812.	IF 5,2
3.	Mohelnikova-Duchonova B, Kocik M, Duchonova B, Brynychova V, Oliverius M, Hlavsa J, Honsova E, Mazanec J, Kala Z, Ojima I, Hughes DJ, Doherty JE, Murray HA, Crockard MA, Lemstrova R , Soucek P. HEDGEHOG PATHWAY OVEREXPRESSION IN PANCREATIC CANCER IS ABROGATED BY NEW-GENERATION TAXOID SB-T-1216. <i>Pharmacogenomics J</i> . 2017;17(5):452-460.	IF 3,8
4.	Lovecek M, Skalicky P, Chudacek J, Szkorupa M, Svebisova H, Lemstrova R , Ehrmann J, Melichar B, Yogeswara T, Klos D, Vrba R, Havlik R, Mohelnikova-Duchonova B. DIFFERENT CLINICAL PRESENTATIONS OF METACHRONOUS PULMONARY METASTASES AFTER RESECTION OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA: RETROSPECTIVE STUDY AND REVIEW OF THE LITERATURE. <i>World J Gastroenterol</i> . 2017;23(35):6420-6428.	IF 3,4
	Původní vědecké publikace v recenzovaném časopise	
5.	Lemstrova R , Melichar B, Mohelnikova-Duchonova B. PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA HARBORING GERMLINE BRCA 2 MUTATION, A CASE REPORT AND REVIEW OF THE LITERATURE. <i>Pancreat Disord Ther</i> . 2017;7:182	

	Přehledné práce v časopise s IF	
6.	Lemstrova R , Melichar B, Mohelnikova-Duchonova B. THERAPEUTIC POTENTIAL OF TAXANES IN THE TREATMENT OF METASTATIC PANCREATIC CANCER. <i>Cancer Chemother Pharmacol.</i> 2016;78(6):1101-1111.	IF 2,8
7.	Lemstrova R , Souček P, Melichar B, Mohelnikova-Duchonova B. ROLE OF SOLUTE CARRIER TRANSPORTERS IN PANCREATIC CANCER: A REVIEW. <i>Pharmacogenomics.</i> 2014;15(8):1133-45.	IF 3,4

9 PŘÍLOHY

Příloha č. 1

Příloha č. 2

Příloha č. 3

Příloha č. 4

Příloha č. 5

Příloha č. 6

Příloha č. 7