

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

# **Minimální reziduální choroba u karcinomu pankreatu**

Doktorská dizertační práce

MUDr. Dušan Klos

Olomouc 2010



Doktorand: MUDr.Dušan Klos  
Doktorský studijní program: Chirurgie  
Školící pracoviště: I.chirurgická klinika Lékařské fakulty  
Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice  
Olomouc  
Školitel: Doc.MUDr.Roman Havlík, Ph.D.



*Věnováno všem, jež této chorobě podlehli*

Prohlašuji, že jsem tuto práci vykonal samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu. Projekt byl realizován na pracovištích I.chirurgické kliniky LF UP a FN v Olomouci pod odborným vedením vedoucího sekce pro hepatopankreatobiliární chirurgii doc.MUDr.Romana Havlíka, Ph.D. a v úzké spolupráci s kolegy z Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc pod odborným vedením vedoucího této laboratoře doc.MUDr.Mariána Hajdúcha, Ph.D.

## **Poděkování**

Chtěl bych na tomto místě vyjádřit upřímné poděkování všem, kteří se podíleli na tomto projektu. Především pak svému školiteli doc.MUDr.Romanu Havlíkovi, Ph.D., jež svým neucházejícím entuziasmem přenáší radost z práce i na své podřízené. Poděkování patří i mým přednostům, prof.MUDr.Vladimíru Královi, CSc. a doc.MUDr.Čestmíru Neoralovi, CSc., jež mi umožnili věnovat se chirurgii a být součástí týmu I.chirurgické kliniky LF UP a FN Olomouc, na což jsem hrdý a bez jejichž podpory a cenných rad, by vznik této práce nebyl možný.

Mé díky patří také kolegům z Laboratoře experimentální medicíny, kteří pracovali na vyhodnocování odebraného materiálu a vytvořili vlastní metodiku hodnocení stanovení minimální reziduální choroby u solidních nádorů, která je součástí této práce, a to především MUDr.Josefu Srovnalovi, Ph.D. a vedoucímu LEM doc.MUDr.Mariánu Hajdúchovi, Ph.D.

Práce na tomto projektu je podporována granty IGA MZCR NS9937-4 a MSM6198959216 a LC07017.

Děkuji své rodině za podporu a toleranci.

V Olomouci dne 4.ledna 2010

MUDr.Dušan Klos



# Obsah

<b>1. Seznam použitých zkratk</b>	10
<b>2. Teoretická část práce</b>	14
2.1. Úvod	14
2.2. Karcinom pankreatu – přehled současného stavu problematiky	16
2.2.1. Obecný úvod - epidemiologie, etiologie, patologie, symptomatologie a diagnostika	16
2.2.2. Molekulární genetik u karcinomu pankreatu	23
2.2.3. Staging – UICC/AJCC verze z roku 2003 a klasifikace Japonské pankreatologické společnosti	35
2.2.4. Možnosti léčby karcinomu pankreatu a její perspektivy	40
2.3. Minimální reziduální choroba	46
2.3.1. Možnosti stanovení minimální reziduální choroby u solidních nádorů	46
2.3.1.1. Imunohistochemie, průtoková cytometrie, polymerázová řetězová reakce	48
2.3.1.2. Real-time RT-polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)	49
2.3.2. Markery vhodné ke sledování minimální reziduální choroby u solidních nádorů	50
2.3.2.1. Karcinoembryonální antigen	51
2.3.2.2. Receptor pro epidermální růstový faktor 1	51
2.3.2.3. Telomeráza	52
2.3.2.4. Další markery (mamaglobin 1, cytokeratiny, transkripční faktor štítné žlázy 1)	54
2.3.3. Potenciální využití minimální reziduální choroby v onkologické praxi	55
<b>3. Experimentální část práce</b>	59
3.1. Cíle práce	59
3.2. Materiál a metoda	60



3.2.1. Materiál a jeho odběr	60
3.2.2. Zpracování materiálu v Laboratoři experimentální medicíny	64
3.2.3. Specificita a senzitivita použité metody	68
3.2.4. Statistické zpracování	71
3.2.5. Soubor pacientů	71
3.3. Výsledky	73
3.3.1. Vztah exprese EGFR1 v jednotlivých kompartmentech vzhledem k jednotlivým klinicko-patologickým parametrům	73
3.3.2. Vztah exprese CEA a sledovaných parametrů	81
3.3.3. Vztah exprese h-TERT a sledovaných parametrů v jednotlivých kompartmentech	85
3.3.4. Korelace pozitivitu sledovaných markerů v kostní dřeni, peritoneální laváži, systémové a portální krvi vzhledem přežívání	88
<b>4. Souhrnné výsledky a diskuze</b>	<b>97</b>
<b>5. Závěr</b>	<b>105</b>
<b>6. Souhrn</b>	<b>106</b>
<b>7. Summary</b>	<b>108</b>
<b>8. Seznam použité literatury</b>	<b>110</b>
<b>9. Přehled publikací a přednášek autora</b>	<b>127</b>
<b>10. Přílohy</b>	<b>130</b>

## 1. Seznam použitých zkratk

BM	kostní dřev (bone marrow)
BT 549	nádorová linie lidského karcinomu prsu
BRCA2	(breast cancer type2 susceptibility antigen)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CEA	karcinoembryonální antigen
CEM	nádorová linie lidské T-lymfoblastické leukémie
CDK	cyklin-dependentní kináza
CI	interval spolehlivosti (confidential interval)
c-onc	celulární onkogen
c-abl	Abelsonův gen myší leukémie
c-erb B	gen ptačí erytroblastózy
c-fos	gen myšího osteosarkomu
c-jun	gen Jainus kinázy
c-myb	gen ptačí myeloblastózy
c-myc	gen ptačí myelocytomatózy
c-H-ras	Karveyův gen potkaního sarkomu
c-K-ras	Kirstenův gen potkaního sarkomu
CD	diferenciační antigeny krevních elementů
CDK	cyklin dependentní kináza
CK19	cytokeratin 19
CK20	cytokeratin 20
CT	výpočetní tomografie (computer tomography)
CTC	cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells)
DFI	interval bez známek onemocnění (disease-free interval)
DFS	přežití bez známek onemocnění (disease-free survival)
DMFS	období do vzniku vzdálených metastáz (distant metastasis free survival)

DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPC4	(gen deleted in pancreatic cancer 4)
DTC	diseminované nádorové buňky (disseminated tumor cells)
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR1	receptor pro epidermální růstový faktor 1
EGFRvIII	variantní forma receptoru epidermálního růstového faktoru
EpCAM	adhezní molekula epiteliálních buněk
ERCP	endoskopická retrográdní cholangiopankreatikografie
FC	průtoková cytometrie (flow cytometry)
FGF	růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
G-CSF	granulocyty stimulující faktor (granulocytes colony stimulating factor)
G-CST	trombocyty stimulující faktor (trombocytes colony stimulating factor)
gDNA	genomická deoxyribonukleová kyselina
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HCT116	nádorová linie lidského karcinomu tlustého střeva
HER2-4	lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor)
HPAC	nádorová linie lidského karcinomu pankreatu
HR	poměr rizika (hazard ratio)
hTERT	lidská telomeráza (human telomerase reverse transcriptase)
CHT	chemoterapie
IGF	(insulin-like growth factor)
IHC	imunohistochemie (immunohistochemistry)
IL-1	interleukin 1
MAP kináza	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)
MGB1	mamaglobin 1
MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
M-MuL V	Moloneyho virus myší leukémie

MMPs	matrix metaloproteináz
MMPI	inhibitor matrix metaloproteináz
MRD	minimální reziduální choroba (minimal residual disease)
mRNA	informační ribonukleová kyselina
MR	magnetická rezonance
MUC1,2,4	mukoprotein
N	status postižení lymfatických uzlin
ND	nestanovena (not determined)
OS	celkové přežití (overall survival)
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplazie
PBS	fosfátový fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet derived growth factor)
PET-CT	vyšetřovací metoda kombinující pozitronovou emisní tomografii s výpočetní tomografií
p-onc	protoonkogen
pTNM	patologická TNM klasifikace (tumor, uzliny, vzdálené metastázy)
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
QRT-PCR	kvantitativně reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SB	systemová krev (systemic blood)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SLN	sentinelová lymfatická uzlina
T	tumor
TGF $\alpha$	transformující růstový faktor $\alpha$ (transforming growth factor $\alpha$ )
TGF $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNM	klasifikační systém nádorů (tumor, node, metastasis)
UZ	ultrazvuk

VEGF	vaskulární růstový endotelový faktor (vascular endothelial growth factor)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

## 2. Teoretická část

### 2.1. Úvod

Karcinom slinivky břišní představuje jedno z nejagresivnějších nádorových onemocnění, s velmi špatnou prognózou, se stoupající incidencí a přitom, přes pokroky ve výzkumu, s neklesající mortalitou. Stává se tak jedním z nejvýznamnějších medicínských problémů moderních rozvinutých zdravotnických systémů. Jedná se o onemocnění, které je často diagnostikováno až ve velmi pokročilém stadiu, kdy možnosti léčby jsou zcela minimální. Vzdálené metastázy a karcinomatóza peritonea jsou způsobeny časnou diseminací nádorových buněk a to buď cestou hematogenní či lymfogenní. Nejčastější příčinou lokálních recidiv tumoru je jeho perineurální šíření. Není k dispozici kvalitní screeningový program, který by byl schopen odhalit nádory pankreatu v počátečním stadiu. Také onkologická adjuvantní terapie je velmi omezená a v drtivé většině případů nevede k radikálnímu prodloužení přežívání nemocných. Někteří autoři tak považují toto onemocnění od počátku za systémové a v určitých fázích historického vývoje se i řada chirurgů k radikálním operacím pankreatu stavěla zdrženlivě, až odmítavě. Názor je to jistě přehnaný, obzvláště za situace, kdy pacientům s radikálně resekovatelným tumorem, není co jiného v managementu léčby nabídnout. Napovídá to však tomu, že karcinom pankreatu vzhledem ke své lokalizaci a biologické aktivitě představuje od počátku vysoce invazivní nádorové onemocnění.

Léčba karcinomu pankreatu je multimodální. Jedinou potenciálně kurabilní metodou je R0 chirurgická resekce. Přitom radikální chirurgický výkon je možný jen u části nemocných s tímto typem nádoru. Pětileté přežívání i po radikálních resekcích výkonech na pankreatu je přesto velmi nízké. Jako významně nepříznivé prognostické faktory pro délku přežití po resekci jsou udávány zejména pozitivita nádoru v uzlinách, grading nádoru, velikost tumoru větší než 2,5 cm, přítomnost nádoru v resekcční linii, cévní invaze, invaze nádoru přes kapsulu, což podmiňuje časnou lokální recidivu.

Jako minimální reziduální choroba je označována přítomnost cirkulujících nádorových buněk v kompartmentech mezenchymálního původu, tj. krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a v dutině peritoneální, které je možné podle současných poznatků považovat, za určitých okolností, za prekurzory rozvoje vzdálených metastáz. Jejich přítomnost však ještě neznamena jednoznačně vznik a vývoj vzdálených metastáz. Klinický význam minimální reziduální choroby tedy není stále přesně jasný a nadále zůstává zdrojem celé řady sporů a odborných diskuzí.

Jak už bylo zmíněno, jedinou potenciálně kurabilní metodou léčby karcinomu pankreatu zůstává radikální resekce. Přitom je nutné naprosto otevřeně konstatovat, že chirurgická metodika a technika je plně rozvinutá, a žádná inovace ve smyslu miniinvazivního přístupu či rozsahu radikality a lymfadenektomie, nevede k tolik žádoucímu zvýšení přežívání nemocných. V tomto smyslu je chirurgická terapie již plně vyčerpána. Další modalita léčby je tak nutné hledat na úrovni molekulárně-genetické, kde nové poznatky v etiopatogenezi a mechanismech pankreatické kancerogeneze, mohou vést k odhalení nových léčebných postupů, ať už ve smyslu moderní chemoterapie, metod biologické léčby či dokonce genové terapie. A z tohoto pohledu má jednoznačný význam i stanovení minimální reziduální choroby jako potenciálního diagnostického a prognostického faktoru.

## **2.2. Karcinom pankreatu – přehled stavu současné problematiky**

### **2.2.1. Obecný úvod - epidemiologie, etiologie, patologie, symptomatologie a diagnostika**

Karcinom exokrinního pankreatu vychází nejčastěji z duktálních buněk (duktální karcinom), ostatní typy nádorů jsou v oblasti pankreatu vzácné.

Incidence vykazuje stálý vzestup, největší nárůst je pozorován v rozvinutých zemích severní polokoule, zejména v USA, v Evropě a Japonsku, zatímco země Afriky, Střední a Jižní Ameriky, Asie a Oceánie hlásí mnohem nižší počty nových onemocnění. Incidence karcinomu pankreatu v USA v roce 2005 se pohybovala u mužů kolem 16,1/100 tis. a u žen 16,0/100 tis.[6], v České republice v roce 2005 byla incidence karcinomu pankreatu 16,7 - 18,1/100 tis., což odpovídá 1777 (876 žen, 901 mužů) nově diagnostikovaným případům za rok. Jedná se zhruba o 100 více než v roce 2002 a 360 více než v roce 2000. Karcinom pankreatu je čtvrtou nejčastější příčinou smrti na nádorové onemocnění u nás a to za karcinomem plic, prsu a kolorekta. V roce 2005, jak již bylo řečeno, bylo nově diagnostikováno 1777 nádorů pankreatu a v témže roce na tuto diagnózu zemřelo 1808 osob (873 žen, 935 mužů). To znamená, že počet nově diagnostikovaných onemocnění za rok odpovídá zhruba ročnímu počtu úmrtí na toto onemocnění. Pětileté přežití od stanovení diagnózy se dožívají jen 2-4% nemocných [2,4], přitom jen 8% případů je diagnostikováno v lokalizovaném stadiu, 25-26 % v lokálně pokročilém a 40% diseminovaném stadiu. Výrazně vyšší pětileté přežití je pozorováno u nemocných s karcinomem Vaterské papily, a to v 50%. Počet procenta nemocných, kteří jsou indikováni k resekci se různí, Fries et al. [1] uvádí 10% nemocných, kteří mohou být v době diagnózy resekováni, Pit et al. [2] až 75%. I podle našich zkušeností a statistik vyplývá jako nejrealističtější odhad Begerova souboru [3], který uvádí, že potenciálně kurativní resekci je možné provést zhruba u 10-15% pacientů. Průměrná délka života od určení diagnózy u neoperovaných nemocných nebo nemocných po paliativních resekcích se udává v rozmezí 4-6 měsíců, po resekčních výkonech 11-18 měsíců. Medián rekurence po resekčním výkonu je 8-9 měsíců [5]. Maximum výskytu je udáváno mezi sedmým až osmým decenniem.



Pětileté přežívání po radikálním výkonu je uváděno podle současných statistik mezi 2-20% [4,2]. Významně vyšší pětileté přežívání, kolem 50%, je popisováno u nemocných s karcinomem Vaterské papily.

Etiopatogeneze karcinomu pankreatu není přesně známa. Jako rizikové se uvádějí jak faktory endogenní, tak exogenní. Za potencionální exogenní riziko je považováno kouření, které zvyšuje pravděpodobnost rozvoje nádorů slinivky břišní až dvojnásobně. Dalšími rizikovými faktory jsou abúzus alkoholu, nadměrný přísun masa, cholesterolu a smažených pokrmů. Naopak bohaté zastoupení zeleniny, ovoce, vlákniny a vitamínu C působí protektivně. Dále je nutné z rizikových faktorů zmínit obezitu, nedostatek fyzické aktivity, profesionální kancerogeny či abúzus kyseliny acetylsalicylové. Z endogenních faktorů je to chronická pankreatitida, která zvyšuje riziko rozvoje karcinomu pankreatu až 16x oproti zdravé populaci [7]. Diabetes mellitus zejména II. typu zvyšuje dvojnásobně relativní riziko následného rozvoje maligního bujení po pěti- a víceletém trvání diabetu. [8]. Cholelithiáza a cholecystektomie dnes nejsou považovány za samostatné predispoziční faktory. Dědičnými faktory můžeme vysvětlit zhruba 5% zhoubných nádorů pankreatu. Jako častá predispozice byla identifikována zárodečná mutace v tumor supresorovém genu *BRCA2*. Jako prekancerózu tedy označujeme hereditární pankreatitidu, která je dnes považována za samostatnou nozologickou jednotku a prekancerózu, kdy se jedná o autozomálně dominantně podmíněné onemocnění způsobené defektem genu pro trypsinogen, který je lokalizován na chromozomu 7q35. Takto postižení jedinci mají oproti ostatní populaci riziko rozvoje karcinomu pankreatu zvýšené 50-60 krát.[12]

Asi 80-90 % karcinomů exokrinního pankreatu jsou duktální adenokarcinomy, postihující asi ze 2/3 hlavu pankreatu, v 1/3 tělo a ocas. Histopatologické dělení nádorů pankreatu dle WHO z roku 2000 [183] zahrnuje:

1. *solidní tumory:*

- a) duktální adenokarcinom a jeho varianty
- b) acinózní buněčný karcinom
- c) pankreoblastom
- d) endokrinní tumory

e) neepiteliální tumory

## 2. cystické tumory:

a) intraduktální papilární acinózní neoplazie

b) acinózní cystická neoplazie

c) serózní cystická neoplazie

d) solidní pseudopapilární neoplazie

e) další cystické tumory

f) neepiteliální tumory a léze

Časná, bohužel právě léčitelná, stadia karcinomu pankreatu jsou dlouho asymptomatická. Symptomatický tumor již velmi limituje možnosti chirurgické resektability. Prvním příznakem je zpravidla nebolestivý obstrukční ikterus, dále je to bolest lokalizována do epigastria a vyzařující směrem do zad, nechutenství, únava, ztráta hmotnosti. Ascites je již známkou pokročilého onemocnění s diseminací na peritoneum nebo metastázami do jater.

Diagnostika se opírá o laboratorní vyšetření – stanovení Ca 19-9, CEA, Ca 50, Ca 125 a dále pak především zobrazovací metody, a to neinvazivní – ultrasonografie, CT vyšetření (obr.2.2.1.1), magnetická rezonance, MR cholangiopankreatikografie a také MR splenoportografie (obr.2.2.1.3).

Ultrasonografie představuje vyšetření první volby. Je dostupné prakticky kdykoliv a kdekoliv s minimálním zatížením pro pacienta. Přínos v diagnostice lézí pankreatu je však omezený. Je to dáno především limitací ze strany pacienta – obezita, meteorismus a hlavně pak limitací ze strany vyšetřujícího – jedná se o subjektivní hodnocení závislé na zkušenostech a morfologických znalostech dané oblasti.

Výpočetní tomografie (computer tomography) je dnes základní zobrazovací modalitou lézí slinivky břišní. Díky rychlým spirálním CT přístrojům a bolusově podávaným kontrastním látkám intravenózně je možné zachytit jednotlivé fáze naplnění splanchnického cévního řečiště, tj. fázi arteriální, portální i naplnění jaterních žil. Je tak možné získat nejen velmi cenné informace o morfologických

ložiskových změnách na pankreatu (obr.2.2.1.1.), patologicky změněných lymfatických uzlinách či vzdálených metastázách, ale také poměrně kvalitní obraz CT angiografie s informací o případném útlaku či infiltraci zejména oblasti soutoku horní mezenterické žíly s žílou lineální a oblasti coeliackého trunku s horní mezenterickou tepnou.

Magnetická rezonance (MR) se stala slibnou alternativou v zobrazení poskytované dosud CT vyšetřením. Prostorové rozlišení MR je ovšem menší, než jaké poskytuje CT. Velmi cenná je však MR cholangiopankreatikografie, která umožňuje zobrazit žlučové a pankreatické cesty v případech, kdy to není možné klasickou cestou endoskopickou – např. stav po resekčních výkonech na žaludku, duodenu či spojkových operacích mezi žlučovými cestami a tenkým střevem. Přínosem je také MR splenoportografie (obr.2.2.1.3.), která zobrazuje oblast portálního řečiště s informací o jeho možné infiltraci tumorem, byť toto vyšetření je dnes v éře spirálního CT spíše vytlačeno CT angiografií.

V poslední době se při posouzení diseminace onemocnění využívá také PET-CT vyšetření (obr.2.2.1.2), kdy se jedná o kombinaci PET kamery, která snímá intravitam rozložení metabolicky aktivní látky značené radionuklidem, nejčastěji je používán derivát glukózy označený radioizotopem fluoru ( $^{18}\text{F}$ ), fluorodeoxyglukóza ( $^{18}\text{F}$ )FDG-PET, jež se specificky vychytává v tkáních s vysokou metabolickou aktivitou (nádor, zánětlivé ložisko), s plnohodnotným CT skenerem. Na fúzovaných obrazech jsou pak údaje o metabolismu glukózy doplněny o anatomické informace, které nelze pomocí radiofarmaka získat. Díky dostupnosti této vyšetřovací modality na našem pracovišti podstupuje většina nemocných toto vyšetření před vlastní operační revizí.

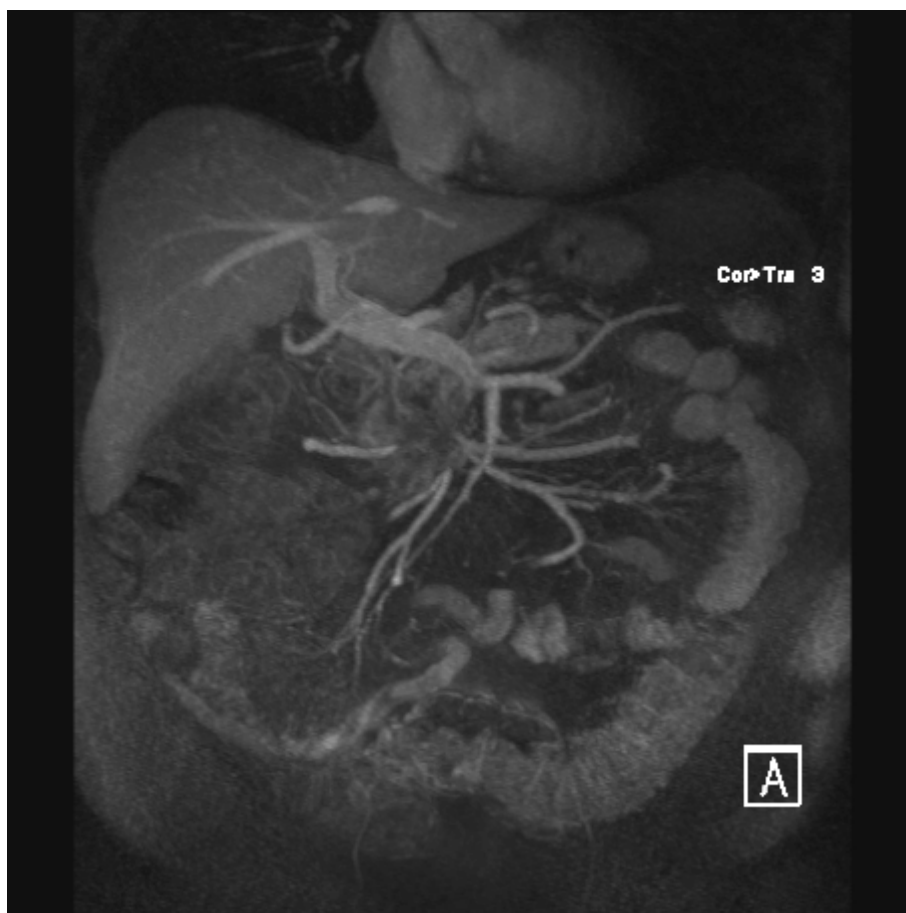
**Obr.2.2.1.1. CT nález tumoru hlavy pankreatu**



**Obr.2.2.1.2. PET-CT nález tumoru hlavy pankreatu**



### Obr.2.2.1.3. MR splenoportografie s útlakem horní mezenterické žíly tumorem pankreatu



Z invazivních metod se používá endoskopická retrográdní cholangiopankreatikografie (ERCP), (obr.2.2.1.4.). Je stále spolehlivou metodou v diagnostice nádorových onemocnění pankreatu, což je podmíněno zejména tím, že většina typů pankreatických nádorů jsou adenokarcinomy, které mají svůj původ v duktálním epitelu. Rozlišujeme čtyři hlavní typy pankreatikogramu při karcinomu:

- I. stenotizující – je nejčastější, kdy nedochází k přerušení kontinuity náplně ductus Wirsungi kontrastní látkou
- II. obstrukční – kontrastní látka se nedostane do periferie
- III. postupné zúžení s předčasným ukončením – tzv.tapering
- IV. kavernózní – ductus Wirsungi se balónovitě rozšiřuje do kavernomu.

**Obr.2.2.1.4. ERCP obraz stenózy distálního choledochu při tumoru hlavy pankreatu překlenuté nasobiliárním drénem (typ I.)**



ERCP je nejen metodou diagnostickou, ale také terapeutickou, kdy umožňuje předoperační zajištění drenáže žlučových cest, buď plastikovým stentem, nebo nasobiliárním drénem.

Endoskopická ultrasonografie a aspirační biopsie tenkou jehlou je nezastupitelnou metodou při stanovení předoperačního stagingu, stejně jako k získání materiálu k histopatologickému vyšetření a k průkazu nádorových buněk. Přesnost při stanovení resekability a TN staging je větší či srovnatelná s CT. Léze větší než 2 cm jsou detekovány téměř se stoprocentní jistotou. U menších lézí má endoskopická ultrasonografie větší senzitivitu než CT či MR. Aspirační biopsie tenkou jehlou je bezpečná metoda cytologické či histologické verifikace pankreatických mas.

Podle našich zkušeností PET-CT diagnostika selhává zejména v časných stádiích karcinomu pankreatu, kdy ložiska do velikosti 10 mm nejsou na PET-CT skenu viditelná. Ložiska velikosti 10-15mm pak sporně. V těchto případech je dominantní diagnostickou metodou endosonografie a aspirační biopsie tenkou jehlou.

### 2.2.2. Molekulární genetika u karcinomu pankreatu

Přesný mechanismus vzniku karcinomu pankreatu v současnosti neznáme, řada autorů jej považuje za primárně geneticky podmíněný. Jedná se přitom o složitý multifaktoriální a vícestupňový proces, který můžeme nejlépe sledovat na úrovni buněčných transformací v nekursorových intraduktálních lézích pankreatu označované jako *pankreatická intraepiteliální neoplazie (PanIN)*. PanIN-1A a PanIN-1B představují léze s lehkou či žádnou atypií, PanIN-2 je označení pro léze s mírnou atypií a PanIN-3 jsou léze s těžkou atypií.

Pod vlivem nejrůznějších faktorů, zejména exogenních, tak v etiopatogenezi nádorového bujení obecně dochází k alteraci protoonkogenů a antionkogenů řídících proliferaci, apoptotických genů a genů opravy poškozené DNA. Postižení může být buď na úrovni několika bazí, nebo se může jednat o větší změny, např. exprese proteinu či amplifikace genů. Změna musí být natolik závažná, aby umožnila buňce nekontrolované dělení a nádorové buněčné populaci schopnost přežití v organismu hostitele. Jako **protoonkogeny** označujeme geny ve zdravých buňkách kódující proteiny, které regulují růst, proliferaci a diferenciaci buněk. Pokud dojde k patologické aktivizaci protoonkogenů dochází k nadměrné proliferaci, která je typická pro malignitu, protoonkogen se mění na onkogen a jeho produktem je onkoprotein. Existuje několik typů aktivace protoonkogenů na onkogen, které můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, zda dojde ke změně struktury protoonkogenů, čímž vzniká onkogen kódující onkoprotein odlišný od protoonkoproteinu strukturálně a tedy i funkčně, nebo zda-li dojde k nadměrné produkci, overexpresi nezměněného proteinu. Do prvního typu patří mutace, translokace a inzerce viru, do druhé pak amplifikace protoonkogenů nebo translokace či inverze, která umístí protoonkogen do sousedství jiného genu. Protoonkogeny pak můžeme rozdělit podle toho, jakou funkci zastává jimi kódovaný produkt, a to buď:

- a) *růstové faktory* – nádorové buňky stimulované TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  a IL-1, zvyšují svou produkci PDGF (destičkového růstového faktoru) a FGF (růstový faktor fibroblastů), kterými stimulují fibroblasty k proliferaci, migraci, diferenciaci a produkci ECM (extracelulární matrix). Bylo také prokázáno, že buňky karcinomu pankreatu produkují GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů) a G-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů).
- b) *receptory pro růstové faktory* – protoonkogeny p-erb-B 1,2 a 3 kódují EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor s tyrozin-kinázovou aktivitou, která se uplatní při vazbě růstových faktorů. Při ní dochází k fosforylaci tyrozinu u celé řady proteinů, které jsou součástí mitotické kaskády. Onkogenní formy těchto receptorů jsou trvale aktivovány bez vazby příslušných růstových faktorů. Tím dodávají permanentní signál pro aktivaci proliferace. Samotná zvýšená exprese těchto ligandů a receptorů však není sama postačující k maligní transformaci, neboť podobné změny byly pozorovány i u chronické pankreatitidy. V kombinaci s mutací onkogeny K-*ras*, v supresorovém genu p53 a spolu s dalšími genetickými změnami může však zvýšená exprese růstových faktorů a jejich receptorů přispívat k extrémní agresivitě karcinomu pankreatu [9]. Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR-1) je za normálního stavu exprimován v duktálních buňkách pankreatu. Má několik ligandů – EGF, TGF- $\beta$ , amfiregulin, betacelulin, epiregulin, který má přitom dvojí roli: inhibuje růst některých typů buněk a zároveň stimuluje jiné, jako fibroblasty a hepatocyty. Zvýšená exprese EGFR-1 a jednoho nebo více z jeho ligandů (především EGF a TGF- $\beta$ ) je spojena s výrazně horší prognózou, vyšším metastatickým potenciálem a vyšší invazivitou nádoru [10]. Další tři receptory jsou blízce příbuzné s EGFR – jedná se o receptory HER2, HER3 a HER4, které jsou také souborně označovány jako c-erbB2-4. Jejich ligandy nejsou vesměs známy, vyšší hladiny HER2 jsou přítomny u asi 20-50% pankreatických nádorů. Překvapivé je, že vyšší exprese HER2 je spojena s lepší diferenciací nádoru, na rozdíl od HER3, kde vyšší exprese značí špatnou prognózu. Dalším růstovým faktorem, který můžeme prokázat u karcinomu pankreatu je hepatocytární růstový faktor a jeho receptor. Skupina transformačního růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ) se



skládá ze tří izoform regulacních peptidů a z dalších inhibičních a aktivačních substancí, které se váží na tři hlavní receptory. U pankreatických tumorů nacházíme zvýšenou expresi těchto růstových faktorů, stejně jako fibroblastových růstových faktorů, jejichž role však není přesně známa [13].

- c) *přenašeče signálů (transdukční faktory)* – můžeme je rozdělit na skupinu vázanou na buněčnou membránu s aktivitou tyrozin-kinázovou nebo aktivitou GTP-ázovou a skupinu přenašečů signálu v cytoplazmě mající serin/treonin – kinázovou aktivitu. Do skupiny s GTP-ázovou aktivitou patří protein RAS (p12) kódovaný *ras*. V neaktivní formě váže GDP, ale při vazbě růstového faktoru na receptor je aktivován výměnou GDP za GTP a interaguje s cytosolovým proteinem RAF-1, čímž dochází ke stimulaci MAP kinázy, která je zodpovědná za aktivaci cílových transkripčních faktorů v jádře, a tím podpoří mitogenezi. V nepřítomnosti růstového faktoru pak protein RAS uplatní svou GTPázovou aktivitu – rozštěpí GTP na GDP a fosfát je opět inaktivní. Mutace v rodě *ras* genů patří mezi nejčastěji se vyskytující abnormality onkogenů u lidských nádorů. Produkty onkogenů *K-ras* nebo *H-ras* (Kirstenův a Harveyův onkogen sarkomu potkanů) nemají GTPázovou aktivitu, GTP tedy nerozloží, což vede k permanentní stimulaci mitogeneze.
- d) *jaderné transkripční faktory* – jsou nukleární proteiny, které se vážou na specifické úseky DNA, ze kterých mohou aktivovat nebo inhibovat transkripci přilehlých genů, jejich aktivace je finální etapou transdukční kaskády, patří sem produkty *myc*, *myb*, *jun*, *fos* a další.
- e) *cykliny a cyklin dependentní kinázy* – po vazbě růstového faktoru na receptor jsou fosforylací aktivovány přenašeče fosforylující komplex CDK s cyklinem, což umožní přechod buňky do další fáze buněčného cyklu. V prvním kontrolním bodě (přechod G1/S) jsou aktivovány komplexy D/CDK 4,6 či E/CDK 2 a tyto fosforylují supresorový Rb protein. V hyperfosforylované podobě je tento supresor inaktivní, uvolní transkripční faktor E2F, který se tak nemůže navázat na specifickou DNA sekvenci a indukuje transkripci genů S fáze, čímž podpoří mitózu. Mutacemi či amplifikacemi protoonkogenů, např. CDK4 či cyklinů D, tak

dochází k nadměrné fosforylaci Rb proteinu vedoucí k zesílení působení E2F faktoru a proliferace.

Nejznámějším onkogenem je zcela jistě *K-ras*, který je také znám pod zkratkou *KRAS2* (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogen) a je přítomný na krátkém raménku chromozomu 12 v lokalizaci p12.1. Jeho aktivovaná forma je detekovatelná již v časném stadiu vývoje maligního bujení PanIN-1A, v invazivním karcinomu byla nalezena téměř v 90% případů. Aktivace nastává nejčastěji v důsledku mutace kodonu 12, méně často v důsledku mutace v kodonu 13 a 61 [14,15]. Gen *K-ras* kóduje malý GTP vazebný protein, který zprostředkovává přenos signálu v systému proteinkinázových kaskád. Jeho mutace je charakterizována záměnou aminokyseliny glycin za valin nebo aspartát a má za následek blokaci genu v aktivní formě, což vede k nadměrné stimulaci buňky. V kombinaci s některými mutovanými tumor supresorovými geny (např. p16 nebo p53) dochází k nekontrolované buněčné proliferaci. Dalším klinicky významným onkogenem vykazujícím aktivitu u nádorů pankreatu je *HER2* (human epidermal growth factor receptor, NEU, ERBB2). Tento gen je lokalizovaný na chromozomu 17 v poloze q21.1. Nejčastější formou genetické alterace *HER2* je genová amplifikace s následnou zvýšenou expresí v nádorové tkáni. V menší míře byl popsán výskyt mutací [16]. Produktem *HER2* je receptor růstového faktoru tyrosinkinázy. Zvýšenou expresí *HER2* lze detekovat v duktálních tkáních vykazujících mírnou atypii, zatímco v normální tkáni není jeho nadměrná exprese přítomna.[11]. Jedná se tedy o časnou změnu ve vývoji nádoru pankreatu. U invazivního karcinomu dosahuje frekvence nadměrné exprese *HER2* více než 50%. Amplifikace a zvýšená exprese *HER2* představuje společně s výskytem mutantní formy onkogenu *K-ras* potenciální genetický marker pro časnou detekci karcinomu pankreatu [17]. Onkogen *AKT2*, nacházející se na chromozomu 19 v poloze q13.1-q13.2, produkuje další protein z řady serin-treoninových kináz, který se významně podílí na zprostředkovávání růstových signálů buňky. Nejčastěji dochází ke genové amplifikaci s následnou nadměrnou expresí proteinového produktu. V buněčných liniích byla sledována redukce nádoru po inhibici *AKT2* za použití antisense RNA-*AKT2* [18]. *MKK* gen (*MAP2K,SEK1*, lokus 6q22.33) je součástí stresem aktivované proteinkinázové signální dráhy. Genové mutace a ztráty obou alel byly zjištěny u 4% nádorů pankreatu [19]. V poslední době je pak sledován význam zvýšené exprese genů *MUC1, MUC2 a MUC4* produkujících vysoce glykosylované mukoproteiny, u

nichž se předpokládá možný podíl na transformaci chronické pankreatitidy v karcinom [20].

Jako **antionkogeny**, či **tumor supresorové geny**, můžeme označit geny, jejichž inaktivace vede k maligní transformaci buňky. Tumor supresorový gen *p16*, který bývá také označován jako *INK4A*, *CDKN2* nebo *MTS1*, tedy multiple tumor supresor 1, je přítomen na chromozomu 9 v lokalizaci p21[21] a je jedním z nejdůležitějších genů, v nichž dochází k alteraci během vývoje karcinomu pankreatu. Inaktivace genu nastává někde na úrovni rozmezí fází PanIN-1B a PanIN-2, u invazivních karcinomů je tento gen inaktivován až v 95%. Nejčastější příčinou je současná delece obou alel, až ve 40 %, a ztráta jedné alely při současné mutaci druhé alely, ve 35-40% případů. Proteinový produkt *p16* reguluje buněčný cyklus ve fázi G1 inhibicí cyklin-dependentní kinázy 4 a 6 (CDK4 a CDK6). Absence proteinového produktu nativního *p16* genu vede k nekontrolovanému buněčnému růstu. Další z podstatných supresorových genů je gen *DPC4* (deleted in pancreatic carcinoma), někdy označovaný jako *SMAD4* nebo *MADH4*, je lokalizován na chromozomu 18 v poloze q21.1. [22]. Snížená exprese tohoto genu byla detekována v pozdním stadiu vývoje (PanIN-3) a u invazivního karcinomu byla zjištěna kompletní absence *DPC4* produktu u 55% případů.[23]. Příčinou defektu je nejčastěji ztráta obou alel či ztráta jedné a mutace druhé. Proteinový produkt *DPC4* řídí signální dráhy růstových faktorů TGF- $\beta$ , které významně ovlivňují regulační systémy buněčného cyklu, buněčné proliferace a apoptózy [24]. Inhibice buněčného růstu zajišťovaná faktorem TGF- $\beta$  je při inaktivaci *DPC4* snížena, a tím dochází k nádorovému bujení. Na rozdíl od dříve popsanych genů je inaktivace *DPC4* specifická pro karcinom pankreatu a u jiných malignit nebyla pozorována [25]. Další z řady supresorových genů, u kterých byla pozorována inaktivace v pokročilých stádiích karcinomu pankreatu je gen *p53* (*TP53*) lokalizovaný na chromozomu 17 v poloze p13.1. Jeho alterace byla pozorována v pozdní fázi PanIN-3 vývoje karcinomu. Dochází k ní nejčastěji v důsledku mutací a ztráty druhé alely [26]. Proteinový produkt tohoto genu výrazně ovlivňuje buněčný cyklus. Mutace lokalizované v oblasti DNA vazebné domény vedou k nadměrné expresi defektního proteinu, který nemá schopnost navázat specifické sekvence DNA [27] a stimulovat transkripci specifických genů, například inhibitoru buněčného cyklu *p21* [28,29]. Inaktivace také eliminuje zásadní funkci proteinu TP53 při indukci kontrolované buněčné smrti, apoptózy [30]. Vrozené

mutace genu *p53* jsou příčinou syndromu Liova-Fraumeniho, který je charakterizován dispozicí ke vzniku nádorů různého druhu [31]. U karcinomu pankreatu je také často sledována mutace tumor supresorového genu *BRCA2* lokalizovaného na chromozomu 13 v poloze q12.3, má zásadní význam při regulaci reparace DNA. Vrozená mutace genu *BRCA2* má za následek predispozici ke vzniku karcinomu prsu a vaječníku [32]. U karcinomu pankreatu je sledována ztráta jedné nebo obou alel *BRCA2* v pozdní fázi pankreatické epiteliální neoplazie, a to s frekvencí v rozmezí 7-10%. [33].

Kromě mutace či delece onkogenů a inaktivace tumor supresorových genů postihuje řada genetických abnormalit také růstové faktory tumoru a jejich receptory, které se zapojují do růstu buněk a jejich diferenciaci v průběhu kancerogeneze a metastatického procesu. U karcinomu pankreatu popisujeme řadu růstových faktorů, jejichž signál je přenášen skrze tyrozin-kinázové receptory a jejichž hladina je exprimována ve zvýšené úrovni, jako transformující růstový faktor –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor destiček (PDGF) a insulin růstový faktor (IGF) a jejich receptory. Předpokládá se, že tyto růstové faktory se podílejí na maligním potenciálu karcinomu pankreatu a to svým autokrinním nebo parakrinním chováním a stimulují tak růst karcinomu. Vazba růstových faktorů s jejich receptory vede k autofosforylaci a následnému přenosu signálu prostřednictvím různých molekul.

Lidské buňky exprimují 3 izotypy TGF- $\beta$  a 3 TGF- $\beta$  receptory. TGF- $\beta$  izotypy vyvíjejí řadu pleiotropních účinků v řadě lidských tkání, včetně pankreatické. Vliv TGF- $\beta$  na buněčný růst přitom závisí na typu buňky, kultivačních podmínkách a koncentracích TGF- $\beta$  [34,35]. Účinky TGF- $\beta$  jsou v lidských buňkách zprostředkovány vazbou na odpovídající receptory, čímž dochází k zahájení intracelulární aktivace kaskády proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a inhibice buněčné proliferace [36,37]. Tumor supresorový gen *SMAD4*, který funguje jako transkripční faktor pro signální transdukční dráhu zprostředkovanou skrze TGF- $\beta$  receptor, je inaktivován v karcinomu pankreatu a tím je zrušena klíčová kontrola buněčné proliferace a negativní dopad TGF- $\beta$  na růst buněk přestane fungovat. Kromě přímých účinků na nádorové buňky může TGF- $\beta$  dodatečně ovlivnit nádorové bujení stimulací angiogeneze či potlačováním přirozených

imunitních procesů proti nádorovému zvratu či změnit složení extracelulární matrix. [38,39,40].

EGFR ligand rodiny HER (EGF, TGF- $\alpha$ , heparin vázající EGF, b-cellulin, amfiregulin) je zvýšeně exprimován u řady tumorů pankreatu a konkomitantní overexprese EGFR a EGF/TGF- $\alpha$  faktoru znamená, že apokrinní nebo parakrinní účinky těchto receptor/ligand systémů hrají zásadní roli v patogenezi karcinomu pankreatu [41-43]. EGFR (HER-1), tyrozin-kinázový protein, je úzce spjat s ostatními receptory, jako je c-erb-2/c-erb-3, které jak známo fungují jako faktory maligní transformace in vitro [44-46]. Overexprese EGFR a c-erb-B3, zdá se, hraje roli v progresi karcinomu pankreatu a negativně ovlivňuje prognózu po resekcích primárního tumoru [47]. EGFR inhibitory snižují růst buněk u karcinomu pankreatu [48] a brzdí růst nádoru společně v kombinaci s chemoterapií [49]. Tumorigenní intracelulární dráhy účastnící se apokrinní či parakrinní aktivace systému EGF/EGFR jsou MAPK, PI3K/AKT, Src, NF- $\kappa$ B a koreceptory pro VEGF, neuropilin-1.

IGF/IGFR-1R aktivace systému je spuštěna u karcinomu pankreatu a významně přispívá k růstu vlastního tumoru [50,51]. Stávající autokrinní aktivační smyčka je podporována aberantní expresí IGF a odpovídajícím receptorem (IGF-1R) v tkáňových vzorcích karcinomu pankreatu a je spojen s dalšími cytoproliferativními dráhami jako je caveolin-1, CEACAM6/Akt a Src aktivace, což vede k IGF-1 závislé proliferaci nádorových buněk se zvýšením obsahu IGF-1R v buňkách [52-55]. Systém IGF- závislých intracelulárních signalizačních kaskád, zahrnující Akt a MAPKs (ERK-1, - 2 a p38) je velmi aktivní při progresi karcinomu pankreatu [56-58]. V poslední době je zájem zaměřen na vysoce afinitní, rozpustné, IGF-vázající proteiny (IGFBPs), které kontrolují distribuci EGF-1 mezi extracelulárním prostředím a vazebnými místy povrchu buňky a mohou měnit aktivitu IGF tím, že mění jeho interakci s příslušným receptorem. IGF-1 se podílí na aktivaci IGF-1R v průběhu kancerogeneze karcinomu pankreatu a může vést k proliferaci nádorových buněk pomocí IGF-1R overexprese [59-61]. Blokáda IGF dráhy pomocí anti-IGF-1R protilátky nebo exprese dominantně-negativní formy IGF-1R inhibuje růst nádoru xenotransplantátu a zvyšuje senzitivitu buněk karcinomu pankreatu vůči chemoterapii [62-63]. Overexprese růstového faktoru cévního endotelu a jeho receptorového systému (VEGF/VEGFR) byla popsána u karcinomu pankreatu v souvislosti s progresí onemocnění, což potvrdilo předpokládaný význam

neovaskularizace pro růst nádoru a jeho metastazování [64,65]. Nicméně exaktní mechanismy aktivace účinku nejsou dodnes přesně známy. Hypoxie reguluje VEGF a IL-8 expresi skrze transaktivaci a NF- $\kappa$ B/AP1 drah. Aberantní exprese VEGF v periferní části nádorové masy znamená, že hormony, cytosiny a růstové faktory, také mohou měnit VEGF expresi a tím podpořit nádorovou angiogenezi. Expres VEGF v nádorových buňkách skrze transkripci regulačních faktorů jako je NF- $\kappa$ B, HIF-1, AP-1, AP-2, Egr-1, SP-1, Stat-3 a další, znamená, že je zapojeno více transdukčních drah [66-69]. VEGF je potencionální mitogenní faktor a narušení drah inhibuje nádorový růst v xenomodelech karcinomu pankreatu [70-73]. VEGF exprese je zvýrazněna EGF, PDGF-BB, TGF- $\beta$  a IGF-I [74-76] a vede k subsekventní deregulované expresi flk-1/KDR/MAPK a stimulaci buněčného růstu. Met receptor tyrozin-kinázy a jeho ligand HGF jsou aktivovány u karcinomu pankreatu a inhibice signální dráhy inhibuje růst nádoru a jeho invazi. [77-79].

Velmi důležitým procesem, který zajišťuje eliminaci náhodných změn v DNA, kterých se denně vytvoří tisíce, ale jen minimum je stabilních a přechází do DNA dceřiných buněk, je DNA reparace, která je zajišťována produkty reparačních genů. Při poškození bází tak dochází k tzv. bázevé excizní opravě. Modifikovaná báze je vyštěpena DNA-glykosylázou, cukr-fosfátový zbytek je pak odstraněn endonukleázou, DNA polymeráza vyplní mezeru nukleotidy komplementárními k nepoškozenému řetězci a DNA ligáza pak spojí nový nukleotid s okolním řetězcem. Při větším poškození DNA se uplatňuje nukleotidová excizní oprava, při které je postižená sekvence nukleotidů vyštěpena specifickou endonukleázou. Vzniklý prostor je pak doplněn opět DNA-polymerázou a DNA-ligázou. V případě mutací či jiných změn postihujících tyto reparační geny je reparační systém defektní a dochází k akumulaci chyb v celé řadě důležitých genů včetně protoonkogenů a nádorově supresorických genů. Příkladem může být HNPCC – „hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome“.

Samotná nekontrolovaná proliferace v hostitelském organismu ještě neznámá, že dochází jednoznačně k expanzivnímu růstu. Jedním z nejsilnějších faktorů, které korigují poruchy buněčného dělení je programovaná smrt buňky, tzv. **apoptóza**. Poškození genomu buňky, které ji učiní nevhodnou pro další život, vyvolá kaskádu změn, která dovede buňku až k buněčné smrti. Efektorovými molekulami apoptózy jsou kaspázy (cystein-aspartic-acid-proteases) štěpící reparační enzymy DNA a

aktivující endonukleázy, jež se účastní štěpení DNA. K aktivaci endonukleáz je nutná přítomnost iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě. Kalcium rovněž aktivuje enzymy zvané kalpainy, které odbourávají membránové proteiny a struktury cytoskeletu. Z apoptotické buňky tak vznikají apoptotická tělíška (což je cytoplazmatickou membránou obalený jaderný a cytoplazmatický materiál), která jsou následně fagocytována makrofágy. Exogenní aktivace apoptózy je zprostředkována cestou membránových receptorů, tzv. „receptorů smrti“ (TNFR, Fas/CD95) obsahujících cytoplazmatické „domény smrti“ (death domain, DD). Při vazbě příslušných ligand (TNF, FasL) se pak na tyto DD váže svou DD transdukční faktor Fadd/Mort-1, který obsahuje i „doménu efektoru smrti“ (death effector domain, DED) vázající se s homologními oblastmi DED kaspáz-8 a -10, které jsou tímto aktivovány. Intracelulární iniciaci procesu apoptózy způsobuje uvolnění cytochromu C z mitochondrií, které následně spouští typickou kaspázovou kaskádu aktivací kaspázy-9. Bylo prokázáno, že všechna cytocidně působící cytostatika využívají zmíněné apoptotické dráhy při výsledné realizaci svého cytotoxického účinku. Defekty apoptotických faktorů nebo převaha antiapoptotických faktorů pak může být příčinou rezistence na cytostatika.

Podobným a přibližně stejně účinným regulátorem replikace je mechanismus **senescence**, tedy stárnutí buňky. Lidské buňky nejsou schopny se dělit nekonečně dlouho. Po několika desítkách dělení se tento proces zpomalí a po 60-70 děleních se zcela zastaví. Za kontrolu replikace jsou zodpovědné koncové repetitivní sekvence chromozomů TTAGGG, zvané telomery. Telomery se při každém dělení zkracují o několik desítek dvojic nukleotidů, dosažení kritické délky telomer je signálem k zastavení replikace. Tento mechanismus může být blokován několika způsoby. Pro nádorovou buňku je typické, že jsou schopny obnovovat délku telomer např. patologickou aktivitou enzymu telomerázy, což dává takovým buňkám neomezený potenciál replikace. Indukce apoptózy a inhibice telomerázy představují možné terapeutické cíle.

Charakteristickým znakem adenokarcinomu pankreatu je tvorba vazivové stromální tkáně složené z fibroblastů a extracelulární matrix (ECM) – desmoplazie. Extracelulární matrix, tvořená bazální membránou a intersticiálním stromatem je složena převážně z kolagenů různého typu, fibronektinu a dalších proteinů, přičemž vzájemná rovnováha je řízena enzymaticky. V procesu onkogeneze je základním

předpokladem invazivního růstu nádoru schopnost překonat bazální membránu a odbourat stroma. Aby vznikla vzdálená metastáza, musí dojít k invazi na třech rozhraních: tumor/stroma, stroma/endotel, endotel/stroma v místě vzdálené metastázy. Schopnost nádorových buněk rozrušit ECM je základní podmínkou procesu invaze a metastazování. Za normálních okolností je ECM pro buňky nepropustnou bariérou, avšak při procesech, jako je hojení, remodelace, zánět a neoplazie, se může stát prostupnou. Klíčovými enzymy v popsaném procesu jsou proteinázy, které dělíme na serinové proteinázy (urokináza, elastáza), cysteinové proteinázy (katepsiny třídy B a C), aspartátové proteinázy (katepsiny třídy D) a matrixy metaloproteinázy. **Matrixové metaloproteinázy (MMPs)** představují jeden z nejvýznamnějších faktorů nádorové invaze a metastazování nádorových buněk. K jejich základním charakteristikám patří schopnost degradace některé z komponentů ECM, obsah komplexně vázaného zinkového iontu, uvolňování v podobě proenzymu následně aktivovaného odštěpením definované peptidové sekvence, inhibice specifickými tkáňovými inhibitory (TIMP) a účast na normálních remodelačních procesech [81]. Dostupnost kompletní sekvence lidského genomu umožnila identifikovat kompletní sestavu MMPs produkovaných lidskými buňkami. Bylo zjištěno celkem 24 různých genů kódujících členy MMP rodiny [82]. Původní dělení na kolagenózy, stromelyziny, matryliziny, gelatinázy, elastázy a tzv. transmembránové MMPs, nahradilo později číselné označení MMP-1 až MMP-28, přičemž ale ne všechna čísla byla použita. Zatímco zdravá tkáň obsahuje jen malé množství MMPs, za patologických okolností je jejich exprese zvýšena. U maligních nádorů to bylo prokázáno v mnoha studiích [83-85]. Bylo prokázáno, že hlavním zdrojem MMPs i TIMPs jsou stromální buňky (fibroblasty a endotelie). Přes složitost regulace MMPs byly pozorovány tři hlavní úrovně regulace – transkripce genu, aktivace proenzymu a inhibice enzymatické aktivity. U nádorových buněk se však bohužel objevily mechanismy umožňující obejít tyto kontrolní body, čímž získaly nové vlastnosti vedoucí k růstu nádoru a jeho diseminaci. Zdaleka nejvíce pozornosti se soustřeďuje na *tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz (TIMPs)*. U obratlovců byly zjištěny celkem 4 TIMPs [86], a to TIMP-1, TIMP-2 a TIMP-4, což jsou secernované proteiny, zatímco TIMP-3 je zakotven v ECM. Tyto 4 TIMPs mohou inhibovat aktivní formy všech známých MMPs, i když TIMP-1 je slabým inhibítorem MMP-19 a některých MT-MMPs [87]. U TIMP-3 byla navíc zjištěna schopnost inhibovat některé ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) a



ADAM-TSs (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs), což jsou skupiny enzymů blízké příbuzné MMPs, se kterými mají společný proteolytický účinek na některé složky ECM i schopnost aktivace či inhibice některých bioaktivních molekul [88-90]. Jak již bylo uvedeno, usnadňuje proteolýza bazální membrány endotelií a ECM matrix metaloproteinázami migraci endotelií v procesu nádorové vaskularizace, což prokázali ve své studii Mignatti a Liotta [91,92]. To může být vysvětlením pro to, jakým mechanismem mohou MMP inhibitory zpomalovat růst nádorů v experimentech na zvířecích modelech. Proteolytickým účinkem MMP na bazální membránu endotelií je také usnadněna invaze nádorových buněk z tkání do cév a následně z cév do tkání, což může mít uplatnění v procesu metastazování. Nedávné zjištění, že velké množství různých bioaktivních molekul představuje také substráty MMPs, vedlo k přehodnocení jejich významu v nádorové progresi. Původně byla známa jen jejich degradační funkce na komponenty bazální membrány a ECM, což ukazovalo především na jejich podíl v pozdějších, invazivních stadiích nádorového onemocnění. Průkaz nových funkcí MMPs jako je např. aktivace růstových faktorů, uvolňování apoptotických nebo angiogenních faktorů ale svědčí pro jejich účast již na časných stadiích kancerogeneze [93-95]. MMPs byly také dále považovány za jeden z mnoha mechanismů, který nádorové buňky vyvinuly, aby unikly z protinádorové imunitní reakce hostitele [96]. MMP-9 např. reprimuje proliferaci T lymfocytů přerušením IL-2R $\alpha$  signálu [97]. MMP-11 odštěpuje z  $\alpha$ 1-P ( $\alpha$ 1 proteinázového inhibitoru) bioaktivní fragment snižující citlivost nádorových buněk k NK buňkám (natural killers) [98]. Studie, které prokázaly antikancerogenní efekt nadměrné exprese TIMPs ve smyslu snížení invazivity nádorových buněk, angiogeneze nebo metastazování [99-101] a opačný efekt při nízké expresi těchto inhibitorů [102], vedly k myšlence jejich využití v terapii nádorů. Povzbudivé výsledky syntetických MMPIs ve studiích na animálních modelech vedly k zahájení klinických zkoušek v léčbě různých typů zhoubných nádorů, především generalizovaných [103,104]. Batimastat (BB-94) a Marimastat (BB-2516) patří mezi peptidomimetické MMPs obsahující hydroxamát vázající Zn<sup>2+</sup> v katalytickém místě MMPs. Intraperitoneálně podávaný Batimastat byl prvním MMPI testovaným u lidí avšak s nedostatečným efektem. Byl proto nahrazen Marimastatem, již perorálním, který byl v léčbě karcinomu pankreatu shledán stejně efektivní jako gemcitabin [105] a vedl k prodloužení přežívání i u generalizovaného karcinomu žaludku [106]. Typický

nežádoucí účinek v podobě muskuloskeletální toxicity, stejně jako nespecifita MMPs, vedla k ukončení klinických zkoušek a řada autorů je k této léčbě skeptických. Při studiu adenokarcinomu pankreatu se ukázalo, že především MMP2 a TIMP1 jsou více exprimovány ve vlastním karcinomu než v přilehlé tkáni normálního pankreatu. Jedním z nových postupů možnosti inhibice MMPs je aplikace tzv. „exosite blockers“. Exosites – zevní místa, jsou substrát vázající místa ležící mimo aktivní místo enzymu, ale jsou nezbytná k jeho proteolytické aktivitě. Podobně Overall prokázal, že C-terminální hemopexinová doména MT1-MMP váže nativní kolagen a blokuje kolagenolytickou aktivitu jak MT1-MMP, tak i MMP-2 [107]. Navržením inhibitorů vázajících jednotlivé substráty MMPs může být dosaženo potlačení aktivity enzymu na jednom substrátu, bez ovlivnění aktivity na druhém [108]. Další možnost protinádorové terapie může být spatřována ve využití protilátek vzniklých vakcinací MMPs. Na myších modelech s tumory byly po vakcinaci kuřecí homologní MMP-2 prokázány anti-MP protilátky a pokles hladiny vlastní MMP-2 v séru [109]. Inhibice aktivních MMPs je zásahem do pouze jedné ze tří hlavních regulačních úrovní těchto enzymů. Nabízí se však také možnost inhibice jejich genové transkripce i inhibice aktivace proenzymů [94,110]. Transkripci genů lze zablokovat na třech úrovních – zabránit působení extracelulárních faktorů, zablokovat signální – transdukční dráhy nebo jaderné faktory zesilující jejich expresi. Nedávné studie prokázaly, že IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$  mohou být využity k inhibici transkripce několika MMPs u různých lidských malignit [85,111]. Lze také blokovat receptory, které transkripci MMPs zvyšují (receptory pro TNF- $\alpha$ , IL-1 nebo EGF) [112]. Stejný efekt byl prokázán při blokádě signální dráhy ras, kde selektivní inhibice p38 MAPK pomocí SB203580 zamezila expresi MMP-1, MMP-9 a MMP-13 u transformovaných keratinocytů a spinocelulárního karcinomu plic [113,114].

Nabízí se celá řada možností potenciálního využití poznatků ze studia kancerogeneze na úrovni molekulární biologie, které jsou výstupem řady experimentálních studií. V kancerogenezi karcinomu pankreatu se však dosud jedná pouze o dílčí znalosti, které bohužel zatím nevedly k podstatné změně přístupu v terapii karcinomu pankreatu a nemají tedy zatím očekávaný klinický impakt. Jejich znalost je však nezbytná k pochopení složitosti problematiky kancerogeneze adenokarcinomu pankreatu, což se pak může odrazit i v našem přístupu k modalitám jeho terapie.

### **2.2.3. Staging – UICC/AJCC verze z roku 2003 a staging Japonské pankreatologické společnosti**

Klasifikační stagingové systémy byly vypracovány s cílem odhadnout prognózu pacientů trpících nádorovým onemocněním a to vzhledem k rozsahu postižení vlastní tkáně tumorem, k infiltraci spádových lymfatických uzlin a k přítomnosti či nepřítomnosti vzdálených metastáz. V současnosti jsou v podstatě k dispozici dva hlavní velké skórovací systémy karcinomu pankreatu, z nichž jeden má původ v euroamerickém písemnictví, byl vypracován mezinárodním grémiem l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) ve spolupráci s americkou Joint Committee of Cancer (AJCC) [115]. Druhý pak byl vytvořen Japonskou pankreatologickou společností v roce 1996 [116] a představuje komplexnější systém stagingu, který zahrnuje prvky invaze na serózu, do retroperitonea, portálního řečiště, a v nové verzi tuto lokální invazi posuzuje i z hlediska invaze do duodena, žlučových cest a arteriálního systému. Vlastní japonský systém klade velké nároky na předoperační diagnostiku s použitím nejmodernějších postupů, především pak na endoskopickou ultrasonografii s odběrem bioptického materiálu. Požadavky na tyto náročné diagnostické postupy činí v řadě zemí tento stagingový systém nepoužitelným, protože nejsou schopny tyto vysoké nároky pokrýt v celé míře.

#### ***UICC/AJCC staging – verze z roku 2003***

*Primární nádor (T)* – řadíme sem nádory hlavy pankreatu, lokalizované napravo od levého okraje vena mesenterica superior (VSM), včetně nádorů postihujících processus uncinatus, nádory těla pankreatu ležící mezi levým okrajem VSM a levým okrajem aorty, nádory kaudy pankreatu, které jsou lokalizovány mezi levým okrajem aorty a hilem sleziny.

**Tab. 2.2.3.1. Primární nádor (T) dle UICC/AJCC klasifikace**

<b>TX</b>	primární nádor nelze hodnotit
<b>T0</b>	primární nádor nepřítomen
<b>Tis</b>	karcinom in situ
<b>T1</b>	nádor omezen na pankreas, < 2 cm v nejdelším rozměru
<b>T2</b>	nádor omezen na pankreas, > 2 cm v nejdelším rozměru
<b>T3</b>	nádor prorůstá mimo pankreas, ale bez postižení celiakální osy nebo arteria mesenterica superior
<b>T4</b>	nádor postihuje celiakální osu nebo arteria mesenterica superior (primárně neresekabilní tumor)

Metastazováním do *regionálních lymfatických uzlin (N)* se rozumí postižení peripankreatických lymfatických uzlin, které dělíme na:

- horní: lokalizované nad hlavou a tělem pankreatu
- dolní: lokalizované pod hlavou a tělem pankreatu
- přední: přední hepatoduodenální, pylorické (typicky jen pro karcinom hlavy pankreatu) a horní mezenterické
- zadní: zadní pankreatoduodenální, horní mezenterické a uzliny kolem ductus choledochus
- lienální: lokalizované v hilu sleziny a kolem kaudy pankreatu (jen pro karcinom kaudy a těla pankreatu)
- celiakální: jen pro nádory hlavy pankreatu

**Tab. 2.2.3.2. Regionální lymfatické uzliny (N) dle UICC/AJCC**

<b>NX</b>	regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit
<b>N0</b>	regionální lymfatické uzliny bez metastáz
<b>N1</b>	metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin <ul style="list-style-type: none"> <li>- N1A: postižení jedné regionální uzliny</li> <li>- N1B: postižení více regionálních uzlin</li> </ul>

*Vzdálené metastázy (M)* – hodnotíme přítomnost nebo nepřítomnost vzdálených metastáz primárního tumoru pankreatu.

**Tab. 2.2.3.3. Vzdálené metastázy (M) dle UICC/AJCC**

<b>MX</b>	přítomnost vzdálených metastáz nelze stanovit
<b>M0</b>	vzdálené metastázy nepřítomny
<b>M1</b>	vzdálené metastázy přítomny

Na základě výše uvedeného pak rozdělujeme jednotlivá stadia karcinomu slinivky břišní, jak je uvedeno v následující tabulce.

**Tab.2.2.3.4. Stadia karcinomu pankreatu dle UICC/AJCC**

<b>stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>stadium IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>stadium IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T1-3	N1	M0
<b>stadium III</b>	T4	jakékoliv N	M0
<b>stadium IV</b>	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

*Nová japonská klasifikace podle Japonské pankreatologické společnosti (JPN)*

Byla vydána v roce 1996 a popisuje primární nádor (T), regionální lymfatické uzliny (N) a vzdálené metastázy (M). Dále pak hodnotí stadium dle TNM dělení a stadium dle invaze do přilehlých struktur.

**Tab.2.2.3.5. JPN klasifikace, primární nádor (T)**

<b>T1</b>	nádory S0, RP0, PV0, A0, DU0, CH0,1: T1a: nádory < 2 cm v nejdelším rozměru T1b: nádory > 2 cm v nejdelším rozměru
<b>T2</b>	nádory splňující jedno nebo více kritérií: S1, RP1, PV1, A1, DU1,2,3, CH2,3 bez ohledu na velikost
<b>T3</b>	nádory splňující jedno nebo více kritérií: S2,3, RP2,3, PV2,3, A2,3 bez ohledu na velikost

Vysvětlivky:

S = invaze na serózu, RP = invaze do retroperitonea, PV = invaze do portální žíly, DU = invaze do stěny duodena, A = invaze do arterií, CH = invaze do ductus choledochus, P = diseminace na peritoneum, H = metastatické postižení jater

Index 0 = invaze nepřítomna, index 1 = suspektní invaze, index 2 = jistá invaze,  
index 3 = masivní invaze

**Tab.2.2.3.6. JPN klasifikace, regionální lymfatické uzliny (N)**

<b>N0</b>	bez metastáz
<b>N1</b>	metastázy do skupiny primárních lymfatických uzlin uložených v blízkosti nádoru
<b>N2</b>	metastázy do sekundárních lymfatických uzlin mezi N1 a N3
<b>N3</b>	metastázy do terciárních, juxtaregionálních lymfatických uzlin

**Tab.2.2.3.7. Dělení lymfatických uzlin dle JPN klasifikace**

1	Pravá kardie	14	V mesenteriu
2	Levá kardie	14A	Podél a.mesenterica sup.
3	Podél malé kurvatury	14a	Na začátku a.mesenterica sup.
4	Podél velké kurvatury	14b	Podél a. pancreaticoduodenalis inf.
5	Suprapyloricky		
6	Infrapyloricky	14c	Na začátku a.colica media
7	Podél a.gastrica l.sin.	14d	Podél první jejunální kličky
8	Podél a.hepatica comm.	14V	Podél horní mezenterické žíly
8a	Anterosuperior	15	Podél střední kolické žíly
8b	Posterior	16	Podél abdominální aorty
9	Podél truncus coeliacus	16a1	Podél hilus aorticus bránice
10	V hilu sleziny	16a2	Mezi horní částí coeliackého trunku k dolnímu okraji levé renální žíly
11	Podél a.lienalis		
12	V lig.hepatoduodenale	16b1	Od dolního okraje levé renální žíly k hornímu okraji a.mesenterica inf.
12h	V porta hepatis		
12a	Podél a.hepatica		
12a1	Superior	16b2	Od dolního okraje a.mesenterica inf. k bifurkaci aorty
12a2	Inferior		
12p	Vzad od v.portae		
12p1	Superior	17	Na přední straně hlavy pankreatu
12p2	Inferior		
12b	Podél d.hepaticus	17a	Nad Vaterskou papilou
12b1	Superior	17b	Pod Vaterskou papilou
12b2	Inferior	18	Podél dolního okraje těla a kaudy pankreatu

- 12c Podél d.cystikus
- 13 Na zadní straně hlavy  
pankreatu
- 13a Nad Vaterskou papilou  
13b Pod V.papilou

**N0**= bez přítomnosti metastáz, **N1**= metastázy do první skupiny lymfatických uzlin: 13ab, 17ab, **N2**= metastázy do druhé skupiny lymfatických uzlin 8a, 8p, 12a, 12b, 12p, 14p, 14d, **N3**= metastázy do třetí skupiny lymfatických uzlin zahrnující oblast coeliackého trunku, lienální arterie, hilu slezinného a podél a.colica media (16a2, 16b1 a 18)

**Tab.2.2.3.8. JPN klasifikace, vzdálené metastázy (M)**

<b>M0</b>	vzdálené metastázy nepřítomny
<b>M1</b>	vzdálené metastázy jsou přítomny, včetně postižení peritonea (P) nebo jater (H)

**Tab.2.2.3.9. Stadia dle JPN klasifikace**

<b>stadium I</b>	T1a	N0	M0
<b>stadium II</b>	T1a T1b	N1 N0,1	M0 M0
<b>stadium III</b>	T1a,b T2	N2 N0,1	M0 M0
<b>stadium IVa</b>	T1a,b T2 T3	N3 N2 N0,1	M0 M0 M0
<b>stadium IVb</b>	T2 T3 jakékoliv T	N3 N2,3 jakékoliv N	M0 M0 M1

**Tab.2.2.3.10. Stadia dle invaze do přilehlých struktur dle JPN klasifikace**

	<b>M0, P0, H0</b>				<b>M1 nebo P1,2,3 nebo H1,2,3</b>
	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>	
T1a	I	II	III	IVa	IVb
T1b	II	II	III	IVa	IVb
T2	III	III	IVa	IVb	IVb
T3	IVa	IVb	IVb	IVb	IVb

#### 2.2.4. Možnosti léčby karcinomu pankreatu a její perspektivy

Léčba karcinomu pankreatu je multimodální. Prakticky jedinou modalitou vedoucí k možnému vyléčení je chirurgická radikální resekce (a to R0 resekce, tj. resekce bez reziduálního nádoru). Bohužel jen malá část pacientů může být takto řešena. Důvodem je stanovení diagnózy v pokročilém stadiu při minimálních symptomech časného stadia onemocnění, vysoké agresivitě nádorových buněk a prakticky neexistující možnosti screeningu. Taktéž statistika přežívání po radikálních výkonech je tristní – pětileté přežívání je popisováno mezi 2-20%. Přitom z dosud dostupných statistických analýz vyplývá, že ani zvýšení radikality operačního výkonu ve smyslu rozšířené lymfadenektomie nevede ke zlepšení přežívání nemocných.

První pankreatoduodenektomii pro karcinom provedl v roce 1889 Codivilla (1861-1912). Ale zdokonalil ji a přivedl mezi standardní výkony až Allen O. Whipple (1881-1963) ve třicátých letech 20.století. Jeho metodický postup zahrnuje resekci distální části žaludku, duodena, části jejunum, hlavy pankreatu a choledochu. Následná rekonstrukce zahrnuje terminolaterální hepatikojejunoanastomózu, terminolaterální pankreatojejunum anastomózu a terminolaterální gastroenteroanastomózu.

Standardem chirurgické radikální léčby je **pravostranná pankreatoduodenektomie**. V otázce provádění pankreatoduodenektomie existuje několik kontroverzních témat:

1. parciální či totální pankreatektomie,
2. klasická versus pylorus šetřící pankreatoduodenektomie a
3. standardní versus rozšířená radikální pankreatoduodenektomie.

Ad 1. V současné době koncept totální pankreatoduodenektomie ztrácí svoje příznivce. Obhájcí tohoto postupu zmiňují především tyto potenciální benefity totální pankreatektomie: eliminace multifokálního postižení a šíření do ponechaného zbytku těla a ocasu pankreatu, provedení en-block resekce společně s lymfatickými uzlinami a eliminaci nutnosti rekonstrukce pankreatojejunum anastomózy, která je vždy nejohroženější z rekonstrukčních anastomóz a zatížena poměrně vysokým rizikem



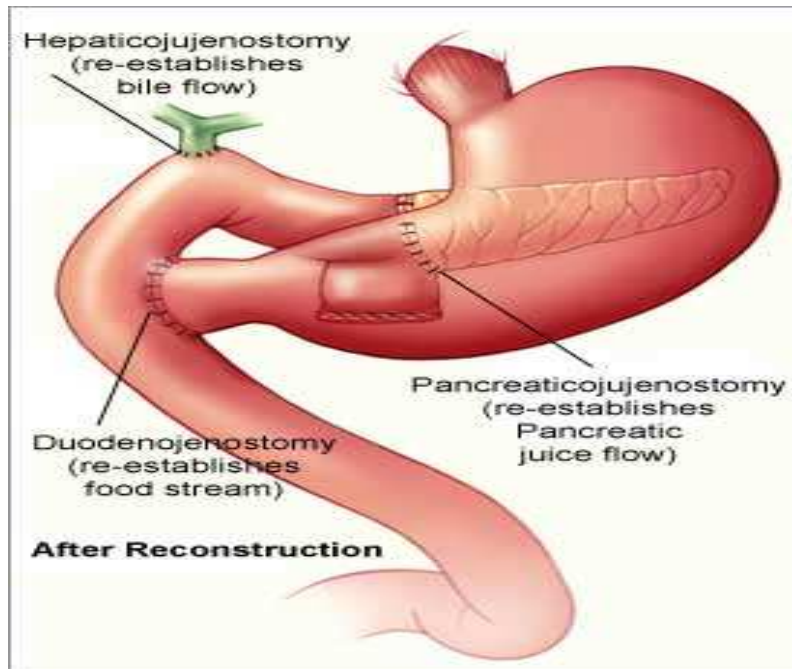
rozvoje pankreatické píštěle [185]. Protože neexistuje rozdíl v přežívání mezi totální a parciální pankreatektomií a navíc pankreatická píštěl sice zvyšuje morbiditu, ale nikoliv letalitu, většina chirurgů dává přednost výkonům parciálním a totální pankreatektomie je vyhrazena jen pro zvláštní případy, kdy se jedná o postižení v oblasti těla pankreatu, nebo když je pankreas či jeho hlavní vývod příliš jemný, křehký či zánětlivě změněný k provedení bezpečné anastomózy s tenkým střevem. Kromě toho je zmiňována výhoda v podobě zachované exokrinní a zejména endokrinní funkce zbytku pankreatu a ušetření sleziny.

Ad 2. Při srovnání klasické Whippleho pankreatoduodenální resekce, která zahrnuje i distální gastrektomii, není pylorus šetřící pankreatoduodenektomie spojena s nárůstem pooperačních komplikací [185]. K dispozici jsou data o identické délce přežívání i stejné kvalitě života po obou typech resekce [186]. Protože pylorus šetřící postupy zahrnují ponechání funkce gastrického rezervoáru, pylorické sfinkterické funkce a řadu normálních fyziologických gastrointestinálních pochodů, většina chirurgů dává přednost tomuto typu resekce a nutnost distální gastrektomie je vyhrazena případům, kdy tumor penetruje těsně k pyloru či první porce duodena, nebo pokud je tato oblast, z důvodu provedené skeletizace, ohrožena ischemií.

Ad 3. Rozšířené radikální pankreatoduodenektomie jsou známy především z prací japonských autorů. Ishikawa v roce 1988 popsal zlepšení přežívání nemocných po extenzivním výkonu zahrnujícím také disekci N3 lymfatických uzlin. To znamená odstranění lymfatických uzlin podél obou kurvatur žaludku, uzliny paraaortální a z oblasti jaterního hilu. Při tomto typu výkonu je uváděno delší přežívání. Názory evropských chirurgů jsou však skeptické a je třeba dalšího klinického výzkumu a ověření, aby došlo k případné změně v indikaci rozsahu výkonu.

Na našem pracovišti je zlatým standardem, stejně jako v celé euroatlantické zóně, pro operabilní tumory hlavy pankreatu a tumory Vaterské papily, **pylorus šetřící pankreatoduodenektomie**, v modifikaci dle Traversa a Longmireho z roku 1978 [119]. Ta zahrnuje en-block resekci duodena společně s hlavou pankreatu a s následnou rekonstrukcí na jednu kličku a to v tomto pořadí: terminolaterální pankreatojejunoanastomóza, terminolaterální hepatikojejunoanastomóza a terminolaterální antekolická duodenojejunoanastomóza (obr. 2.2.4.1).

**Obr.2.2.4.1. Pylorus šetřící pravostranná pankreatoduodenektomie** (copyright 2009 Mayo Foundation for Medical Education and Research, převzato se souhlasem Mayo Clinic z website mayoclinic.org, zde v modifikaci terminoterminální pankreatojejunoanastomózy)



Pokud si stav vynucuje resekci distální části žaludku pak jsou v rekonstrukční fázi použity dvě Rouxy kličky, z nichž jedna je určena pro terminoterminální či terminolaterální pankreatojejunoanastomózu a terminolaterální hepaticojejunoanastomózu a druhá pak pro terminoterminální gastroenteroanastomózu. V případě drobné nádorové infiltrace stěny vena portae či vena mesenterica superior je ad hoc rozhoduto, buď o resekci tohoto segmentu s primární suturou, či jeho přemostění venózním štěpem nebo cévní protézou, nebo je stav hodnocen jako inoperabilní, obzvláště při infiltraci peripankreatické tkáně s předpokládaným perineurálním šířením tumoru, nebo pokud je tumor oddělitelný od cévních struktur, resekce může být dokončena jako paliativní výkon v podobě R1 (mikroskopický reziduální nádor) či R2 (makroskopický reziduální nádor) resekce. V případě předoperačně zjištěného multicentrického postižení pankreatu, výrazně jemné struktury zbývající části pahýlu pankreatu, příliš úzkému průměru Wirsungova vývodu, pozitivní resekční linii, nebo poranění lienální žíly je indikována totální pankreatektomie. U tumorů v oblasti těla či kaudy pankreatu se pak provádí distální (levostranná) pankreatektomie.

Paliativní výkony jsou prováděny především z důvodu obstrukce žlučových cest a obstrukce duodena. Chirurgické paliativní výkony (thorakoskopická či otevřená splanchiektomie) vedoucí k omezení konzervativně neovlivnitelné bolesti jsou dnes prakticky nahrazeny moderními preparáty ze skupiny dlouhodobě působících opioidů, podávaných perorálně či transkutánně, resp. velmi účinnou chemickou splanchiektomií pod CT kontrolou. Dominantní indikací k paliativnímu výkonu je především porucha pasáže v oblasti proximální části zažívacího traktu z důvodu útlaku či penetrace tumoru hlavy pankreatu do duodena, projevující se nauzeou, zvracením stagnující potravy a hubnutím s malnutricí. Indikace u prokázané obstrukce duodena je nezpochybnitelná. Diskutabilní zůstává preventivní provedení gastroenteroanastomózy u asymptomatických nemocných. Výhodné je provést gastroenteroanastomózu u lokálně neresekabilního tumoru při očekávaném delším přežívání. Pak je indikována zadní retrokolická gastroenteroanastomóza dle Hackera, která nemusí být doplněna vagotomií, protože vřed v anastomóze se zde neobjevuje. Paliativní výkon na žlučových cestách je diskutabilní, protože drtivou většinu stavů lze vyřešit metodami endoskopickými či radiologicko-intervenčními, kterým je dávána jednoznačně přednost. Chirurgické výkony v podobě biliodigestivní spojky jsou zatíženy poměrně velkou morbiditou i letalitou, která dosahuje na nespecializovaných chirurgických pracovištích až 15% [12]. Paliativní biliodigestivní spojka, nejčastěji choledochoduodenoanastomóza, výjimečně hepatojejunonoanastomóza na Roux kličku, je indikována opět za situace lokálně neresekabilního tumoru s obstrukcí žlučových cest, pokud nemocný není zatížen dalšími komorbiditami, které by zapříčinily pooperační komplikace.

Onkologická terapie má velmi omezený význam. Od roku 1980 proběhlo několik studií se zaměřením na adjuvantní chemoterapii a radioterapii u nemocných po radikálním operačním řešení. Výsledky jsou spíše rozporuplné. V případě adjuvantní terapie můžeme konstatovat, že chemoterapie je lepší než observace. Studie, které probíhaly (ESPAC-1, CONKO-001, RTOG 9704) hodnotí význam monoterapie gemcitabinem a fluorouracilem v kombinaci s radioterapií. Zda-li je lepší fluorouracil nebo gemcitabin rozhodne pravděpodobně až studie ESPAC-3, která porovnává tyto dva léky. Další probíhající studie ESPAC-4 porovnává kapecitabin+gemcitabin s gemcitabinem samotným. Velmi zajímavý design má studie fáze II E 2204, porovnávající sekvenci gemcitabinu + cetuximab následně

kapecitabin + cetuximab s radioterapií a následně gemcitabin + cetuximab se stejnou sekvencí s bevacizumabem. Úloha radioterapie není jasná, a to ani u R0 či R1 resekci. O indikaci především rozhoduje vybavení a zkušenosti pracoviště, protože zajištění kvality záření je nejpodstatnější. Ještě kontroverznější otázkou je neoadjuvantní léčba, tj. léčba lokálně pokročilého nádoru, ale bez generalizace. Můžeme také diskutovat, jestli používat termín neoadjuvantní léčba, když léčebná odpověď na chemoterapii u karcinomu pankreatu je pod 10%. Historicky však existují studie z osmdesátých let, kde základem léčby je fluorouracil s radioterapií nebo bez ní [120,121]. Zda je či není odstraněn nádor je však klíčový moment a prognostický faktor [122]. Cílem neoadjuvantní terapie je tedy teoreticky snížení počtu pozitivních resekčních okrajů, potlačení mikrometastatické nemoci před operací a v neposlední řadě vyloučit nemocné s rychle progredující chorobou [122]. Sekundární operabilita je však spíše dílem překvapivé parciální či systémové odpovědi, než primárně plánovaný výstup léčby. V literatuře se objevují studie GERCOR a SFRO/FFCD, které kombinují podání oxaliplatinu s gemcitabinem a gemcitabinem samotným, resp. ve francouzské studii byl sledován účinek vstupní radioterapie a následně gemcitabin + cisplatin resp. účinek samotného gemcitabinu bez radioterapie. Medián přežití byl 8 měsíců ve skupině s radioterapií a 14,5 měsíců u skupiny bez radioterapie. Sekundární cíl, tj. resekabilita, byl dosažen jen u zlomku pacientů a nebyl signifikantní rozdíl mezi skupinou s radioterapií a bez ní [123]. Základem je tedy podání chemoterapie. Monoterapie gemcitabinem je logickou volbou. Kombinace s radioterapií u pacientů s lokálně inoperabilním karcinomem pankreatu se zdá být v daném případě nevýhodná. V léčbě metastatického postižení je od roku 1987 používán gemcitabin v monoterapii [124]. Probíhala a probíhá řada studií, kde byl gemcitabin kombinován s dalšími látkami. Výsledky jsou sporné, často spíše charakterizované zhoršením kvality života a nežádoucích účinků. Jedinou výjimkou je kombinace gemcitabin + kapecitabin, kdy došlo k prodloužení mediánu přežití o 6 týdnů. [125]. Studie SWOG S0205 porovnávala gemcitabin + cetuximab (monoklonální protilátka proti receptoru epitelálního růstového faktoru EGFR-1) s gemcitabinem samotným. Primární cíl, zlepšení celkového přežití, opět nebyl splněn. Výsledek 5,9 vs. 6,4 měsíců ve prospěch kombinace. Zatím jedinou pozitivní studií s integrací monoklonálních protilátek je studie NCIC PA [126], fáze III. Porovnávající kombinaci erlotinib + gemcitabin s gemcitabinem samotným. Erlotinib je tyrozin-kinázový inhibitor EGFR1 receptoru. Přidáním erlotinibu ke gemcitabinu

došlo k mírnému prodloužení mediánu přežití z 5,91 na 6,24 měsíce a ročnímu celkovému přežití 17% vs. 23 % [127]. V poslední době probíhá řada studií s kombinací gemcitabinu a jiných léčiv, na jejich výsledek si však bohužel musíme ještě počkat.

Na základě výše uvedeného můžeme konstatovat, že chirurgické metody v léčbě karcinomu pankreatu jsou v podstatě vyčerpány. Radikalita nemůže ovlivnit přežívání nemocných. Budoucnost je tedy zaměřena na hledání biologických cílů a hledání konkrétní léčby pro konkrétního pacienta. V nejbližších letech a desetiletích však bohužel nelze očekávat žádný radikální zvrat v přístupu k terapii karcinomu pankreatu a tedy chirurgická resekce zůstává jedinou potenciálně kurabilní metodou a karcinom pankreatu i nadále zůstává jedním z nejobávanějších nádorových onemocnění vůbec.

## **2.3. Minimální reziduální choroba**

### **2.3.1. Možnosti stanovení minimální reziduální choroby u solidních nádorů**

Minimální reziduální choroba je definována jako přítomnost izolovaných nebo kolujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni, mízních uzlinách a tělních dutinách pacientů s nádorovým onemocněním v širším slova smyslu, resp. cirkulujícími izolovanými nádorovými buňkami u nemocných, u nichž byl primární nádor radikálně odstraněn, a kteří jsou t.č. bez klinických známek onemocnění, v užším slova smyslu. Tyto buňky jsou podle současných poznatků považovány za možné prekurzory vzdálených metastáz. Ani jeden z těchto stavů však ještě nemusí nutně vyústit ve vzdálenou metastázu. Bohužel zatím nejsou k dispozici přesnější informace o mechanismech, které vedou k vytvoření metastáz a které naopak podmiňují zánik těchto buněk. Stejně tak není k dispozici jednoznačná standardizovaná laboratorní metoda, která by s co největší přesností byla schopna tyto prekurzory vzdálených metastáz identifikovat. Pokud by byla k dispozici, pak by bylo možné identifikovat pacienty s vyšším rizikem vzniku metastáz, na které by se cíleně zaměřily adjuvantní onkologické terapeutické metody, zejména chemoterapie, která by sloužila k eliminaci zbylých okultních nádorových buněk, tzn. minimální reziduální choroby. A naopak lze předpokládat, že bude možné určit pacienty s nízkým rizikem (negative detection of minimal residual disease), u kterých by nebyla nutná zatěžující a nákladná chemoterapie [128,129].

Standardní zobrazovací, biochemické, cytogenetické a imunologické metody nejsou schopny detekovat volné nádorové buňky s dostatečnou citlivostí. Až rozvoj nových postupů v molekulárně-biologických metodách na principu polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) umožnil zvýšit senzitivitu této diagnostiky a detekovat až 1 nádorovou buňku mezi 1-10 miliony buňkami nenádorovými [128,130]. Tyto metody jsou s úspěchem využívány u hematologických malignit, kde jsou pro jednotlivé diagnózy, díky dobře popsáným genetickým změnám, dostupné vysoce specifické markery nádorových buněk (např. fúzní gen bcr-abl u chronické myeloidní leukémie). U solidních nádorů je to mnohem obtížnější a opravdu dostatečně senzitivní a specifické markery se teprve hledají a to

především z důvodu vysoké míry genetické instability a nádorové heterogenity. Přítomnost okultních nádorových buněk lze vyšetřovat ve vzorcích periferní systémové krve, kostní dřeni, v lymfatickém systému nebo v peritoneální laváži, kde může přítomnost nádorových buněk předpovědět recidivu nemoci, ovlivnit volbu léčebné modalit a předpovědět prognózu. [128,129]. Podstatou je detekce znaků epiteliálních nádorových buněk v kompartmentech mezenchymálního původu.

Současná indikace k adjuvantní onkologické léčbě vychází ze standardního vyšetření typu nádoru, gradingu, histopatologického vyšetření spádových lymfatických uzlin a zařazení dle stávající TNM klasifikace do příslušného stadia onemocnění, které predikuje prognózu a riziko nemocného. Detekce metastatického postižení spádových lymfatických uzlin je signifikantním prognostickým faktorem a často svědčí pro přítomnost systémového onemocnění. Přitom však i u pacientů, u nichž byl nádor odstraněn radikálním chirurgickým výkonem a u nichž běžnými metodami vyloučíme diseminaci do lymfatických uzlin, se mohou, s určitým odstupem, objevit vzdálené metastázy. Důvodem je nedostatečná senzitivita histopatologických metod při průkazu systémového onemocnění. Např. u třiceti procent pacientek s karcinomem prsu s histologicky negativními axilárními uzlinami se do pěti let objeví vzdálené metastázy. Rozvoj nových vyšetřovacích metod, především real-time PCR, umožňuje, díky absolutní kvantifikaci genové exprese vybraných markerů u onkologicky nemocného pacienta, rozlišit změny v počtu nádorových buněk v periferní krvi a kostní dřeni. Pokud se provedou odběry i s určitým časovým odstupem, lze z poklesu nebo vzestupu exprese nádorového markeru, a tedy i nádorových buněk, odhadovat a monitorovat léčebnou odpověď. Možností je také časný záchyt recidivy nádorového onemocnění a to dříve, než se rozvine klinicky manifestní, tedy makroskopické postižení, s významnými důsledky pro strategii terapie a také pro prognózu nemocného.

Přes tyto vysoké pokroky v možnostech průkazu minimální reziduální choroby, není význam přítomnosti malého množství nádorových buněk v mezenchymálních prostorech nemocných po radikálních výkonech zcela jasný. Výsledky řady studií si v prognostickém významu minimální reziduální choroby protirečí, některé jej přímo zavrhují. Důvodů je několik, je to především nejednotnost použitých metod, vysoká instabilita genové exprese u solidních tumorů a také absence statisticky

signifikantního souboru nemocných, u kterých byla pozitivita či negativita minimální reziduální choroby korelována s jejich klinickým, makroskopickým stavem.

### **2.3.1.1. Imunohistochemie, průtoková cytometrie a polymerázová řetězová reakce**

K detekci minimální reziduální choroby můžeme použít několik typů metodických přístupů, které se liší svojí senzitivitou, specificitou, nákladností a pracností. *Imunohistochemie* (imunohistochemistry, IHC) je schopna detekovat jednu nádorovou buňku mezi 10 až 100 tisíci nenádorovými buňkami. [131]. Principem této metody je reakce monoklonálních protilátek se specifickými antigeny nádorových buněk a jejich následná vizualizace. Výsledný obraz, který touto reakcí získáme, je mikroskopicky vyhodnocován patologem a nebo automaty. Nevýhodou této metody je omezený počet hodnocených buněk, riziko zkřížené reakce s jinými epitopy (epitop neboli antigenní determinant je konkrétní oblast antigenu, na kterou se váží protilátky) a mnohem nižší citlivost než mají metody jiné.

*Průtoková cytometrie* (flow cytometry, FC) je metoda, která umožňuje stanovit množství povrchových i intracelulárních antigenů pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorescenčním barvivem. Nejčastějšími cílovými antigeny pro detekci minimální reziduální choroby jsou cytoskeletální proteiny a cytokeratiny. První prototyp této metody byl použit v roce 1968 Wolfgangem Göhdem na univerzitě v Münsteru a první komerčně vyráběný cytofluorograf byl vyroben v roce 1971. Principem této metody je měření proudu buněk procházejících měřicí komorou, kde dochází k excitaci navázaných fluorochromů po ozáření laserem. Emitované záření je pak detekováno fotonásobiči a výsledný signál je zpracován počítačově. Výhodou je schopnost kvantitativně vyšetřit velké množství buněk v relativně krátkém čase s možností víceparametrového měření. Ke zvýšení citlivosti metody dochází po obohacení vzorku, nejčastěji za použití imunomagnetických metod, ve kterých je na paramagnetickou látku navázána monoklonální protilátka. I přes toto obohacení však nedochází ke zvýšení citlivosti řádově více než o  $10^4$ . Průtokovou cytometrií tak můžeme detekovat 1 nádorovou buňku mezi řádově 10 až 100 tisíci buněk nenádorových [132,133].



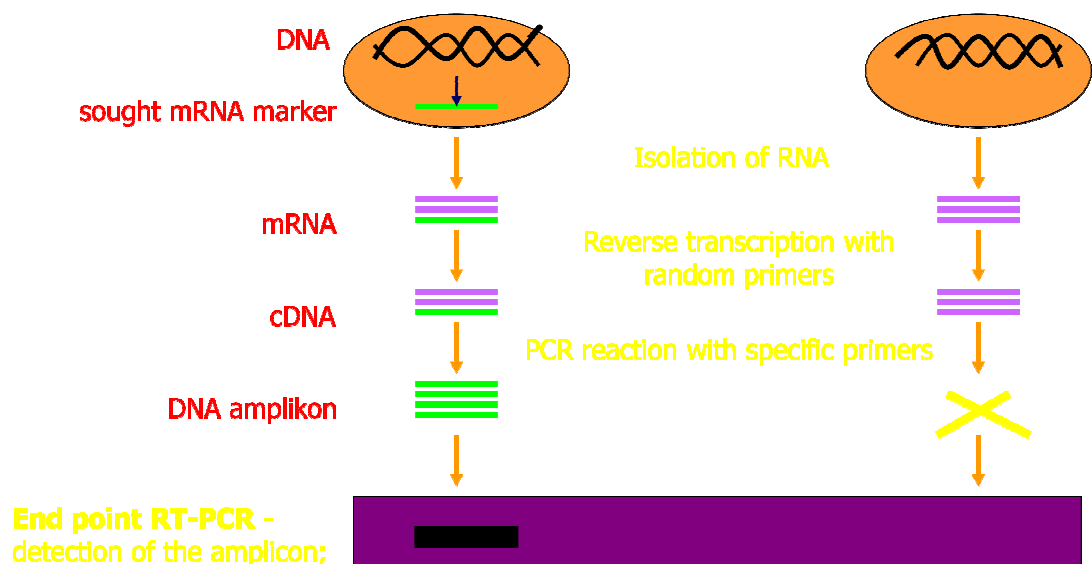
***Polymerázová řetězová reakce*** (Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda, kterou objevil Kerry Mullis, a za kterou obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Princip je založen na detekci vybrané sekvence DNA pomocí její amplifikace za použití sekvenčně specifických oligonukleotidů (primerů) a DNA polymerázy. Princip PCR je založen na opakujících se cyklech, kdy každý cyklus je složen ze dvou až tří po sobě následujících kroků: dvouřetězová DNA je tepelně denaturována za vzniku jednořetězové DNA. Pak primery nasedají na hledanou sekvenci DNA a nakonec se syntetizují komplementární vlákna [134]. Vzniklé produkty – amplikony, jsou standardně detekovány elektroforeticky. Pro detekci minimální reziduální choroby cestou PCR metodiky na úrovni nádorové DNA je třeba najít vhodný marker. Mezi nejčastěji detekované změny DNA solidních nádorů patří mutace protoonkogenů či nádorových supresorových genů, specifické fúzní geny vzniklé chromozomálním přeskupením, nestabilita mikrosatelitů a specifické sekvence onkogenních virů [135].

#### **2.3.1.2. Real-time reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)**

Cílem této metody je detekovat hledaný znak nádorových epiteliálních buněk na úrovni RNA sekvence (informační RNA – mRNA). Jedná se tedy v podstatě o metodu, která při detekci minimální reziduální choroby využívá studia genové exprese. K tomuto účelu se tedy nejdříve pomocí reverzní transkriptázy izolovaná RNA přepíše do komplementární DNA (cDNA), která je pak využita jako templát pro PCR reakci [136]. Nejčastěji používanými cílovými sekvencemi pro detekci minimální reziduální choroby metodou RT-PCR u solidních nádorů jsou cytokeratiny, karcinoembryonální antigen, mamaglobin, mucin aj. Výhodou tohoto postupu je nízká stabilita RNA po uvolnění z buňky a většinou detekce živých buněk. Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (real-time QRT-PCR) je metoda umožňující přesnou a absolutní kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku. Využívá se zde několika možností detekce narůstajícího množství amplikonů během reakce. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, které se interkalují mezi báze DNA (např. Sybr Green), narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství amplikonů ve vzorku [137]. V současnosti je asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonuklásové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití

oligonukleotidu – próby (nejčastěji TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášedčem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken provede DNA polymeráza hydrolytické štěpení TaqMan sondy, čímž dojde k uvolnění fluorescenční látky a nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase [136]. Tato metoda umožňuje detekovat jednu nádorovou buňku až mezi deseti miliony nenádorových buněk [137]. Sestrojením standardizačních křivek lze přesně a absolutně kvantifikovat množství hledané cDNA sekvence vybraného markeru ve vzorku.

#### Obr.2.3.1.2.1. Schematické znázornění metody RT-PCR



#### 2.3.2. Markery vhodné ke sledování minimální reziduální choroby u solidních nádorů

Ke sledování minimální reziduální choroby u solidních nádorů je nejvýhodnější využití metodiky real-time RT-PCR, pomocí níž sledujeme expresi některých markerů typických pro nádorovou buňku a které se mezi sebou liší odlišnou mírou senzitivity a specificity.

### **2.3.2.1. Karcinoembryonální antigen**

Jedná se o glykoprotein, který patří do velké CEA skupiny, jež jsou blízké imunoglobulinům, a jejichž molekulární hmotnost se pohybuje kolem 180-200 kDa. Tato skupina sestává z 29 genů a pseudogenů umístěných na dlouhém raménku chromozomu číslo 19. Tuto CEA skupinu můžeme rozdělit do tří podskupin, a to vlastní podskupiny CEA, podskupiny těhotensky-specifických glykoproteinů (pregnancy specific glykoprotein, PSG) a podskupiny pseudogenů [139]. Karcinoembryonální antigen je vazebný protein buněčného povrchu a jako nádorový antigen je zvýšeně exprimován u více než 95% nádorů gastrointestinálního traktu, přibližně u 70% nemalobuněčných karcinomů plic a u 50% nádorů prsu [140]. Poměrně velmi častým vyšetřením v onkologii je stanovení plazmatické hladiny koncentrace CEA. Tato hladina v séru dobře koreluje s léčebnou odpovědí a dokáže odhalit časnou rekurenci onemocnění. Řada předcházejících studií, které detekovaly minimální reziduální chorobu na podkladě metody PCR, použila právě CEA jako vhodný marker, a to u karcinomu prsu [141-144], kolorektálního karcinomu [145,146], u nádorů hepatopankreatické oblasti [147] a žaludku [148].

### **2.3.2.2. Receptor pro epidermální růstový faktor 1**

Receptor patří do HER skupiny, který je využíván jako marker nádorových buněk. EGFR (c-erb-1/HER-1) byl identifikován pomocí inzerční mutagenese retrovirů. Geny pro EGFR jsou lokalizovány na chromozomu 17p13-12. Základní struktura tohoto proteinu je tvořena 621 aminokyselinovou extracelulární doménou, která je často glykosylovaná a obsahuje ligand vazebnou oblast, hydrofobní transmembránovou oblast (23 aminokyselin) a cytoplazmatickou doménu (542 aminokyselin), která obsahuje vývojově vysoce konzervativní tyrozinovou kinázu. Rozdíly v expresi jednotlivých růstových faktorů skupiny HER u jednotlivých typů karcinomů je možné použít jako nové diagnostické a také prognostické faktory v rámci stanovení minimální reziduální choroby a mohou být potenciálním cílem při selektivní terapii. V praxi se již používá biologická léčba pomocí monoklonálních látek, které se specificky váží na extracelulární domény nadměrně exprimovaných receptorů c-erbB, a tím brání jejich aktivaci. Z nejpoužívanějších monoklonálních protilátek jsou to např. Herceptin (trastuzumab), který je využíván k léčbě

pokročilých karcinomů mammy a Erbitux (cetuximab) určený k terapii karcinomů hlavy a krku, plic a tlustého střeva s nadměrně exprimovaným EGFR1. EGFR1 je zvýšeně exprimován až u 70% nádorů prsu, plic, střeva, gliomů, orofaciálních nádorů a obvykle není exprimován v buňkách hematopoetických [149]. V nedávné době byla prokázána vysoce specifická, ale méně selektivní, mutovaná, zkrácená verze EGFR a to EGFRvIII, která má deletovanou část extracelulární domény, což se projevuje nezávislostí na aktivaci ligandem. Tyto formy mutací EGFR tvoří až 50% veškerých genetických změn u glioblastoma multiforme. Některé studie naznačují, že zvýšená exprese EGFRvIII a amplifikace genu pro EGFR je u pacientů s glioblastoma multiforme indikátorem špatné prognózy. Exprese EGFRvIII byla také prokázána u karcinomů mammy, ovaria a plic. V poslední době byla také prokázána přítomnost mutací a amplifikací genů pro intracelulární doménu EGFR. Tyto typy mutací se vyskytují zejména u nemalobuněčných karcinomů plic (NSCLC). Pro karcinomy pankreatu je typické, že exprese EGFR, EGF, TGF- $\alpha$  byla více zaznamenána v duktálních buňkách v porovnání s buňkami acinárními. EGFR byly exprimovány u 43% těchto tumorů. V karcinomech pankreatu byla dále prokázána vyšší exprese dalších členů rodiny c-erbB (c-erbB-2 a c-erbB-3) a to bez amplifikace genů.

### **2.3.2.3. Telomeráza**

Jedná se o enzym pracující jako reverzní transkriptáza, který je schopen prodlužovat samotné konce eukaryotických chromozomů, tzv. telomery. Je to velký ribonukleotidový komplex o molekulové hmotnosti kolem 500 kDa. Za výzkum telomeráz byla v roce 2009 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu Elizabeth Blackburnové, Carol W. Greiderové a Jacku W. Szostakovi. Telomeráza za normálních okolností pracuje pouze v dělících se embryonálních a v zárodečných buňkách. V klasických tělních buňkách je naopak její funkce blokována, výjimkou jsou však nádorové buňky, které si tím otvírají vrátka pro mnohonásobné dělení. Telomery, specializované struktury eukaryotických buněk obratlovců, jsou tvořeny dvojitě vinutou DNA s hexamerickými sekvencemi 5'-(TTAGGG) $_n$ -3', uložené na koncích lineárních chromozomů spolu s asociovanými proteiny. Stabilizují integritu chromozomů, chrání před enzymatickou degradací, před ztrátou genetické informace,

senescencí a apoptózou. Telomery jsou zakončeny jednořetězovým úsekem (3'-overhang), který je nezbytný pro vytvoření strukturálního zakončení telomery pomocí T-kličky (T-loop). V důsledku nekompletní replikace lineární DNA (end-replication problem) dochází při každém buněčném cyklu ke zkracování telomer somatických buněk. Výrazné zkrácení telomer bylo popsáno zejména u nádorových buněk [150]. K replikaci koncových částí telomer dochází pomocí enzymu telomerázy. Vlastní telomeráza sestává z telomerázové reverzní transkriptázy (hTERT), vlastní RNA komponenty (hTERC, hTR) a asociovaných proteinů (dyskerin, p23, hsp90, hStau a další). Model sekundární struktury hTR, navržený pomocí fylogenetické kovariační a mutační analýzy, obsahuje tři vysoce konzervované strukturální a funkční oblasti: templát/pseudoknot, CR4-CR5 a scaRNA (small Cajal-body RNAs) doménu. Pseudoknot doména s krátkým templátovým úsekem je nezbytná pro tvorbu DNA telomerových sekvencí, doména CR4-CR5 s vazebnými místy pro hTERT protein je rozhodující pro zachování enzymatické aktivity. Doména scaRNA obsahuje tři konzervované motivy box H, box ACA a CAB box, které udržují nukleonární lokalizaci, strukturální stabilitu RNA, dále se podílejí na akumulaci a maturaci HTERC a na vazbě asociovaných proteinů [151].

Udržení funkčních telomer na chromozomálních koncích je klíčové pro všechny proliferující buňky. Vedle progresivního telomerického zkracování jako následku nekompletní replikace DNA, může být telomerická dysfunkce způsobena též změnou funkčního stavu 3'- konce, se ztrátou capping funkce vedoucí k fúzím chromozomů a chromozomální instabilitě. Tato pak aktivuje „DNA damage checkpoints“, což vede k rychlé zástavě buněčného cyklu a apoptóze, nebo při vyřazení těchto tumor supresorových genů urychluje maligní transformaci. Klíčovou vlastností maligních nádorů je jejich nesmrtnost a neomezený replikační potenciál, který v naprosté většině nádorových buněk zajišťuje konstitutivní reaktivace telomerázy a následnou stabilizaci délky telomer. Tím je dán předpoklad, že by telomeráza mohla být charakterizována jako ideální tumormarker, stanovovaný metodikou RT-PCR v časně detekci nádorových buněk u tumorů, kde je telomerázová aktivita reaktivována v časných stádiích tumorogeneze a dále jako prognostický faktor u malignit, u nichž dochází k nárůstu telomerázy v průběhu progresu onemocnění, v rozpoznání prekancerózních lézí a možné detekci nádorových elementů v krvi

pacientů. A dále antagonisté telomer a telomerázového komplexu představují novou generaci antitumorózních léčiv, které při svém rychlém rozvoji mohou významně přispět k účinné a specifické terapii nejrůznějších malignit.

#### **2.3.2.4. Další markery (mamaglobin 1, cytokeratiny, transkripční faktor štítné žlázy 1)**

Mamaglobin 1 je vysoce glykosylovaný protein o nízké molekulární hmotnosti, asi 10,5 kDa. Gen byl poprvé identifikován v roce 1996 a kóduje protein o 93 aminokyselinách. Mamaglobin 1 (MGB1, SCGB2A2) patří společně s dalšími proteiny, do rodiny sekretoglobulinů, jejichž biologická funkce zatím zůstává neznámá. Gen je lokalizován na chromozomu 11q13. Exprese mamaglobinu byla detekována asi u 80% všech nádorů prsu. U 23% nádorů je exprese mnohonásobně vyšší, nebyla u nich však nalezena žádná genová amplifikace ani přeskupení, jedná se tedy o overexpresi na transkripční úrovni [152]. Dále bylo zjištěno, že zvýšená exprese mamaglobinu u nádorů prsu je spojena s nižší agresivitou tumoru [153]. Mamaglobin je exprimován téměř výhradně v epitelu prsní tkáně, ale byly také publikovány práce, ve kterých byla popsána detekce exprese mamaglobinu v benigních i maligních tkáních ovaria a endometria, avšak v mnohonásobně nižších hladinách než ve tkáni prsu. Přitom mamaglobin není exprimován v buňkách mezenchymálního původu, což znamená, že tedy v kostní dřeni, krvi ani lymfatickém systému, není exprese mamaglobinu u zdravého jedince detekovatelná. Díky prakticky výlučné expresi u nádorů prsu je mamaglobin k dnešnímu datu nejvíce senzitivní a specifický marker pro detekci minimální reziduální choroby u pacientek s karcinomem prsu, jaký byl kdy popsán. Je tak zajímavý nejen jako marker cirkulujících nádorových buněk, ale je zajímavý i z pohledu specifické imunoterapie [154].

Cytokeratiny tvoří největší podskupinu proteinů intermediálních filament cytoskeletu epitelálních buněk. Tyto proteiny jsou kódovány velkou multigenní rodinou zahrnující přes 50 členů, která se dělí do dvou velkých skupin – typ I a typ II. Geny typu I jsou lokalizovány na chromozomu 17q12-21 a geny typu II na chromozomu 12q13. Primární funkcí cytokeratinů je chránit epitelální buňky před mechanickým poškozením. Dále hrají roli v oblasti buněčné signalizace a apoptózy.

Cytokeratiny jsou exprimovány v epiteliálních buňkách v různých kombinacích a to v závislosti na typu a stupni diferenciacie epitelu, např. cytokeratiny 8, 18, 19 a 20 jsou exprimovány v jednovrstevném dlaždicovém epitelu. Předpokládalo se, že cytokeratiny tvořící skelet epiteliálních buněk, nejsou za normálních okolností exprimovány v lymfatickém ani v hematopoetickém systému a byly proto použity jako markery minimální reziduální choroby u karcinomu prsu [155]- cytokeratin 19, cytokeratin 20 u karcinomu kolorekta [145], prsu a uroteliálních karcinomů.

Transkripční faktor štítné žlázy 1 byl poprvé identifikován v roce 1995, nachází se na dlouhém raménku chromozomu 14q13, skládá se ze dvou exonů a má délku 3,3 kb. Je členem rodiny NKx2 transkripčních faktorů a je specificky exprimován ve štítné žláze, plicích a mezimozku. Vrozená delece genu TTF1 se může projevit u novorozenců hypothyroidismem, respiračním selháním a dyskinezií. V onkologické diagnostice lze použít TTF1 při detekci minimální reziduální choroby, při diferenciální diagnostice tumorů plic a jako prognostický faktor u pacientů s karcinomem plic.

Dalším zajímavým markerem, který je exprimován na povrchu většiny epiteliálních buněk, a který tak může být využit jako univerzální marker nádorových buněk pro detekci minimální reziduální choroby, je tumor-associated calcium signal transducer TACSTD1 (ekvivalentem je adhezní molekula epiteliálních buněk EpCAM, epiteliální glykoprotein EGP, KSA, GA 733-2), což odráží jednu z jeho mnoha funkcí. Je to membránový protein kódovaný genem o devíti exonech.

Závěrem lze říci, že v detekci minimální reziduální choroby byla použita celá řada nejrůznějších markerů nádorových buněk, problémem zůstává otázka jejich kvantifikace a specificity.

### **2.3.3. Potenciální využití minimální reziduální choroby v onkologické praxi**

V klinické onkologii slouží adjuvantní terapie především k eliminaci diseminovaných nádorových buněk. Často je však běžnými laboratorními vyšetřeními nejsme schopni identifikovat. Vlastní indikace k adjuvantní onkologické léčbě tak vychází ze zjevných parametrů diseminace, tj. metastatického postižení

spádových lymfatických uzlin, či parametrů nepřímých a to prostřednictvím parametrů přežívání. Jako minimální reziduální chorobu označujeme přítomnost cirkulujících nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byl odstraněn primární nádor a je bez známek nádorového onemocnění. Pomocí RT-PCR metodiky je možné rozdělit pacienty po primárním radikálním výkonu na dvě základní skupiny a to ty s vyšším rizikem recidivy onemocnění, tj. pozitivní záchyt MRD, a ty s nižším rizikem, tj. negativní záchyt MRD. Při tomto dělení by bylo možné vyloučit z adjuvantní terapie, která je nejen nákladná, ale i neobyčejně zatěžující, pacienty s nízkým rizikem a naopak zacílit adjuvantní terapii na pacienty, kteří nesplňují dosavadní standardy pro podání adjuvantní terapie, ale při vyšetření těmito vysoce senzitivními metodami molekulárně-biologickými, je prokázáno, z důvodu přítomnosti cirkulujících nádorových buněk, vyšší riziko recidivy. Metoda RT-PCR umožňuje kvantifikovat genovou expresi markerů epiteliálních tumorů v krvi, kostní dřeni a v lymfatickém systému s citlivostí až  $10^{-7}$ . Tímto ultrastagingem je možné zpřesnit diagnostiku a následnou léčbu onkologického pacienta v duchu „správná léčba, správnému pacientovi, ve správnou chvíli“. Tímto vyšetřením je také možné zjistit případnou recidivu nádorového onemocnění a to dříve, než se rozvine v podobě makroskopického postižení. Přes všechny pokroky v metodice stanovení minimální reziduální choroby, není význam cirkulujících nádorových buněk v mezenchymálních tkáních ještě plně objasněn.

Největší zkušenosti jsou v problematice stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu, na čemž se významně podílí svými poznatky také Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice FN v Olomouci, pod vedením jejího vedoucího lékaře doc.MUDr.Mariána Hajdúcha, PhD.

*Minimální reziduální choroba u karcinomu prsu* – podle dosavadních statistických údajů se až u třiceti procent primárně operabilního karcinomu prsu objeví do pěti let od diagnózy vzdálené metastázy. Standardní metodou používanou k určení diseminace postižení je vyšetření spádových axilárních lymfatických uzlin, modifikované v současnosti dominantně používanou metodou, a to stanovením nádorové infiltrace tzv. sentinelové uzliny. Tj. první splavné spádové lymfatické uzliny, která je také jako první postižena nádorovou diseminací, označená pomocí patent-blue či  $^{99}\text{Tc}$ . Smyslem stanovení MRD u těchto pacientek je vyselektovat skupinu nemocných, jež budou profitovat z adjuvantní terapie za účelem eliminace



pozitivních cirkulujících buněk v této skupině, s cílem zabránit recidivě onemocnění a prodloužit přežívání [156]. Vyšetření minimální reziduální choroby by také bylo možné využít pro monitorování léčebné odpovědi na adjuvantní terapii [157]. Jako nejspolehlivější se z hlediska prognostického významu pro vznik vzdálených metastáz jeví vyšetření kostní dřene [158]. V literatuře se objevilo 15 velkých studií s celkem 3240 pacientkami vyšetřenými na přítomnost minimální reziduální choroby v kostní dřeni metodikami založenými na imunohistochemickém postupu. Jako nejčastěji používané markery pro detekci MRD u nemocných s karcinomem prsu patří cytokeratiny, zejména CK 19, dále karcinoembryonální antigen a mamaglobin-1. Výsledky studií jsou navzájem poměrně obtížně srovnatelné pro značnou variabilitu v použitých protilátkách a metodice zpracování vzorků. V sedmi z analyzovaných studií byl potvrzen významně kratší čas do vzniku vzdálených metastáz a v šesti z nich bylo kratší celkové přežití u pacientek s pozitivní reziduální chorobou. V souboru 44 pacientek sledovaných ve FN Olomouc (spolupráce LEM a I.chirurgické kliniky) byla polovina odebrané sentinelové uzliny u pacientek, které podstoupily chirurgický výkon na prsu odeslána na klasické histopatologické vyšetření a druhá polovina byla vyšetřena metodou real-time RT-PCR, kdy byla stanovena míra exprese CEA, mamaglobinu a CK19. Zajímavé bylo zjištění, že histologickými metodami bylo prokázáno postižení lymfatických uzlin u 36% pacientek, u kterých byla indikována následná adjuvantní chemoterapie, ale metodou RT-PCR byla odhalena přítomnost nádorových buněk u 59% pacientek, tzn. i u těch, u nichž nebyla indikována další adjuvantní terapie. Definitivní prognostické výsledky srovnávající dobu do recidivy v obou skupinách však ještě nejsou k dispozici. Z prvotních výstupů však vyplývá, že pozitivita minimální reziduální choroby sentinelové lymfatické uzliny značí kratší přežívání bez nádorového onemocnění i při negativním nálezu minimální reziduální choroby v kostní dřeni pacientek.

*Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu* – jedná se o nejčastější maligní onemocnění zažívacího traktu vůbec, přičemž Česká republika se společně s Maďarskem střídá na prvním místě v incidenci tohoto onemocnění. Základem úspěšné léčby je chirurgický radikální výkon, který umožňuje stanovit klasifikaci nádorového procesu dle pTNM klasifikace. Pacienti v I. a II. stadiu jsou považováni za vyléčené již samotným chirurgickým výkonem a chemoterapie není většinou

indikována, zatímco pacienti se stadiem III. a IV. jsou po chirurgickém výkonu indikováni k adjuvantní chemoterapii a výrazně z ní profitují. Podle dosavadních zkušeností se ale ukazuje, že u zhruba 30-50% pacientů ve stadiu I. a II. bez adjuvantní chemoterapie se po určité době objeví vzdálené metastázy [159]. Příčinami je nesprávné zhodnocení počátečního stadia, kdy nejčastější příčinou tohoto „understagingu“ je nedostatečný počet vyšetřených lymfatických uzlin, resp. nesprávným technickým zpracováním histopatologického materiálu, včetně rizika selhání lidského prvku. Dalším a nejpodstatnějším důvodem je přítomnost synchronních mikrometastáz a perzistujících cirkulujících volných nádorových buněk v kompartmentech nemocného, které nelze v době diagnózy standardními vyšetřovacími metodami postihnout. To pak vede k nesprávnému podhodnocení stadia onemocnění s následujícím výsledkem v podobě podhodnocené adjuvantní terapie. Zmiňována v této souvislosti je problematika tzv. „ultrastagingu“ [160], jedná se o detekci minimální reziduální choroby a mikrometastáz a to pomocí metodiky RT-PCR, kdy je stanovována exprese specifických markerů CEA, CK20, EGFR, hTERT a další. Z výsledků studií vyplývá, že existuje jednoznačná signifikantní závislost mezi pozitivitou lymfatických uzlin a pozitivní MRD v portální a systémové krvi u kolorektálního karcinomu. Dále, že velikost nádoru koreluje s pozitivitou MRD v kostní dřeni, že ve všech klinických stádiích dle TNM klasifikace u karcinomu kolorekta je vidět pokles positivity MRD v kostní dřeni měsíc po resekci tumoru. Pokles je větší ve stádiích I. a II., než III. a IV. a že pozitivita MRD u nemocných se synchronními metastázami byla v době operace 45%, proti 27% u metastáz metachronních [160]. Z dalších studií je možné zmínit práci Allen-Mershe a spol. z roku 2007 [161], který sledoval přítomnost cirkulujících nádorových buněk pomocí exprese CEA a CK20 u 196 pacientů s kolorektálním karcinomem a její vliv na predikci recidivy nádorového onemocnění. Bohužel, přestože stoupá počet výsledků vyplývajících z jednotlivých studií, definitivní závěry stran významu stanovení minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu nejsou k dispozici a hlavní příčina tkví opět v odlišných metodikách, sledovaných statistických parametrech a poměrně malých souborech pacientů.

Dalším potenciálním uplatněním stanovení minimální reziduální choroby je sledování účinku nových látek s potenciálním protinádorovým účinkem [162], zejména látek ze skupiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz.

## 3. Experimentální část

### 3.1. Cíle práce

Minimální reziduální chorobu lze stanovit u pacientů s karcinomem pankreatu v systémové a portální krvi, kostní dřeni a peritoneální laváži pomocí metod real-time RT-PCR. Tato diagnostika však zatím není standardizována k vyšetřování cirkulujících nádorových buněk u jednotlivých nádorových onemocnění. Na počátku je tedy nutné stanovit markery, které charakterizují nádorové buňky a to tak, aby je s dostatečnou senzitivou a specificitou odlišily od buněk nenádorových a dále pak je nutné ve skupině pacientů s karcinomem pankreatu v různých stádiích, u nichž bude minimální reziduální choroba sledována, určit jednotlivé parametry, které budou korelovány s výsledky vyšetření.

Na základě výše uvedeného pak byly stanoveny hlavní cíle práce:

1. Stanovit optimální vyšetřovací postup, navrhnout, zoptimalizovat a provést validaci metody real-time kvantitativní RT-PCR pro detekci minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu (ve spolupráci s LEM FNOL)
2. Stanovit optimální metodiku odběru materiálu k vyšetření MRD
3. Zhodnotit význam vyšetření MRD u pacientů s karcinomem pankreatu a to na základě klinického stadia, rozsahu operačního výkonu, velikosti nádoru a postižení lymfatických uzlin
4. Stanovit expresi jednotlivých sledovaných markerů v systémové krvi, kostní dřeni, portální krvi a peritoneální laváži vzhledem ke klinickému stadiu
5. Vyhodnotit prognostický význam stanovení MRD u karcinomu pankreatu

## 3.2. Materiál a metoda

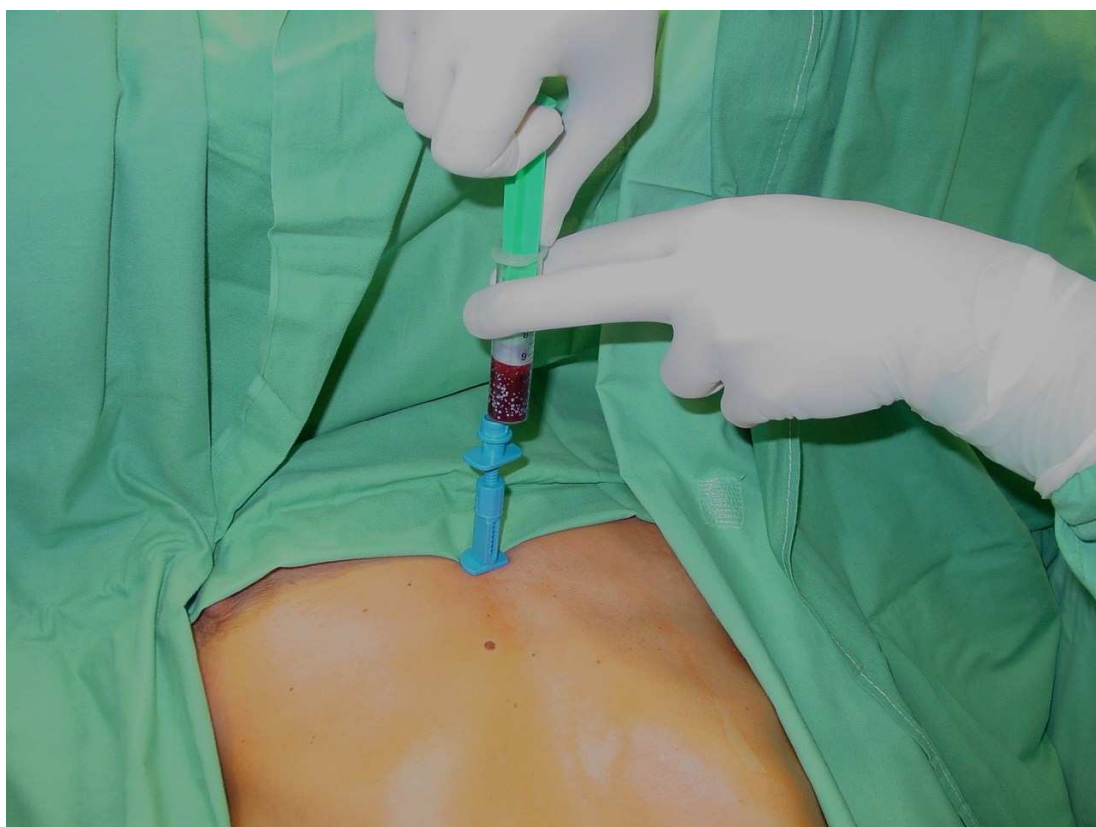
### 3.2.1. Materiál a jeho odběr

K vyšetření minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu byly použity vzorky systémové a portální krve, kostní dřeně a peritoneální laváže, odebírané peroperačně u skupiny pacientů s karcinomem pankreatu v různých stádiích choroby, indikovaných k operační revizi. Odběr byl prováděn v celkové anestézii po informovaném souhlasu pacientů, jež byl součástí žádosti u grantové agentury a jež byl schválen Etickou komisí FN v Olomouci. V případě radikálně operabilního nálezu byl dalším vzorkem několikamilimetrový bloček nádorové tkáně, který se ukládá do 700  $\mu$ l roztoku RNA later, kde jsou obsaženy inhibitory ribonukleáz. Tkáň se v roztoku stabilizuje a je připravena pro další analýzy RNA, DNA i proteinů. Alternativně opět v případech resektabilních nálezů a tam, kde to technické možnosti dovolily, byl odebrán vzorek 3 ml pankreatické šťávy z hlavního pankreatického vývodu, který byl opět umístěn a stabilizován do RNA lateru k případné další analýze.

Od každého pacienta byl tedy získán set čtyř, resp. šesti vzorků materiálu, jež zahrnoval:

1. *Odběr kostní dřeně* – je odebrána na samotném počátku operačního výkonu, po úvodu nemocného do celkové anestézie ze sternální punkce za přísných aseptických kautel. Bylo odebráno 9ml aspirátu kostní dřeně, který je umístěn do zkumavek s EDTA.

### Obr. 3.2.1.1. Odběr kostní dřeně ze sternální punkce



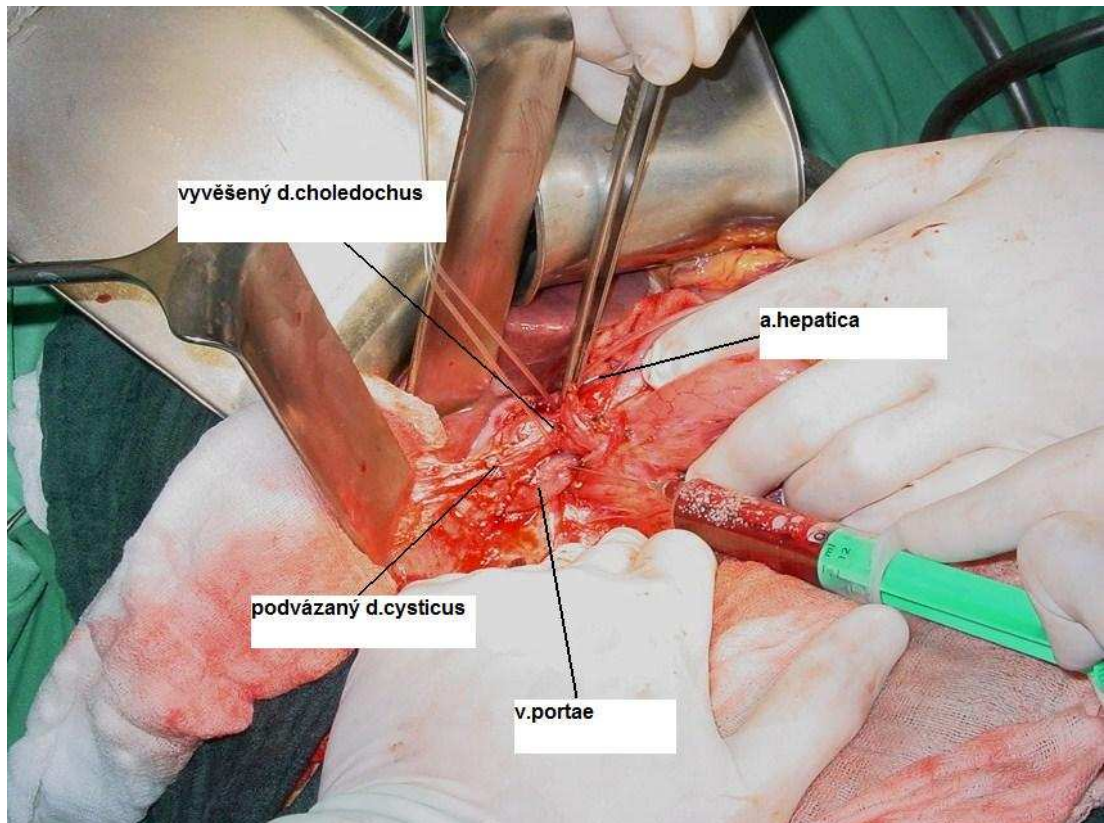
2. *Systémová žilní krev* – odebrána z periferní či centrální žíly, nejčastěji z vena cubita či vena jugularis interna, v množství 9 ml do zkumavek s EDTA. Systémová krev je odebrána předoperačně před vlastním resekci karcinomu slinivky břišní.
3. *Peritoneální laváž* – vzorek z peritoneální laváže je odebírán na počátku operačního výkonu, těsně po provedení laparotomie. Do dutiny břišní je aplikováno cca 300 ml fyziologického roztoku ohřátého na tělesnou teplotu 37°C, který po dobu 5 minut promývá nástěnné peritoneum a cca 100 ml je odesláno ve fixačním roztoku s živným médiem pro buňky a EDTA k vyšetření.

### Obr.3.2.1.2. Odběr vzorku z peritoneální laváže



4. *Odběr portální krve* – dalším vzorkem, který je odebírán od všech pacientů, kteří byli zařazeni do studie sledující přítomnost minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu, je odběr 9 ml portální krve ještě před zahájením resekční fáze, tzn. před odstraněním vlastní nádorové masy. Krev se umístí taktéž do zkumavek s fixačním roztokem EDTA. Odběr je prováděn tenkou jehlou po preparaci v oblasti hepatoduodenálního vazu, kdy jsou selektivně odseparovány všechny tři struktury vazu, tj. společný hepatikus, portální žíla i arteria hepatica propria. Vlastní místo odběru není nutné přešívát, zpravidla stačí krátkodobá komprese longetou a krvácení spontánně ustává.

### Obr.3.2.1.3. Odběr krve z portální žíly



5. Vzorek z ložiska nádoru v hlavě pankreatu – pokud se jednalo o resekovatelný nález, pak byla odebrána část tumoru hlavy pankreatu velikosti cca 3x3 mm, která byla umístěna do vzorku RNA lateru, následně byla uložena do genetické banky. Tato tkáň tedy nesloužila primárně ke stanovení minimální reziduální choroby, ale může být v budoucnu využita k různým účelům, např. sledování genových mutací apod.
6. Vzorek pankreatické šťávy – byl stejně jako předchozí materiál odebírán jen u pacientů radikálně resekováných, kdy po nasondování ductus pancreaticus maior s.Wirsungi, bylo odsáto cca 3 ml pankreatické šťávy umístěné do RNA lateru a uchované v genetické bance k dalšímu využití. V metodice standardního stanovení MRD karcinomu pankreatu nebyl tento vzorek použit.

### 3.2.2. Zpracování materiálu v Laboratoři experimentální medicíny

Bezprostředně po odběru byl materiál odeslán ke zpracování do Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice FN v Olomouci, kde probíhalo vlastní testování odebraných vzorků na přítomnost minimální reziduální choroby a byla rozpracována metodika stanovení MRD u solidních nádorů a byla převzata do této práce [163].

Prvním krokem v metodice byla *izolace jaderných buněk osmotickou lýzou*. Osmotická lýza, kdy dochází k osmotické lýze erytrocytů, zatímco jaderné buňky jsou zachovány, se provádí především s cílem odstranit erytrocyty ze vzorků krve a kostní dřeně a to především z důvodu přítomnosti hemu, který působí jako inhibitor mnoha enzymů užívaných v diagnostice molekulárně-biologických metod. Lyzační roztok obsahuje: 1,55M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 1mM EDTA, promývací roztok (Phosphate Buffer Saline, PBS) obsahuje: 1,4M  $\text{NaCl}$ , 0,03M  $\text{KCl}$ , 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,015M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Vzorek krve či kostní dřeně tak byl lyzován na ledu vychlazeným lyzačním roztokem v poměru ke vzorku 4:1 po dobu 15-30 minut do vyčechení lyzátu. Tyto vzorky pak byly centrifugovány 2200rpm, 10 minut, 4°C, po odstranění supernatantu, pak je vzorek ještě jednou centrifugován a promyt lyzačním roztokem. Následuje změření koncentrace jaderných buněk na Coulter Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) a rozplnění alikvotů po  $11 \times 10^6$  buněk do připravených zkumavek. K těmto alikvotům pak byl za současného propipetování přidán 1ml TRI reagentu a vzorek byl zamražen.

Poté následuje *vlastní izolace RNA*. K tomuto účelu byla použita tzv. Chomczynského fenol-chloroformová metoda pomocí komerční chemikálie TRI reagent (MMC, Cincinnati, Ohio, USA), což je směs guanidinu-thiokyanátu a fenolu. Ke směsi TRI reagentu a vzorku se přidá chloroform, během centrifugace se směs rozdělí do tří fází. Horní vodná fáze obsahuje RNA, interfáze DNA a spodní organická fáze obsahuje proteiny, je tedy možné současně izolovat z jednoho vzorku RNA, DNA i proteiny. RNA rozpuštěná ve vodné fázi se precipituje izopropanolem, promyje etanolem a rozpustí ve vodě. Metoda je vhodná pro izolaci RNA všech typů o délce 0,1-15 kb. Kvalita vyizolované RNA byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy, následně pak bioanalyzárem Agilent 2100 (Agilent Technologies,



Santa Clara, CA, USA), koncentrace a čistota byla ověřena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). Při použití 1 ml TRI reagentu lze izolovat RNA z 50-100 mg tkáně a z 5-11 milionů buněk. Lze použít čerstvé nebo zamražené buněčné TRI lyzáty (koncentrace 5-11 milionů buněk/1ml TRI reagentu). Izolace RNA začíná přidáním 200 $\mu$ l chloroformu ke vzorku, následně je ponechán vzorek stát 10 minut při pokojové teplotě, poté je centrifugován 15 minut při 120000 g, 4°C. Při centrifugaci dojde k oddělení vrstev – spodní růžová obsahuje detritus, lipidy a proteiny, prostřední mezivrstev je DNA a horní, čirá obsahuje RNA. Tato vrchní fáze je přepipetována do čisté zkumavky a provedena precipitace RNA přidáním 400-500  $\mu$ l isopropanolu. Následně je centrifugována 10 minut při 120000 g, 4°C, na dně by měla zůstat bílá RNA peleta, pak je odstraněn opatrně supernatant a RNA peleta promyta 1,5 ml 75% etanolu. Po centrifugaci a odstranění supernatantu je přidáno k RNA peletě cca 25 $\mu$ l DEPC vody (21-60  $\mu$ l podle velikosti peletky) a obsah několikrát propipetován. Rozpuštěná RNA může být dlouhodobě uchovávána při -70 až -80°C. Pro izolaci RNA z tkání fixovaných v RNA lateru je nadměrně důležitá dokonalá homogenizace vzorku. Do zkumavky s 1ml TRI reagentu jsou přidány dvě sterilní skleněné kuličky o průměru 5mm a vzorek vyšetřované tkáně o velikosti 3x3x3 mm. Přístrojem Mixer Mill 300 (Retsch, Haan, Německo) je provedena homogenizace při maximální rychlosti 30 Hz po dobu 3-4 minut. Díky homogenizaci v TRI reagentu nedochází k enzymatické degradaci izolované RNA, po homogenizaci se ke vzorku přidá chloroform a pokračuje se jak shora uvedeno.

Poté následuje *reverzní transkripce*. Při reverzní transkripci dochází pomocí enzymu reverzní transkriptázy k přepisu RNA do komplementární jednovláknové DNA (cDNA). Nejčastěji se používá transkriptáza, jež pochází z Moloneyho viru myší leukémie (M-MuLV), nebo z viru ptačí myeloblastózy (AMV). Pro reverzní transkripci je vhodné používat enzymy bez H-RNázové aktivity. Při reverzní transkripci je dále nutno použít primery. Používají se buďto specifické mRNA primery, oligo-dT primery nebo náhodné hexamery. Nejvyšší výtěžnost mají náhodné hexamery, nejvyšší specifitu mají specifické mRNA primery. K ochraně mRNA při reverzní transkripci je vhodné používat inhibitory ribonukleáz, např. RNAsin ( Promega, Madison, WI, USA). V naší práci byly použity RevertAid H minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Vilnius, Litva) a náhodné

primery (Promega, Madison, WI, USA). Reverzní transkripce je provedena ze 3 $\mu$ g izolované celkové RNA v reakčním objemu 30 $\mu$ l. Směs 3 $\mu$ g RNA a 0,3 $\mu$ g hexamerů je doplněna vodou do objemu 19,5  $\mu$ l a pak je inkubována v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70°C po dobu 5 minut. Následně je vzorek rychle zchlazen na ledu po dobu cca jedné minuty. MasterMix připravený z 6 $\mu$ l 5xRT pufru, 3 $\mu$ l 10mM DTP a 30U RNAsinu je přidán ke zchlazenému vzorku RNA s hexamery a s vodou a ponechán 5 minut při pokojové teplotě. Po přidání 150U reverzní transkriptázy je vzorek inkubován v termocykléru s vyhříváním víčkem při 42°C po dobu 60 minut a pak 10 minut při 70°C. Po inkubaci je vzorek zchlazen a uložen do -20°C do dalšího zpracování.

Dále již následuje samotná *polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time RT-PCR)*. Je to enzymatická reakce, která je umožněna primery, specifickou fluorescenčně značenou sondou (Tab. 3.2.2.1.) a termostabilní DNA- polymerázou. Průběh reakce je snímán termocyklérem v reálném čase jako změny fluorescence, v našem projektu se jednalo o real-time cykléry Rotor Gene 2000, resp. 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Po přidání standardů k reakci a vytvoření standardizační křivky lze hodnotit specifické vyšetřované sekvence ve vzorku. Ke každé polymeráze je dodáván reakční pufr o vhodném složení. Optimální koncentrace hořčičných iontů je optimalizována pro každou sadu primerů, standardem je dnes již využití tzv. hot-start DNA-polymerázy. Primery, jsou krátké oligonukleotidy o délce cca 20-25 bp, které vymezují amplifikovaný úsek DNA, specifická hydrolyzační TaqMan sonda je krátký oligonukleotid značený fluorescenční barvou a zhášečem. Syntéza primerů a sond byla provedena firmou Generi Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR. Samotná PCR je prováděna se 100ng cDNA, resp. celkové RNA vstupující do reverzní transkripce, v reakčním objemu 25 $\mu$ l. MasterMix sestává ze 2,5  $\mu$ l 10x PCR pufru, 0,5 $\mu$ l 10mM DTP, zoptimalizovaného množství primerů, próby a MgCl<sub>2</sub>, DEPC vody a 1U Taq polymerázy ( Tab. 3.2.2.2.). Do připravených 0,1 ml zkumavek je rozpipetováno 24  $\mu$ l MasterMixu, 1 $\mu$ l cDNA vzorků, 1  $\mu$ l DEPC vody jako „no template“ kontrola, 1  $\mu$ l cDNA pozitivní kontroly a 1 $\mu$ l specifických standardů. Zkumavky jsou vloženy do karuselu přístroje, vyváženy, poté je provedena automatická kalibrace snímání fluorescence přístroje a spuštěn příslušný amplifikační program. Po proběhnutí real-time RT-PCR je provedena samotná analýza. Ke stanovení minimální reziduální

choroby u karcinomu pankreatu bylo využito sledování exprese CEA, EGFR1 a hTERT. Pro provedení absolutní kvantifikace exprese jednotlivých markerů metodou real-time RT-PCR bylo nutno sestavit standardizační křivku. Jako standardy byly použity desetinásobně řaděné PCR amplikony obsahující v sobě sekvenci testovaného markeru. Výpočet množství kopií byl proveden na základě známé molekulové hmotnosti (délka amplikonu), spektrofotometricky určené koncentrace a Avogadrovy konstanty.

**Tab.3.2.2.1. Sekvence použitých primerů a sond**

Název	Sekvence
<b>Carcinoembryonic antigen (CEACAM5)</b>	
CEAs	5'- taagtgttgaccacagcgacct - 3'
CEAas	5'- gttcccatcaatcagccaagaa - 3'
CEAp	5'- atgtcctctatggcccagacgacct - 3' BHQ1-HEX
<b>Epidermal growth factor receptor 1 (EGFR1)</b>	
EGFRs	5'- acttcaaaaactgcacctccat - 3'
EGFRas	5'- aatcagcaaaaacctgtgatt - 3'
EGFRp	5'- acatcctgccggtggcatttagg - 3' BHQ1-HEX
<b>h-Telomerase (hTERT)</b>	
hTERTs	5'- atgtcacggagagaccacgtt - 3'
hTERTas	5'- gcaccctctcaagtgtg - 3'
hTERTp	5'- tggagcaagttgcaaagcattgga - 3' BHQ1-HEX

**Tab.3.2.2.2. Optimalizované koncentrace oligonukleotidů, sond, hořčnatých kationtů a PCR teplotní schéma**

Marker	Finální koncentrace				Teplotní profil	Produkt (bp)	
	Primer (nM)	sense	Primer antisense (nM)	Próba (nM)			MgCl <sub>2</sub> (mM)
CEA	300		600	200	3	95°C/15sec.- 65°C/15sec.	179
EGFR	400		400	200	3	95°C/15sec.- 62°C/15sec.	149
GAPDH	300		300	200	3	95°C/15sec.- 60°C/30sec.	226

### 3.2.3. Specificita a senzitivita použité metody

Aby bylo možné stanovit *specificitu* dané metody při stanovení minimální reziduální choroby, bylo nutné stanovit expresi jednotlivých nádorových markerů – genů v krvi, kostní dřeni a lymfatické tkáni zdravých jedinců. V této pilotní studii byly do srovnávací skupiny zařazeny vzorky krve získané od 58 dobrovolných dárců krve, dále vzorky kostní dřene od 12 zdravých dárců a vzorky 3 lymfatických uzlin odebraných u pacientů pro zánětlivá benigní onemocnění (cholecystektomie, polypektomie apod.). Byla provedena real-time RT-PCR reakce dle uvedených standardizovaných podmínek (tab. 3.2.2.2) a následně byly výsledky statisticky zpracovány. Jako cut-off hodnota pro pozitivní versus negativní hodnocení minimální reziduální choroby byl stanoven trojnásobek průměrné hodnoty exprese markeru v kontrolním souboru (tab. 3.2.3.1) Při hodnocení diagnostické specifičnosti byla jako falešně pozitivní výsledek hodnocena exprese vyšší než cut-off hodnota. Výpočet diagnostické specifičnosti byl proveden podle vzorce: správná negativita / (správná negativita + falešná pozitivita). Specificita jednotlivých testovaných markerů je pak uvedena v tabulce č.3.2.3.2.

**Tab. 3.2.3.1. Kvantitativní exprese epitelálních markerů v krvi, kostní dřeni a lymfatických uzlinách zdravých dárců**

Expresa v negativních kontrolách (počet kopií/μg RNA)				
Marker		Krev	Kostní dřeň	Lymf.uzlina
CEA	Mean	88.3	155.6	5.0
	SD	111.5	124.8	7.1
	<b>Cut-off</b>	<b>200.0</b>	<b>350.0</b>	<b>250.0</b>
EGFR	Mean	49.2	15 528.3	216 098.3
	SD	127.1	21 960.4	63 025.4
	<b>Cut-off</b>	<b>250.0</b>	<b>30 000.0</b>	<b>ND</b>

**Tab. 3.2.3.2. Specificita jednotlivých markerů obecně používaných pro detekci minimální reziduální choroby u solidních nádorů**

<b>Marker</b>	<b>Specificita %</b>
<b>CEA</b>	<b>94.4</b>
<b>CK20</b>	<b>96.5</b>
<b>EpCAM</b>	<b>97.7</b>
<b>CK19</b>	<b>98.3</b>
<b>EGFR1</b>	<b>98.3</b>
<b>MAM</b>	<b>100.0</b>
<b>TTF1</b>	<b>100.0</b>
<b>hTERT</b>	<b>100.0</b>

Stanovit *senzitivitu* této metody není možné a to vzhledem k povaze vyšetření minimální reziduální choroby a z biologické povahy a proměnlivosti vzorků. Pro detekci diseminovaných nádorových buněk v těle pacienta se zhoubným nádorem, a to na podkladě exprese jednotlivých nádorových markerů, byla testována senzitivita této metodiky na základě dilučních řad. Nádorové buňky získané z reálných vzorků nativních tumorů byly přidány do vzorků jaderných buněk krve získaných od zdravých dárců – dobrovolníků v poměru 1:1 až 1:10 000 000. Poté byla provedena real-time RT-PCR o 50 cyklech s markery a sondami dle uvedených schémat (tab. 3.2.2.2.). Výsledná citlivost detekce diseminovaných nádorových buněk za použití CEA byla  $3,3 \times 10^{-7}$ , EGFR1  $2,5 \times 10^{-7}$ , CK 19 a CK 20  $1 \times 10^{-6}$ . Expres TTF1 je nízká i v primárním nádoru, proto diluční experiment nebylo možné provést v dostatečném rozsahu. Senzitivitu jednotlivých markerů pak ukazuje následující tabulka č.3.2.3.3.

**Tab. 3.2.3.3. Senzitivita jednotlivých markerů pro detekci minimální reziduální choroby u solidních nádorů**

<b>Marker</b>	<b>Senzitivita (počet nádorových buněk/ počet nenádorových bb.)</b>
TTF1	neurčeno
EpCAM	$1 \times 10^{-6}$
CK 19	$1 \times 10^{-6}$
CK 20	$1 \times 10^{-6}$
MAM	$2 \times 10^{-6}$
EGFR1	$2,5 \times 10^{-7}$
CEA	$3,3 \times 10^{-7}$

Pro testování *opakovatelnosti a reprodukovatelnosti* vyšetření byla provedena metoda real-time RT-PCR stanovující expresi karcinoembryonálního antigenu. Pro ověření opakovatelnosti byly vzájemně porovnávány výsledky exprese CEA v jedné sérii – v jednom dni, jedním pracovníkem, 5x1 vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí, pro testování reprodukovatelnosti bylo provedeno totéž v různých dnech a různými pracovníky. Po statistickém srovnání výsledků nebyly nalezeny mezi testovanými soubory statisticky významné rozdíly, jak ukazuje následující tabulka (tab.3.2.3.4)

**Tab. 3.2.3.4. Validace opakovatelnosti a reprodukovatelnosti vyšetření MRD pro CEA**

<b>Opakovatelnost, reprodukovatelnost(kopieCEA/<math>\mu</math>gRNA/průměr<math>\pm</math>směr.odchylka)</b>			
	<b>1.analýza</b>	<b>2.analýza</b>	<b>3.analýza</b>
<b>Vzorek XY</b>	3901540,2 $\pm$ 282322,6	2302267,4 $\pm$ 384178,5	3518324,4 $\pm$ 462366,1
<b>Vzorek XY 100xřředěný</b>	30647,4 $\pm$ 5372,9	28981,8 $\pm$ 8582,1	24345,4 $\pm$ 7738,9
<b>Vzorek XY 10tis.xřředěný</b>	191,8 $\pm$ 40,6	67 $\pm$ 18,8	20,2 $\pm$ 8,5

### 3.2.4. Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu Statistica 8 od firmy StatSoft. Jako mezní hladina významnosti u všech testů byla stanovena  $\alpha=0,05$ . U výsledků exprese jednotlivých markerů bylo pak Shapiro-Wilkovým testem stanoveno porušení normality, proto následné statistické analýzy byly provedeny neparametricky (Kruskal-Wallis-Anovou metodou, Mann-Whitneyovým testem). Závislosti mezi expresí markerů byly ověřovány testem nulovosti Spearmanova korelačního koeficientu.

V analýzách přežití byla použita Kaplan- Meierovu metodu a Gehanův-Wilcoxonův test, kde počátkem sledování u každého pacienta je vždy datum operačního výkonu s odběrem vzorků. Při analýzách kontingenčních tabulek byl použit Pearsonův  $\chi^2$ -test.

### 3.2.5. Soubor pacientů

Do pilotní studie stanovení minimální reziduální choroby u adenokarcinomu pankreatu bylo zařazeno celkem 70 pacientů, kteří byli operováni na I. chirurgické klinice FN v Olomouci v letech 2007-2009 pro tuto diagnózu. V této skupině bylo 28 žen a 42 mužů, průměrného věku 65 let. Stadium I-III. dle UICC/AJCC bylo u 28 nemocných, stadium IV. u 42. Rozsah výkonu zahrnoval od prosté explorační s biopsií, či excizí, většinou metastázy jater. Přes spojivé operace, tj. zadní retrokolickou gastroenteroanastomózu a choledochoduodenoanastomózu, resp. hepatikojejunoanastomózu, jako paliativní výkon k zajištění pasáže zažívacího traktu a drenáže žlučových cest. Až po standardizovaný výkon pro tumory v oblasti hlavy pankreatu, tj. pravostrannou pylorus šetřící pankreatoduodenektomii. Ve třech případech byla provedena totální pankreatektomie, vynucená buď pozitivní resekční linií, či jemnou strukturou pankreatu. 30 pacientů bylo odoperovaných radikálně, přitom ve čtyřech případech se jednalo o R1 resekci. Metodou RT-PCR byly na míru exprese hTERT(telomeráza), EGFR1 (receptor pro epidermální růstový faktor) a

CEA (karcinoembryonální antigen) vyšetřeny vzorky periferní a portální krve, kostní dřevě a peritoneální laváže. Naměřené hodnoty byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami a s parametry přežívání.

**Tab.3.2.5.1. Soubor pacientů zařazených do studie**

		Sex				N			
		F		M		posit		negat	
total		28	40%	42	60%	23	62,16%	14	37,84%
stage	I	0	0%	5	100%	0	0%	5	100%
	II	3	37,50%	5	62,50%	0	0%	8	100%
	III	5	33,33%	10	66,67%	15	100%	0	0%
	IV	20	47,62%	22	52,38%	8	88,89%	1	11,11%

		G						Radikalita					
		1		2		3		R0		R1		R2	
total		2	3,17%	42	66,67%	19	30,16%	27	38,57%	4	4,29%	40	57,14%
stage	I	1	20%	4	80%	0	0%	5	100%	0	0%	0	0%
	II	0	0%	7	87,50%	1	12,50%	8	100%	0	0%	0	0%
	III	1	6,67%	14	93,33%	0	0%	13	86,67%	2	13,33%	0	0%
	IV	0	0%	18	50%	18	50%	0	0%	2	4,76%	40	95,24%

		age		max. diameter	
		min- median	max	min- median	max
total		63	40-84	5	1-10
stage	I	55	44-71	2,5	1-5
	II	60,5	52-84	3,25	1-4
	III	66	46-78	3,5	1-8
	IV	64,5	40-76	5	3-10

R0 resekce= bez reziduálního nádoru, R1 resekce=mikroskopický reziduální nádor

R2=makroskopický reziduální nádor



### 3.3. Výsledky

#### 3.3.1. Vztah exprese EGFR1 v jednotlivých kompartmentech vzhledem k jednotlivým klinicko-patologickým parametrům

Míra exprese EGFR1 byla korelována jednak v *portální krvi* vzhledem k:

1. radikalitě (obr.3.3.1.1)
2. stadiu onemocnění (obr.3.3.1.2)
3. ke gradingu (obr.3.3.1.7).

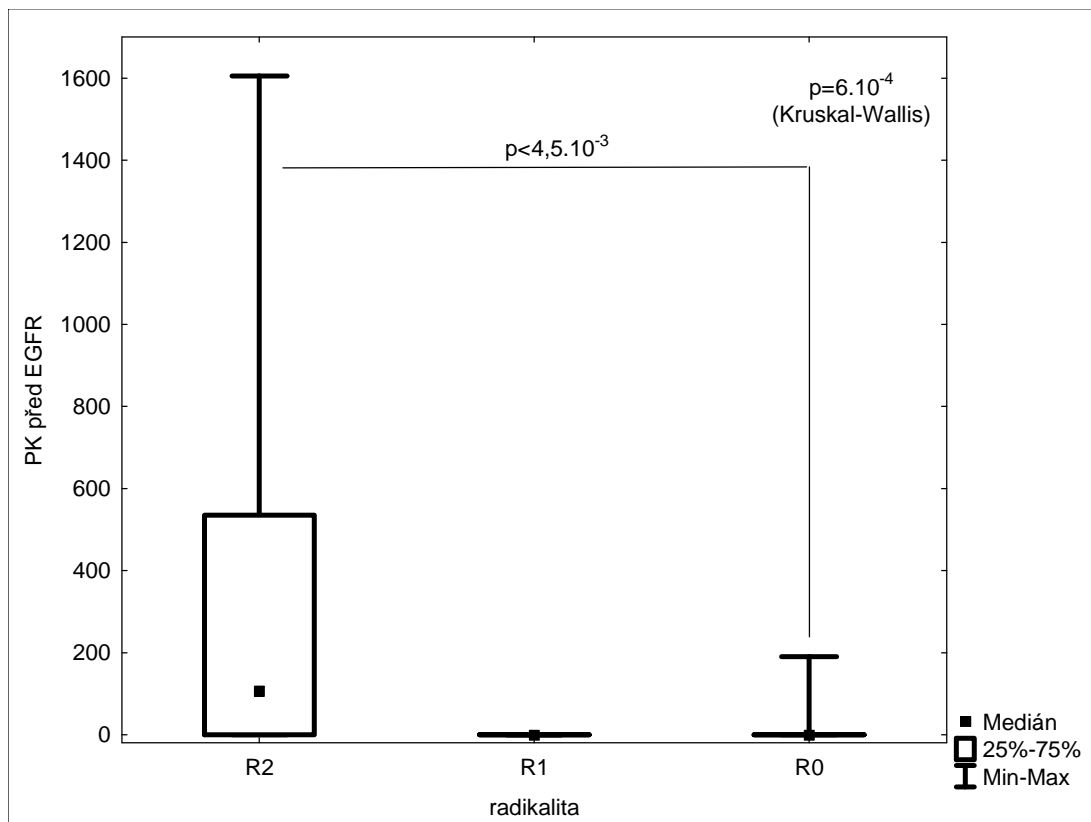
Dále byla míra exprese EGFR1 korelována v *systémové krvi* vzhledem k:

1. radikalitě (obr. 3.3.1.3)

Poslední korelovanou hodnotou byla exprese EGFR1 v *peritoneální laváži* vzhledem k :

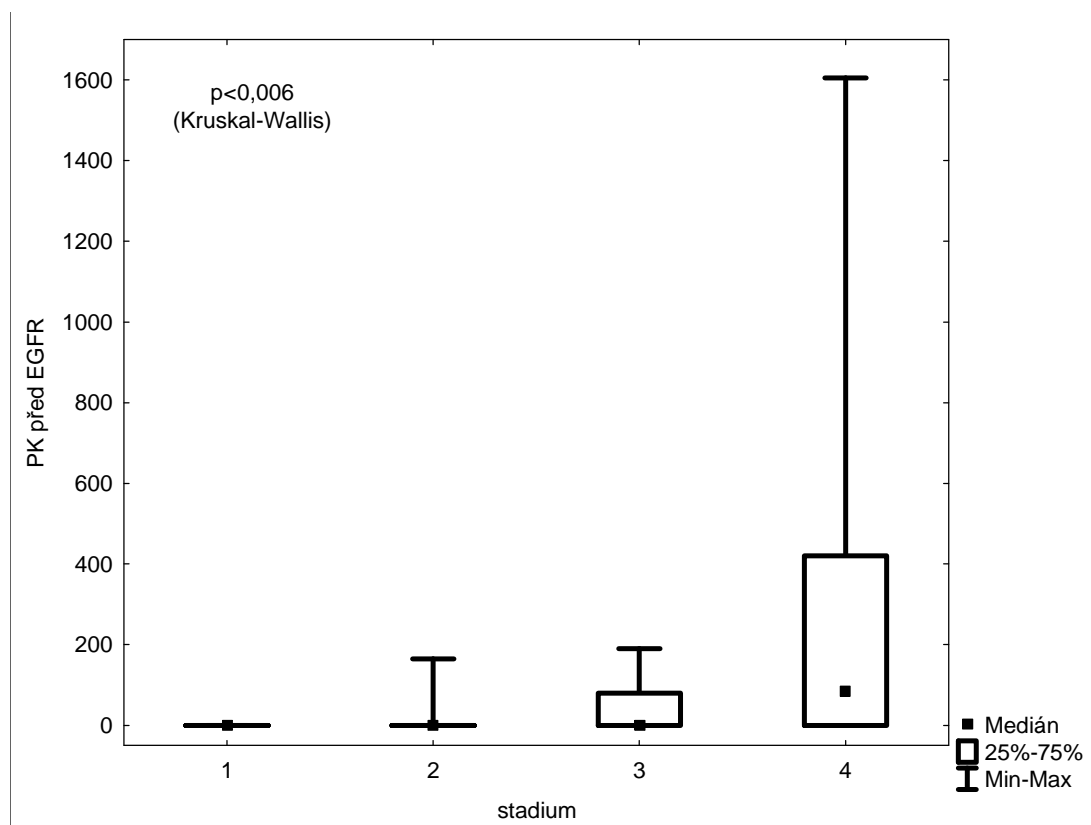
1. radikalitě (obr.3.3.1.4)
2. stadiu choroby (obr.3.3.1.5).
3. přítomnosti metastáz (obr.3.3.1.6)

**Obr.3.3.1.1. Expresa EGFR1 v portální krvi vzhledem k radikalitě**



Naměřená hodnota exprese EGFR1 v portální krvi vzhledem k provedené radikalitě výkonu byla zcela statisticky nepřínosná. Nepodařilo se prokázat jakoukoliv souvislost mezi mírou exprese EGFR1 v tomto kompartmentu a rozsahem provedeného výkonu. (obr 3.3.1.1.)

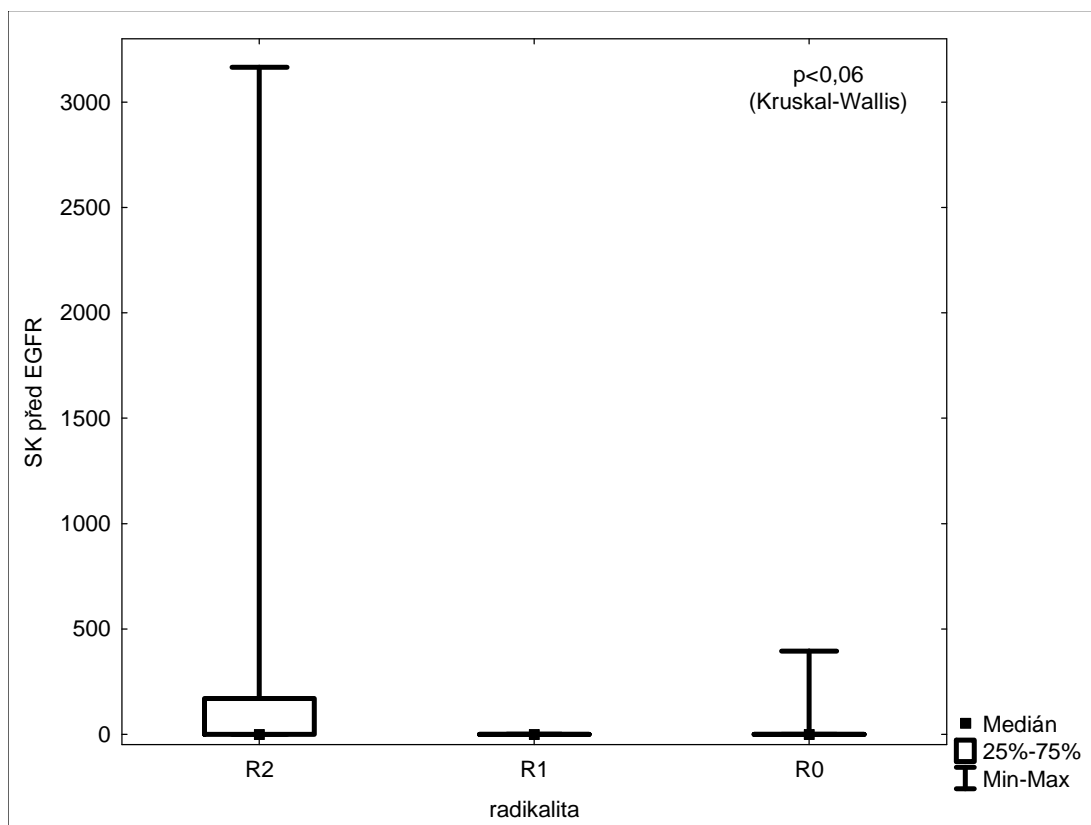
**Obr.3.3.1.2. Expres EGFR1 v portální krvi vzhledem ke stadiu onemocnění**



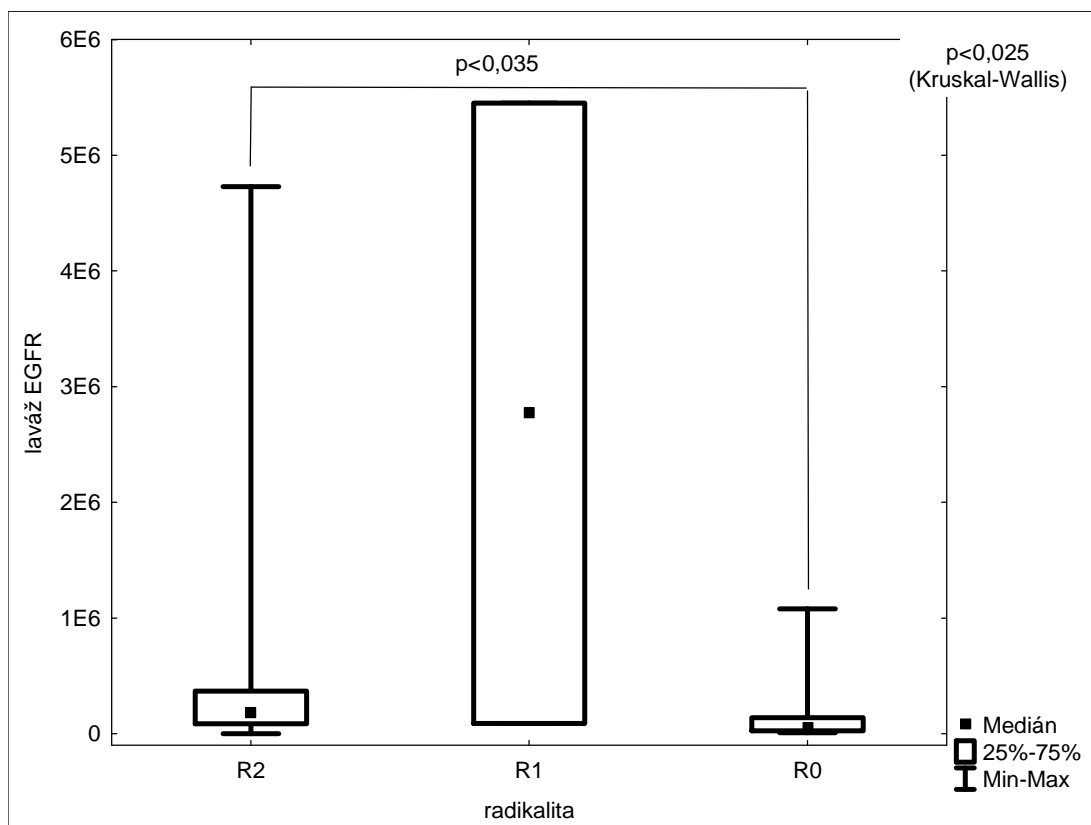
Další korelovanou klinickopatologickou veličinou byl vztah klinického stadia dle TNM klasifikace v modifikaci UICC, vzhledem k expresi EGFR1 v portální krvi. Zde byl prokázán statisticky signifikantní vztah mezi mírou exprese EGFR1 a klinickým stadiem a to tak, že čím vyšší stadium, tím vyšší míra exprese EGFR1 v portální krvi ( $p < 0,006$ ). (obr.3.3.1.2.)

Vztah mezi expresí EGFR1 v systémové krvi a radikalitou výkonu, byl stejně jako v případě exprese EGFR1 v portální krvi statisticky zcela nepřínosný a nehodnotitelný. (Obr 3.3.1.3.)

**Obr.3.3.1.3. Expresa EGFR1 v systémové krvi vzhledem k radikalitě**



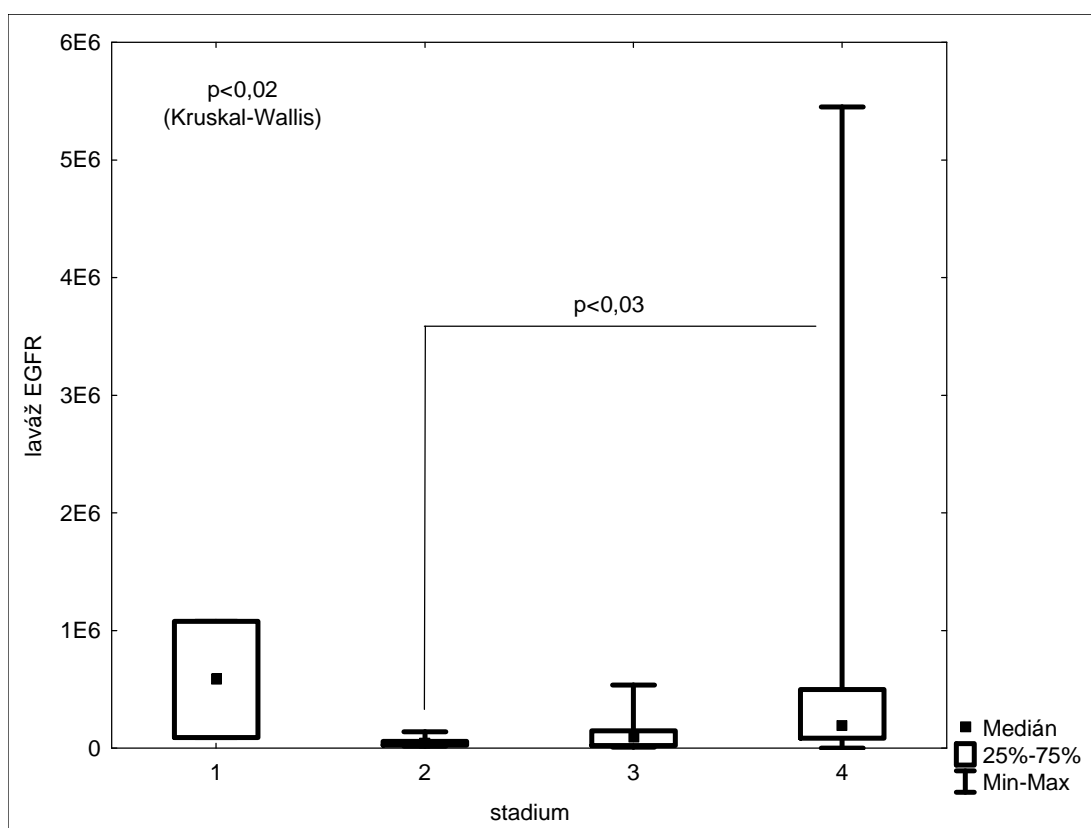
**Obr.3.3.1.4. Exprese EGFR1 v peritoneální laváži vzhledem k radikalitě**



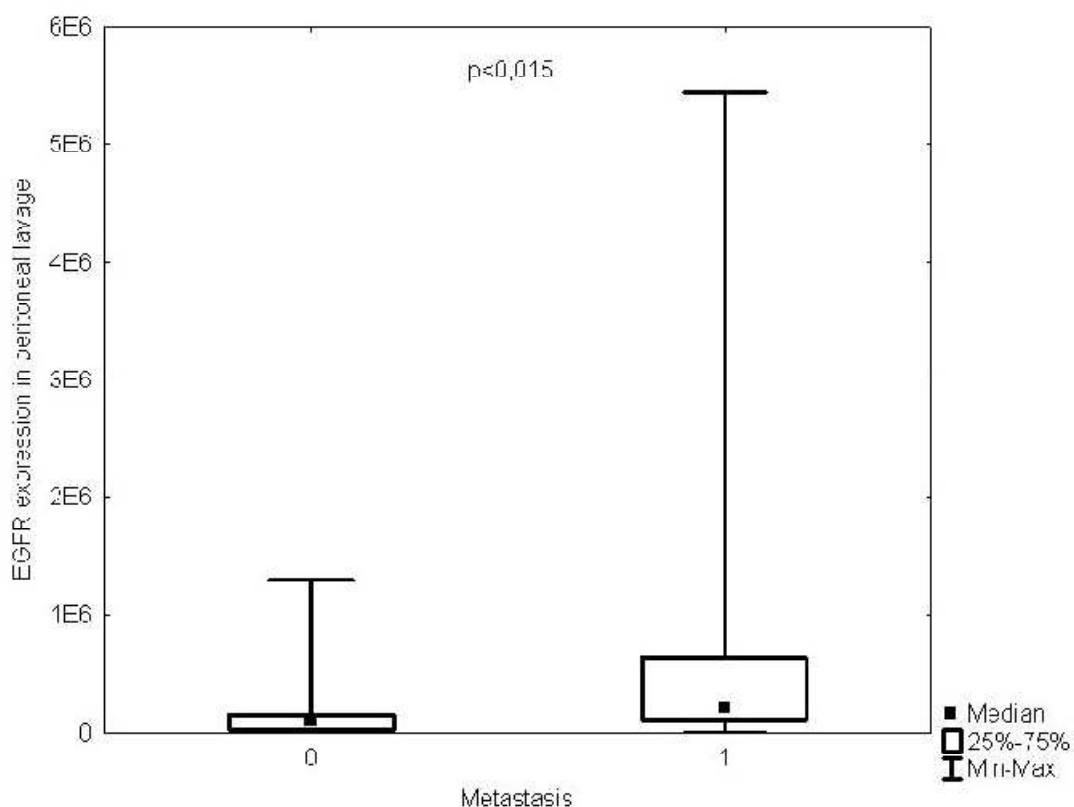
Nebyl prokázán ani statisticky významný vztah mezi expresí EGFR1 v peritoneální laváži a rozsahem operačního výkonu a jeho radikalitě. (obr.3.3.1.4.)

Stejně nepřínosný a neprůkazný byl vztah mezi klinickým stadiem onemocnění dle TNM klasifikace a mírou exprese EGFR1 v peritoneální laváži. (Obr.3.3.1.5)

**Obr.3.3.1.5. Expresse EGFR1 v peritoneální laváži vzhledem ke stadiu**



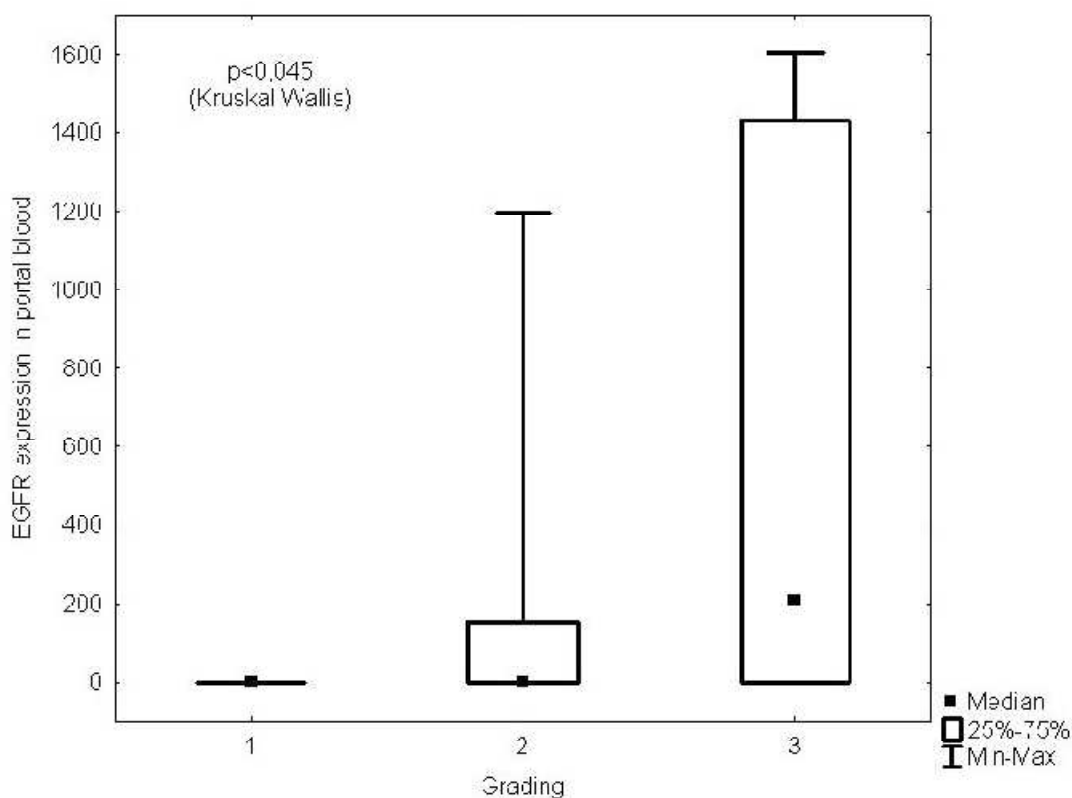
**Obr.3.3.1.6. Exprese EGFR1 v peritoneální laváži vzhledem k přítomnosti metastáz**



Naproti tomu byl prokázán statisticky signifikantní ( $p < 0,015$ ) vztah mezi mírou exprese EGFR1 v peritoneální laváži a přítomností vzdálených metastáz (M1). Přítomnost vzdálených metastáz vykazovala signifikantně vyšší expresi EGFR1 v peritoneální laváži, na rozdíl od pacientů bez peroperačně prokázaného metastatického postižení. (obr.3.3.1.6.)

Zajímavý byl také vztah mezi expresí EGFR1 v portální krvi a gradingu diferenciacie tumoru. Zde byla prokázána statisticky významná závislost ( $p < 0,045$ ) mezi expresí EGFR1 v portální krvi a gradingu. Čím méně diferencovaný byl tumor, tím vyšší byla exprese EGFR1 v portální krvi. (obr.3.3.1.7.)

**Obr.3.3.1.7. Expresa EGFR1 v portální krvi vzhledem ke gradingu**



Souhrnně je tedy možné konstatovat, že byla prokázána statisticky významná souvislost mezi mírou exprese EGFR1 v portální krvi a klinickým stadiem ( $p < 0,006$ ) (obr.3.3.1.2), kde pacienti s pokročilým onemocněním mají vyšší expresi EGFR1 v portálním řečišti, než pacienti s nízkým stadiem onemocnění. Obdobně koreluje vztah exprese EGFR1 v peritoneální laváži pacientů s metastatickým postižením, kdy je míra exprese EGFR1 signifikantně vyšší u pacientů generalizovaných, na rozdíl od pacientů bez metastáz ( $p < 0,015$ ) (obr.3.3.1.6). Dále byla prokázána korelace mezi mírou exprese EGFR1 v portální krvi se stupněm diferenciacie primárního tumoru, kdy pacienti s tumory G3 mají statisticky významně vyšší expresi EGFR1 ( $p < 0,045$ ) (obr.3.3.1.7). U ostatních sledovaných parametrů, tj. vztah exprese EGFR1 v portální



a systémové krvi vzhledem k radikalitě (obr.3.3.1.1. a 3.3.1.3), exprese EGFR1 v peritoneální laváži vzhledem k radikalitě a stadiu (obr.3.3.1.4. a 3.3.1.5), se staticky významné souvislosti nepotvrdily.

### 3.3.2. Vztah exprese CEA a sledovaných parametrů

Dalším sledovaným markerem, byla míra exprese CEA v *portální krvi* vzhledem :

1. k pozitivitě uzlin (obr.3.3.2.1),
2. ke klinickému stadiu dle TNM (obr.3.3.2.2),

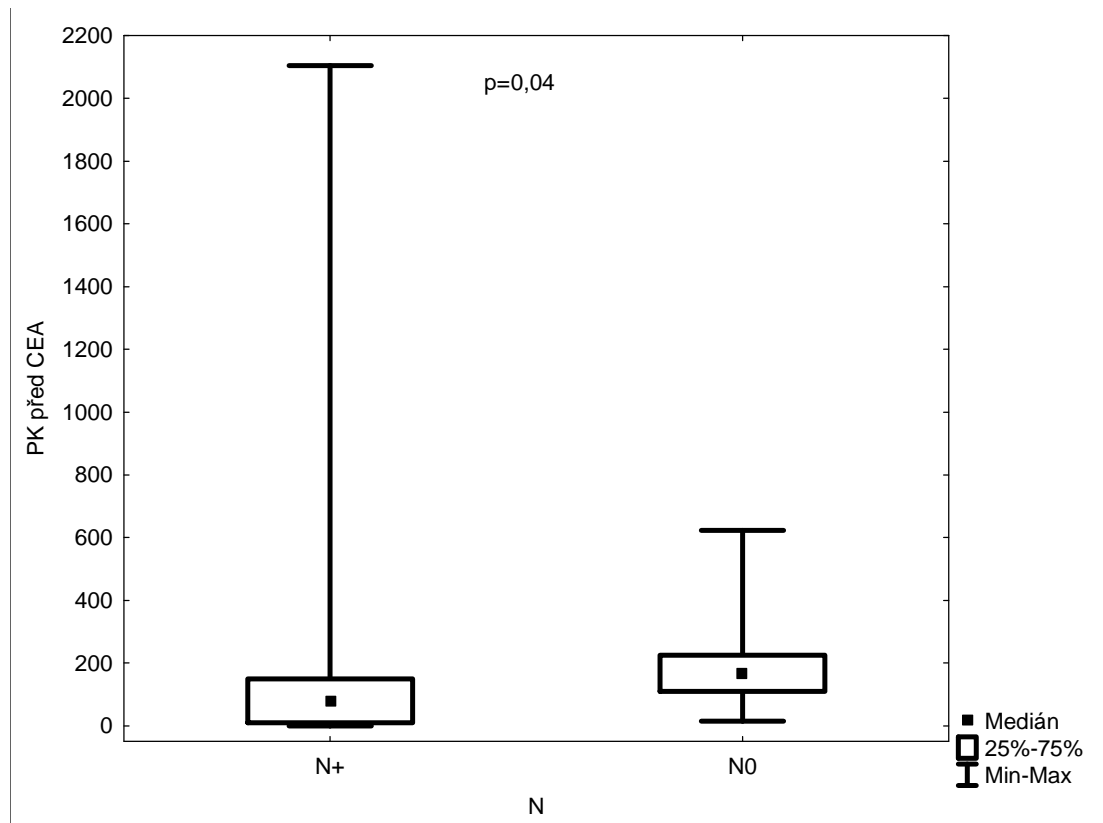
Dále byla korelována míra exprese CEA v *systémové krvi* vzhledem :

1. k pozitivitě lymfatických uzlin na přítomnost mikrometastáz (obr.3.3.2.3)
2. ke klinickému stadiu dle TNM klasifikace (obr.3.3.2.4)

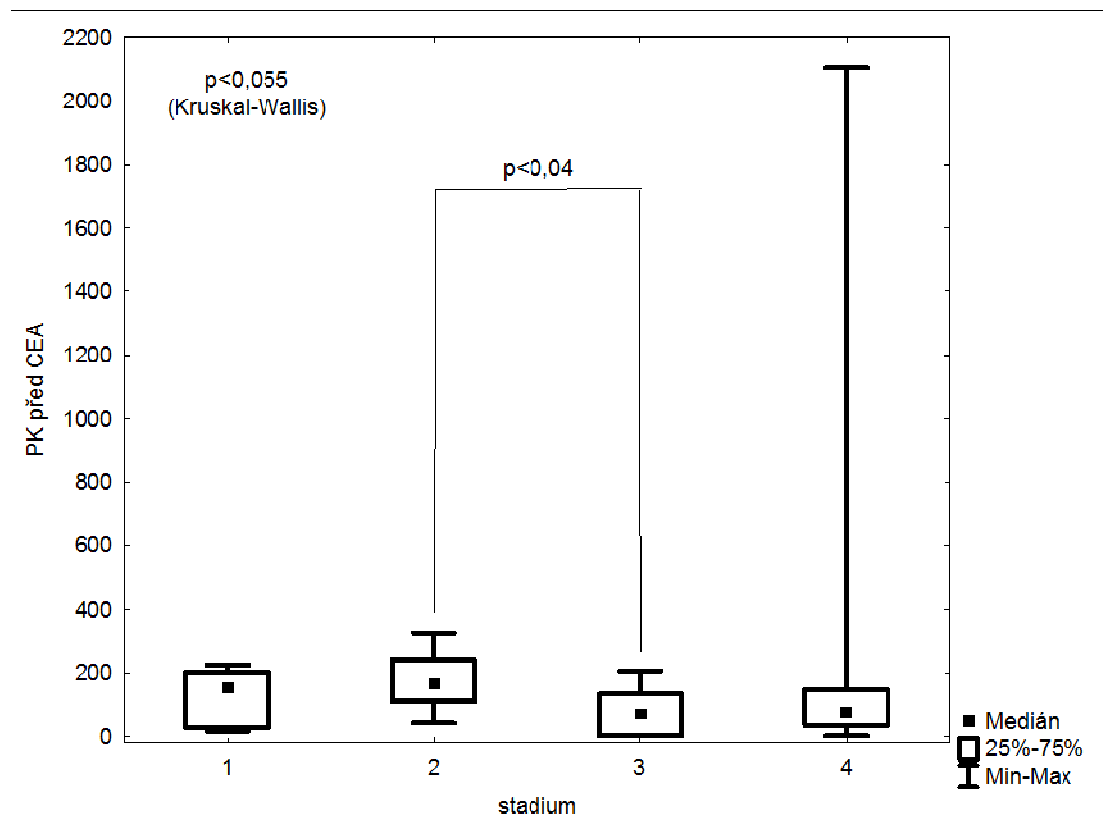
Míra exprese CEA v peroperačně odebírané *peritoneální laváži* byla korelována vzhledem ke klinickému stadiu dle TNM (obr.3.3.2.5)

V případě korelace míry exprese CEA v portální krvi vzhledem k pozitivitě metastatického postižení lymfatických uzlin, bez závislosti na jejich lokalizaci, byla pozorována statisticky signifikantní závislost ( $p=0,04$ ) mezi mírou exprese CEA a pozitivitou lymfatických uzlin, kdy výrazně vyšší exprese tohoto markeru byla sledována u nemocných s metastatickým postižením lymfatických uzlin. (obr.3.2.2.1.)

**Obr.3.3.2.1. Expresse CEA v portální krvi vzhledem k pozitivitě uzlin**



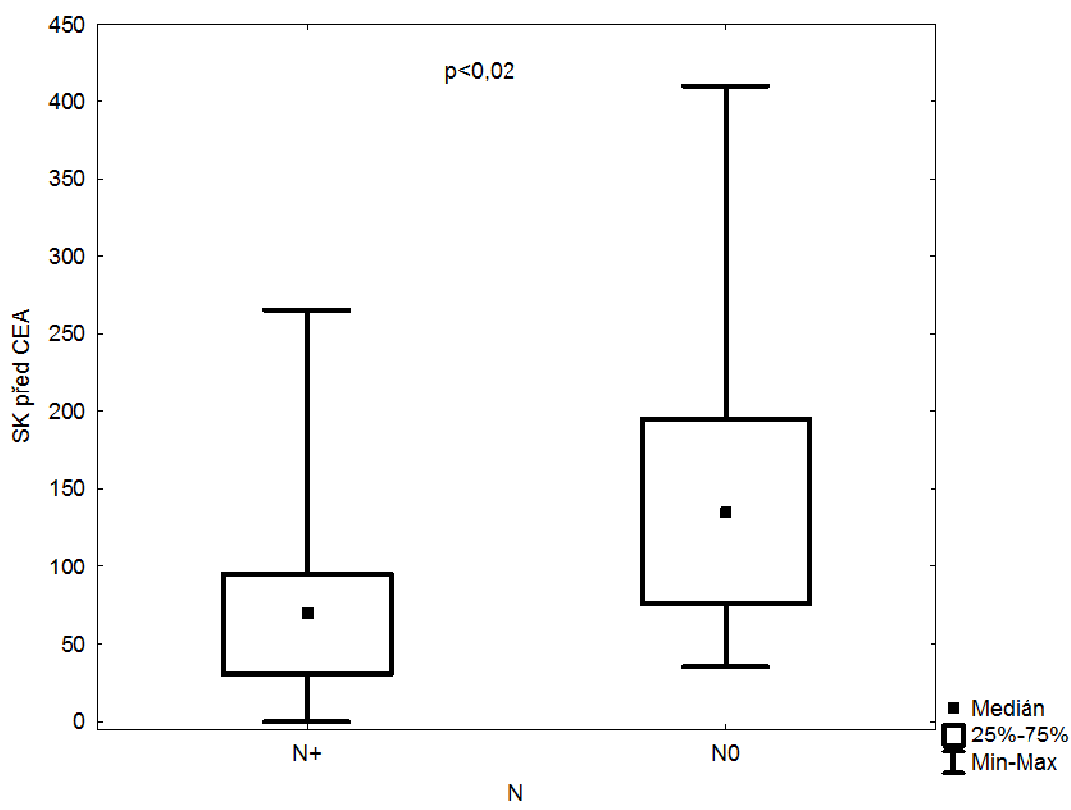
**Obr.3.3.2.2. Expresse CEA v portální krvi vzhledem ke stadiu**



Vztah exprese CEA v portální krvi nevykazoval žádnou statistickou souvislost s klinickým stadiem onemocnění dle TNM klasifikace. (obr.3.3.2.2.)

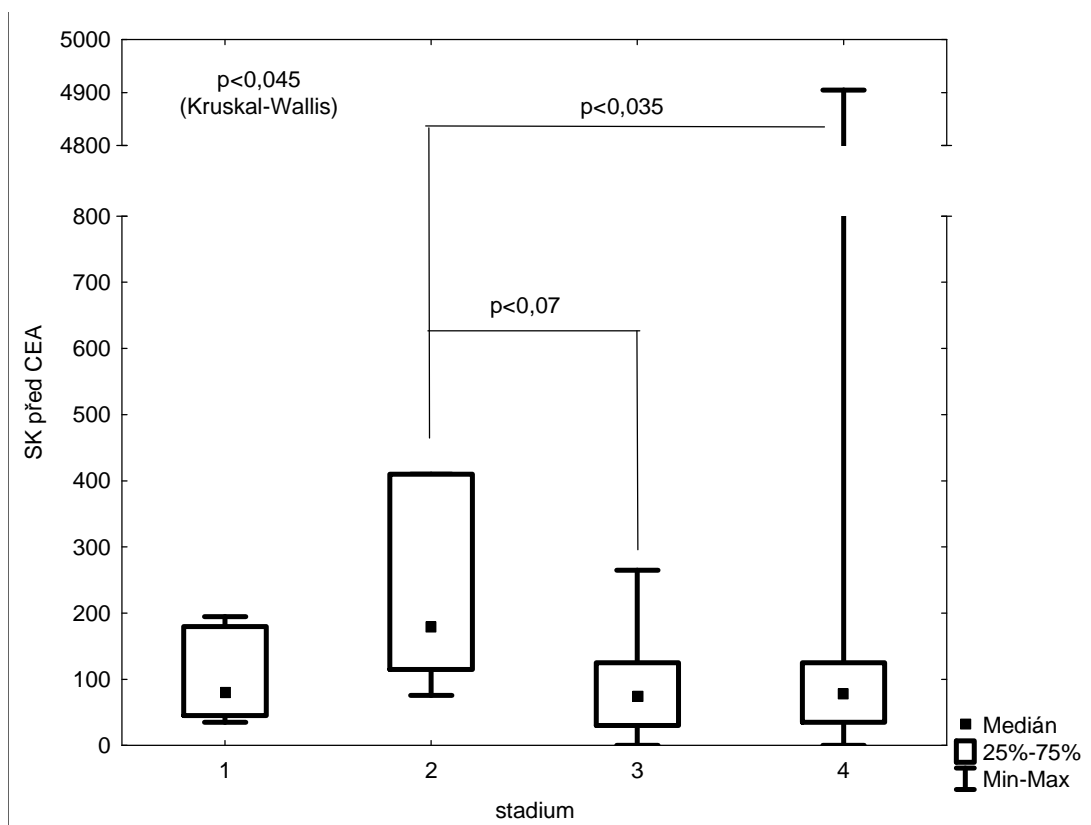
Také vztah exprese CEA v systémové krvi vzhledem k pozitivitě uzlin nebyl nijak přínosný. (obr.3.3.2.3.)

**Obr.3.3.2.3. Expresse CEA v systémové krvi vzhledem k pozitivitě uzlin**

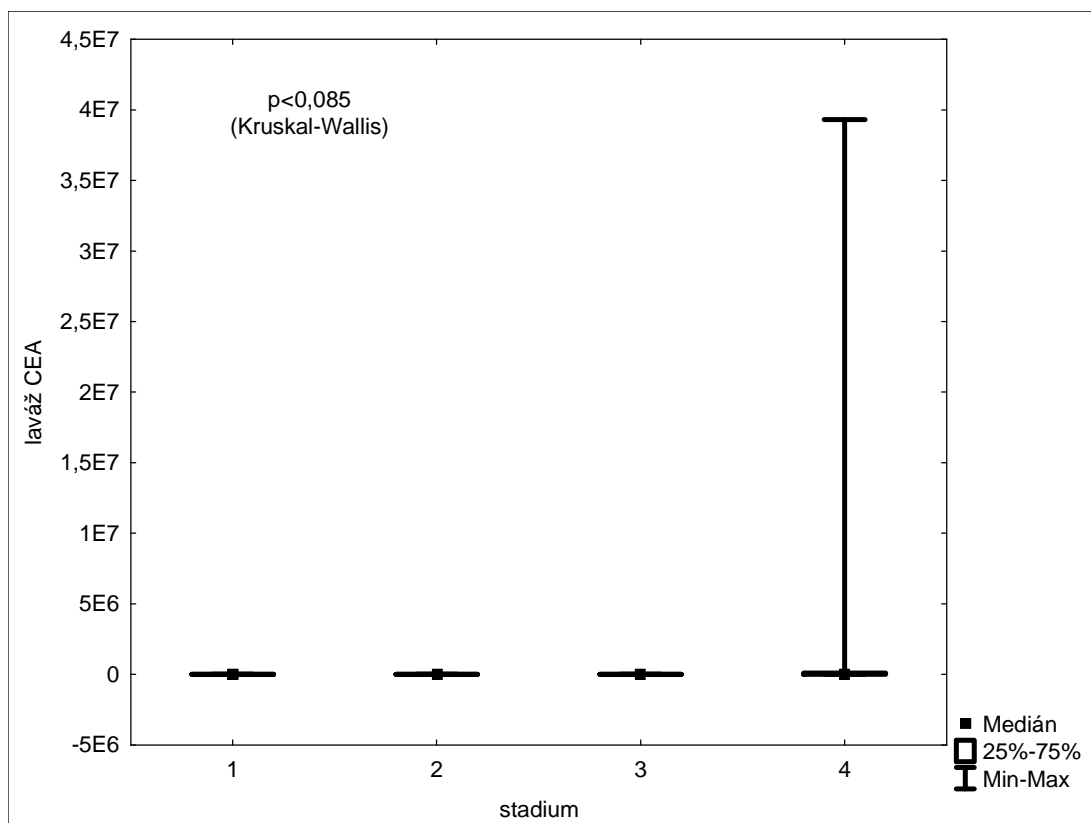


Bohužel ani vztah exprese CEA v systémové krvi a peritoneální laváži vzhledem ke klinickému stadiu (obr.3.3.2.4., 3.3.2.5.) nevykazoval žádnou souvislost a nebyl tedy statisticky významný.

**Obr.3.3.2.4. Expresse CEA v systémové krvi vzhledem ke klinickému stadiu**



**Obr.3.3.2.5. Expresse CEA v peritoneální laváži vzhledem ke stadiu**



V případě exprese CEA v jednotlivých kompartmentech vzhledem ke sledovaným parametrům se podařilo prokázat pouze jedinou statistickou souvislost, a to mezi mírou exprese CEA v portální krvi a pozitivitou postižení lymfatických uzlin, kdy vyšší míru exprese CEA ( $p=0,04$ ) v tomto prostoru mají pacienti s pozitivními uzlinami, na rozdíl od pacientů bez pozitivních mikrometastáz v uzlinách. Další sledované parametry byly neprůkazné.

### **3.3.3. Vztah exprese h-TERT a sledovaných parametrů v jednotlivých kompartmentech**

Posledním sledovaným markerem byla telomeráza.

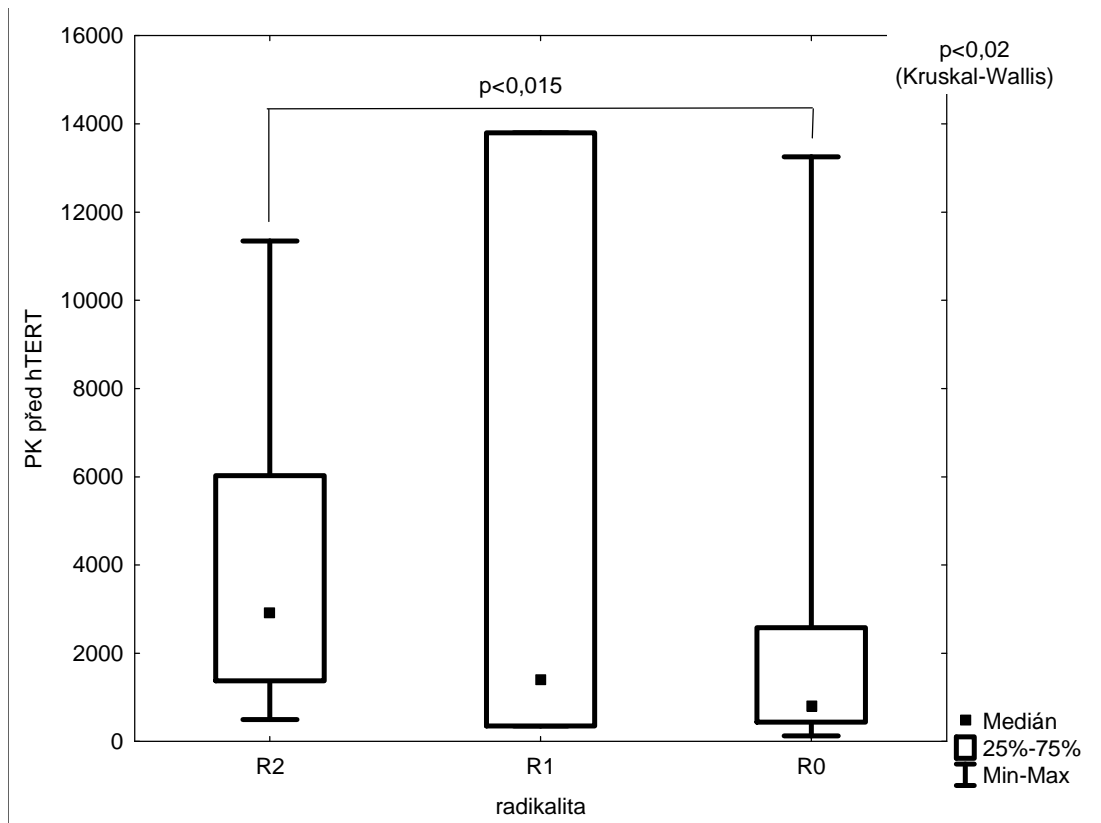
Míra exprese tohoto markeru v *portální krvi* byla korelována vzhledem:

1. k radikalitě výkonu (obr.3.3.3.1) a
2. ke klinickému stadiu (obr.3.3.3.2)

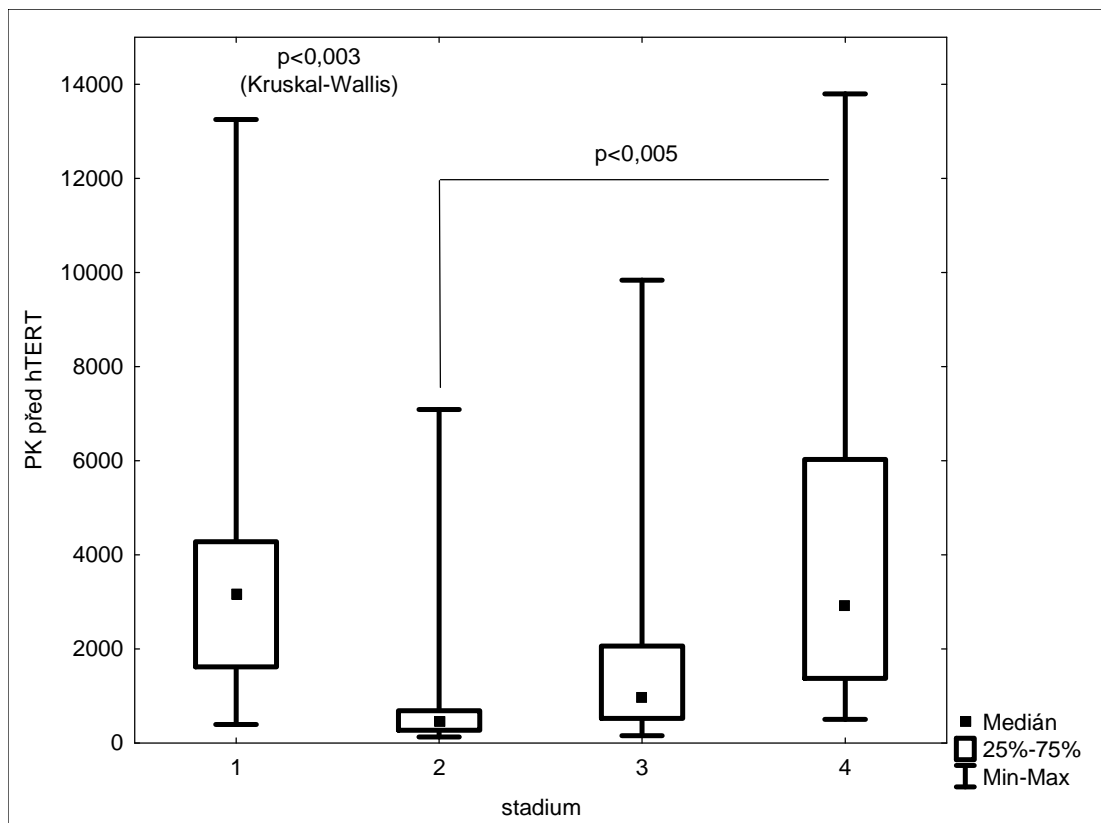
Dále byla sledována míra exprese hTERT v *systémové krvi* vzhledem ke klinickému stadiu (obr.3.3.3.3) .

Bohužel ani v jednom případě, jak dokládají následující grafy, se neprokázala statisticky významná spojitost mezi sledovanými a korelovanými daty.

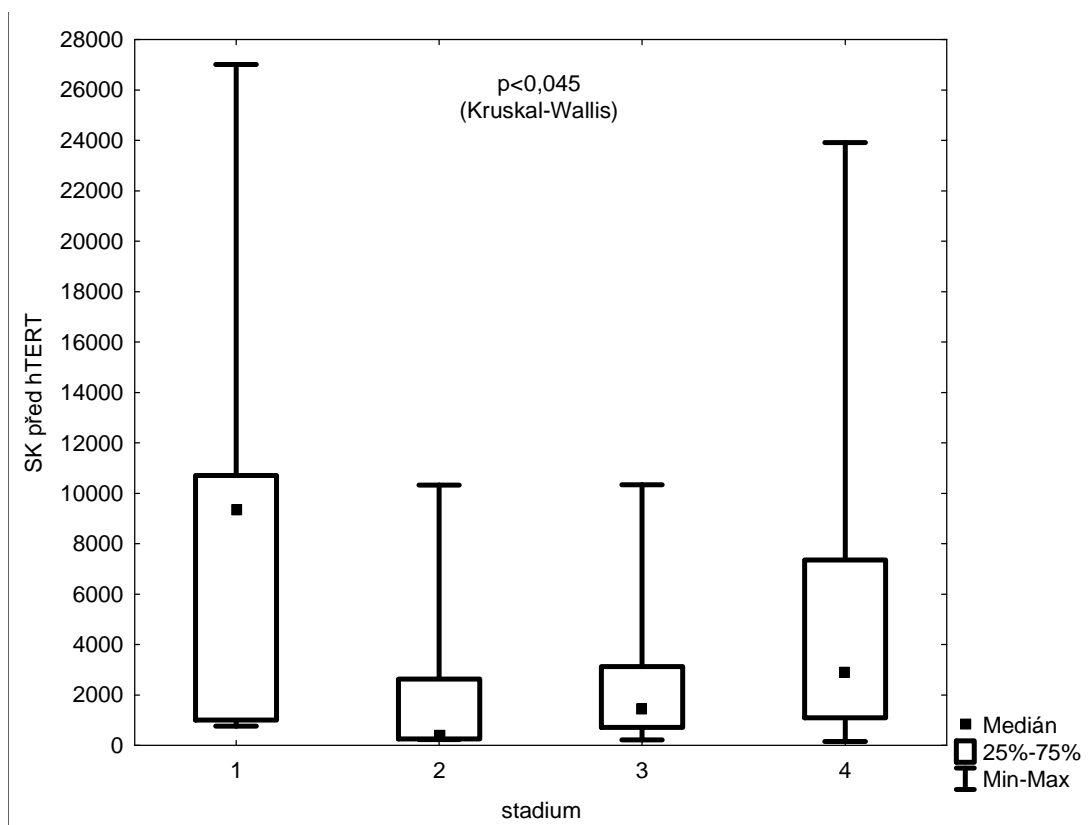
**Obr.3.3.3.1. Expresse hTERT v portální krvi vzhledem k radikalitě výkonu**



**Obr.3.3.3.2. Expresse hTERT v portální krvi vzhledem ke stadiu**



**Obr.3.3.3.3. Expres hTERT v systémové krvi vzhledem ke stadiu**

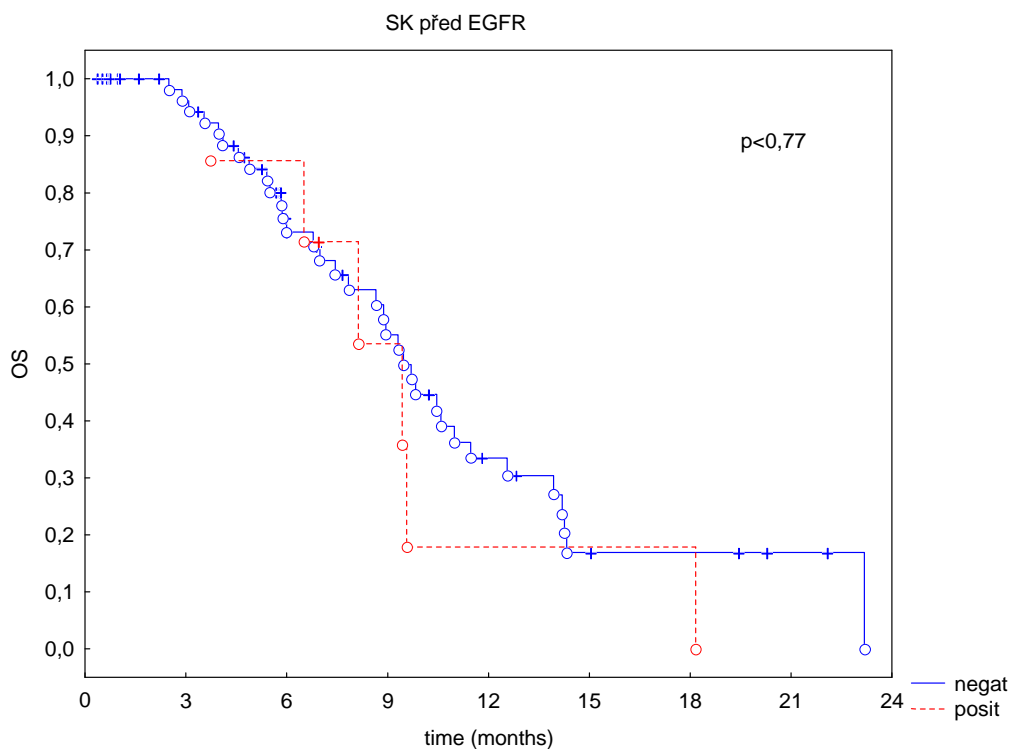


Telomeráza byla vyhodnocena jako nevhodný marker k určení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu. Tento biomarker vykazoval příliš nízkou expresi v jednotlivých nádorech pacientů a příliš vysokou expresi v systémové krvi zdravých dárců. Pravděpodobně je to způsobeno vysokou expresí hTERT v cirkulujících zárodečných buňkách v krvi nebo regulací telomerických délek telomeráza nezávislým mechanismem. Z uvedených výsledků vyplývá, že jsme neprokázali ani v jednom případě vztah expresi hTERT a sledovaných parametrů.

### 3.3.4. Korelace pozitivita sledovaných markerů v kostní dřeni, peritoneální laváži, systémové a portální krvi vzhledem přežívání

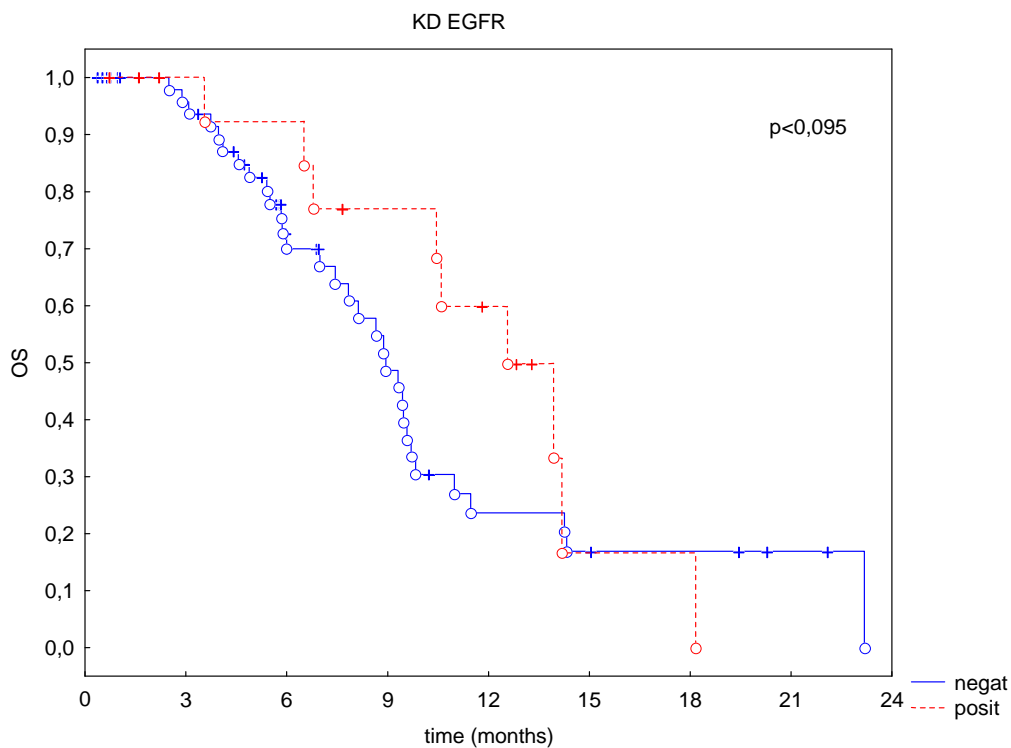
Dalším cílem naší práce bylo určit, zda-li je možné minimální reziduální chorobu u karcinomu pankreatu na základě míry exprese EGFR1, CEA a hTERT v portální a systémové krvi, kostní dřeni a peritoneální laváži, použít jako nezávislý prognostický faktor, tzn. jestli v souboru našich pacientů lze vystopovat některou z rizikových skupin nemocných. Byla tak korelována míra exprese EGFR1 v systémové krvi (obr.3.3.4.1), v kostní dřeni (obr.3.3.4.2), v portální krvi (obr.3.3.4.3) a peritoneální laváži (obr.3.3.4.4) vzhledem k přežívání.

**Obr.3.3.4.1. Vztah přežívání nemocných k míře exprese EGFR1 v systémové krvi**

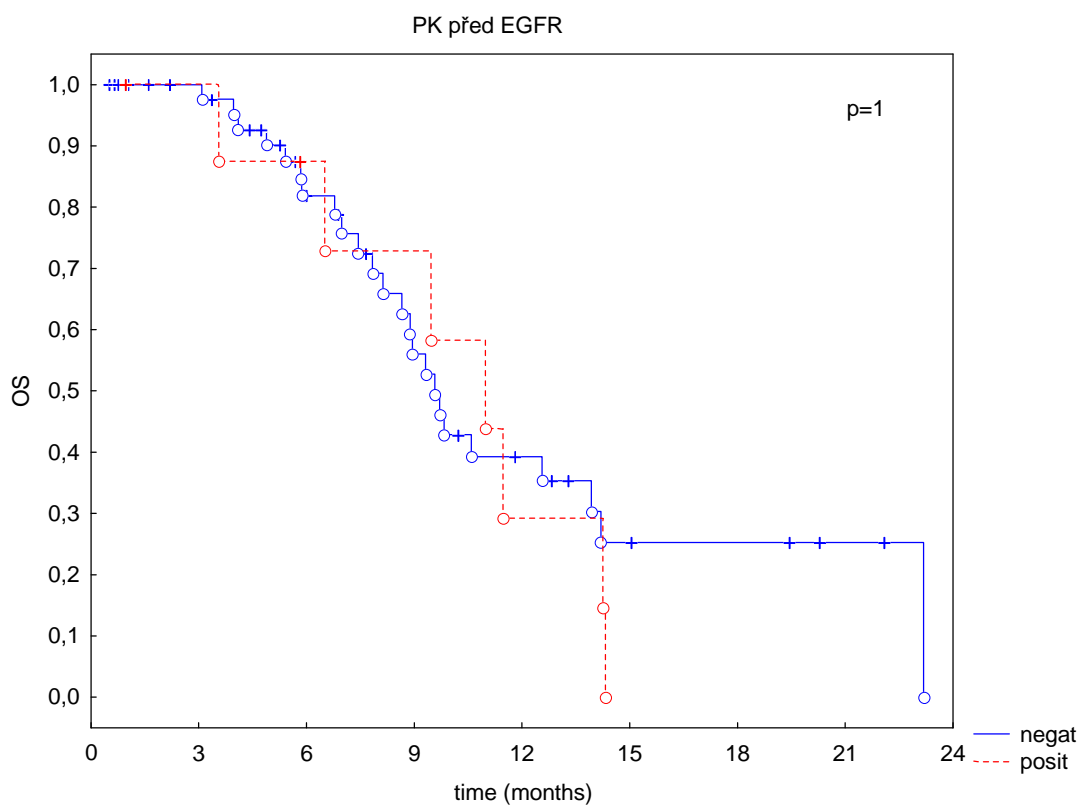




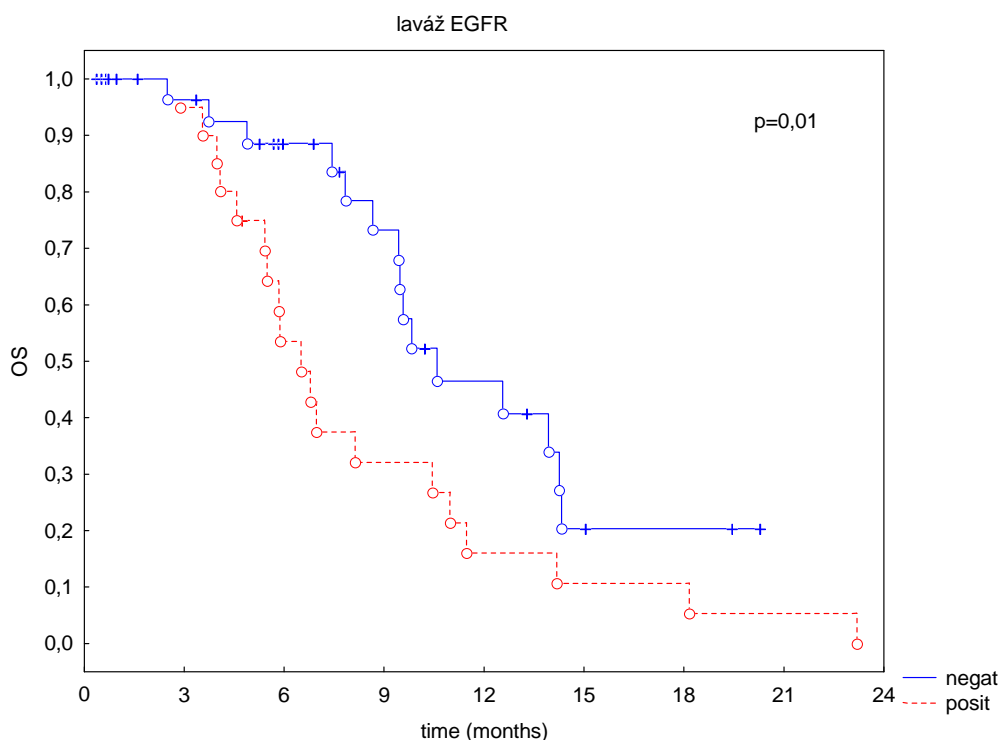
**Obr.3.3.4.2. Vztah přežívání nemocných k míře exprese EGFR1 v kostní dřeni**



**Obr.3.3.4.3. Vztah přežívání nemocných k míře exprese EGFR1 v portální krvi**



**Obr.3.3.4.4. Vztah přežívání nemocných k míře exprese EGFR1 v peritoneální laváži**

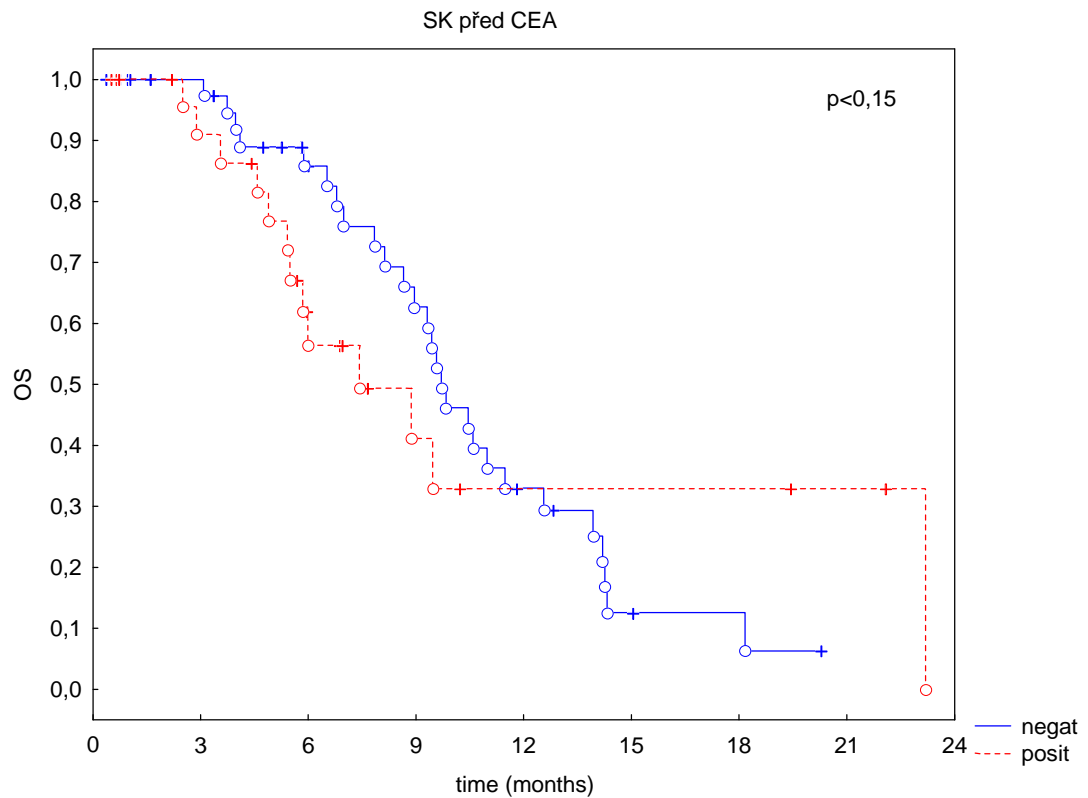


Z výše uvedených grafů vyplývá, že pozitivita EGFR1 v pooperační peritoneální laváži znamená kratší celkové přežívání ( $p=0,01$ ). U ostatních kompartmentů nebyl sledován signifikantní rozdíl v přežívání při pozitivitě exprese EGFR1 v daném prostoru.

Dále byl sledován vztah míry exprese CEA opět v systémové krvi (obr.3.3.4.5), v kostní dřeni (obr.3.3.4.6), portální krvi (obr.3.3.4.7) a peritoneální laváži (obr.3.3.4.8), vzhledem k přežívání v našem souboru nemocných.

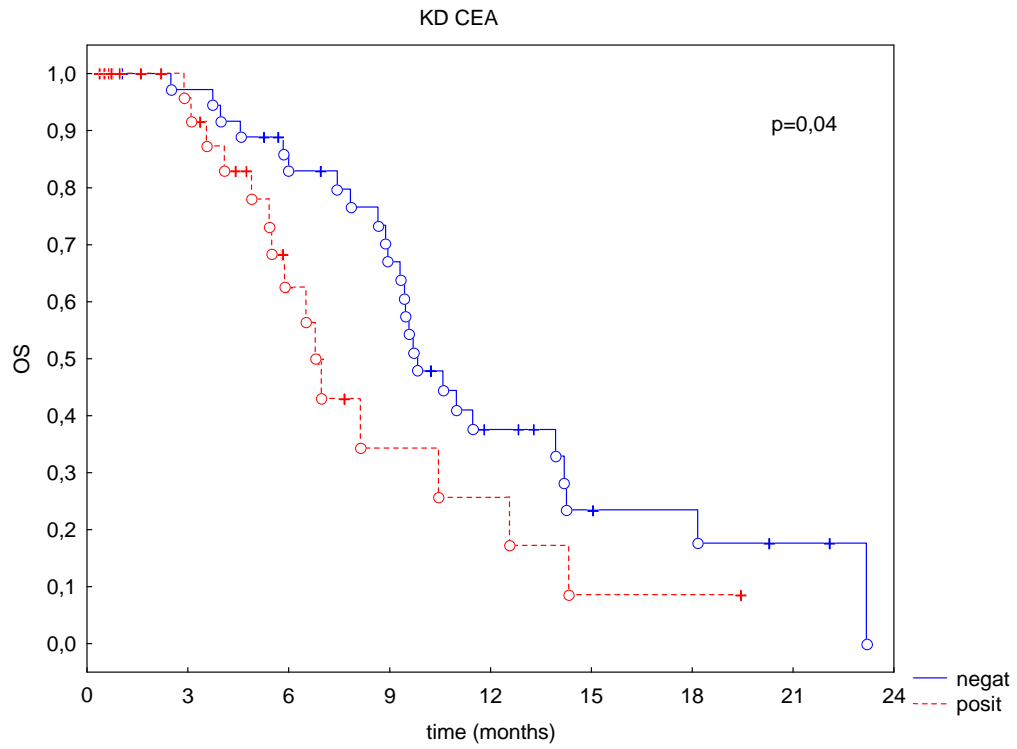
V případě korelace exprese CEA v systémové krvi a délce přežívání nebyl prokázán statisticky významný vztah.

**Obr.3.3.4.5. Vztah přežívání nemocných k míře exprese CEA v systémové krvi**

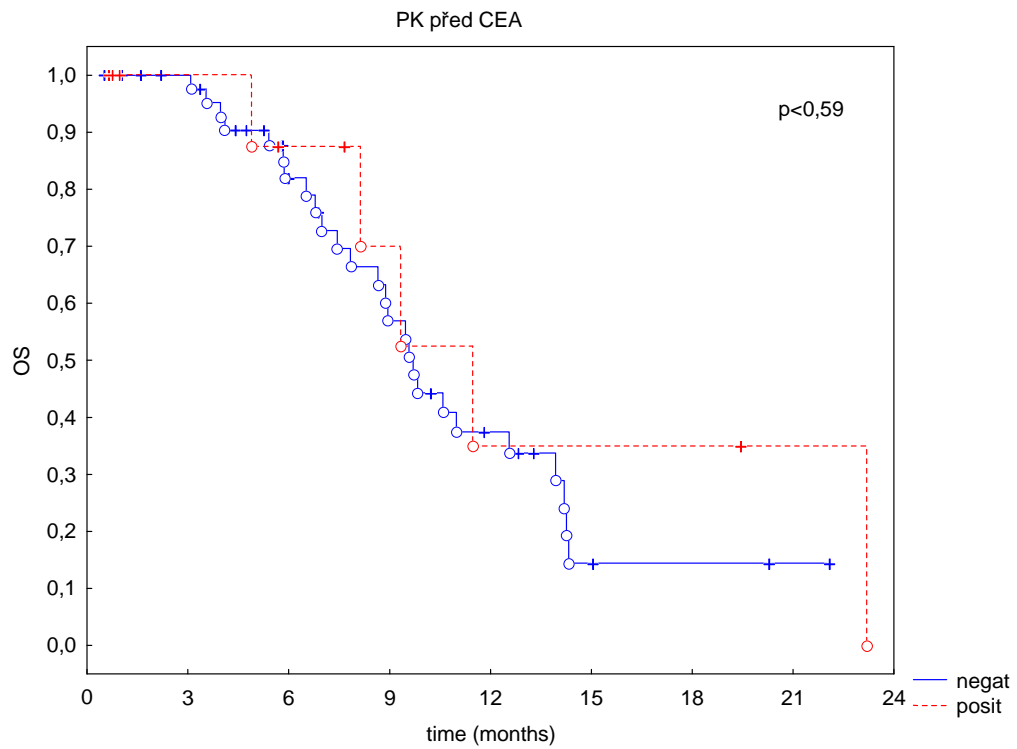


Naopak bylo prokázáno, že míra exprese CEA v kostní dřeni koreluje s délkou přežívání. Pacienti s pozitivním nálezem exprese CEA měli signifikantně nižší dobu přežívání, než pacienti s nálezem negativní exprese.(obr.3.3.4.6.)

**Obr.3.3.4.6. Vztah přežívání nemocných k míře exprese CEA v kostní dřeni**

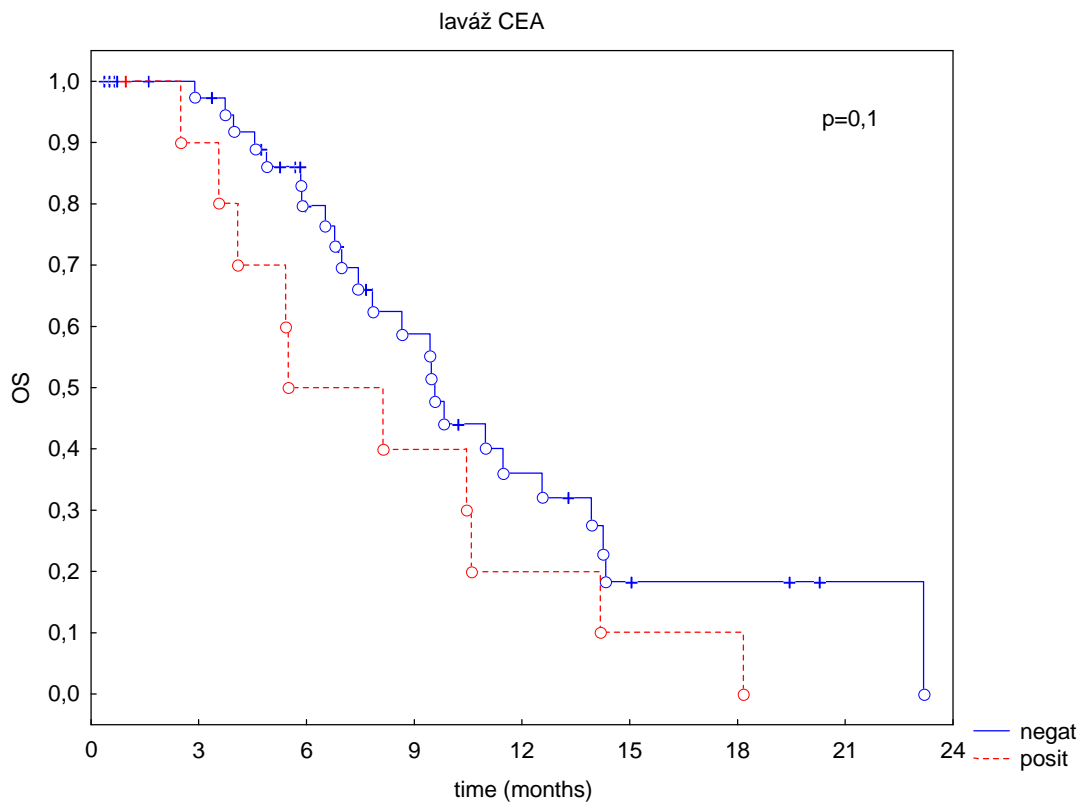


**Obr.3.3.4.7. Vztah přežívání nemocných k míře exprese CEA v portální krvi**



Expresí CEA v portální krvi vzhledem k přežívání byla statisticky nesignifikantní, na rozdíl od míry exprese CEA v peritoneální laváži (obr.3.3.4.8.), kde pozitivita značila nižší délku přežití.

**Obr.3.3.4.8. Vztah přežívání nemocných k míře exprese CEA v peritoneální laváži**

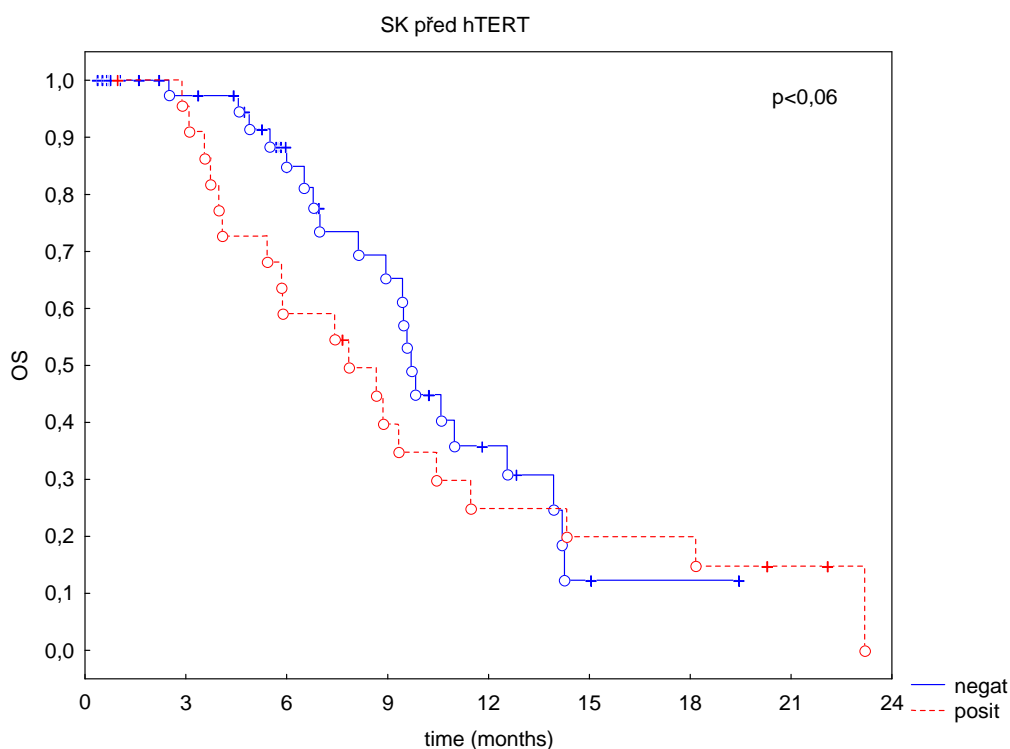


Při posuzování vztahu přežití v našem souboru pacientů s mírou exprese CEA v jednotlivých tělních prostorech, byl tedy konstatován významný vztah mezi mírou exprese v peritoneální laváži ( $p=0,1$ ) a kostní dřeni ( $p=0,04$ ), kdy pozitivita exprese CEA v těchto kompartmentech značila nižší přežívání. V případě portální a systémové krve se tento vztah nepotvrdil.

Posledním sledovaným markerem byla míra exprese telomerázy v systémové krvi (obr.3.3.4.9), kostní dřeni (obr.3.3.4.10), portální krvi (obr.3.3.4.11) a peritoneální laváži (obr.3.3.4.12) a délkou přežívání.

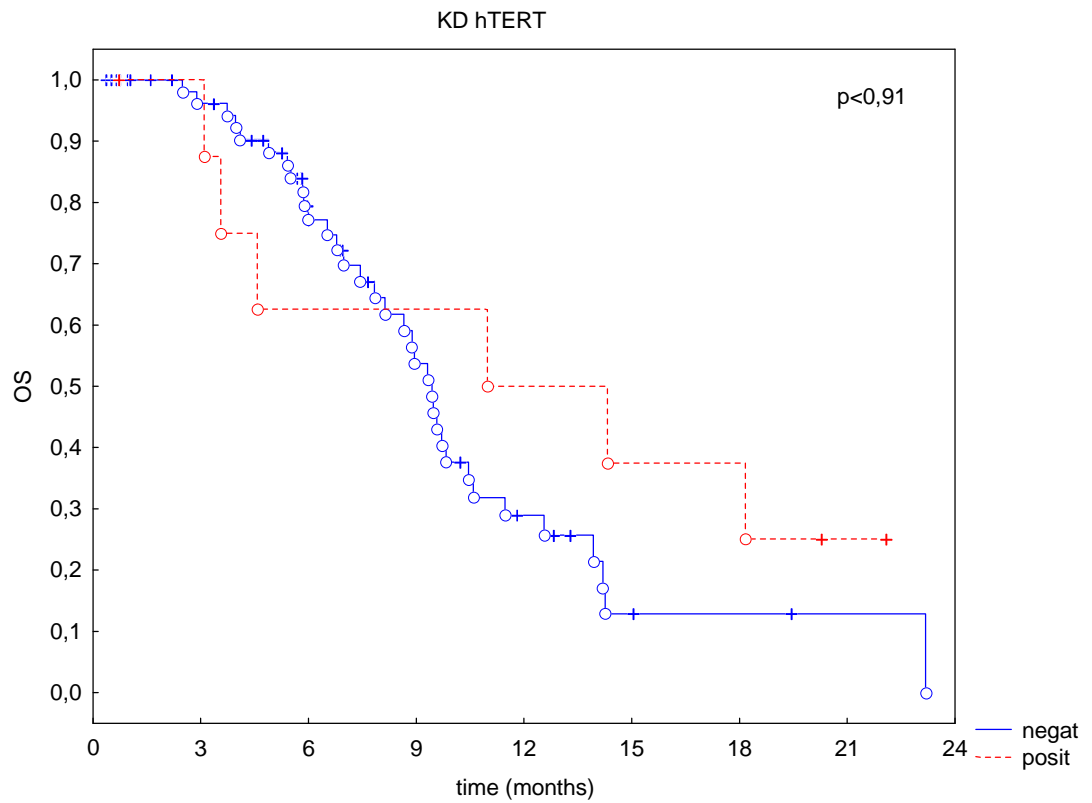
V případě korelace vztahu přežívání nemocných k míře exprese telomerázy v systémové krvi byla prokázána statisticky významnou souvislost ( $p < 0,06$ ), kdy pozitivní exprese telomerázy v tomto kompartmentu, značí nižší přežívání. (obr.3.3.4.9.)

**Obr.3.3.4.9. Vztah přežívání nemocných k míře exprese hTERT v systémové krvi**

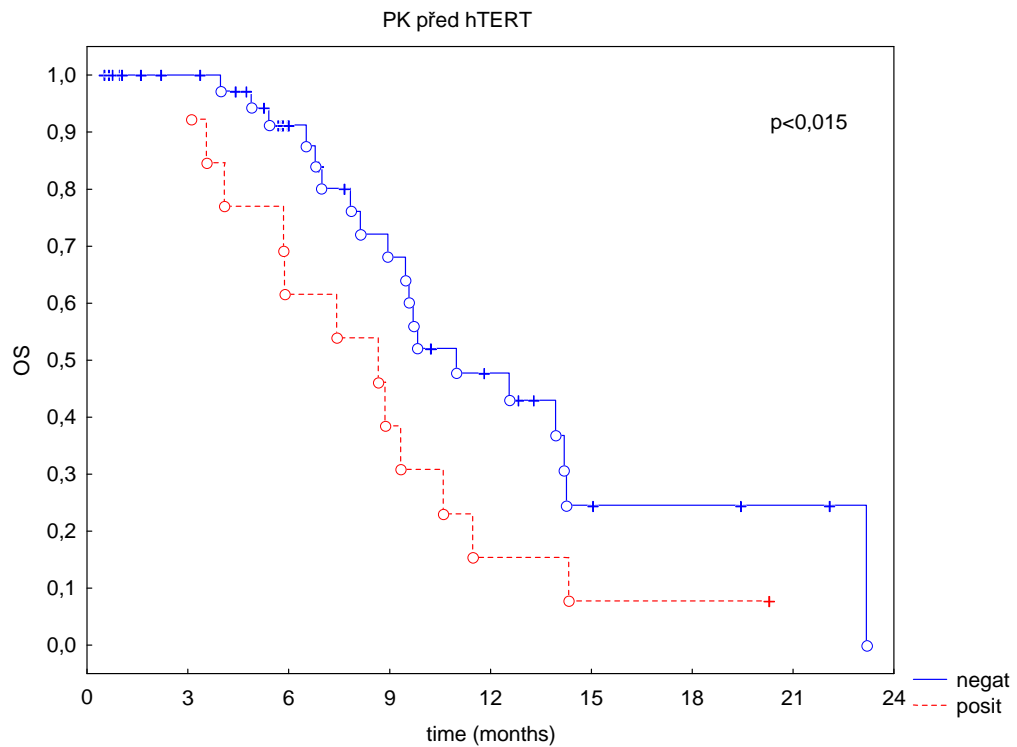


V případě exprese telomerázy v kostní dřeni vzhledem k přežívání nebyl prokázán žádný statisticky významný vztah. (obr.3.3.4.10.)

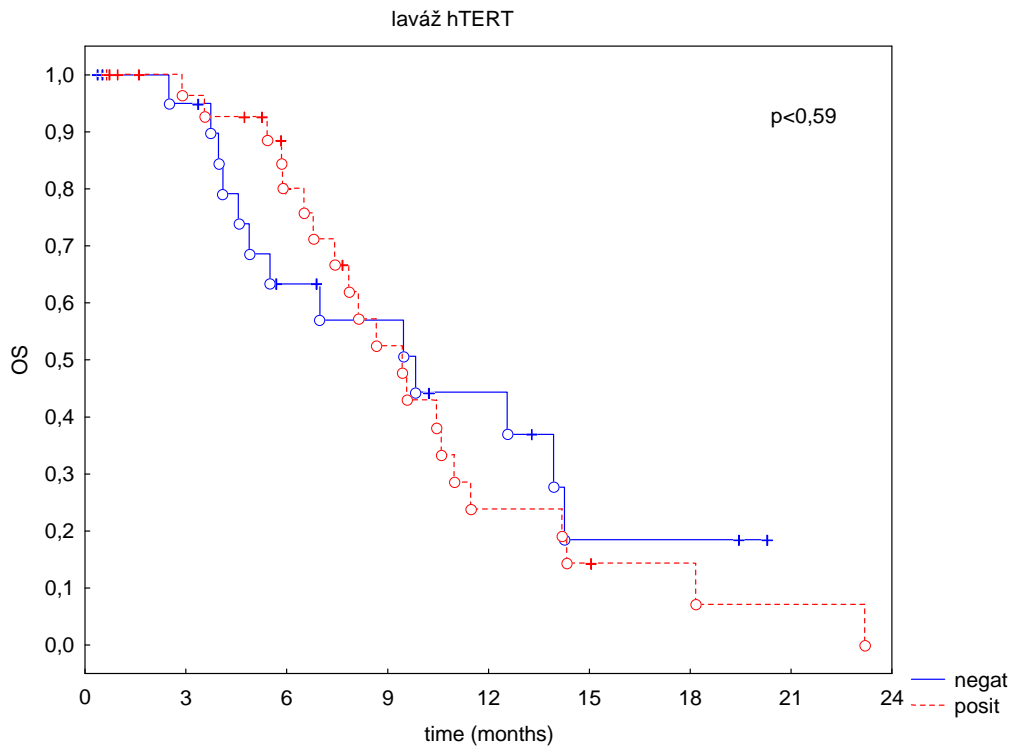
**Obr.3.3.4.10. Vztah přežívání nemocných k míře exprese hTERT v kostní dřeni**



**Obr.3.3.4.11. Vztah přežívání nemocných k míře exprese hTERT v portální krvi**



**Obr.3.3.4.12. Vztah přežívání nemocných k míře exprese hTERT v peritoneální laváži**



Stejně nepřínosný byl i vztah mezi expresí telomerázy v peritoneální laváži a délkou přežívání, na rozdíl od exprese telomerázy v portální krvi, kde byla prokázána statisticky významná souvislost ( $p < 0,015$ ). Nemocní s pozitivní expresí telomerázy v tomto kompartmentu měli výrazně nižší interval přežívání, než nemocní s negativní expresí.



## 4. Souhrnné výsledky a diskuze

Jak už bylo zmíněno, minimální reziduální chorobou rozumíme přítomnost izolovaných nádorových buněk cirkulujících v těle pacienta a jeho tělesných kompartmentech před a po odstranění nádorového primoložiska, v daném případě adenokarcinomu pankreatu. Tyto izolované buňky podle současných znalostí považujeme za prekuzory nádorového onemocnění, avšak přesný mechanismus, přesnou genezi přechodu od těchto buněk k vlastní metastatické mase, dosud neznáme.

Adenokarcinom pankreatu představuje vysoce agresivní tumor, který svou biologickou aktivitou a maligním potenciálem jen stěží hledá konkurenta mezi solidními nádory. Tomu odpovídá i naprosto tragická délka přežívání nemocných, kdy pětileté přežívání je popisováno asi u 2-4% z celkového počtu nemocných. Léčba je multimodální a prakticky jedinou potenciálně kurabilní metodou je chirurgická R0 resekce. Přestože pouze pacienti po radikální operaci mají šanci na delší přežívání, je nutné konstatovat, že chirurgický způsob léčení adenokarcinomu pankreatu představuje víceméně uzavřenou kapitolu a nelze v budoucnosti očekávat, že by nějaký technicky modifikovaný styl resekce, ať už ve smyslu rozsahu výkonu (břišní kvadrantektomie, resekce pankreatu společně s pravostrannou hemikolektomií [164]), či změně přístupu – miniinvazivní, laparoskopický, vedl k radikální změně délky přežívání pacientů. Je zřejmé, že targeting strategie léčby je nutné zaměřit na úroveň molekulárně-biologickou, na úroveň kancerogeneze, kde pochopení jednotlivých mechanismů vlastního rozvoje nádorového procesu umožní zahájit individuální cílenou léčbu u daného pacienta.

Pro detekci minimální reziduální choroby u solidních nádorů lze použít několika metodických postupů, které se od sebe liší v pracnosti, nákladnosti, specifičnosti a především senzitivitě. Mezi nejcitlivější metody průkazu nádorových markerů patří imunocytohistochemie a moderní metody molekulární biologie, které dosahují citlivosti až  $1:10^{-7}$  a jsou tedy zhruba o dva řády citlivější než imunocytochemie [165-168]. Metoda real-time RT-PCR je v podstatě studiem genové exprese, kdy jsou nádorové buňky detekovány na úrovni informační, messengerové RNA. Metoda

vyniká svou specificitou a v závislosti na použitém markeru nádorových buněk i svou senzitivitou. Tu stanovujeme na základě vyšetření zdravých jedinců, od nichž odvozujeme tzv. „cut-off“ hodnotu, jako průměr plus dvakrát směrodatná odchylka, čili 97,5% zdravých jedinců bude MRD negativních.

Dosud nejvíce zkušeností se stanovením minimální reziduální choroby je u kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu. Pro detekci MRD u karcinomu tlustého střeva a konečníku se jako markery nádorových buněk nejčastěji používají CEA a CK 20 [146,169]. Použití této multimarkerové analýzy je také spolehlivější než analýzy stanovení minimální reziduální choroby založené na jediném markeru [170]. V případě karcinomu prsu byly jako markery použity MGB1 a CEA. V několika recentních studiích byla u pacientů s kolorektálním karcinodem prokázána vyšší prognostická hodnota přítomnosti cirkulujících nádorových buněk v kontrolních, pooperačních vzorcích periferní krve, než ve vzorcích předoperačních [161]. Načasování odběru vzorků krve se také zdá být rozhodující pro odhad významu přítomnosti MRD u pacientů s kolorektálním karcinodem. Ukazuje se, že nádorové buňky uvolněné do krevního řečiště během operace pravděpodobně nemají významný metastatický potenciál [171]. Předpokládá se, že přítomnost MRD je nezávislým prognostickým faktorem u pacientů s kolorektálním karcinodem [165,172]. Dalším vysoce zajímavým uplatněním stanovení MRD je použití u mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinodem prsu. Správný staging nádorového onemocnění je nezbytným předpokladem pro stanovení správné léčby a určení prognózy nemocné. Standardně se využívá klasické TNM klasifikace s histopatologickým vyšetřením axilárních lymfatických uzlin. Exenterace axily je zatížena značným rizikem a to především v podobě možného rozvoje lymfedému, a proto se dnes již běžně využívá stanovení pozitivivity tzv. sentinelové uzliny, jejíž postižení se značnou mírou predikuje postižení dalších axilárních uzlin. Otázkou zůstává, jak postupovat v případě pozitivního nálezu v sentinelové uzlině [173]. Zda-li provést následnou exenteraci axily či nikoliv. Na našem pracovišti při pozitivitě sentinelové uzliny následuje vždy exenterace axily. Přitom je jisté, že pozitivita sentinelové lymfatické uzliny řadí onemocnění do vyššího klinického stadia s nutností následující onkologické léčby, tj. adjuvantní chemoterapie. Bohužel, u třetiny až poloviny pacientek s karcinodem prsu klinického stadia I-II a bez postižení lymfatických uzlin dochází k recidivě

onemocnění. Příčinou jsou pravděpodobně mikrometastázy v lymfatických uzlinách, které nejsou detekovatelné běžnými histopatologickými metodami. Řada studií dokazuje pozitivitu mikrometastáz na základě průkazu exprese genů, nejčastěji CEA, MGB1 a CK19, metodou real-time RT-PCR. Tak např. Gillanders a kol.(2004) [174] publikoval pozitivitu mikrometastáz u 33% pacientek s primárně histopatologicky negativními uzlinami. Další studie Trudeau et al.(1999) [175] popsala postižení 30-40% jinak histopatologicky negativních lymfatických uzlin. Z toho vyplývá, že stanovení minimální reziduální choroby v lymfatických uzlinách u pacientek s karcinomem prsu může působit jako nezávislý prognostický faktor, který vede k přehodnocení stupně postižení nemocných a může indikovat adjuvantní chemoterapii i u žen, které by jinak dle klasické klasifikace a stagingu byly z této léčby vyloučeny.

Výzkumem minimální reziduální choroby u adenokarcinomu pankreatu se do dnešních dnů nezabývalo mnoho studií. Detekcí okultních nádorových buněk v paraaortálních lymfatických uzlinách se zabýval např. Niedergethmann et al. (2002) [166], jako marker byl použit mutantní K-ras. Postižení lymfatických uzlin bylo za pomoci standardních histopatologických metod zjištěno u 4% ze 69 pacientů, za použití PCR metod to bylo u 17% pacientů. Z multivariační analýzy vyplynulo tedy toto postižení jako nezávislý prognostický marker. Podobných výsledků dosáhl i Tamagawa v roce 1997 [176]. Detekce mikrometastatického postižení kostní dřevě se u karcinomu pankreatu za pomoci imunohistochemického markeru cytokeratinu 20 ukázalo jako negativní prognostický faktor [177]. Stejných výsledků dosáhla tato skupina i při vyšetření žilní krve na přítomnost diseminovaných nádorových buněk za použití cytokeratinu 20.

Podobných výsledků dosáhl také Scheunemann P. et al. (2008) [178], který ve své práci vyšetřil pomocí imunohistochemických metod celkem 154 lymfatických uzlin bez histopatologického průkazu metastáz od celkem 59 pacientů. Přitom zjistil, že padesát, tj. 32,5% „tumor-free“ lymfatických uzlin od 36 pacientů (61%), vykazuje známky mikrometastatického postižení. Z multivariační analýzy pak vyplývá, že přítomnost diseminovaných nádorových buněk v „tumor-free“ lymfatických uzlinách znamená nezávislý prognostický faktor a značí signifikantně nižší relaps-free přežívání ( $p=0,03$ ).

Také Wolfrum F. et al. (2005) [179], Vogel I. et al. (2002) [180] a Rosenberg et al. (2002) [181] popisují stanovení minimální reziduální choroby a okultních metastáz na základě počtu diseminovaných nádorových buněk u gastrointestinálních tumorů jako nezávislý prognostický faktor. Výsledky jsou však charakterizovány velkou heterogenitou, řada výsledků je limitována malým počtem souboru pacientů a také nízkým přežíváním u pacientů s karcinomem pankreatu, což do značné míry limituje prognostický význam MRD. Přesto lze však očekávat, že v budoucnosti bude stanovení minimální reziduální choroby standardním vyšetřením a rozšíří klasickou TNM klasifikaci.

Z'graggen K. et al. (2001) [182] se zabýval detekcí okultních nádorových buněk v krvi a v kostní dřeni u pacientů s karcinomem pankreatu v době stanovení diagnózy. Byla použita imunohistochemická analýza u 105 pacientů. Přitom pankreatické nádorové buňky byly detekovány v 26% vzorků krve a v 24% vzorků kostní dřeně. Specificita pro přítomnost nádorových buněk byla 96%. Prevalence izolovaných nádorových buněk u pacientů s provedeným radikálním resekcčním výkonem byla 9% v periferní krvi a 13% v kostní dřeni. Přitom prevalence těchto buněk klesala se stupněm UICC klasifikace stadia tumoru ( $p=0,04$ ) v periferní krvi, ale nikoliv v kostní dřeni ( $p=0,52$ ). Hodnoty v krvi korelovaly s resekcibilitou ( $p=0,02$ ), s progresí onemocnění ( $p=0,08$ ) a s peritoneálními metastázami ( $p=0,003$ ). Přestože přežívání signifikantně korelovalo se stupněm stadia nádoru ( $p<0,001$ ) a izolované nádorové buňky v krvi korelovaly s nádorovým stadiem, průkaz nádorových buněk v krvi či v kostní dřeni, nebyl nezávisle asociován s přežíváním pacientů s karcinomem pankreatu. Výsledky ukázaly, že přítomnost nádorových buněk v krvi, nikoliv v kostní dřeni, odpovídá stupni stadia nádorového onemocnění a s následnou progresí nádorového bujení, zejména v prostoru peritoneální dutiny.

Soeth E. et al. (2005) [183] se zabýval stanovením minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu na podkladě exprese cytokeratinu 20 pomocí metodiky RT-PCR. Ve studii mezi lety 1994-2003 bylo vyšetřeno 172 pacientů (83 mužů, 89 žen, 13-82 let), kteří byli operováni pro adenokarcinom pankreatu. Opět byly předoperačně odebrány vzorky jak periferní krve, tak kostní dřeně a analyzovány na expresi cytokeratinu 20 pomocí RT-PCR. Z výsledků vyplývá, že nádorové buňky byly detekovány u 81 (47,1%) z 172 pacientů v kostní dřeni a/nebo v krvi. Ve 45 vzorcích kostní dřeně ze 135 (33,3%) byly detekovány CK20 pozitivní

buňky, stejně jako v 52 vzorcích periferní krve ze 154 (33,8%). Kaplan-Meierova analýza přežívání nemocných ukázala statisticky signifikantní vztah vyššího přežívání vzhledem k radikalitě výkonu ( $p < 0,0001$ ), stadiu onemocnění dle UICC ( $p = 0,0011$ ) a detekci diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni či periferní krvi ( $p = 0,05$ ). Pacienti s dobře diferencovanými karcinomy G1 a G2 mají signifikantně vyšší délku přežívání ( $p = 0,045$ ) než pacienti s nízké diferencovanými tumory. Pozitivita exprese CK 20 v kostní dřeni a/nebo krvi u pacientů ve skupině s tumory G1 a G2 diference značí signifikantní negativní prognostický faktor ( $p = 0,046$ ).

V roce 2007 Hoffmann K. et al. [184] publikoval svoji práci, kde se zabýval detekcí diseminovaných pankreatických nádorových buněk na základě exprese cytokeratinu 19 v krvi, kostní dřeni a peritoneální laváži pomocí metodiky RT-PCR. Bylo vyšetřeno celkem 69 pacientů s karcinomem pankreatu ( $n = 37$ ), chronickou pankreatitidou ( $n = 16$ ) a benigními tumory pankreatu ( $n = 15$ ), což představovalo kontrolní skupinu. Venózní krev byla odebrána předoperačně, intraoperačně a postoperačně ve dnech 1. a 10. Před zahájením vlastního resekcčního výkonu byla odebrána kostní dřeň a peritoneální laváž. Tyto vzorky byly vyšetřeny na přítomnost diseminovaných nádorových buněk pomocí exprese CK19 RT-PCR metodou. CK19 mRNA exprese byla detekována u 24 (64%) vzorků krve a 11 (30%) vzorků peritoneální laváže u pacientů s karcinomem pankreatu. V peritoneální laváži detekce nádorových buněk korelovala s velikostí tumoru a se stupněm nádorové diference. Hodnoty exprese CK19 byly vyšší u stadií pT3/pT4 a u nízké diferencovaných tumorů (G2/G3). Pacienti s karcinomem pankreatu alespoň s jednou pozitivitou exprese CK19 v jednom ze sledovaných kompartmentů měli nižší dobu přežívání, než pacienti negativní. Pacienti s karcinomem pankreatu měli také signifikantně vyšší pozitivitu exprese CK19 v krvi a v peritoneální laváži, než pacienti s chronickou pankreatitidou. Sledování exprese CK19 je potenciálním markerem k odlišení mezi benigním a maligním nálezem u tumorózních změn pankreatu, s možným klinickým využitím.

Cílem naší pilotní studie bylo tedy najít vhodné nádorové markery k detekci minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu. Jednou z mnoha vlastností solidních nádorů je totiž jejich heterogenita a genetická nestabilita. Také cirkulující nádorové buňky jsou z genetického pohledu heterogenní skupinou. Nalezení

vhodného, dostatečně senzitivního i specifického markeru cirkulujících nádorových buněk je tedy velmi obtížné. Vycházeli jsme ze znalostí exprese genů u nádorových buněk kolorektálního karcinomu a výsledků recentních studií, které se již zabývali stanovením pozitivitu MRD u karcinomu pankreatu na základě exprese CK19, CK20 a mutantního K-ras. A jako možné markery nádorových pankreatických buněk byla vybrána telomeráza, karcinoembryonální antigen a epidermální růstový faktor. Kvantitativní stanovení genové exprese markerů MRD umožňuje určit cut-off hodnoty s rozlišením mezi fyziologickým a patologickým stavem. Následně umožňuje posoudit změny v přítomnosti cirkulujících nádorových buněk během dispenzarizace pacienta. Cut-off hodnoty byly určeny v naší studii na základě analýzy exprese výše uvedených markerů v kontrolní skupině zdravých dárců krve. Peroperačně (ale před vlastní manipulací a odstraněním tumoru pankreatu) byly odebírány vzorky kostní dřeně, systémové a portální krve a peritoneální laváže, které byly podrobeny stanovení přítomnosti nádorových buněk na základě exprese CEA, EGFR1 a hTERT pomocí real-time RT-PCR metodiky. Tyto výsledky byly korelovány s klinicko-patologickými veličinami (velikost tumoru, radikalita výkonu, pozitivita lymfatických uzlin, klinické stadium a grading stupně diferenciacie tumoru) a celkovým přežíváním.

Výsledně pak byla prokázána statisticky významná souvislost mezi:

1. **expresí EGFR1 v portální krvi a klinickým stadiem** ( $p < 0,006$ ), kde pacienti s pokročilým stadiem mají vyšší expresi EGFR1 v portálním řečišti, než pacienti s nízkým klinickým stadiem
2. **expresí EGFR1 v portální krvi se stupněm diferenciacie primárního tumoru**, kde pacienti s tumory G3 mají statisticky významně vyšší expresi EGFR1 ( $p < 0,045$ ).

Dále byla prokázána **vysoká exprese EGFR1 v peritoneální laváži** pacientů s metastatickým postižením, na rozdíl od pacientů bez přítomnosti metastáz ( $p < 0,015$ ).

Bohužel se nepodařilo prokázat signifikantní závislost mezi ostatními testovanými markery (hTERT, CEA) a ostatními kompartmenty (systémová krev, kostní dřeň).

Při hodnocení vztahu exprese markerů a přežívání bylo sledováno několik zajímavých výsledků. A to především při hodnocení přežití vzhledem k pozitivitě exprese testovaných markerů v peritoneální laváži.

**Expese EGFR1 ( $p=0,01$ ) a CEA ( $p=0,1$ ) v peritoneální laváži značí kratší celkové přežívání pacientů s karcinomem pankreatu.** Dále bylo prokázáno statisticky významně kratší přežívání u pacientů s **pozitivitou hTERT v systémové a portální krvi ( $p<0,06$ ,  $p<0,015$ ).**

Výsledky naší pilotní studie tedy potvrzují dostatečnou specificitu a v případech námi vybraných nádorových markerů i dostatečnou senzitivitu real-time RT-PCR metodiky pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu. Byly vybrány vhodné markery detekce pankreatických nádorových buněk a ve spolupráci s Laboratoří experimentální medicíny zdokonalena vlastní metodika odběru materiálu a jeho následné zpracování. Pouze necelých 40% operovaných testovaných pacientů bylo klinického stadia I-III a byl u nich proveden radikální chirurgický výkon. Tento fakt bohužel značně snižuje použití metodiky pro prognostické účely. Výsledek je také ovlivněn velmi nízkým přežíváním pacientů po radikálních výkonech pro karcinom pankreatu. Na rozdíl od karcinomu kolorekta či prsu, které představují potenciálně kurabilní onemocnění, a kde lze sledovat „disease-free survival“ v mnohem delším časovém úseku a tedy také potenciál predikce je mnohem vyšší u těchto typů karcinomu než u karcinomu pankreatu. Přesto však byli v této skupině identifikováni pacienti s kratším přežíváním, a to na základě exprese vybraných markerů – hTERT, CEA a EGFR1 v krvi a peritoneální laváži.

Dalším cílem naší studie je sledování dynamiky minimální reziduální choroby v čase a sledování DFI u pacientů po radikálních výkonech. Výsledky zatím nejsou k dispozici. Otázkou k zamyšlení také zůstává možnost použití techniky real-time RT-PCR k odlišení, často někdy velmi obtížné, diferenciální diagnostiky mezi karcinomem pankreatu a chronickou pankreatitidou, která představuje jistý predilekční prostor k rozvoji karcinogeneze.

Vlastní a potenciální význam stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu pro klinickou praxi vidíme především ve zpřesnění stadiu onemocnění, mluvíme o tzv. ultrastagingu, který jistě již brzy rozšíří klasickou TNM

klasifikaci. Dále je možné zhodnotit přežívání a přežití bez známek onemocnění u pacienta s karcinomem pankreatu v závislosti na daném ultrastadiu. Je možné vyselektovat rizikovou skupinu ohroženou časnou recidivou onemocnění a to na základě MRD-pozitivního statusu. Minimální reziduální choroba u karcinomu pankreatu může také v budoucnu ovlivnit indikaci a průběh další adjuvantní onkologické léčby. Lze také předpokládat, že pozitivita minimální reziduální choroby u hraničně operabilních stadií karcinomu pankreatu může vyselektovat pacienty, u kterých právě na základě této znalosti positivity, je možné prohlásit toto onemocnění za systémové. Obzvláště za situace, kdy v daném ultrastadiu onemocnění by bylo vhodné kontraindikovat extenzivní a řadou rizik zatížený operační výkon, který představuje větší riziko letality a morbidit, než by byl možný benefit z tak radikální léčby.



## 5. Závěr

V naší studii byla ověřena možnost detekce minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu pomocí sledování nádorových buněk na základě exprese stanovených markerů, tj. karcinoembryonálního antigenu, telomerázy a receptoru pro epiteliální růstový faktor, pomocí metody real-time RT-PCR, a to s dostatečnou senzitivitou a specificitou. Byla stanovena metodika diagnostiky nádorových pankreatických buněk pomocí vlastního designu prób použitých v laboratorních podmínkách. Podařilo se také standardizovat metodiku odběrů systémové a portální krve, peritoneální laváže a kostní dřeně, které byly podrobeny další diagnostice. V našem souboru pacientů byly korelovány získané výsledky stran positivity či negativity minimální reziduální choroby s jednotlivými patologicko-anatomickými činiteli a s délkou přežívání. Přitom byla prokázána statisticky signifikantní závislost mezi detekcí exprese EGFR1 v portální krvi a klinickým stadiem, expresí EGFR1 v portální krvi vzhledem ke stupni diferenciaci tumoru a také vztah exprese EGFR1 v peritoneální laváži a k přítomnosti vzdálených metastáz. Při porovnání exprese stanovených markerů s délkou přežívání bylo zjištěno, že vysoce pozitivní exprese EGFR1 a CEA v peritoneální laváži a pozitivita exprese hTERT v systémové a portální krvi značí kratší přežívání nemocných. Byla tedy ověřena možnost využití detekce minimální reziduální choroby jako nezávislého prognostického faktoru u karcinomu pankreatu.

Bohužel však dosud není zcela vyjasněn klinický impakt stanovení minimální reziduální choroby, neboť řada výsledků je rozporuplná. Jednoznačný klinický benefit minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu je tedy nutné dále ověřit v různých podmínkách, s různým designem detekce nádorových pankreatických buněk a to na velké skupině pacientů.

## 6. Souhrn

### Úvod:

Minimální reziduální chorobou (MRD) u nemocných pacientů s karcinomem pankreatu rozumíme přítomnost izolovaných nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byl odstraněn primární tumor a který je v současnosti bez klinických známek onemocnění. Tyto izolované nádorové buňky lze na základě současných znalostí považovat za prekuzory mikrometastáz. Posouzení MRD u pacientů s tímto vysoce maligním onemocněním by mohlo eliminovat provedení zatěžujícího chirurgického výkonu u nemocných se systémovou molekulární diseminací nemoci a zpřesnit prognózu onemocnění.

### Materiál a metoda:

Do studie bylo k dnešnímu dni zařazeno 70 pacientů operovaných s kurativním záměrem pro karcinom slinivky. Metodou real-time RT-PCR byly na míru exprese hTERT (telomeráza), EGFR1 (receptor pro epidermální růstový faktor) a CEA (karcinoembryonální antigen) vyšetřeny vzorky systémové a portální krve, kostní dřevě a peritoneální laváže. Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami a s parametry přežití.

### Výsledky:

Byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi mírou exprese EGFR1 v portální krvi a klinickým stadiem, kde pacienti s pokročilým onemocněním mají vyšší expresi EGFR1 v portálním řečišti, než pacienti s nízkým klinickým stadiem. Obdobně koreluje exprese EGFR1 v portální krvi se stupněm diferenciacie primárního tumoru, kde pacienti s tumory G3 mají statisticky významně vyšší expresi EGFR1. Dále byla prokázána vysoká exprese EGFR1 v peritoneální laváži pacientů s metastatickým onemocněním, na rozdíl od pacientů bez přítomnosti metastáz. Bohužel se nepodařilo prokázat signifikantní závislosti mezi ostatními testovanými markery (hTERT, CEA) a ostatními kompartmenty (systémová krev, kostní dřevě). Při hodnocení parametrů přežití bylo prokázáno několik zajímavých výsledků. Především to bylo hodnocení přežití vzhledem k pozitivitě exprese

testovaných markerů v peritoneální laváži. Pozitivita EGFR1 ( $p=0,01$ ) a CEA ( $p=0,1$ ) v předoperační peritoneální laváži značí kratší celkové přežívání pacientů s karcinomem pankreatu. Dále bylo prokázáno kratší přežívání u pacientů s pozitivitou hTERT v systémové i portální krvi ( $p<0,06$ ,  $p<0,015$ ).

### **Závěr:**

Výsledky naší pilotní studie potvrzují dostatečnou senzitivitu a specificitu real-time RT-PCR metodiky pro detekci cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem pankreatu. Pouze necelých 40% operovaných a testovaných pacientů bylo klinického stadia I-III a byl u nich proveden radikální výkon s kurativním záměrem. Tento fakt bohužel značně omezuje použití této metodiky pro prognostické účely. Přesto však v této skupině bylo možné identifikovat pacienty s kratším přežíváním, a to na základě exprese vybraných markerů, hTERT, CEA a EGFR1 v krvi a peritoneální laváži. Pro definitivní ověření prognostické hodnoty minimální reziduální choroby je však potřeba delšího sledování většího souboru pacientů. Zvláště u pacientů s hraničně operabilním nálezem by bylo možné při známkách mikrodiseminace zvažovat neprovedení radikálního, řadou rizik zatíženého, chirurgického resekcčního výkonu.

## 7. Summary

### **Introduction:**

Pancreatic cancer is one of the most aggressive malignities with the statistically proven upward trend and a very poor prognosis. This is due to local recurrence and early dissemination, either by hematogenic or lymphogenic way. Minimal residual disease (MRD) in patients with pancreatic cancer is defined as the presence of isolated tumor cells in the patient's body, in which the primary tumor was removed and is currently without clinical signs of disease. Based on current knowledge, these isolated tumor cells may be described as precursors of micrometastases. Assessment of MRD in patients with this highly malignant disease could eliminate burdensome implementation of surgery in patients with systematic dissemination of molecular disease and provide a more precise prognosis.

### **Material and Methods:**

The study to date included 70 patients with carcinoma of the pancreas operated on with curative intent. Samples of peripheral and portal blood, bone marrow, peritoneal lavage and of the tumor itself were analyzed by real-time PCR which measured the expression of hTERT (telomerase), EGFR1 (receptor for epidermal growth factor) and CEA (carcinoembryonic antigen). The expression of these markers was correlated with clinicopathological characteristics and survival parameters.

### **Results and Conclusion:**

We found a statistically significant association between EGFR1 expression levels in the portal blood and clinical stage, where patients with advanced disease have a higher expression of EGFR1 in the portal stream, than the patients with low clinical stage. Similarly, EGFR1 expression in the portal blood correlates with the degree of differentiation of the primary tumor, where patients with G3 tumors had a statistically significantly higher expression of EGFR1. We also showed high expression of EGFR1 in the peritoneal lavage of patients with metastatic disease, in

contrast to patients without the presence of metastases. Unfortunately, we failed to demonstrate a significant dependence between the other tested markers (hTERT,CEA) and other compartments (systematic blood, bone marrow). In assessing the parameters of survival, we found several interesting results. In particular it was the evaluation of survival with regard to the positivity of expression of tested markers in the peritoneal lavage. EGFR1 and CEA positivity in pre-operative peritoneal lavage means shorter overall survival of patients with pancreatic cancer. Furthermore, although statistically insignificant, we demonstrated a shorter survival in patients with positive hTERT in systematic and portal blood. The results of our pilot study confirm the adequate sensitivity and specificity of the RT-PCR method for detecting circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer. Only less than 40% of patients were in the clinical stage I-III and underwent a radical surgical operation with curative intent. Unfortunately, this fact significantly reduces the use of this methodology for forecasting purposes. Nevertheless, we are able to identify patients with a shorter survival based on the expression of selected markers – hTERT, EGFR1 and CEA in the blood and peritoneal lavage. For the final certified prognostic value of MRD it is necessary to monitor a larger group of patients.

## 8. Seznam použité literatury

1. Friess, H., Uhl, W., Silva, JC., et al. : Praeoperative laparoscopy: do we need it in patients with pancreatic malignancies? *Am J Surg.* 1998; 175, 172-178
2. Pit, HA. : Pancreatic cancer: evaluation, management from a surgical perspective. Postgr Course AASGE, Chicago, 2000
3. Beger, Hg., Rau, B., Gansauge, F., et al.: Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J Surg.*2003; 27, 1075-1084
4. Gouma, DJ., Nieveen van Dijkum, EJ.: The standard work-up and surgical treatment of pancreatic head tumours. *Eur J Surg Oncol.* 1999; 25, 113-123
5. van Eijck, Ch., Link, KH., van Rossen, EE., et al.: (Neo) adjuvant treatment in pancreatic cancer – the need for future trials. *Eur J Surg Oncol.*; 25, 132-137
6. Cancer Statistics 2005. A presentation from The American Cancer Society. American Cancer Society Inc., 2004 ( <http://www.cancer.org>)
7. Lowenfels, AB., Maisonneuve, P., Lankisch, PG.: Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999; 28, 673-685
8. Fisher, WE.: Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg.* 2001; 25, 503-508
9. Lemoine, NR., Hughes, CM.: The epidermal growth factor receptors in human pancreatic cancer. *J Pathol.* 1992; 166, 7-12
10. Yamaka, Y., Friess, H., Kobrin, MS., et al.: Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 1993; 13, 565-569
11. Day, J.D., Digiuseppe, JA., Yeo, C., et al.: Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol.* 1996; 27, 119-124
12. Zavoral, M. : Karcinom pankreatu. Praha, Galén, 2005

13. Lemoine, NR., Hall, PA. : Growth factors and oncogenes in pancreatic cancer. In Neo-Ptoleamos, JP., Bailliere's Clinical Gastroenterology. Oxford, 1999, 565-569
14. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., et al.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988; 53, 549-554
15. Der, CJ., Finkel, T., Cooper, GM.: Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell*. 1986; 44, 167-176
16. Ehsani, A., Low, J., Wallace, RB.: Characterisation of a new allele of the human ERBB2 gene by allele-specific competition hybridization. *Genomics*. 1993; 15, 426-429
17. Hruban, RH., Goggins, M., Parsons, J., et al.: Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6, 2969-2972
18. Cheng, JQ., Ruggeri, B., Klein, WM., et al.: Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93, 3636-3641
19. Su, Gh., Hilgers, W., Shekher, MC., et al.: Alterations in pancreatic, biliary and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene. *Cancer Res*. 1998; 58, 2339-2342
20. Ringel, J., Lohr, M.: The MUC gene family: their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer. *Molecular cancer*. 2003; 2, 9-13
21. Caldas, C., Hahn, SA., Da Costa, LT., et al.: Frequent static mutations and homozygot deletions of the p16(MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Natura Genet*. 1994; 8, 27-32
22. Hahn, SA., Caldas, C., Hahn, SA., et al.: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 1996; 271, 350-353
23. Wilentz, RE., Su, GH., Dai, JL., et al.: Immunohistochemical labeling for DPC4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol*. 2000; 156, 37-43
24. Massague, J., Blain, SW., Lo, RS.: TGF $\beta$  signalign in growth control cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000; 103, 295-309
25. Hruban, RH., Iacobuzio-Donahue, C., Wilentz, RE.: Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J*. 2001; 7, 251-258

26. Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., et al.: Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinom. *Cancer Res.* 1997; 57, 1731-1734
27. Kern, SE., Pietenpol, JA., Thiagalingam, S., et al.: Oncogenic forms of p53 inhibit p53- regulated gene expression. *Science.* 1992;56, 827-830
28. Waldmann, T., Kinzler, KW., Vogelstein, B., et al.: p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 1995; 55, 5187-5190
29. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C. et al.: Requierement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 1998; 282, 1497-1501
30. Levine, AJ.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; 88, 323-331
31. Li, FP., Fraumeni jr., JF., Mulvihill, JJ., et al.: A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1998; 48, 5358-5362
32. Lancaster, JM., Wooster, R., Mangion, J., et al.: BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet.* 1996; 13, 238-240
33. Goggins, M., Hruban, RH., Kern, SE.: BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol.* 2000; 156, 1767-1771
34. Sporn, MB., Roberts, AB.: Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 1992; 119, 1017-1021
35. Steiner, MS., Barrack, ER.: Transforming growth factor- beta 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol.* 1992;6, 15-25
36. Alexandrow, MG., Moses, HL.: Transforming growth factor beta and cell cycle regulativ. *Cancer Res.* 1995;55, 1452-1457
37. Baldwin, RL., Korc, M.: Growth inhibition of human pancreatic carcinoma cells by transforming growth factor beta-1. *Growth Factors.* 1993;8, 23-34
38. Schwarte-Waldhoff, I., Volpert, OV., Bouck, NP., et al.: Smad4/DPC4-mediated tumor supression through supression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97, 9624-9629
39. Peng, B., Fleming, JB., Breslin, T., et al.: Suppresion of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2000; 8, 3628-3638



40. Duda DG., Sunamura, M., Lefter, LP., et al.: Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2003;22, 6857-6864
41. Friess, H., Barberat, P., Schilling, M, et al.: Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J Mol Med*. 1996;74, 35-42
42. Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, MS., et al.: Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res*. 1993;13, 565-569
43. Tzeng, CW., Frolov, A., Frolova N., et al.: EGFR genomic gain and aberrant pathway signaling in pancreatic cancer patients. *J SurgRes*. 2007;143, 20-26
44. Ullrich, A., Schlesinger, J.: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61, 203-212
45. Schlessinger, J., Ulrich, A.: Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 1992; 9, 383-391
46. Holmes, WE., Sliwkowski, MX., Akita, RW., et al.: Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*. 1992;256, 1205-1210
47. Friess, H., Yamanaka, Y., Kobrin, MS., et al.: Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clin Cancer Res*. 1995;1, 1413-1420
48. Li, J., Kleeff, J., Giese, N., et al.: Gefitinib, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth, invasion, and colony formation. *Int J Oncol*. 2004;25, 203-210
49. Bruns, CJ., Koehl, GE., Guba, M., et al.: Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10, 2109-2119
50. Stoeltzing, O., Liu, W., Reinmuth, N., et al.: Regulation of hypoxemia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *Am J Pathol*. 2003;163, 1001-1011
51. Bergmann, U., Funatomi, H., Yokoyama, M., et al.: Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res*. 1995;55, 2007-2011
52. Hunter, T.: A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell*. 1987;49,1-4

53. Flossmann-Kast, BB., Jehle, PM., Hoeflich, A., et al.: Src stimulans insulin-like growth factor I (IGF-1)-dependent cell proliferation by increasing IGF-1 receptor number in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.*1998;58, 3551-3554
54. Hilbig, A.: Src kinase and pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2008;177, 179-185
55. Duxbury, MS., Ito, H., Benoit, E., et al.: Overexpression of CEACAM6 promotes insulin-like growth factor I-induced pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *Oncogene.* 2004;23, 5834-5842
56. Tanno, S., Tanno, S., Mitsuuchi, Y., et al.: AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*2001;61,589-593
57. Kleeff, J., Kornmann, M., Sawhney, H.,et al.: Actinomycin D induces apoptosis and inhibic growth of pancreatic cancer cells. *Int J Cancer.*2000;86, 399-407
58. Yao, Z., Okabayashi, Y., Yutsudo, Y., et al.: Role of Akt in growth and survival of PANC-1 pancreatic cancer cells. *Pancreas.* 2002;24, 42-46
59. Lutz, MP., Esser, IB., Flosmann-Kast, BB., et al.: Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biphys Res Commun.* 1998;243, 503-508
60. Ohmura, E., Okada, M., Onoda, N., et al.: Insulin-like growth factor I and transforming growth factor alpha as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res.* 1990;50, 103-107
61. Freeman, JW., Mattingly, CA., Strodel, WE.: Increased tumorigenicity in the human pancreatic cell line MIA PaCa-2 is associated with an aberrant regullation of an IGF-1 autocrine look and lack of expression of the TGF-beta type RII receptor. *J Cell Physiol.*1995;165, 155-163
62. Maloney, EK., McLaughlin, JL., Dagdigian, NE., et al.: An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 2003;63, 5073-5083
63. Min, Y., Adachi, Y., Yamamoto, H., et al.: Genetic blockade of the insulin-like growth factor-1 receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003;63, 6432-6441

64. Itakura, J., Ishiwata, T., Friess, H., et al.: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res.* 1997;3, 1309-1316
65. Itakura, J., Ishiwata, T., Shen, B., et al.: Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2000;85,27-34
66. Xie, K.: Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12, 375-391
67. Tischer E., Mitchell, R., Hartman, T., et al.: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991;266, 11947-11954
68. Wei, D., Le X., Zheng, L., et al.: Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene.* 2003; 22, 319-329
69. Le, X., Shi, Q., Wang, B., et al.: Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma. *Interferon Cytokine Res.* 2000;20,935-946
70. Hoshida, T., Sunamura, M., Duda, DG., et al.: Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas.* 2002;25, 111-121
71. Tokunaga, T., Abe, Y., Tsuchida, T., et al.: Ribozyme mediated cleavage of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor inhibits liver metastasis of a pancreatic cancer cell line. *Int J Oncol.* 2002;21, 1027-1032
72. Hotz, HG., Hines, OJ., Hotz, B., et al.: Evaluation of vascular endothelial growth factor blockade and matrix metalloproteinase inhibition as a combination therapy for experimental human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2003;7,220-227
73. Fukasawa, M., Korc, M.: Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2004;10,3327-3332
74. Goldmann, CK., Kim, J., Wong, WL., et al.: Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell.* 1993;4, 121-133

75. Koochekpour, S., Merzak, A., Pilkington, GJ.: Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.*1996;102, 209-215
76. Warren, RS., Yuan, H., Matli, MR., et al.: Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.*1995;95, 1789-1797
77. Furukawa, T., Duguid, WP., Kobari, M., et al.: Hepatocyte growth factor and Met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol.*1995;147, 889-895
78. Tomioka, D., Maehara, N., Kuba, K., et al.: Inhibition of growth, invasion, and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in a orthoptic mouse model. *Cancer Res.* 2001;61, 7518-7524
79. Saimura, M., Nagai., E., Mizumoto, K., et al.: Tumor supression through angiogenesis inhibition by SUI-2 pancreatic cancer cells genetically engineered to secrete NK4. *Clin Cancer Res.*2002;8,281-288
80. Koliopanos, A., Avgerinos, C., Paraskeva, C., et al.: Molecular aspects of carcinogenesis in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dic Int.* 2008;7, 345-356
81. Davies, B., Brown, PD.: A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian cancer xenografts. *Cancer Res.*1993;53,2087-2091
82. Puente, XS., Sanchez, L., Overall., CM., et al.: Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev Genet.*2003;4,544-548
83. Caudroz, T., Polette, M., Tournier, JM., et al.: Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metaloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions. *J Histochem Cytochem.*1999;47, 1575-1580
84. Nawrocki, B., Polete, M., Marchand, V., et al.: Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses. *Int J Cancer.*1997;556-564
85. Qin, MZ., Benveniste, EN.: Transcriptional supression of matrix metalloproteinase-9 by RFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1 alpha. *J Immunol.*2001;167,5150-5159

86. Brew, K., Dinakarpanian, D., Nagase, H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta*.2000;1477,267-283
87. Lee, MH., Rapti, M., Murphy, G.: Unveiling the surface epitopes that render tissue inhibitor of metalloproteinases-I inactive against membrane type I-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*.2003;278,40224-40230
88. Amour, A., Knight, CG., Webster, A., et al. : The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*.2000;473,275-279
89. Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, et al.: TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem*.2001;276,12501-12504
90. Seo, DW., Li, H., Guedez, L., et al.: TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an-MMP-independent mechanism. *Cell*.2003;114,171-180
91. Liotta, LA., Steeg, PS., Stetler-Stevenson, WG.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*.1991;64, 327-336
92. Liu, LT., Chang, HC., Chiang, LC., et al.: Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells. *Oncogene*. 2002;54, 8347-8350
93. Egeblad, M., Werb, Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*.2002;2,161-174
94. Freije, JM., Balbin, M., Pendas, AM., et al.: Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Biol*.2003;532, 91-107
95. Hojilla, CV., Mohammed, FF., Khokka, R.: Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer*.2003;89, 1817-1822
96. Cousens, LM., Fingleton, B., Matrisian, LM.: Matrix metalloproteinases inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*.2002;295, 2387-2392
97. Sheu, BC., Hsu, SM., Ho, HN., et al.: A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res*.2001;61,237-242
98. Kataoka, H., Uchino, H., Iwamura, T., et al.: Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha 1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulator role in natural killer cytotoxicity. *Am J Pathol*. 1999;154, 457-468

99. Albini, A., Melchiori, A., Santi, L., et al.: Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst.*1991;83, 775-779
100. De Clerck, YA., Imre, S.: Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer.*1994;30A, 2170-2180
101. De Clerck, YA., Perez, N., Shimada, H., et al.: Inhibition of invasion and metastasis in cells trasfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.*1992;52,701-708
102. Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., et al.: Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science.*1989;243,947-950
103. Brown, PD.: Clinical trials of a low molecular weight matrix metalloproteinases inhibitor in cancer. *Ann NY. Acad Sci.*1994;732,217-221
104. Drummond, AH., Beckett, RP., Brown., PD., et al.: Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *AM NY Acad Sci.*1999;878, 228-235
105. Bramhall, SR., Rosemurgy, A., Brown., PD., et al.: Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.*2001;19,3447-3455
106. Bramhall, SR., Hallissey, MT., Whiting, J., et al.: Marimastat as maintaince therapy for patiens with advanced gastrin cancer: a randomized trial. *Br J Cancer.* 2002;86, 1864-1870
107. Overall, CM.: Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinases substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol.*2002;22,51-86
108. Folgueras, AR., Pendas, AM., Sanchez, LK., et al.: Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.*2004;48,411-424
109. Su, JM., Wei, YQ., Tian, L., et al.: Active imunogene therapy of cancer with valine on the basis of chicken homologous matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.*2003;63,600-607
110. Overall, CM., Lopez-Otin,C.: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer.*2002;2,657-672
111. Slaton, JW., Karashima, T., Perrotte, P., et al.: Treatment with low-dose interferon-alpha restores the ballance between matrix metalloproteinase-

- 9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.*2001;7, 2840-2845
112. Mengshol, JA., Mix, KS., Brinckerhoff, CE.: Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritis disease: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis Rheum.*2002;46,13-20
113. Johansson, N., Ala-Aho, R., Uitto, V., et al.: Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci.*2000;113,227-235
114. Simon, C., Goepfert, H., Boyd, D.: Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res.*1998;58, 1135-1138
115. AJCC Cancer Staging Handbook. 6<sup>th</sup> ed. New York. Springer Verlag.2002
116. Japan Pancreas Society. Classification of pancreatic carcinoma. Tokyo. Kanehara. 1996
117. Ishikawa, O., Ohhigashi, K., Sasaki, Y., et al.: Practical usefulness of lymphatic and connective tissue clearance for the carcinoma of the pancreas head. *Ann Surg.*1988;208, 215-220
118. Gall, FP., Zirngibl, H.: Cancer of the pancreas – extensive lymph node dissection. Cambridge. University Press.1993, 654-662
119. Traverso, LW., Longmire, P.: Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *SGO.* 1978;146, 959-962
120. Moertel, CG., Frytak, S., Hahn, RG., et al.: Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil. The Gastrointestinal Study Group. *Cancer.*1981;48,1705-1710
121. Klaassen, DJ., MacIntyre, JM., Catton, GE., et al.: Treatment of locally unresectable cancer of the stomach and pancreas: a randomized comparison of 5-fluorouracil alone with radiation plus concurrent and maintenance 5-fluorouracil – An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol.*1985;3,373-378

122. Huguet, F., André, T., Hammel, P., et al.: Impact of chemoradiotherapy after disease control with chemotherapy in locally advanced pancreatic adenocarcinoma in GERCOR Phase II and III studies. *J Clin Oncol.*2007;25, 326-331
123. Rougier, P., Mornex, F., Chauffert, B., et al.: Unresectable pancreatic cancer : survival and secondary resections after chemoradiotherapy followed by gemcitabine compared to gemcitabine alone (SFRO/FFCD 2000-01 PHASE III TRIAL). Proceedings from the Ninth World Congress on gastrointestinal cancer.Barcelona.Spain. 2007. Abstrakt 8
124. Burris, HA., Moore, MJ., Andersen, J., 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, 2403-2413
125. Cunningham, D., Chau, I., Stocken, D., et al.: Phase III randomised comparision of gemcitabine (GEM) versus gemcitabine plus capecitabine (GEM-CAP) in patients with advanced pancreatic cancer. *Eur J Cancer Suppl.* 2005;3,4
126. Richter, A., Niedergethmann, M., Sturm, JW., et al.: Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World J Surg.* 2003;27, 24-29
127. Moore, MJ., Goldstein, D., Hamm, J., et al.: Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer : a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.*2007;25,1960-1966
128. Pantel, K., Cote, RJ., Fodstad, O.: Detection nad clinical importace of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst.*1999;91, 1113-1124
129. Wang, J., Wu, CH., Lu, CH., et al.: Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patiens with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World J Surg.*2006;30, 1007-1013
130. Bustin, SA.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assai. *J Mol Endocrinology.*2000;25,169-193



131. Hagenbeek, A.: Minimal residual disease in leukemia: state of the art 1991. *Leukemia*.1992;6,12-16
132. Fehm, T., Sagalowsky, A., Clifford, E., et al.: Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*.2002;8,2073-2084
133. Tsavellas, G., Huang, A., McCullough, T.: Flow cytometry correlates with RT-PCR for detection of spiked but not circulating colorectal cancer cells. *Clinical Experimental Metastasis*.2002;19, 495-502
134. Dieffenbach, CW., Dveksler, GS.: PCR primer a laboratory manual. Cold Spring Harvor Laboratory Press.1995
135. Maguire, D., O'Sullivan, GC., Collins, JK., et al.: Bone marrow micrometastases and gastrointestinal cancer detection and significance. *Am J Gastroenterol*.2000;7, 256-262
136. Bustin, SA.: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinology*.2002;29,23-39
137. Amutan, M., Batey D.: Real-time quantification of genomic DNA using DyNAzyme II DNA polymerase and SYBR Green I Dye. *MJ Research Application Note*
138. Smith, BM., Slade, MJ., English, J., et al.: Responce of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*.2000;18, 1432-1439
139. Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., et al.: Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in varior tumors. *Cancer Res*.1988;48,2550-2554
140. Aquino, A., Formica, V., Prete, SP., et al.: Drug-induced increase of carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Pharmacological Res*.2004
141. Marchetti, A., Buttitta, F., Bertacca, G., et al.: mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathology*.2001;195,186-190

142. Mitas, M., Mikhitarian, K., Walters, CH.: Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastases using a multigene marker panel. *Int J Cancer*.2001;93,162-171
143. Lin, Y., Chen, S., Hsueh, S., et al.: Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *Cancer Sci*.2003;1, 99-102
144. Manzotti, M., Dell'Orto, P., Maisonneuve, P., et al.: Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph node. *Int J Cancer*.2001;95,307-312
145. Wong, IHN., Yeo, W., Cachn, AT., et al.: Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Duke's stage, serum CEA level and tumor progression. *Cancer Lett*.2001;162,65-73
146. Ito, S., Nakanishi, H., Hirai, T., et al.: Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a LightCycler. *Cancer Lett*.2002;183, 195-203
147. Okami, J., Dohno, K., Sakon., M., et al.: Genetic detection for micrometastases in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin Cancer Res*.2000; 2326-2332
148. Kubota, K., Nakanishi, H., Hiki, N., et al.: Quantitative detection for micrometastases in the lymph node of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer*, 2003;105,136-143
149. DeLuca, A., Pignata, S., Casamassini, A. et al.: Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay. *Clin Cancer Res*.2000;6,1439-1444
150. Meeker, AK., Hicks, JL., Iacobuzio-Donahue, CA., et al.: Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res*.2004;10,3317-3326

151. Theimer, CA., Feigon, J.: Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol.*2006;16,306-308
152. Watson, MA., Fleming, TP.: Mammaglobin, a specific member of uteroglobin gene family, is overexpresses in human breast cancer.*Cancer Res.*1996;56,860-865
153. Nunéz-Villar, MJ., Martínez-Arribas,F., Pollán, M., et al.: Elevated mammaglobin a(h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features definied a less aggressive tumor phenotype. *Breast Cancer Res.*2003;5,65-67
154. Tanaka, Y., Amos, KD., Fleming, TP., et al.: Mammaglobin-A is a tumor-associated antigen in human breast carcinoma.*Surgery.*2003;133,74-80
155. Ignatiadis, M., Kallergi, G., Ntoulia, M., et al.: Prognostic values of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assai for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res.*2008;9,2593-2600
156. Peto, R., Boreham, J., Clarke, M., et al.: UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet.*2000;355,1822-1827
157. Zehentner, BK., Secrist, H., Hayes, DC., et al.: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients during or after therapy using a multigene real-time RT-PCR assay. *Mol Diagn Ther.*2006;10,41-47
158. Benoy, IH., Elst, H., Philips, M., et al.: Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer,* 2006;94,672-680
159. Bohm, B., Schwenk, W., Hucke, HP., et al.: Does metodic long-term follow-up effect survival after curative resection of colorectal carcinoma? *Dic Colon Rectum.*1993;36,280-286
160. Duda, M., Vysloužil, K., Skalický, P., et al.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – nový prognostický marker v onkochirurgii.*Sloveská chirurgie.*2006;16-22

161. Allen-Merish, TG., McCullough, T., Patel, H., et al.: Role of circulating tumor cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *Brit J Surg.*2007;94,96-105
162. Krystof, V., Cankar, P., Frysova, I., et al.: 4-Arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, Crystal Structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J Med Chem.*2006;49, 6500-6509
163. Srovnal, J.: Minimální reziduální choroba u solidních nádorů. Disertační práce. UP Olomouc.2009
164. Kimchi, ET., Nikfarjam, M., Gusani, NJ., et al.: Combined pancreaticoduodenectomy and extended right hemicolectomy: outcomes and indications. *HPB.*2009.;11,559-564
165. Koch, M.: Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Anno f Surg.* 2005;241(2),199-205
166. Niedergethmann, M., Rexin, M., Hildenbrand, R., et al.: Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.*2002;12,1578-1587
167. Schuster, R., Max, N., Mann, R., et al.: Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer.*2004;108, 219-227
168. Taniguchi, T., Makino, M., Suzuki, K., et al.: Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of CEA mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma. *Am Cancer Soc.*2000;5,970-976
169. Tsouma, A., Aggeli, CH., Pissimissis, N., et al.: Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance. *Anticancer Res.*2008; 28, 3945-3960
170. Conzelmann, M., Linnemann, U., Berger, MR.: Molecular detection of clinical colorectal cancer metastasis: how should multiple markers be put to use? *Int J Colorectal Dis.*2005; 20, 137-146
171. Yamaguchi, K., Takagi, Y., Aoki, S., et al.: Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg.*2000;232,58-65

172. Uen, Y., Lu, CH., Tsai, H., et al.: Persistent presence of postoperative circulating tumor cell is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Ann Surg Oncology*.2008;8,2120-2128
173. Alran W. :Validation and limitations of use of a breast cancer nomogram predicting the likelihood of non-sentinel node involvement after positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*, 2007;7,2195-2201
174. Gillanders, WE.: Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis. *Ann of Surg*.2004;239,828-840
175. Trudeau, W., Shivers, S, Stall, A., et al.: Detection of metastases in the sentinel lymph nodes of breast cancer patients by mammaglobin and CEA RT-PCR. *Eur J Nucl Med*.1999;26,55-61
176. Tamagawa, E., Ueda, M., Takahashi, S., et al.: Pancreatic lymph nodal and plexus micrometastases detected by enriched polymerase chain reaction and nonradioisotopic singlestrand conformation polymorphism analysis: a new predictive factor for recurrent pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*.1997;3,2143-2149
177. Soeth, E., Grigoleit, U., Moellmann, B., et al.: Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol*.2005;10,669-676
178. Scheunemann, P., Stoecklein, NH., Rehders, A., et al.: Occult tumor cells in lymph nodes as a predictor for tumor relapse in pancreatic adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg*.2008;3,359-365
179. Wolfrum, F., Vogel, I., Fandrich, F., et al.: Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg*.2005;5,430-441
180. Vogel, I., Kalthoff, H., Henne-Bruns, D., et al.: Detection and prognostic impact of disseminated cells in pancreatic carcinoma. *Pancreatology*.2002.;2,79-88
181. Rosenberg, R., Nekarda, H., Thorban, S., et al.: Minimal residual disease in gastrointestinal tumors: tumor cell detection in bone marrow, blood and lymph nodes. *Acta Med Austriaca*.2002;29,42-53

182. Z'graggen, K., Centeno, BA., Fernandez-del Castillo, C., et al.: Biological implications of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients. *Surgery*.2001;5,537-546
183. Soeth, E., Grigoleit, U., Moellmann, B., et al.: Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol*.2005;10,669-676
184. Hoffmann, K., Kerner, C., Wilfert, W., et al.: Detection of disseminated pancreatic cells by amplification of cytokeratin-19 with quantitative RT-PCR in blood, bone marrow and peritoneal lavage of pancreatic carcinoma patients. *World J Gastroenterol*.2007;2, 257-263
185. Lillemoe, KD.: Pancreatic cancer:state-of-the-art-care. *CA Cancer J Clin*.2000;50,241-268
186. Nguyen, TC. : Standard versus radical pancreticoduodenectomy for periampullary adenocarcinoma: a prospective randomized trial evaluating quality of life in pancreticoduodenectomy survivors.*J Gastrointest Surg*.2003;7,1-11
187. Hamilton, SR, Aaltonen, LA, et al.: Pathology and genetics of tumors of the digestive system. WHO Classification of tumors. Lyon: IARC Press, 2000.

## 9. Seznam publikací a přednášek autora

### 1.Práce související s dizertační prací

#### a) Původní vědecké publikace uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech

**Klos D., Loveček M., Skalický P., et al.:** Minimální reziduální choroba u karcinomu pankreatu – naše prvotní zkušenosti, Rozhledy v chirurgii, přijato do tisku čísla 2/2010

**Klos D., Loveček M., Srovnal J., et al.:** Klinický význam stanovení minimální reziduální choroby u adenokarcinomu pankreatu – pilotní studie, Miniinvaz.chir. a endoskop súč, 2009, 4, přijato do tisku

**Klos D., Loveček M., Srovnal J., et al.:** Možnosti využití stanovení minimální reziduální choroby u adenokarcinomu pankreatu pomocí metodiky real-time RT-PCR – pilotní studie, Časopis lékařů českých, přijato do tisku čísla 2/2010

#### b) Publikovaná abstrakta

**Klos D., Havlík R., Loveček M., et al.:** Minimální reziduální choroba u karcinomu pankreatu – naše prvotní zkušenosti, In Sborník abstrakt z IV.kongresu chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu, Plzeň, 2009, – nejlepší přednáška autora do 35 let

**Klos D., Srovnal J., Benedíková A., et al.:** Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem pankreatu – pilotní studie, In Supplementum

**Klos D., Loveček M., Kysučan J., et al.:** Klinický přínos stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu – pilotní studie, In Supplementum 1, Čes a Slov Gastroent a Hepatol, 2009; 63(Suppl.1), 24

### c) Seznam přednášek

**Klos D., Havlík R., Loveček M., et al.:** Minimální reziduální choroba u karcinomu pankreatu – naše prvotní zkušenosti, IV.kongresu chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu, Plzeň, červen 2009 – nejlepší přednáška autora do 35 let

**Klos D., Havlík R., Loveček M., et al.:** Přínos metod molekulární biologie do strategie diagnostiky adenokarcinomu pankreatu – stanovení minimální reziduální choroby, Pelhřimovský chirurgický den, 20.11.2009, Pelhřimov

**Klos D., Srovnal J., Benedíková A., et al.:** Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem pankreatu – pilotní studie, V.dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 25.-27.11.2009, Olomouc

**Klos D., Loveček M., Kysučan J., et al.:** Klinický přínos stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu – pilotní studie, IV.kongres České gastroenterologické společnosti, 10.-12.12.2009, Praha

## 2. Ostatní publikace

a) Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatní recenzovaných vědeckých časopisech

**Havlík R., Král V., Klos D., et al.:** Solid papillar neoplasia of the pankreas – case report, Rozhl Chir. 2003;82, 533-535

**Havlík R., Loveček M., Klos D., et al.:** Zlepšení evakuace žaludku po pravostranné pylorus šetřící pankreatoduodenektomii, Bull HPB. 2007; 15, 10-13

**Loveček M., Havlík R., Klos D., et al.:** PET/CT u nádorů slinivky břišní, Bull HPB. 2007; 15, 13-16



## **b) Seznam přednášek**

**Klos D., Halama J., Neoral Č.:** Reoperace po resekcích rekta, Petřivalského den, Olomouc, 2006

**Klos D., Havlík R., Loveček M., et al.:** Význam PET-CT v předoperační diagnostice a stagingu karcinomu pankreatu, In Sborník abstrakt, XI. Harrachovské chirurgické dny, 31.5.-1.6.2007, Harrachov

**Klos D., Halama J., Neoral Č.:** Prevence hnisavých komplikací v kolorektální chirurgii a současná antibiotická profylaxe na I.chirurgické klinice FN v Olomouci, VII. Kongres mladých chirurgů prof.Čárského, Prešov, červen 2007

**Klos D., Marek O., Koutná J., et al.:** Léčba akutní bolesti jako prevence časných pooperačních komplikací, VII. Kongres mladých chirurgů prof.Čárského, Prešov, červen 2007

**Klos D., Halama J., Aujeský R., et al.:** Ruptura jater u HELLP syndromu jako příčina akutního hemoperitonea, Pelhřimovský chirurgický den, Pelhřimov, listopad 2008

**Klos D., Halama J., Aujeský R., et al.:** Akutní ruptura jater u HELLP syndromu – kazuistika, In sborník abstrakt, XVI. Pražské chirurgické dny, Praha, květen 2009

**Klos D., Halama J., Chudáček J., et al.:** Burkittův lymfom jako příčina NPB – kazuistika, XIII. Harrachovské chirurgické dny, červen 2009

## 10. Přílohy

1. diplom pro autora nejlepší přednášky do 35 let na IV.kongresu jater, žlučových cest a pankreatu, červen 2009, Plzeň
2. potvrzení vědeckého výboru 9.světového kongresu Mezinárodní hepatopankreatobiliární společnosti o přijetí abstraktu - Klos D. et al.: Minimal residual disease in pancreatic cancer – pilot study, k ústní prezentaci na tomto světovém vědeckém setkání v Buenos Aires, Argentina, 2010