

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta



UNIVERZITA KARLOVA
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2024

MUDr. Marián Liberko

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Prognostické a prediktivní markery v léčbě karcinomu pankreatu

Prognostic and predictive markers in the treatment of pancreatic carcinoma

Školitel:

Prof. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA

Prohlášení:

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

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

V Praze, 8.12.2024

MUDr. Marián Liberko

Podpis

Identifikační záznam:

LIBERKO, Marián. *Prognostické a prediktivní markery v léčbě karcinomu pankreatu [Prognostic and predictive markers in the treatment of pancreatic carcinoma]*. Praha, 2024. Počet stran: 111, počet příloh: 4. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav hygieny, epidemiologie a preventivního lékařství 3. LF UK 2024 Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA

Klíčová slova: *karcinom pankreatu, prognostické markery, inflammation-based parametry, exprese miRNA, cirkulující nádorové buňky, celkové přežití, terciární prevence [pancreatic cancer, prognostic markers, inflammation-based parameters, expression of miRNA, circulating tumor cells, overall survival, tertiary prevention]*

Poděkování:

Chtěl bych na tomto místě především poděkovat své školitelce prof. MUDr. Renatě Soumarové, Ph.D., MBA za odborné vedení, za pomoc v publikační a vědecké činnosti, za cenné rady a za vytrvalou a všestrannou podporu nejenom v průběhu postgraduálního studia. Současně bych rád poděkoval Mgr. Kateřině Kološtové, Ph.D. a prof. MUDr. Vladimírovi Bobkovi, Ph.D., za možnost výzkumu cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem pankreatu v jejich laboratoři, za jejich rady a pomoc při zpracovávání vzorků a vyhodnocování analýz. Velké díky patří i Mgr. Michalu Tenčíkovi za provedení statistických analýz.

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Epidemiologie nádorů a karcinomu pankreatu	10
2.1.	Epidemiologie nádorů a karcinomu pankreatu globálně.....	10
2.2.	Epidemiologie nádorů a karcinomu pankreatu v České republice.....	11
3.	Etiologie a rizikové faktory karcinomu pankreatu	12
3.1.	Faktory vnějšího prostředí	12
3.1.1.	Kouření	12
3.1.2.	Alkohol	13
3.1.3.	Obezita.....	13
3.1.4.	Diabetes mellitus II. typu.....	13
3.2.	Faktory vnitřního prostředí	15
3.2.1.	Genetická predispozice.....	15
4.	Prevence karcinomu pankreatu.....	18
5.	Etiopatogeneze karcinomu pankreatu.....	20
6.	Patologie karcinomu pankreatu	22
7.	Symptomatologie a diagnostika karcinomu pankreatu.....	24
7.1.	Symptomatologie karcinomu pankreatu	24
7.2.	Diagnostika karcinomu pankreatu	24
8.	Léčba karcinomu pankreatu.....	28
8.1.	Resekabilní karcinom pankreatu	28
8.2.	Hraničně resekabilní karcinom pankreatu.....	30
8.3.	Lokálně pokročilý karcinom pankreatu	33
8.4.	Metastatický karcinom pankreatu	33
8.5.	Personalizovaná terapie karcinomu pankreatu.....	35
9.	Prognostické a prediktivní markery v léčbě karcinomu pankreatu.....	38
9.1.	Tekutá biopsie	38
9.1.1.	ctDNA.....	38
9.1.2.	CTC	39
9.1.3.	MicroRNA	41
9.2.	Inflammation-based prognostické skórovací systémy	41
10.	Metodologie.....	43
11.	Cíle a hypotézy	43
12.	Materiál a metody.....	44
12.1.	Inflammation-based parametry u pacientů s karcinomem pankreatu.....	44
12.1.1.	Design studie	44
12.1.2.	Léčebné schémata a hodnocení odpovědi	44
12.1.3.	Definice studovaných inflammation-based parametrů.....	45
12.1.4.	Statistická analýza	47
12.2.	Expres vybraných miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu.....	48

12.2.1.	Design studie	48
12.2.2.	Izolace miRNA a reverzní transkripce	48
12.2.3.	Statistická analýza	48
12.3.	Genová exprese CTC u pacientů s karcinomem pankreatu.....	49
12.3.1.	Design studie	49
12.3.2.	Vyšetření CTC.....	49
12.3.3.	Statistická analýza	51
13.	Výsledky	53
13.1.	Inflammation-based parametry u pacientů s karcinomem pankreatu.....	53
13.1.1.	Charakteristiky pacientů.....	53
13.1.2.	Inflammation-based prognostické markery u pacientů léčených chemoterapií	58
13.2.	Exprese vybraných miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu.....	66
13.2.1.	Charakteristiky pacientů.....	66
13.2.2.	Exprese vybraných miRNA a vztah k přežívání	67
13.3.	Genová exprese CTC u pacientů s karcinomem pankreatu.....	69
13.3.1.	Charakteristiky pacientů.....	69
13.3.2.	Analýza genové exprese CTC ve vztahu k inflammation-based parametrům.....	69
13.4.	Souhrn výsledků ve vztahu k cílům a hypotézám práce	72
14.	Diskuse	73
14.1.	Inflammation-based parametry u pacientů s karcinomem pankreatu.....	73
14.2.	Exprese vybraných miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu.....	76
14.3.	Genová exprese CTC u pacientů s karcinomem pankreatu.....	78
15.	Závěry	80
16.	Abstrakt	82
17.	Abstract.....	83
18.	Seznam použitých zkratk	84
19.	Seznam použité literatury	89
20.	Přílohy	107

1. Úvod

Karcinom pankreatu je všeobecně vnímán jak v laické veřejnosti, tak i v lékařské komunitě, jako onemocnění s tristní prognózou. Jedná se navíc o onemocnění s rostoucí incidencí, která je těsně kopírována mortalitou. Příčiny rostoucí incidence jsou multifaktoriální, v zásadě známé, nicméně nelze identifikovat jeden konkrétní specifický, preventabilní, rizikový faktor. I přes obecnou znalost rizikových faktorů tohoto onemocnění jako je chování jednotlivců (zejména dietní vlivy), resp. vliv vnějšího prostředí, jsou možnosti primární prevence poměrně omezené a nedostatečné. Velmi důležité je proto šířit povědomí o možných rizikových faktorech vzniku karcinomu pankreatu v širší veřejnosti s cílem minimalizace jejich vlivu.

S ohledem na sekundární prevenci tohoto onemocnění neexistuje plošný screening tohoto onemocnění. Objevují se první signály, že screening tohoto onemocnění může být přínosem ve specifické populaci osob se zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu (specifická kritéria pro familiární výskyt, přítomnost specifické zárodečné mutace a další). Nicméně, v současnosti není jednoznačný konsenzus ohledně věkové hranice iniciace screeningu, použití diagnostických modalit a frekvence screeningového vyšetření. Současně je ale potřeba konstatovat, že pilotní zavedení screeningu karcinomu pankreatu v rizikové populaci je spojené s detekcí onemocnění v časnějších stádiích, což se promítá do zlepšení onkologických výsledků.

Nicméně, v současnosti platí, že absence screeningu karcinomu pankreatu pro všeobecnou populaci společně s pozdní diagnostikou tohoto onemocnění z důvodu nespecifických projevů je příčinou, že naprostá většina pacientů (přibližně 2/3) je diagnostikována s metastatickým onemocněním, kde je medián přežití kratší než jeden rok. Karcinom pankreatu je chápán jako systémové onemocnění i v časných (nemetastatických) stádiích. Systémový charakter onemocnění již v časných stádiích je společně s rezistencí tohoto onemocnění vůči standardním modalitám onkologické léčby důvodem neuspokojivých léčebných výsledků.

Při nepřímém srovnání významných pokroků onkologie v léčbě řady malignit je zjevné, že v případě karcinomu pankreatu je tento progres výrazně pomalejší a celá řada velkých randomizovaných studií s nadějnými molekulami selhala. Dílčí úspěchy v léčbě tohoto

onemocnění lze pozorovat až v poslední době, kde kombinované chemoterapeutické režimy a větší personalizace terapie vede k pozvolnému prodlužování přežití nemocných. V této souvislosti je významná terciární prevence, resp. identifikace prognostických parametrů, k odhalení pacientů se zvýšeným rizikem primární progresse onemocnění, nebo časného selhání potenciálně kurativního přístupu. Identifikace těchto parametrů by mohla pomoci více personalizovat terapii, optimalizovat náklady na léčbu, individualizovat načasování re-stagingových vyšetření při léčbě. Bylo by možné také lépe komunikovat s pacientem prognózu onemocnění.

2. Epidemiologie nádorů a karcinomu pankreatu

2.1. Epidemiologie nádorů a karcinomu pankreatu globálně

Nádorová onemocnění jsou častou příčinou morbidity a mortality celosvětově. Dle posledních dat International Agency For Research On Cancer (IARC) za rok 2022 bylo v tomto roce diagnostikováno 19 976 499 zhoubných novotvarů a 9 743 832 osob zemřelo na maligní onemocnění. V závislosti od regionu a přítomnosti specifických rizikových faktorů lze pozorovat odlišnosti v incidenci a mortalitě na specifickou malignitu. Karcinom pankreatu je onemocnění s globálně rostoucí incidencí, a vzhledem k nedobré prognóze bez ohledu na stadium onemocnění, křivka mortality těsně kopíruje křivku incidence. Dle posledních dostupných dat byla incidence tohoto onemocnění v roce 2022 celkem 510 992 případů (12. nejčastější malignita globálně) a mortalita 467 409 případů (6. hlavní příčina úmrtí na zhoubné onemocnění) ¹. Dle predikcí IARC je předpoklad nárůstu nově diagnostikovaných pacientů s tímto onemocněním v následujících letech. V roce 2030 je predikce incidence 634 341 (nárůst o 24,1 %), v roce 2040 je predikce incidence 819 959 (nárůst o 60,5 %), a konečně v roce 2050 je predikce incidence tohoto onemocnění 998 663 (nárůst o 95,4 %) ve srovnání se situací v roce 2022. Predikce stran mortality tohoto onemocnění v následujících letech jsou obdobně neuspokojivé, kdy v roce 2030 je odhadovaná mortalita 585 750 (nárůst o 24,7 %), v roce 2040 je odhadovaná mortalita 761 496 (nárůst o 62,9 %), a konečně v roce 2050 je odhadovaná mortalita na karcinom pankreatu 936 038 (nárůst o 100,3 %) ve srovnání se situací v roce 2022 ², shrnuto v tabulce 1. Vzhledem ke kontinuálnímu nárůstu incidence, která je kopírovaná křivkou mortality je předpoklad, že v roce 2040 bude karcinom pankreatu druhou hlavní příčinou úmrtí na nádorové onemocnění po karcinomu plic ve Spojených státech ³.

Tab. 1 Predikce incidence a mortality karcinomu pankreatu (upraveno dle ¹)

Rok	Predikce incidence	% změna	Predikce mortality	% změna
2022	510 992	0	467 409	0
2030	634 341	+24,1	587 750	+24,7
2040	819 959	+60,5	761 496	+62,9
2050	998 663	+95,4	936 038	+100,3

2.2. Epidemiologie nádorů a karcinomu pankreatu v České republice

V České republice máme k dispozici data k roku 2021⁴. V tomto roce byla incidence zhoubných nádorů 58 461 nových případů (kromě nemelanomových nádorů). Dominantními malignitami byli karcinom prostaty, prsu, tlustého střeva, plic, které tvořili až 48,5 % všech nádorů. Mortalita na zhoubné nádory byla v roce 2021 v České republice 26 865 osob (kromě nemelanomových nádorů). Mortalita na zhoubné onemocnění, tak představovala až 19,3 % všech úmrtí v České republice v roce 2021. S ohledem na výskyt úmrtí na malignitu, byli nejčastější příčinou úmrtí zhoubné nádory plic, tlustého střeva, pankreatu, prsu a prostaty, které představovali až 50,7 % všech úmrtí na zhoubné onemocnění⁴.

V roce 2021 bylo v České republice nově diagnostikováno 2393 případů (1189 mužů a 1204 žen). Ve srovnání incidence karcinomu pankreatu s evropskými zeměmi patří České republice 3-4 místo. Medián věku v době stanovení diagnózy byl 71 let u mužů a 73 let u žen. Mortalita karcinomu pankreatu v roce 2021 představovala 2343 případů (1183 mužů a 1160 žen). Ve srovnání mortality karcinomu pankreatu s evropskými zeměmi patří České republice 2-3 místo. Medián věku při úmrtí byl 71 let u mužů a 75 let u žen. Vzhledem k tomu, že naprostá většina pacientů s touto malignitou umírá, je prevalence tohoto onemocnění v České republice poměrně nízká a v roce 2021 představovala 3455 případů (1657 mužů a 1798 žen). Ve srovnání s předchozím rokem vzrostl počet žijících osob s touto diagnózou o 4,1 %. Medián věku žijících pacientů byl 70 let u mužů a 71 let u žen. Velmi často infaustní prognóza onemocnění s rychlou deteriorací celkového stavu pacientů je spojena i s nízkým výskytem duplicitních nádorů, který v letech 2012-2021 představoval pouze 450 osob. Nízké procento 5letého přežívání nemocných s karcinomem pankreatu (období 2015-2019) je dalším důkazem tristní prognózy tohoto onemocnění, kdy 5leté přežití všech pacientů bylo 9,3 % a 12,6 % v případě pacientů, u kterých byla zahájena specifická onkologická terapie⁴.

3. Etiologie a rizikové faktory karcinomu pankreatu

Etiologie karcinomu pankreatu je multifaktoriální a uplatňují se jak faktory vnějšího prostředí (fyzikální, chemické, biologické), tak faktory vnitřního prostředí (zejména genetická predispozice). Naprostá většina případů karcinomu pankreatu (>80 %) je tzv. sporadická forma, z důvodu náhodného výskytu a akumulace somatických mutací. Tzv. familiární forma karcinomu pankreatu je definována jako výskyt alespoň dvou prvostupňových příbuzných a představuje přibližně 4-10 % všech případů. Zbylá část karcinomu pankreatu je asociována s přítomností specifických germinálních mutací ⁵.

3.1. Faktory vnějšího prostředí

3.1.1. Kouření

Kouření cigaret je spojeno se zvýšením rizika celé řady malignit včetně karcinomu pankreatu. Metanalýza ⁶ 78 studií prokázala relativní riziko (RR) karcinomu pankreatu 1,8 (95% konfidenční interval (CI): 1,7-1,9) pro současné kuřáky a 1,2 (95% CI: 1,1-1,2) pro bývalé kuřáky vs. nikdy kuřáky. Riziko karcinomu pankreatu rychle rostlo již s menším množstvím spotřebovaných cigaret s postupným relativním oploštěním při vyšším počtu cigaret/den: 10 cigaret/den (RR 1,6; 95% CI: 1,5-1,8), 20 cigaret/den (RR 2,1; 95% CI: 1,9-2,2), 30 cigaret/den (RR 2,2; 95% CI: 1,9-2,4). Současně se prokázal i vliv doby kouření na riziko vzniku karcinomu pankreatu, kdy RR bylo 1,3 (95% CI: 1,3-1,4) v případě kouření 10 let, RR 1,7 (95% CI: 1,5-1,8) v případě kouření 20 let, a konečně RR 1,8 (95% CI: 1,6-2,0) v případě kouření 30 let. Autoři ale současně v této metaanalýze prokázali pokles rizika vzniku karcinomu pankreatu s prodlužující se dobou od ukončení kouření, kdy po 20 letech od ukončení kouření bylo RR 0,6 (95% CI: 0,5-0,7) a bylo podobné riziku nikdy kuřáků, RR 0,6 (95% CI: 0,5-0,6) pro nikdy kuřáky vs. současné kuřáky ⁶. Asociace mezi kouřením a zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu byla prokázána i dalšími autory v metaanalýzách ^{7,8}. Mechanismus účinku karcinogenní složky obsažené v cigaretách je komplexní a je pouze dílčím mechanismem karcinogeneze, vzhledem k tomu, že kuřáci jsou vystaveni celé řadě dalších rizikových faktorů prostředí. Bylo prokázáno, že nikotin indukuje karcinogenezu dediferenciací acinárních buněk pankreatu downregulací GATA vázajícího faktoru 6 (GATA6) u myší ⁹.

3.1.2. Alkohol

Konzumace alkoholu je rovněž spojena se zvýšením rizika vzniku karcinomu pankreatu. I zde se jedná o komplexní mechanismus genotoxického účinku a spolupůsobení řady proměnných, resp. dalších rizikových faktorů. Konzumace alkoholu je spojena s produkcí onkogenního acetaldehydu, který se váže na DNA reparační proteiny a vede k poškození DNA a tvorbě DNA aduktů¹⁰. Současně, acetaldehyd představuje rizikový faktor rozvoje pankreatitidy akutní, chronické. Současně osoby, které mají anamnézu pankreatitidy mají 6x vyšší riziko rozvoje karcinomu pankreatu ve srovnání s kontrolami¹¹. Asociace mezi pankreatitidou akutní, chronickou bez ohledu na etiologii a rizikem rozvoje karcinomu pankreatu byla prokázána i v recentních publikacích^{12–14}.

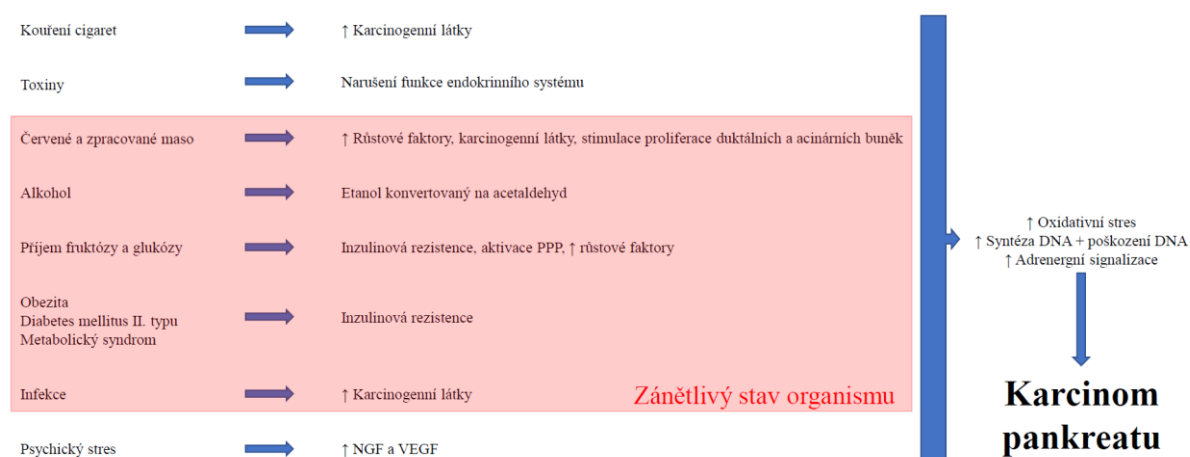
3.1.3. Obezita

Obezita, definována BMI > 30 je asociována se zvýšeným rizikem řady onemocnění, jako například: diabetes mellitus, hypertenze, dyslipidémie, ischemická choroba srdeční, nádorová onemocnění (zejména karcinomu prsu, endometria, kolorektální karcinom a karcinom pankreatu). Riziko představuje zejména tzv. centrální obezita, která je spojována s inzulínovou rezistencí a diabetem, což jsou další rizikové faktory vzniku karcinomu pankreatu¹⁵. Zvláště riziková pro rozvoj karcinomu pankreatu je nadváha a obezita v časně dospělosti, která zvyšuje riziko karcinomu pankreatu, OR 1,67 (95% CI: 1,2-2,34) a OR 2,58 (95% CI: 1,7-3,9), resp.¹⁶. Metabolický syndrom, kterého součástí je obezita, diabetes, dyslipidémie a hypertenze je rovněž asociován se zvýšeným rizikem rozvoje karcinomu pankreatu¹⁷.

3.1.4. Diabetes mellitus II. typu

Diabetes mellitus II. typu je často asociován s obezitou a metabolickým syndromem. Tyto jednotky jsou charakterizovány s proinflamatorním prostředím, které vede k inzulínové rezistenci. Současně, přítomný oxidativní stres vlivem vysoké hladiny glykémie, makronutrientů vede ke zvýšené produkci proinflamatorních cytokinů, interleukin 6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), které rovněž vedou ke vzniku inzulínové rezistence¹⁸. Inzulínová rezistence a kompenzatorní hyperinzulinémie u pacientů s diabetem mellitem II. typu je spojena s progresí karcinomu pankreatu¹⁹. Navíc se ukazuje, že diabetes mellitus II. typu je spojen s vyšším rizikem vzniku karcinomu pankreatu ve srovnání s non diabetem mellitem II. typu (OR 2,5; 95% CI: 2,05-3,05), a současně, že osoby s nově vzniklým diabetem mellitem II. typu jsou v největším riziku vzniku karcinomu (OR 6,39; 95% CI: 4,18-9,78).

V této populaci jde pravděpodobně o manifestaci diabetu z důvodu destrukce parenchymu pankreatu nádorem, zatímco o osob s dlouhodobým diabetem mellitem II. typu je tento příčinou vzniku karcinomu pankreatu z důvodu chronického proinflamatorního stavu a dlouhodobé inzulinové rezistence²⁰. Kromě prokázané asociace mezi diabetem mellitem II. typu a karcinomem pankreatu se zdá, že toto riziko může být modifikováno typem medikace, kterou diabetici užívají. Inzulin a deriváty sulfonylurey, které vedou k hyperinzulinémii mohou být spojené se zvýšením rizika karcinomu, zatímco metformin bývá spojován se snížením rizika karcinomu^{21–24}.



Obr. 1 Rizikové faktory a potenciální mechanismy rozvoje karcinomu pankreatu.

Souhra faktorů vnějšího prostředí (například zvýšený příjem alkoholu, fruktózy, glukózy, nadměrná konzumace červeného a zpracovaného masa), patologických stavů (například obezita, diabetes mellitus II. typu, metabolický syndrom a infekce) dále stres a kouření mohou vést k poškození DNA, interferovat s fyziologickými funkcemi pankreatu, indukovat zánět a hrát tak roli v rozvoji karcinomu pankreatu. NGF: nerve growth factor, PPP: pentose phosphate pathway, ROS: reactive oxygen species, VEGF: vascular endothelial growth factor (upraveno dle²⁵).

3.2. Faktory vnitřního prostředí

3.2.1. Genetická predispozice

Karcinom pankreatu je onemocnění, kterého iniciace, promoce a progres je multifaktoriální, a kromě modifikovatelných faktorů vnějšího prostředí byla identifikována řada genů, které jsou asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje této malignity. Dle současných doporučení by měli být všichni pacienti s nově diagnostikovaným onemocněním konzultováni cestou ambulance klinického genetika k potvrzení/vyloučení germinální predisponující mutace, a současně osoby léčené s karcinomem pankreatu by měli podstoupit i somatické testování primárního tumoru, nebo metastatických ložisek s cílem identifikace potenciálně targetabilních alterací metodou sekvenování nové generace (NGS) ²⁶.

Specifickou podskupinu karcinomu pankreatu představuje tzv. familiární karcinom pankreatu, který je definován jako výskyt karcinomu pankreatu alespoň u 2 prvostupňových příbuzných. Tato jednotka představuje přibližně 4-10 % nádorů pankreatu ²⁷⁻²⁹. Až 80 % prvostupňových příbuzných pacientů s karcinomem pankreatu přitom má nespecifický nález v rámci vyšetření germinálního genomu ³⁰. Existují důkazy, že riziko vzniku karcinomu pankreatu u osob s pozitivní rodinnou anamnézou je významně vyšší v srovnání s běžnou populací. Porter et al. v rámci studie 4433 rodin (celkem 21141 jedinců) s anamnézou karcinomu pankreatu srovnávali výskyt karcinomu pankreatu u příbuzných ve srovnání s populací bez rodinné zátěže karcinomem pankreatu. Osoby s výskytem dvou prvostupňových příbuzných měli standardizovaný poměr výskytu (SIR) karcinomu pankreatu 4,86 (95% CI: 4,01-5,90), zatímco osoby nesplňující kritéria pro familiární výskyt měli SIR 2,55 (95% CI: 1,95-3,34). Riziko vzniku karcinomu pankreatu u příbuzných vzrůstalo s počtem prvostupňových příbuzných s karcinomem pankreatu, SIR 3,46 (95% CI: 2,52-4,76), SIR 5,44 (95% CI: 4,07-7,26) a SIR 10,78 (95% CI: 6,87-16,89) v případě jednoho, dvou a tří prvostupňových příbuzných s karcinomem pankreatu, respektive. Riziko onemocnění u příbuzných bylo zvýšeno i nízkým věkem v době diagnózy karcinomu pankreatu (věk pod 50 let) ³¹.

Současně byla identifikována řada genů, mutace, kterých je spojena se zvýšením rizika rozvoje tzv. hereditárního karcinomu pankreatu. Řadíme sem zejména mutace genů: BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, TP53, MMR, STK11, APC, MUTYH, CDKN2A, PRSS1/SPINK1. Relativní riziko a celoživotní riziko v závislosti na přítomné alteraci je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2 Genetické syndromy asociované s karcinomem pankreatu (upraveno dle ^{26,32,33})

Gen	Syndrom	RR karcinomu pankreatu	Celoživotní riziko karcinomu pankreatu
BRCA1	Hereditární syndrom karcinomu prsu a ovárií	2,26 - 3	1-3 %
BRCA2	Hereditární syndrom karcinomu prsu a ovárii	3,5-10	2-7 %
PALB2	Familiární karcinom prsu	2,37	2-3 %
ATM	Familiární karcinom prsu	2,41	nedefinováno
CDKN2A	Familiární atypický mnohočetný melanom	13-39	17 %
MMR proteiny: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Lynchův syndrom	1,8-7,8	0,5-6,2 %
PRSS1, SPINK1	Hereditární pankreatitída	53	40 %
STK 11	Peutz-Jeghers syndrom	76,2	25,6 %
TP53	Li-Fraumeni syndrom	7,3	nedefinováno
APC, MUTYH	Familiární adenomatózní polypóza	4,5	nedefinováno

Včasná identifikace germinálních alterací u pacientů s karcinomem pankreatu je nezbytná jednak z důvodu následného testování příbuzných pacienta s cílem identifikace potenciálních nosičů alterací a u těchto následně zahájení screeningu vedoucímu k časnému zachytu případného rozvoje onemocnění, případně zavedení riziko redukujících opatření. Jednak je germinální testování zásadní pro případnou personalizovanou terapii léčených pacientů (např. preferována terapie platinovými deriváty u pacientů s BRCA1, BRCA2 mutací).

I přes rostoucí incidenci tohoto onemocnění není screening karcinomu pankreatu pro neselektovanou populaci standardně doporučován. Nicméně, v rámci rizikové populace (pozitivní rodinná anamnéza, specifické germinální mutace atd.) je pravděpodobnost identifikace osob v riziku vyšší. První konsenzus ohledem definice rizikové populace vhodné pro screening, diagnostických metod a následného managementu těchto pacientů v rámci high-volume centrech byl publikován v roce 2013 v rámci Cancer of the Pancreas Screening Study (CAPS) v roce 2013 ³⁴ a aktualizován v roce 2020 ³⁵. Recentně byly publikovány výsledky, které prokázali, že screening rizikové populace dle kritérií CAPS konsorcia je spojený se zvýšeným zachytem karcinomu pankreatu ve stadiu I s dlouhodobým přežíváním těchto pacientů ^{36,37}.

4. Prevence karcinomu pankreatu

Prevenci v onkologii lze rozdělit na primární, sekundární, terciární a kvarterní. Cílem primární prevence onkologických onemocnění obecně je předcházet rozvoji maligního onemocnění minimalizací známých rizikových faktorů vnějšího, či vnitřního prostředí. Efektivitu metod primární prevence lze hodnotit změnami incidence dané malignity. Obecně lze metody primární prevence charakterizovat jako programy odvykání kouření, léčby závislosti na tabáku, boje s nadužíváním alkoholu. K metodám primární prevence lze řadit i vakcinaci proti některým virovým onemocněním (papilomaviry, viry hepatitid), diagnostiku a eradikaci infekce *H. pylori*, edukaci a ochranu před nadměrnou expozicí ultrafialovému záření. Neméně důležitá je edukace veřejnosti o potřebě vyvážené stravy a dostatku pohybu jako prevence obezity a s ní spojených nemocí.

Specificky, v případě karcinomu pankreatu k primární prevenci patří minimalizace expozice k alkoholu, odvykání kouření. Součástí je i edukace populace s ohledem na rizika obezity a s ní spojenou řadou civilizačních onemocnění, včetně řady malignit. V případě diabetu mellitu jako známého rizikového faktoru iniciace a progresu karcinomu pankreatu, lze primární prevenci karcinomu pankreatu chápat i ve smyslu včasného zachytu diabetiků v rámci lékařů primární péče a současně snahou o co nejlepší kompenzaci diabetu z dlouhodobého hlediska. Navíc jakákoliv dekompenzace stabilního diabetu by měla být signálem pro podrobnější vyšetření pacienta. Je proto důležité, aby zásady primární prevence byli komunikovány s širší veřejností, zdravotnickými pracovníky formou osvěty a vzdělávacích programů. Nicméně, i když jsou postupy, doporučení primární prevence obecně známé, incidence a mortalita na karcinom pankreatu vykazují vzestupný trend globálně. Jistě, velkou roli hrají individuální charakteristiky jedince a jeho adherence k doporučením.

Cílem sekundární prevence je identifikace časných stadií onemocnění s možností potenciálně kurativního přístupu a z toho vyplývající dlouhodobé přežívání nemocných. V České republice je zaveden screening karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu, karcinomu čípku děložního a recentně byl zahájen i screening karcinomu plic a program časného zachytu karcinomu prostaty. Indikátorem kvality screeningu je poměr časných a pokročilých stadií onemocnění a současně také vývoj úmrtí na nádorová onemocnění. Vzhledem ke kontinuálnímu nárůstu incidence karcinomu pankreatu, kdy je naprostá většina pacientů diagnostikována ve stádiu neresekabilního, lokoregionálně pokročilého a/nebo metastatického

onemocnění, je zřejmé, že je potřeba nalézt mechanismus časného zachytu pacientů s touto malignitou s cílem zlepšení aktuálních špatných výsledků. Je známo, že neselektovaný screening karcinomu pankreatu není nákladově efektivní ^{34,35}. Na druhou stranu, přibývá důkazu, že screening karcinomu pankreatu v definované rizikové populaci je spojený se zvýšeným zachytem časných stadií, což se promítá do delšího celkového přežívání nemocných ^{36,37}. V současnosti je v České republice iniciován program časného zachytu karcinomu pankreatu pro jedince se zvýšeným rizikem onemocnění ^{38,39}.

Terciární prevence je cílená na pacienty s již diagnostikovanou malignitou. Podstatou terciární prevence je včasné odhalení progresu onemocnění, relapsu, nebo objevení se duplicitního nádorového onemocnění. Indikátorem kvality terciární prevence je doba přežití pacientů s lokalizovanými stadii onemocnění. Metodami terciární prevence jsou jednak zobrazovací metody, jednak laboratorní vyšetření, včetně hodnot nádorových markerů. Časná diagnostika progresu onemocnění na léčbě může vést ke změně léčebné strategie s cílem navození opětovné kontroly onemocnění. V případě relapsu onemocnění po kurativní léčbě má za cíl odhalit recidivu v bezpříznakovém stadiu, kdy je opět možná potenciálně kurativní léčba. Konečně, terciární prevence zahrnuje i surveillance nad případným výskytem duplicitní nebo triplicitní malignity vzhledem ke zvýšenému riziku maligní transformace buněk u pacientů s primárním nádorem, jak spontánní, tak onkologickou léčbou indukovanou.

Kvartérní prevence má za cíl včas identifikovat rizikové faktory, které mohou vést ke zhoršení kvality života pacientů s nádorovým onemocněním, ať už vlivem samotné malignity, nebo vlivem vedlejších účinků onkologické léčby. Lze sem řadit dostatečnou a účinnou analgeterapii, péči o nutriční pacienta, prevenci skeletálních příhod u pacientů s metastatickým postižením skeletu, zajištění derivace žlučových cest při obstrukci, zavedení stentů při nádorech jícnu, tlustého střeva, derivační stomie při maligních stenózách a řadu dalších profylaktických opatření. Indikátorem kvality kvartérní prevence jsou dotazníky kvality života pacientů.

5. Etiopatogeneze karcinomu pankreatu

Etiopatogeneze karcinomu pankreatu je charakterizována postupnou akumulací mutací v řídicích genech. Akumulace těchto mutací vede k progresi od prekancerózních lézí (low grade → high grade dysplázie) k invazivnímu karcinomu. Hlavními prekancerózami jsou pankreatická intraepiteliální neoplázie (PanIN) a intraduktální mucinózní cystická neoplázie (IPMN). PanIN je diagnostikován výhradně z bioptického materiálu, zatímco IPMN může být diagnostikován/detekován pomocí zobrazovacích vyšetření. Rizikovost IPMN závisí od lokalizace, kdy tzv. branch duct IPMN mají nízký maligní potenciál ⁴⁰, zatímco tzv. main duct IPMN (dilatace hlavního pankreatického ductu >5 mm) je spojován s vysokým rizikem karcinomu pankreatu (OR 5,66 pro high grade dysplázii, OR 7,40 pro invazivní karcinom) ⁴¹.

Prekursorové léze karcinomu pankreatu zahrnují PanIN, IPMN, mucinózní cystické neoplázie (MCN). Přibližně 85-90 % karcinomů pankreatu vzniká na podkladě progresse PanIN lézí a zbylých 10-15 % z cystických precursorů (IPMN a MCN) ⁴². V rámci PanIN lézí, karcinom pankreatu z nich nejčastěji vzniká na podkladě postupné akumulace mutací. V rámci premaligních lézí dochází vlivem faktorů vnějšího a vnitřního prostředí k mutacím v protoonkogenech a tumor supresorových genech (KRAS, CDKN2A, TP53 a SMAD4). Jednou z prvních molekulárních alterací, kterou lze identifikovat již v případě low-grade PanIN jsou mutace KRAS, které jsou přítomné až u 90 % pacientů s karcinomem pankreatu. Při progresi do PanIN grade 2 a grade 3 dochází k mutacím v genech CDKN2A, TP53, SMAD4 ⁴³. Mutace těchto 4 základních genů vede k nekontrolované proliferaci, signalizaci, zánětu a v konečném důsledku ke vzniku invazivního karcinomu a invazi do okolitých struktur a metastazování ⁴⁴.

Samotný proces metastazování, resp. metastatické kaskády, je komplexní proces a je značně neefektivní. Pouze malá část buněk primárního tumoru vstupuje do cirkulace a méně než 0,01 % těchto buněk je následně schopno založit metastatické ložisko ⁴⁵. Jedná se o komplexní proces, v rámci kterého nádorové buňky získávají schopnost invadovat přes basální membránu, vstoupit do cirkulace, být následně transportovány cirkulací, vystoupit z cirkulace a založit metastatické ložisko. Nádorové buňky během progresse onemocnění a zakládání vzdálených metastáz podstupují tzv. proces epiteliálně-mesenchymální tranzice (EMT), který je charakterizován ztrátou epiteliálních vlastností (polarita, buněčná organizace) a získáním

schopnosti invaze, vlastností kmenových buněk ⁴⁶. EMT je tak základní předpoklad pro schopnost nádorových buněk invadovat okolní struktury a zakládat vzdálené metastázy ^{47,48}.

Vzhledem k tomu, že často dochází ke generalizaci i původně velmi časných nádorů, resp. k relapsu dochází delší dobu po terapii primárního nádoru, je přijímán předpoklad, že k okultní diseminaci dochází již během velmi časných fází nádorového růstu ⁴⁹. Rhim et al. prokázali na myším modelu karcinomu pankreatu, že EMT proces je časným jevem přítomným již ve fází premaligního růstu, ve které identifikovali mesenchymální markery EMT tranzice již ve stádiích PanIN II a PanIN III ⁵⁰. Současně v těchto premaligních lézích rozpoznali buňky, které měly epiteliální, epiteliálně-mesenchymální i mesenchymální fenotyp. Navíc tyto buňky, které podstoupily EMT, byly schopné invadovat basální membránu a migrovat do okolí a byly detekovány i v cirkulaci těchto myších modelů. Autoři dále prokázali, že tyto cirkulující buňky uvolněné do oběhu již během premaligní fáze růstu karcinomu pankreatu jsou CD24+, CD44+ ^{51,52}, a mají vlastnosti nádorových kmenových buněk (CSCs) - jsou schopny sebeobnovy, iniciace nádorového růstu. Rhim et al. dále prokázali, že přítomnost zánětu v tkáni vede k iniciaci EMT a nádorové progresi již během PanIN lézí a zánět je tak významným etiopatogenetickým faktorem v nádorové progresi karcinomu pankreatu. Na druhou stranu, v případě že myší modely byly vystaveny dexamethasonu, došlo k výraznému omezení EMT a schopnosti diseminace ⁵⁰.

Na základě výše uvedeného je karcinom pankreatu dnes přijímán jako systémové onemocnění již v časných stádiích, bez ohledu na M0 status onemocnění dle zobrazovacích vyšetření. Časná, okultní diseminace je ale pouze jednou z mnoha příčin rezistence tohoto onemocnění vůči onkologické terapii. Dalšími důvody jsou: rychlá deteriorace klinického stavu pacientů, relativní chemorezistence, chybějící screening a pozdní diagnostika, extenzivní stromální (desmoplastická) reakce, která vede k hypovaskulárnímu a hypoxickému mikroprostředí, preprogramování metabolismu a úniku před buňkami imunitního systému ⁵³.

6. Patologie karcinomu pankreatu

Klasický duktální adenokarcinom pankreatu vychází z buněk vývodů žlázy a představuje přibližně 80 % nádorů exokrinní části pankreatu. Jak již bylo zmíněno dříve, karcinom pankreatu vzniká z prekursorových lézí: 85-90 % z PanIN a 10-15 % z IPMN a MCN⁴². Cystické neoplázie pankreatu zahrnují serózní cystadenom, IPMN a MCN, kde mucinózní léze mají maligní potenciál, zatímco non-mucinózní léze ho nemají⁵⁴. Mikroskopický obraz bývá velmi pestrý a nabývá obrazu od dobře diferencovaných nádorů se zachovalou tvorbou ductů až ke špatně diferencovaným nádorům, kde lze epiteliální diferenciaci identifikovat pouze pomocí imunohistochemie. Navíc, pro nádory pankreatu je typické výrazné, desmoplastické stroma, které představuje významný faktor odpovědný za rezistenci tohoto onemocnění vůči konvenční terapii⁵⁵. Kromě klasického duktálního adenokarcinomu pankreatu lze identifikovat jednak nádory s lepší prognózou (karcinom pankreatu z acinárních buněk), jednak nádory s ještě horší prognózou (adenoskvamózní karcinom, nediferencovaný karcinom, karcinom s osteoclast-like velkými buňkami)⁵⁶.

Klasická patologická klasifikace nevystihuje dostatečně heterogenitu tohoto onemocnění a neumožňuje predikovat odpověď na terapii a odhadovat prognózu. Je obecně známo, že i pacienti s podobnými klinickými charakteristikami onemocnění mají odlišnou prognózu a současně vykazují odlišnou odpověď na podávanou terapii. S rozvojem molekulárně-genetických metod se objevili snahy identifikovat a lépe charakterizovat jednotlivé subtypy karcinomu pankreatu na molekulárně-genetické úrovni. Na základě analýzy 100 duktálních adenokarcinomů pankreatu byly zjištěny časté chromosomální změny, které byly spojeny často s narušením funkce genů, které hrají důležitou roli při iniciaci a progresi karcinomu pankreatu (TP53, SMAD4, CDKN2A). Z hlediska strukturálních variací (variací ve struktuře chromozomů) byly identifikovány 4 genomické subtypy karcinomu: stabilní (<50 strukturálních variant/genom), lokálně přeskupený (>200 strukturálních variant seskupených na <3 chromozomech), rozptýlený (5-200 strukturálních variant/genom) a nestabilní (>200 strukturálních variant/genom). Nádory zařazené do nestabilního subtypu navíc vykazovaly známky genomické instability obdobné nádorům s mutací BRCA1, BRCA2, PALB2, resp. známky HRD/DDR a senzitivity vůči platinovým derivátům, což představovalo 24 % vzorků. Současně tato práce identifikovala přítomnost řady potenciálně targetabilních alterací, ale s velmi nízkou frekvencí výskytu⁵⁷. V této práci bylo současně dokumentováno, že přibližně 1

% pacientů s karcinomem pankreatu má defekt v systému miss-match reparace a tito pacienti mohou být potenciálními kandidáty pro léčbu imunoterapií ⁵⁸.

Kromě genomických subtypů karcinomu pankreatu byly definovány i transkriptomické subtypy. Byla publikovány práce s různými subtypy karcinomu pankreatu dle analýzy transkriptomu, které se v konečném důsledku více, nebo méně překrývají ve společných charakteristikách jednotlivých kategorií ^{59–61}. I přes odlišnosti v nomenklatuře a způsobu identifikace jednotlivých subtypů lze ve výše zmíněných klasifikacích najít společné znaky, které umožňují karcinom pankreatu rozdělit z transkriptomického hlediska na 2 základní subtypy: skvamózní/bazální a klasický. Pro skvamózní/bazální subtyp jsou charakteristické tyto znaky: vysoký grade (G3 v 45 %), metastatické onemocnění, tzv. aktivované stroma, chemorezistence a špatná prognóza (OS: 10 – 19,2 měsíce, DFS: 4,6 – 10,9 měsíce). Na druhou stranu, klasický subtyp je asociován s nižším grade (G1 v 50 %), tzv. normálním stromatem, vyšší chemosenzitivitou a lepší prognózou (OS: 19 – 43,1 měsíce, DFS: 13,5 – 20,6 měsíce) ⁶².

Jsou k dispozici i klinická data dokladující odlišnou biologii mezi skvamózním/bazálním a klasickým subtypem. V rámci studie COMPASS bylo zařazeno 63 pacientů, kterých nádory byly analyzovány s ohledem na subtyp metodou celogenomového sekvenování (WGS). Bylo prokázáno, že míra objektivních odpovědí (ORR) na chemoterapii v první linii léčby byla signifikantně lepší ($p=0,004$) ve skupině pacientů s klasickým subtypem onemocnění. Současně byla identifikována exprese GATA6 jako zástupného markeru odlišujícího skvamózní/bazální a klasický subtyp ⁶³. Obdobné výsledky byly publikovány později, kdy v rámci studie se 195 pacienty bylo 20 % nádorů klasifikovaných jako bazální subtyp a 80 % nádorů jako klasický subtyp. I zde byl ORR nižší ve skupině pacientů s bazálním subtypem (10 % vs. 33 %, $p=0,02$) a míra progresse onemocnění při terapii režimem FOLFIRINOX byla 60 % pro bazální subtyp a 15 % pro klasický subtyp onemocnění ($p=0,0002$). Tyto výsledky se projeví i celkovém přežívání pacientů, kdy opět lepší výsledky byly pozorovány v populaci pacientů s nádory s klasickým subtypem (mOS: 9,3 měsíce vs. 5,9 měsíce, HR 0,47, $p=0,0001$). I v této práci byla identifikována exprese GATA6 jako možný zástupný parametr k diferenciaci mezi dvěma základními subtypy onemocnění, kdy nízká exprese GATA6 je asociována se skvamózním/bazálním subtypem onemocnění ⁶⁴.

7. Symptomatologie a diagnostika karcinomu pankreatu

7.1. Symptomatologie karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu je onemocnění, které v časných stádiích nemá specifické projevy, a proto je naprostá většina pacientů diagnostikována s pokročilým a/nebo metastatickým onemocněním. Časná stadia se mohou projevovat nespecifickými dyspeptickými obtížemi: nauzea, zvracení, pocity plnosti po jídle, bolesti epigastria s propagací do zad, meteorismus, průjemovitě, mastné stolice, anorexie spojená s váhovým úbytkem. V dalších fázích dochází k progresi celkového neprospívání, často je nově diagnostikován diabetes mellitus, nebo dochází k dekompenzaci dlouhodobě stabilního diabetu mellitu. Zvláště varovným symptomem onemocnění je nově vzniklý diabetes mellitus u neobézního jedince, se současným váhovým úbytkem. Bezbolestný obstrukční ikterus je další možností primární manifestace tohoto onemocnění. Přítomnost ascitu, fluidothoraxu, kachektizace jsou již známky pokročilého, metastatického onemocnění.

Naprostá většina pacientů je vzhledem k nespecifickým symptomům diagnostikována v pokročilém, neresekabilním a/nebo metastatickém stadiu onemocnění. Screening tohoto onemocnění pro neselektovanou populaci není zaveden, nicméně se ukazuje, že i rizikových populací³⁵ může být přínosem a vede k vyššímu zachytu časných stádií a současně ke zlepšení celkového přežívání^{36,37}.

7.2. Diagnostika karcinomu pankreatu

Základní modalitou pro diagnostiku a staging karcinomu pankreatu je počítačová tomografie (CT). Je obecný konsenzus, aby toto vyšetření nebylo starší než 4 týdny před zahájením terapie. Současně je doporučováno provést CT vyšetření před případným zavedením stentu do žlučových cest, co by mohlo limitovat následnou interpretaci nálezů. Je nezbytné, aby CT vyšetření bylo provedeno v milimetrových řezech (ideálně <3 mm) v pankreatické, portální a arteriální fázi s intravenózně podanou kontrastní látkou. Diagnostická kritéria pro karcinom pankreatu jsou jednak přímé: hypovaskulární tumor, jednak nepřímé: dilatace hlavního pankreatického vývodu a/nebo dilatace ductus hepatocholedochus, segmentární atrofie parenchymu a nepravidelnost kontury pankreatu. Pankreatická fáze CT protokolu je nejvhodnější k detekci primárního tumor vzhledem k vyššímu gradientu sycení ve srovnání

s venózní a arteriální fází ⁶⁵ přičemž pozdní fáze mohou být více senzitivní k detekci menších nádorů ⁶⁶.

Vyšetření magnetickou rezonancí (MR) není standardem v primární diagnostice karcinomu pankreatu a lze ho indikovat v případě nejasností v rámci vyšetření pomocí CT, například nádory (5-17 %) s denzitou srovnatelnou s parenchymem pankreatu ⁶⁵, nebo v případě kontraindikace CT vyšetření s kontrastní látkou. Jednoznačný benefit MR ve srovnání s CT je v případě detekce malých jaterních metastáz, dle dostupných údajů až u 10-23 % pacientů, kteří měli negativní CT staging ⁶⁷.

PET/CT vyšetření není rovněž doporučováno jako vstupní stagingová modalita pro pacienty s karcinomem pankreatu, vzhledem k riziku falešné positivity u pacientů se současně přítomnou pankreatitidou ⁶⁸. Na druhou stranu ale PET/CT může vést k detekci okultního metastatického postižení při nejasném, resp. nespecifickém CT nálezu ⁶⁹.

Vzhledem ke komplexnosti anatomických struktur, se kterými je tkáň pankreatu v bezprostřední blízkosti je vhodné při radiologickém popisu využívat strukturovaný popis k zajištění zhodnocení všech důležitých aspektů při rozhodování o volbě primární terapie (primární operace, nebo primární onkologická léčba s cílem downsizingu a downstagingu ⁷⁰. Strukturovaný CT popis karcinomu pankreatu – viz příloha 1.

Existuje řada kritérií/definic resekability karcinomu pankreatu dle stagingových vyšetření. Dle možností primární chirurgické intervence lze karcinom pankreatu dle kvalitně provedeného stagingového CT vyšetření pankreatickým protokolem rozdělit na: resekabilní, hraničně resekabilní, lokálně pokročilý a metastatický karcinom pankreatu. Velmi často používaná klasifikace ke stratifikaci pacientů je dle NCCN guidelines (definice resekability karcinomu pankreatu dle NCCN guidelines – viz příloha 2). Vzhledem ke komplexnosti anatomických struktur v blízkosti pankreatu má pro klinickou praxi a rozhodování o volbě terapie větší význam definice dle vztahu k cévním strukturám než klasická TNM klasifikace, kterou uvádím pro úplnost.

TNM klasifikace karcinomu pankreatu

T – primární nádor

TX: primární nádor nelze hodnotit

T0: bez známek primárního nádoru

Tis: karcinom in situ

T1: nádor o velikosti do 2 cm včetně v největším rozměru

T1a: nádor o velikosti do 0,5 cm v největším rozměru

T1b: nádor větší než 0,5 cm, do 1 cm včetně v největším rozměru

T1c: nádor větší než 1 cm, do 2 cm včetně v největším rozměru

T2: nádor větší než 2 cm, do 4 cm včetně v největším rozměru

T3: nádor větší než 4 cm v největším rozměru

T4: nádor postihuje truncus coeliacus, a. mesenterica superior a/nebo a. hepatica communis

N – regionální lymfatické uzliny

NX: regionální mízní uzliny nelze hodnotit

N0: regionální mízní uzliny bez metastáz

N1: metastázy v 1-3 regionálních mízních uzlinách

N2: metastázy ve 4 a více regionálních mízních uzlinách

M – vzdálené metastázy

M0: bez vzdálených metastáz

M1: vzdálené metastázy

Hodnocení resekability onemocnění pouze na základě stagingového CT vyšetření není dostatečné a je potřeba při rozhodování o volbě ideálního postupu v prostředí multidisciplinárního týmu zohlednit i další proměnné. Byla publikována řada prací, které toto dokazují. V roce 2017 byl publikován konsenzus definice a kritérií hraničně resekabilního karcinomu pankreatu. Byly definovány tzv. ABC kritéria, A: anatomické, B: biologické, C:

kondicionální. Anatomické kritéria jsou založeny na posouzení vztahu k cévním strukturám (žíly a tepny). Biologická kritéria zohledňují suspektní CT nálezy s ohledem na možnost metastatického rozsevu, postižení lymfatických uzlin a hladiny Ca19-9. Konečně, kondicionální kritéria zahrnují výkonnostní stav, definován jako PS >2 ⁷¹. Autoři konsenzu vycházeli z práce, která na souboru více než 1600 pacientů s hraničně resekalibilním karcinomem pankreatu sledovala korelaci mezi hodnotou Ca19-9 a resekalibilitou a prognózou. Při hodnotě Ca19-9 >500 kU/ml byla pozorována výrazně nižší míra resekcí (67,4 %) a rovněž kratší přežívání (15,4 měsíce) ⁷². Současně, přítomnost a počet postižených regionálních lymfatických uzlin byl spojen s horším celkovým přežíváním bez ohledu na resekalibilitu a stadium nádoru ⁷³. S ohledem na biologické parametry definující tzv. hraničně resekalibilní karcinom pankreatu byla v rámci konsenzu identifikována hodnota Ca19-9 >500 kU/ml, přítomnost regionální lymfadenopatie (identifikována biopsicky, případně pomocí PET/CT) a suspektní, ale nepotvrzené vzdálené metastázy. S ohledem na kondicionální kritéria hraničně resekalibilního karcinomu pankreatu byla identifikována hodnota PS > 2 WHO jako negativní prognostický ukazatel přežití pacientů ⁷⁴.

Recentně byla publikována retrospektivní kohortová studie pacientů s lokalizovaným karcinomem pankreatu léčených režimem mFOLFIRINOX, které hodnotila význam ABC kritérií v této populaci ⁷⁵. Celkem bylo zařazeno 1835 pacientů s lokalizovaným karcinomem pankreatu. Resekalibilní onemocnění mělo 18,9 % pacientů, hraničně resekalibilní onemocnění mělo 28,9 % pacientů, a konečně lokálně pokročilé onemocnění mělo 52,2 % pacientů. Nezávislými prognostickými faktory pro OS byly: hraničně resekalibilní onemocnění (HR 1,26, 95% CI: 1,06-1,50), lokálně pokročilé onemocnění (HR 1,71, 95% CI: 1,45-2,02), hodnota Ca19-9 > 500 kU/ml (HR 1,36; 95% CI: 1,21-1,52) a výkonnostní stavu dle WHO > 1 (HR 1,31; 95% CI: 1,16-1,47). V rámci této studie byl každému rizikovému faktoru z kategorie ABC přidělen 1 bod, v případě lokálně pokročilého onemocnění byly přiděleny 2 body. Celkové skóre „rizikovosti“ tak mohlo nabývat hodnot 0-4. Studie prokázala, že se vzrůstající hodnotou skóre klesá mOS: 49,7 měsíce, 29,9 měsíce, 22,0 měsíce, 19,1 měsíce a 14,9 měsíce a rovněž tak 5leté celkové přežití: 47 %, 28,9 %, 19,2 %, 9,3 % a 4,8 % ⁷⁵. Tyto výsledky jsou důkazem skutečnosti, že pro správné rozhodnutí o volbě iniciační terapie by vstupní staging měl zahrnovat anatomické parametry, hodnotu Ca19-9 a výkonnostní stav pacienta.

8. Léčba karcinomu pankreatu

Léčebná strategie karcinomu pankreatu by měla být diskutována v prostředí multidisciplinárního týmu. Volba adekvátního postupu závisí na řadě proměnných, které je potřeba zohlednit při volbě terapeutického přístupu. Jsou to jednak vlastnosti nádoru (resekabilní, hraničně resekabilní, lokálně pokročilý, metastatický karcinom pankreatu), jednak vlastnosti pacienta (biologický věk, výkonnostní stav, komorbidita, funkční stav jater, ledvin, zázemí pacienta) a konečně vlastnosti léčby (toxicita režimu, frekvence návštěv, vliv na kvalitu života pacienta).

8.1. Resekabilní karcinom pankreatu

Resekabilní karcinom pankreatu je diagnostikován vstupně u přibližně 15 % pacientů. Základem léčby resekabilního onemocnění je primární chirurgický výkon následován adjuvantní terapií s cílem snížení rizika recidivy onemocnění a prodloužení přežití. Cílem chirurgického výkonu je dosažení R0 resekce, která je definována jako nepřítomnost nádorových buněk ve vzdálenosti 1 mm od resekcčních okrajů. V závislosti od lokalizace onemocnění je zvolen typ výkonu. V případě nádorů hlavy pankreatu je to hemipankreatoduodenektomie dle Whipple, nebo dle Traverso-Longmire. V případě lokalizace nádorů v oblasti těla a kaudy pankreatu je standardem distální pankreatektomie, obvykle se splenektomií. Ve specifických případech je nutné provedení totální pankreatektomie, která je ale spojena s rozvojem obtížně kompenzovatelného pankreatogenního diabetu mellitu. V rámci chirurgického výkonu je indikována i lymfadenektomie, kdy za standard se považuje odstranění >16 lymfatických uzlin ²⁶. V případě, že je peroperačně identifikováno postižení vena portae, nebo vena mesenterica superior, je indikována cévní resekce s rekonstrukcí, nicméně takové výkony jsou spojeny s horším přežíváním pacientů ⁷⁶. U části pacientů je primomanifestace onemocnění spojena s rozvojem obstrukčního ikteru. V současnosti je přijímán konsenzus, že v případě resekabilního onemocnění a hyperbilirubinémie <250 μmol/l, bez známek cholangitidy není rutinní zavedení biliárních stentů indikováno vzhledem k vyššímu výskytu komplikací ⁷⁷.

Vzhledem k obecně přijímanému konsenzu karcinomu pankreatu jako systémového onemocnění je adjuvantní chemoterapie indikována pro všechny pacienty bez ohledu na klinické stadium po resekci. Benefit adjuvantní terapie byl prokázán i v případě karcinomu pankreatu stadia I ⁷⁸. Adjuvantní chemoterapie je tedy doporučována i pro tyto pacienty

vzhledem k nízkému 5letému přežívání po samotné operaci i přes nedostatečné množství klinických dat z randomizovaných studií ⁷⁹. Adjuvantní terapii je vhodné zahájit u pacientů po odeznění časné pooperační morbidit. Existují data, že pacienti stadia I a II, kteří měli delší dobu do zahájení adjuvantní terapie z důvodu pooperačních komplikací, měli z této terapie benefit i v případě, že byla zahájena do 12 týdnů od chirurgického výkonu ⁸⁰. Standardem je v současnosti adjuvantní chemoterapie v délce 6 měsíců. Pooperační terapie by měla být zahájena v době, kdy je předpoklad, že stav pacienta umožní podání plného plánovaného kurzu adjuvantní chemoterapie. Dokončení plánované adjuvantní chemoterapie v délce 6 měsíců je silným prediktorem jejího benefitu s ohledem na přežívání ^{81,82}.

Základy adjuvantní terapie karcinomu pankreatu byly položeny na výsledcích studie ESPAC-1, která byla publikována již v roce 2011. Adjuvantní terapie vedla k prodloužení mediánu celkového přežití (mOS) u pacientů léčených chemoterapií vs. pacientů v rameni s observací (mOS: 19,7 měsíce vs. 14,0 měsíce, HR 0,66, $p=0,005$) ^{83,84}. Proto byla zavedena adjuvantní terapie s 5-fluorouracilem a leukovorinem do klinické praxe.

Další možností adjuvantní léčby je monoterapie gemcitabinem dle výsledků studie CONKO-001. V ní gemcitabin prokázal superioritu v parametru přežívání bez progresu (DFS) ve srovnání s observací (mDFS: 13,4 měsíce vs. 6,9 měsíce, $p < 0,001$). Studie neprokázala rozdíl v parametru mOS (22,1 měsíce vs. 20,2 měsíce, $p=0,06$) mezi rameny, ale splněný primární cíl studie vedl k zavedení monoterapie gemcitabinem do klinické praxe ⁸⁵.

Historické, standardní možnosti terapie, 5-fluorouracil a gemcitabin v adjuvantním podání byly testovány proti sobě ve studii ESPAC-3 ⁸⁶. Tato studie prokázala ekvivalenci obou režimů v parametru mOS (23,0 měsíce vs. 23,6 měsíce, HR 0,94, $p=0,39$). Nicméně, vzhledem k menší míře nežádoucích účinků u pacientů v rameni s gemcitabinem se tento režim na dlouho stal preferovanou volbou terapie.

Neuspokojivé výsledky adjuvantní monoterapie vedly k iniciaci dalších studií, které testovaly benefit kombinované chemoterapie u pacientů po resekci karcinomu pankreatu. Studie ESPAC-4, randomizovala pacienty mezi kombinaci gemcitabin + kapecitabin vs. monoterapie gemcitabinem a prokázala superioritu kombinovaného režimu v parametru mOS (28,0 měsíce vs. 25,5 měsíce, HR 0,82, $p=0,032$). Vzhledem k přijatelnému a známému profilu toxicity obou preparátů, jejich efektivitě se tato kombinace stala preferovanou léčebnou možností ⁸⁷.

Signifikantní zlepšení přežívání pacientů po operaci přinesla až studie PRODIGE-24, která randomizovala pacienty mezi rameno mFOLFIRINOX vs. gemcitabin ⁸⁸. Intenzifikace chemoterapie vedla k jednoznačnému zlepšení ve sledovaných parametrech, kdy mDFS byl 21,6 měsíce vs. 12,8 měsíce, HR 0,58, $p < 0,001$ a mOS byl 54,4 měsíce vs. 35,0 měsíce, HR 0,64, $p = 0,003$. Režim mFOLFIRINOX je v současnosti akceptován jako prokazatelně nejúčinnější možnost terapie v adjuvantním podání s vědomím jeho toxicity, vyžadující velmi dobrý celkový stav nemocného. Robustnost dat je podpořena i výsledky 5letého přežívání pacientů léčených mFOLFIRINOX-em ⁸¹.

Vzhledem k toxicitě režimu mFOLFIRINOX byly hledány další možnosti adjuvantní terapie pro pacienty s karcinomem pankreatu. Na základě slibných výsledků studie MPACT u pacientů s metastatickým onemocněním ⁸⁹ byl režim gemcitabin a nab-paclitaxel testován i v adjuvantním podání v rámci studie APACT, kde byl gemcitabin a nab-paclitaxel testován proti monoterapii gemcitabinem. Studie ale nesplnila primární cíl, DFS (19,4 měsíce vs. 18,8 měsíce, HR 0,88, $p = 0,1824$) a je tak považována za negativní, i když byl pozorován slibný benefit v parametru mOS ve prospěch kombinovaného režimu (mOS: 40,5 měsíce vs. 36,2 měsíce, HR 0,82, $p = 0,232$) ⁹⁰.

Postavení adjuvantní chemoterapie je podloženo řadou randomizovaných studií. Na druhou stranu je místo adjuvantní chemoradioterapie v léčbě pacientů s karcinomem pankreatu kontroverzní. Studie EORTC, která zahrnovala 114 pacientů neprokázala benefit adjuvantní chemoradioterapie ⁹¹. Adjuvantní chemoradioterapie ve studii ESPAC-1 byla dokonce spojena s horším přežíváním pacientů. Navíc, benefit nebyl pozorován ani v populaci pacientů s R1 resekcí ⁹².

V současnosti lze tedy pro pacienty po resekci primárního nádoru indikovat v závislosti od celkového stavu pacienta k monoterapii gemcitabinem, kombinaci gemcitabin a kapecitabin, nebo mFOLFIRINOX. Platí, že vyšší účinnost terapie je spojena s vyšší mírou jak akutní, tak chronické toxicity.

8.2. Hraničně resekabilní karcinom pankreatu

Toto klinické stadium je charakterizováno nízkou mírou R0 resekcí, vyšší peri- a postoperační morbiditou, a konečně horším celkovým přežíváním v případě indikace primárního chirurgického výkonu. Dlouhodobě byla hlavním kritériem hraničně resekabilního onemocnění cévní invaze, nicméně přibývá důkazů vlivu biologických a kondicionálních

faktorů, které je potřeba zvažovat při volbě optimální léčebné strategie ⁷¹. V současnosti je pro tuto kategorii doporučována primární onkologická terapie s cílem downsizingu a downstagingu onemocnění. Neoadjuvantní terapie má v této indikaci řadu výhod. Větší část pacientů je exponována systémové terapii (s možností ovlivnění mikrometastatické nemoci) před operací primárního nádoru ve srovnání s nízkým procentem pacientů, kteří jsou schopni podstoupit adjuvantní terapii. Není negativně ovlivněno cévní zásobení nádoru primární chirurgickou resekcí. Zmenšení rozsahu onemocnění vede potenciálně k menší chirurgické náročnosti výkonu, zvyšuje pravděpodobnost dosažení R0 resekce. Další klinicky významnou charakteristikou neoadjuvantního přístupu je identifikace pacientů s inherentně agresivním onemocněním, u kterých dojde k progresi lokoregionální a/nebo systémové během neoadjuvance. To v konečném důsledku vede k selekci pacientů, pro které by jakýkoliv chirurgický výkon nebyl přínosem. Neoadjuvantní terapie současně může být možností ke zlepšení nutričního stavu pacienta před náročným operačním výkonem.

V současnosti existuje několik přístupů k léčbě tohoto onemocnění, které jsou podloženy výsledky randomizovaných studií. Známá je studie PREOPANC, kde byli pacienti s resekabilním a hraničně resekabilním onemocněním léčeni neoadjuvantní terapií v sekvenci: chemoterapie (gemcitabin), chemoradioterapie (gemcitabin weekly + hypofrakcionovaná radioterapie 15 x 2,4Gy), chemoterapie (gemcitabin) s následnou případnou operací a dokončením adjuvantní části chemoterapie (gemcitabin) do celkové doby 6 měsíců. Kontrolní rameno byli pacienti, kteří byli primárně operováni s následnou adjuvantní 6měsíční terapií gemcitabinem (standard v době zahajování studie). V rámci primárních výsledků nebyl pozorován rozdíl v parametru mOS mezi experimentálním a kontrolním ramenem (16,0 měsíce vs. 14,3 měsíce, HR 0,78, p=0,0096) v celkové populaci (resekabilní a hraničně resekabilní onemocnění). Byl ale identifikován benefit neoadjuvantního přístupu v parametru DFS, doby do objevení se lokální recidivy, vyššího procenta R0 resekci, vyššího procenta N0 onemocnění ⁹³. Aktualizované výsledky této studie při mediánu sledování 59 měsíců již prokázali statisticky signifikantní benefit v parametru OS pro experimentální rameno (mOS: 15,7 měsíce vs. 14,3 měsíce, HR 0,73, p=0,025). Jistě, z klinického pohledu rozdíl 1,4 měsíce není velký, ale při pohledu na Kaplan-Meierovy křivky je vidět, že 5letý OS byl 20,5 % vs. 6,5 % ve prospěch experimentálního ramene. Tedy existuje podskupina pacientů, která z tohoto přístupu může mít dlouhodobý klinický benefit. Otázkou zůstává, jak tuto podskupinu identifikovat ⁹⁴.

Na základě výsledků studií s adjuvantní terapií lze usuzovat, že režim mFOLFIRINOX je významně účinnější ve srovnání s gemcitabinem. To vedlo k iniciaci studie PREOPANC-2, kde byl srovnáván režim PREOPANC vs. mFOLFIRINOX. První výsledky této studie byly prezentovány na konferenci ESMO 2023, kde překvapivě nebyl nalezen rozdíl mezi rameny v parametru OS (21,9 měsíce v rameni s mFOLFIRINOX vs. 21,3 měsíce v rameni s režimem PREOPANC, HR 0,87, $p=0,28$). Současně nebyl pozorován ani rozdíl v míře dosažených resekcí (77 % vs. 75 %), a tak na objasnění těchto výsledků budeme muset vyčkat dalších analýz této studie ⁹⁵. I přes tyto výsledky je preferovaným režimem v případě pacientů s hraničně resekalibilním karcinomem, režim mFOLFIRINOX ⁹⁶.

Postavení radioterapie v léčbě hraničně resekalibilního onemocnění je kontroverzní, kdy malá studie ALLIANCE A021101 prokázala benefit sekvenční terapie režimem mFOLFIRINOX a chemoradioterapií ⁹⁷. Následně byli publikovány obdobné povzbudivé výsledky s tímto přístupem i dalšími autory ^{98–100}. Radioterapie primárního nádoru byla aplikována formou normofrakcionace. Vzhledem k známé radiorezistenci onemocnění byl testován i přístup využití stereotaktické radioterapie (SBRT) v léčbě tohoto onemocnění. Studie ALLIANCE 1021501, v rámci, které byli pacienti léčeni 8 cykly neoadjuvantního režimu mFOLFIRINOX vs. 7 cykly mFOLFIRINOX s následnou SBRT (5 x 5 Gy) primárního tumoru. Překvapivě, ale v této studii nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl mezi rameny ¹⁰¹. V rámci kongresu ESMO 2024 byly prezentovány výsledky studie PANDAS/PRODIGE 44, kde pacienti s hraničně resekalibilním onemocněním byli randomizováni mezi rameno se samotným režimem mFOLFIRINOX vs. rameno s režimem mFOLFIRINOX s následnou chemoradioterapií normofrakcionací. Studie neprokázala rozdíl mezi rameny v parametru R0 resekcí, ani v parametru mOS i přes skutečnost, že pravděpodobnost dosažení kompletní patologické remise (pCR) po neoadjuvantní terapii byla vyšší v rameni s radioterapií. Vyšší procento pCR se ale nepromítlo pozitivně do ostatních sledovaných parametrů.¹⁰². Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že radioterapie není volbou pro neselektovanou populaci pacientů, resp. v současnosti neznáme prediktory benefitu radioterapie u konkrétního pacienta a současné zástupné parametry jsou nedostatečné. Současně, neprokázaný rozdíl v parametru mOS mezi rameny i přes vyšší procento dosažených pCR v rameni s radioterapií, ukazuje opět na systémový charakter onemocnění, který je příčinou nejčastěji mnohočetné systémové generalizace a úmrtí pacientů.

8.3. Lokálně pokročilý karcinom pankreatu

Pacienti v tomto stadiu onemocnění jsou kontraindikováni k primárnímu chirurgickému výkonu z důvodu chirurgicky neřešitelné infiltrace cévních svazků (arteria hepatica communis, arteria mesenterica superior, truncus coeliacus). Základem terapie těchto pacientů je systémová terapie, zpravidla s paliativním záměrem. Pouze v nízkém procentu dochází k downsizingu a downstagingu, který by umožňoval resekci. Intenzita chemoterapie se odvíjí od celkového stavu pacienta a zahrnuje možnosti: gemcitabin, gemcitabin + nab-paclitaxel, mFOLFIRINOX. S ohledem na prospektivní studie máme pro tuto populaci data ze studie LAPACT pro gemcitabin + nab-paclitaxel, kde pacienti dosáhli mOS 18,8 měsíce a dokonce 16 % pacientů podstoupilo chirurgickou resekci ¹⁰³. Pocitově účinnější režim je mFOLFIRINOX. Pro tento režim v indikaci lokálně pokročilého karcinomu pankreatu ale nemáme k dispozici výsledky z prospektivní studie. Data o efektivitě tohoto režimu můžeme čerpat z metaanalýzy 13 studií, kde pozorován mOS byl 24,2 měsíce a resekce byla možná u 25,9 % pacientů ¹⁰⁴.

Zahájení terapie pacientů s lokálně pokročilým onemocněním je všeobecně akceptován standard. Již menší konsenzus je stran délky podávání, tzv. indukční terapie před eventuálním zařazením lokoregionálních metod (zejména radioterapie). Preferována délka úvodní systémové terapie se nejčastěji uvádí v rozmezí 4-6 měsíců, kdy je možné identifikovat pacienty s relativně indolentním onemocněním, bez vzdálené generalizace, kde je racionální zvažovat zařazení radioterapie s cílem zvýšit lokální kontrolu onemocnění a současně do strategie zařadit tzv. chemoterapeutické prázdniny. I v tomto případě, ale data pro zařazení radioterapie do algoritmu léčby lokálně pokročilého onemocnění nejsou přesvědčivá. V rámci LAP-07 studie byli pacienti po stabilizaci onemocnění po 4 měsících chemoterapie s gemcitabinem a erlotinibem randomizováni mezi pokračování v systémové terapii vs. zařazení chemoradioterapie. Zařazení chemoradioterapie sice vedlo ke zvýšení lokální kontroly onemocnění, ale nebyl pozorován rozdíl mezi rameny v parametru mOS ¹⁰⁵. Podobné výsledky byly pozorovány i v rámci studie CONKO-007, kde systémovou léčbou byl zejména režim mFOLFIRINOX. I zde zařazení chemoradioterapie nevedlo k prodloužení mOS, i když pacienti v rameni s chemoradioterapií měli vyšší procento dosažení pCR ¹⁰⁶.

8.4. Metastatický karcinom pankreatu

Převážná část pacientů (>60 %) s karcinomem pankreatu je diagnostikována primárně ve stadiu metastatického onemocnění, kdy je základem léčby paliativní chemoterapie. I zde lze sledovat vývoj od méně účinných režimů v podobě monoterapie, k dnes již standardním,

účinnějším kombinovaným režimům (dublety, triplet). Dnes již poměrně historickou možností terapie těchto pacientů je monoterapie gemcitabinem, která vede k diskrétnímu prodloužení přežití (mOS: 5,65 měsíce v případě gemcitabinu vs. 4,41 měsíce v případě 5-fluorouracilu),¹⁰⁷. Tato možnost je v současnosti zvažována u pacientů vyššího věku, případně v horší celkovém stavu (PS 2 WHO). Významný progres v terapii metastatického onemocnění představuje studie PRODIGE 4/ACCORD 11, která vedla k zakotvení režimu mFOLFIRINOX jako standardu léčby. Režim mFOLFIRINOX byl spojený s téměř dvojnásobně delším přežíváním ve srovnání s kontrolním ramenem, gemcitabinem (mOS: 11,1 měsíce vs. 6,8 měsíce, HR 0,45, $p < 0,001$). Vzhledem k profilu toxicity, mFOLFIRINOX je volen primárně pro biologicky mladší pacienty v dobrém celkovém stavu (PS 0-1 WHO)¹⁰⁸. Další možností iniciační terapie je kombinace gemcitabin a nab-paclitaxel dle výsledků studie MPACT. Kombinovaný režim byl srovnáván proti monoterapii gemcitabinem a prokázal prodloužení přežití v experimentálním rameni (mOS: 8,5 měsíce vs. 6,7 měsíce, HR 0,72, $p < 0,001$),⁸⁹. Vzhledem k příznivějšímu profilu toxicity je tento režim preferován u pacientů, kteří z důvodu celkového stavu, nebo komorbidit nejsou vhodní k terapii mFOLFIRINOX. Přímé srovnání dvou nejúčinnějších režimů v rámci randomizované studie nemáme k dispozici, ale dle dat z reálné klinické praxe se jeví v zásadě jako ekvivalentní s odlišným profilem toxicity^{109,110}. Recentně byly publikovány výsledky studie NAPOLI-3, která jako první svého druhu srovnávala dva moderní režimy v prostředí randomizované studie. Režim NALIRIFOX (v zásadě mFOLFIRINOX s nižší dávkou oxaliplatiny a nanoliposomálním irinotekanem místo konvenčního irinotekanu) byl testován vůči kombinaci gemcitabin a nab-paclitaxel. Studie prokázala superioritu NALIRIFOX proti kombinaci gemcitabinu a nab-paclitaxelu (mOS: 11,1 měsíce vs. 9,2 měsíce) při odlišném profilu toxicity¹¹¹. Nicméně, pozorovaný mOS režimu NALIRIFOX (11,1 měsíce) je identický jako v případě režimu mFOLFIRINOX (11,1 měsíce), a proto postavení NALIRIFOX jako nového standardu léčby je kontroverzní i s ohledem na výrazně vyšší finanční zátěž nového režimu. Argumenty pro NALIRIFOX může být o něco lepší tolerance a odpověď na léčbu.

Progrese onemocnění na první linii léčby je nevyhnutelná u naprosté většiny pacientů. Dle celkového stavu při progresi, odpovědi na léčbu první linie lze zvažovat pokračování v další řadě systémové léčby s vědomím jejího omezeného benefitu a nepříznivé biologie tohoto onemocnění. Možností terapie v rámci druhé linie je terapie platinovými deriváty v případě, že nebyli použity dříve. Data pro použití oxaliplatiny jsou ale kontroverzní, kdy studie CONKO-003 prokázala superioritu proti 5-fluorouracilu¹¹² a současně studie PANCREOX neprokázala

superioritu proti 5-fluorouracilu ¹¹³. V rámci druhé linie léčby metastatického onemocnění máme robustní data pro nanoliposomální formu irinotekanu, který v kombinaci s 5-fluorouracilem a leukovorinem prokázal svoji superioritu proti 5-fluorouracilu s leukovorinem v rámci studie NAPOLI-1 (mOS: 6,1 měsíce vs. 4,2 měsíce, HR 0,67, p=0,012), ¹¹⁴. Po progresi na druhé řadě systémové terapie je k dalšímu pokračování v systémové terapii vhodné velmi malé procento pacientů a je k nim potřeba přistupovat vysoce individuálně s vědomím velmi malého benefitu, a naopak velkého rizika dekompenzace křehkého stavu. Ve vysoce selektovaných případech se volba preparátů řídí předléčeností a je individualizována.

8.5. Personalizovaná terapie karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu je z molekulárního pohledu heterogenní onemocnění s řadou alterací, které vedou k deregulaci buněčné proliferace a iniciaci nádorové progresi. U většiny nádorů lze identifikovat mutaci v 4 základních genech (KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4), ke kterým dochází již během časných fází maligní transformace ⁴⁴. Vedle těchto alterací lze identifikovat desítky dalších, které se vyskytují s řádově nižší frekvencí, ale jsou rovněž odpovědné za nádorovou progresi, invazivitu, metastazování, rezistenci vůči konvenční terapii ¹¹⁵.

Přibližně 4-7 % pacientů s karcinomem pankreatu je nositelem germinální mutace BRCA1, nebo BRCA2 ^{116–118}. Gen BRCA kóduje proteiny, které se účastní homologní reparační dvouřetězcových zlomů DNA. Je známo, že nádory s BRCA1, BRCA2 mutací jsou senzitivní vůči terapii platinovými deriváty, a navíc vykazují senzitivitu k terapii inhibitory polyadenosin difosfát-ribóza polymerázy, tzv. PARP inhibitory. Vlivem PARP inhibitorů dochází k omezení reparační jednořetězcových DNA zlomů, což vede v konečném důsledku ke generaci dvouřetězcových zlomů, které v případě buněk s defektem homologní rekombinace (typicky buňky s deficiencí BRCA1, BRCA2) jsou neopravitelné a letální. Akumulace dvouřetězcových zlomů vede v konečném důsledku ke smrti buňky, procesem tzv. syntetické letality ¹¹⁹. Efektivita PARP inhibitorů byla potvrzena napříč spektrem BRCA mutovaných nádorů ¹²⁰. V rámci populace pacientů s karcinomem pankreatu byl benefit terapie PARP inhibitory potvrzen v několika menších studiích fáze II ^{121–123}. Robustní data o efektivitě PARP inhibitorů u pacientů s karcinomem pankreatu a germinální BRCA1, BRCA2 mutací máme ze studie fáze III, POLO. Pacienti byli léčeni chemoterapií založenou na platinovém derivátu a v případě, že nedošlo k progresi onemocnění byli randomizováni k maintenance terapii olaparibem vs. placebo. V rámci aktivního ramene byla prokázána superiorita maintenance

olaparibem proti placebu v parametru PFS (7,4 měsíce vs. 3,8 měsíce, HR 0,54, $p=0,004$), ¹²⁴. Zlepšení v parametru mPFS se ale nepromítlo do rozdílu mOS mezi rameny, kde byly výsledky prakticky identické (19,0 měsíce vs. 19,2 měsíce, HR 0,83, $p=0,3487$). Nicméně, více pacientů v rameni s olaparibem mělo šanci na déletrvající přežití, kde 3 roky přežívalo 33,9 % pacientů v aktivním rameni a pouze 17,8 % pacientů v kontrolním rameni ¹²⁵.

Přítomnost germinální BRCA1, BRCA2 mutace je poměrně vzácná. Přibývá ale důkazů, že i nádory pankreatu bez BRCA1, BRCA2 mutace mohou být senzitivní vůči platinovým derivátům s možností déletrvající kontroly onemocnění. Jedná se o významně větší populaci pacientů s geminálními a/nebo somatickými mutacemi v genech, kterých produkty se účastní reparace poškození DNA (například PALB2, ATM, ATR, CHECK1, CHECK2, RAD51 a další), ^{126,127}. Konkrétně se jedná o 20-25 % všech případů karcinomu pankreatu s alterací v těchto genech a jsou souhrnně označovány jako homologní rekombinace deficiční (HRD), nebo DNA damage repair deficiční (DDR) ^{128,129}. Tito pacienti by preferenčně měli být léčeni některým z režimů zahrnující platinový derivát (mFOLFIRINOX, mFOLFOX6, cisplatina/gemcitabin). Byly prezentovány klinické výsledky podporující tento preklinický předpoklad na souboru 820 pacientů, kde pacienti s HRD/DDR deficiencí měli signifikantní benefit z terapie platinovými deriváty (mOS: 2,37 roku vs. 1,45 roku). Tento přínos byl pozorován i v parametru PFS a bez ohledu na linii léčby, ve které byla terapie platinovým derivátem indikována ¹³⁰. Význam identifikace vhodných pacientů a senzitivita k platinovým derivátům byla potvrzena i v další studii ¹³¹.

Kromě populace BRCA1, BRCA2 a HRD/DDR nádorů pankreatu, lze identifikovat velmi malé podskupiny pacientů s přítomností potenciálně targetabilní alterace. Jsou k dispozici práce, které dokladují existenci dvou molekulárně odlišných skupin karcinomu pankreatu s ohledem na frekvenci výskytu potenciálně targetabilních alterací. Naprostá většina pacientů (cca 90 %) s karcinomem pankreatu má přítomnou KRAS mutaci ¹¹⁵. S ohledem na možnost personalizované terapie je klinicky zajímavější populace bez přítomnosti mutace KRAS vzhledem k významně vyššímu výskytu možných terapeutických cílů (FGFR2, BRAF, ERBB2, ALK, RET, NRG1). Současně jsou tyto nádory častěji mikrosatelitně instabilní (MSI-H), mají vyšší mutační nálož (TMB) a vyšší expresi PD-L1 kombinovaného pozitivního skóre (CPS) ^{132,133}. Navíc se ukazuje, že nepřítomnost KRAS mutace je častější u pacientů mladšího věku (medián věku 62,6 let vs. 65,7 let, $p=0,037$) a tato možnost by měla být vždy zvažována

¹³⁴.

Identifikace specifických molekulárních alterací u pacientů s karcinomem pankreatu je doporučována řadou mezinárodních onkologických společností. Všichni pacienti by měli být vyšetřeni s ohledem na možnou přítomnost germinální mutace, a současně pacienti, kteří jsou únosní k systémové terapii by měli podstoupit testování s cílem identifikace somatických mutací některým z dostupných panelů ²⁶, shrnuto v tabulce 3.

Tab. 3 Potenciálně targetabilní alterace u karcinomu pankreatu (upraveno dle citace ¹³⁵)

Gen	Alterace	Prevalence
BRCA1/2	germinální	1-4 %
	somatická	3 %
MMR geny	MSI-H	1-3 %
NTRK	fúze	<1 %
KRAS	mutace	90 %
PIK3CA	hotspot mutace	3 %
BRAF ^{V600E}	mutace	3 %
MDM2	amplifikace	2 %
ERBB2	amplifikace/mutace	1-2 %
NRG1	fúze	1 %
ALK	fúze	<1 %
RET	fúze	<1 %
ROS1	fúze	<1 %

9. Prognostické a prediktivní markery v léčbě karcinomu pankreatu

9.1. Tekutá biopsie

Diagnostika karcinomu pankreatu, zejména s ohledem na potřebu odběrů biologického materiálu k histopatologickému a v současnosti i molekulárně-biologickému vyšetření, je prováděna nejčastěji formou tenkojehlové biopsie (FNAB) v rámci endoskopického ultrazvukového (EUS) vyšetření. Vzhledem k invazivitě vyšetření a rizikům spojeným s odběrem materiálu není tato metoda vhodná k opakovaným odběrům biologického materiálu. Navíc vzhledem k charakteru mikroprostředí nádoru, což je desmoplastické stroma s malým zastoupením nádorových buněk, může být FNAB často diagnosticky nevýtežná.

Jako slibná alternativa EUS + FNAB se jeví možnost tzv. tekuté biopsie prostřednictvím odběru periferní krve. Vzhledem ke své bezpečnosti a malé invazivitě je vhodná i pro opakovaná vyšetření v průběhu léčby. V současnosti jsou rutinně vyšetřovány z periferní krve pouze nádorové markery, CEA a Ca19-9. I když je jejich specifita poměrně vysoká (0,82 pro Ca19-9 a 0,73 pro CEA), jejich senzitivita je nižší (0,43 a 0,78, resp.). Navíc hodnota Ca19-9 může být falešně pozitivní i z nenádorových důvodů (obstrukční ikterus), nebo falešně negativní u přibližně 10 % populace, která neexprimuje Lewisův antigen. K metodám tekuté biopsie v pravém slova smyslu lze řadit vyšetření cirkulující nádorové DNA (ctDNA) a vyšetření cirkulujících nádorových buněk (CTC).

9.1.1. ctDNA

ctDNA představuje relativně snadno dostupný materiál u pacientů s malignitami cestou tzv. tekuté biopsie. Vzhledem k relativně malé invazivitě této metody cestou odběru periferní krve je analýza ctDNA prostřednictvím tekuté biopsie vhodným markerem k opakovaným analýzám v průběhu onkologického onemocnění. Analýzu ctDNA lze využít v řadě situací: v rámci časně diagnostiky onemocnění, k stratifikaci pacientů dle rizikovosti, při monitorování léčebné odpovědi v reálném čase, po léčbě k sledování tzv. minimální residuální nemoci, k časně detekci relapsu onemocnění. Neméně důležitá analýza ctDNA s cílem identifikace možných mechanismů rezistence nádorového onemocnění a případně i identifikace nových potenciálních terapeutických cílů ¹³⁶. Vzhledem ke krátkému poločasu přítomnosti ctDNA v cirkulaci poskytuje tento marker obraz o onemocnění v reálném čase.

ctDNA je obvykle tvořena fragmenty dvouvláknové molekuly DNA o velikosti 70-200 párů bazí a může být detekována jak v plazmě, tak séru. Do cirkulace je ctDNA uvolňována apoptózou, nekrózou, lýzou cirkulujících nádorových buněk (CTC), jednak spontánní, jednak indukovanou léčbou ¹³⁷.

Vzhledem k vysoké frekvenci přítomnosti KRAS mutace u nádorů pankreatu je právě tato mutace často využívána jako zástupný marker přítomnosti ctDNA u pacientů s karcinomem pankreatu ^{138,139}. Dle dostupných dat se frekvence přítomnosti KRAS mutace u pacientů s karcinomem pankreatu pohybuje v rozmezí 50-77 % ^{140–142}, což je ale významně méně než očekávaná frekvence výskytu KRAS mutace u pacientů s karcinomem pankreatu a je tak prostor pro další zvýšení senzitivity detekčních metod. V řadě prací se nicméně potvrdil negativní prognostický význam přítomnosti KRAS v ctDNA jak s ohledem na OS, tak PFS pacientů s karcinomem pankreatu jak v časném, tak metastatickém stadiu ^{143–145}. Tyto výsledky potvrzuje i zcela recentní práce, kde přítomnost ctDNA v cirkulaci během terapie, nebo v období sledování byla spojena se signifikantně horším DFS ¹⁴⁶. Navíc se ukazuje, že dynamika změn ctDNA během terapie metastatického onemocnění predikuje odpověď na terapie lépe než klasické markery CEA a Ca19-9 ¹⁴⁷. Kromě prognostického významu přítomnosti ctDNA lze tento marker využít do jisté míry i při rozhodování o volbě terapeutického postupu nad rámec klasických modalit (CT vyšetření), kde přítomnost ctDNA po neoadjuvantní terapii a zvažování resekce může pomoci identifikovat pacienty v riziku mikrometastatické nemoci, u které případný chirurgický výkon by nebyl přínosem ¹⁴⁸. Konečně, analýza ctDNA v průběhu léčby může pomoci identifikovat jednak mechanismy vzniku sekundární rezistence, jednak identifikovat nové potenciální terapeutické cíle ¹⁴⁹.

9.1.2. CTC

Cirkulující nádorové buňky (CTC) jsou buňky, které se oddělily od primárního nádoru, vstoupily do cirkulace, kterou jsou transportovány do potenciálních cílových orgánů, kde zakládají metastatické ložisko. Předpokladem vzniku CTC je oslabení mezibuněčných kontaktů v rámci primárního nádoru, indukce buněčné motility a invazivity v rámci procesu EMT ¹⁵⁰. Tyto buňky jsou považovány za prekurzory metastáz a často vykazují známky tzv. tumor iniciujících buněk, resp. nádorových kmenových buněk ¹⁵¹. Souhrnně lze změny v procesu EMT, které vedou ke vzniku CTC charakterizovat: zvýšená invazivita, zvýšená schopnost indukce angiogeneze, zvýšená rezistence vůči apoptotickým signálům. Přítomnost CTC v periferní krvi pacientů je prokazatelně asociována s prognózou pacientů u řady malignit ¹⁵².

Detekce, izolace, kvantifikace a molekulární charakterizace CTC má velký potenciál v onkologii. Nicméně jejich detekce a izolace z periferní krve není jednoduchá vzhledem k jejich nízkému zastoupení v periferní krvi, kde 1 CTC připadá na 10^6 - 10^9 normálních buněk. Další výzvou je jejich biologická heterogenita, která znesnadňuje jejich detekci a izolaci ¹⁵³. V současnosti je k dispozici řada možností detekce a izolace CTC z periferní krve. Využívají jednak odlišné fyzikální parametry CTC (velikost, hustota), jednak specifické povrchové struktury CTC. V případě metod využívajících fyzikální vlastnosti CTC se jedná o separaci dle velikosti (size-based separation) přes membránu ¹⁵⁴, případně separaci dle hustoty (density-gradient separation). Limitací těchto metod je jejich nízká senzitivita, vzhledem k podobné velikosti části CTC a krevních elementů mohou tyto uniknout detekci. Na druhou stranu, izolace dle velikosti není závislá na přítomnosti specifických povrchových antigenů (nejčastěji epiteliální markery), které řada CTC ztrácí v průběhu procesu EMT. Navíc v procesu izolace CTC pomocí separace dle velikosti lze izolovat viabilní CTC, které mohou být následně kultivovány in vitro. Takto vzniklé populace buněk lze následně charakterizovat s cílem identifikace potenciálních terapeutických cílů, nebo testování chemosenzitivity in vitro ¹⁵⁴. Podobný princip je využíván i v případě tzv. patient derived organoids metod, kde lze in vitro tyto buňky kultivovat a testovat jejich chemosenzitivitu s potenciálem přenosu těchto informací do klinické praxe ^{155,156}. S ohledem na metody, které k detekci CTC využívají specifické povrchové struktury CTC jsou to polo/automatické metody typu imunomagnetické separace (tzv. pozitivní selekce) s následným skenováním takto izolovaných buněk ^{157,158}. Výhodou těchto metod je rychlost, polo/automatická technologie. I zde jsou však přítomné limitace, například ztráta epiteliálních markerů CTC v procesu EMT vede k falešné negativitě a je známo, že právě CTC, které exprimují mezenchymální markery a mají downregulované epiteliální markery jsou biologicky nejvíce potentní a mají vlastnosti nádorových kmenových buněk a tzv. tumor iniciujících buněk ¹⁵².

Klinický význam CTC lze doložit v řadě klinických situací. Je prokázáno v řadě metaanalýz, že přítomnost CTC v periferní krvi predikuje riziko budoucí generalizace a prognózu pacientů ^{159–162}. V průběhu léčby pacientů mohou být CTC opakovaně využity k hodnocení léčebné odpovědi nad rámec běžných re-stagingových metod a rovněž mohou sloužit k volbě preferovaného režimu při progresi onemocnění v případě molekulárně-genetického vyšetření CTC ¹⁶³. To vše vede k větší míře individualizace terapie pacientů. Vzhledem k tomu, že CTC jsou obecně chápány jako prekursor metastáz, je jejich identifikace

a charakterizace jednou z možných cest, jak terapeuticky ovlivnit metastatický rozsev v samotném počátku ¹⁶⁴.

9.1.3. MicroRNA

MicroRNA (miRNA) jsou endogenní malé (19-24 nukleotidů) nekódující RNA molekuly, které regulují expresi řady genů cestou párování bazí ke komplementárním, nepřekládaným, úsekům cílové messenger RNA (mRNA), což vede k ovlivnění následné translace, případně k degradaci mRNA ¹⁶⁵. Bylo identifikována přes 700 miRNA, které tvoří asi 3 % lidského genomu a kontrolují expresi více než 60 % protein-kódujících genů. Účastní se regulace genové exprese řady genů a uplatňují se tak například v procesu růstu, diferenciaci, proliferaci a apoptózy ¹⁶⁶. Velká část miRNA má významnou roli v postranskripční regulaci a může v konečném důsledku působit onkogenně, nebo jako tumor-supresor dle vazby na cílovou mRNA ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Odlíšná exprese miRNA nádorových buněk ve srovnání se zdravými tkáněmi vedla k jejich dalšímu studiu. Z výsledku dosavadních studií je zřejmé, že miRNA je dalším potenciálním prognostickým markerem u pacientů s malignitami. Význam miRNA byl identifikován již v časných fázích karcinomu pankreatu, kde downregulace specifických miRNA vedla k upregulaci exprese onkogenu KRAS a maligní transformaci buňky, zatímco reexprese specifických miRNA vedla k supresi migrace, proliferace a invaze buněk ¹⁷⁰⁻¹⁷². Analogicky byl význam miRNA popsán ve vztahu k: regulaci exprese tumor-supresorových genů, genů majících vztah k vlastnostem nádorových kmenových buněk, epigenetické regulaci, ovlivnění nádorového mikroprostředí, imunosupresivnímu prostředí. Heterogenní exprese řady miRNA a jejich pleiotropní efekt v rámci iniciace, progresu, odpovědi na léčbu z nich dělá potenciální diagnostické, prognostické a prediktivní markery u pacientů s karcinomem pankreatu ¹⁷³.

9.2. Inflammation-based prognostické skórovací systémy

Karcinogeneze je mnohostupňový proces akumulace mutací vlivem faktorů vnějšího a vnitřního prostředí, který vede k aktivaci onkogenů, inaktivaci tumor supresorových genů a narušení reparačních mechanismů.

Vliv zánětu na iniciaci a progresi nádorů byl popsán Virchowem již v roce 1863, když pozoroval přítomnost zánětlivého infiltrátu v nádoru. V současnosti je zánět chápán jako jeden

typických znaků nádorů⁴⁷ a jako jeden z mechanismů iniciace nádorové progresi řady nádorů, včetně karcinomu pankreatu^{174,175}. Přítomnost zánětu, který je iniciálně aktivován jako reakce organismu na narušení homeostázy, v konečném důsledku vede k nádorové progresi¹⁷⁶. V případě karcinomu pankreatu je zánět v rámci chronické pankreatitidy známým rizikovým faktorem¹². Navíc je prokázáno, že řada stavů, které jsou spojené s přítomností mírného chronického zánětu jako metabolický syndrom, diabetes mellitus zvyšují riziko vzniku nádorů, zvláště karcinomu pankreatu¹⁷⁷.

Je prokázáno, že součástí každého nádoru jsou imunokompetentní buňky od ojedinělých populací až po rozsáhlé infiltráty¹⁷⁸. Přítomnost buněk imunitního systému v okolí/uvnitř nádoru byla v minulosti chápána zejména jako snaha o eradikaci takto mutovaných buněk z organismu. V současnosti přibývá informací, že imunokompetentní buňky (zejména buňky vrozené imunity) v nádoru se mohou paradoxně podílet na nádorové progresi. Přítomnost zánětu v konečném důsledku vede k produkci/přítomnosti bioaktivních molekul v nádorovém mikroprostředí, které působí jako: růstové faktory stimulující proliferaci, molekuly odpovědné za rezistenci vůči apoptóze, proangiogenní faktory, enzymy modifikující extracelulární matrix, které zvyšují invazivitu a metastazování. Dalšími působky, které imunokompetentní buňky produkují v reakci na setkání s antigenem (nádorem), jsou reaktivní sloučeniny kyslíku, které rovněž mohou působit mutagenně, a tak vést k maligní transformaci nebo zvyšovat nádorovou heterogenitu.^{179–182}

Významný vliv lokálního a/nebo systémového zánětu a role imunokompetentních buněk v iniciaci, progresi nádorového onemocnění vedla ke snahám využít tyto poznatky v klinické praxi ve smyslu návrhu skórovacích systémů, které jednotlivé komponenty hodnotí samostatně, nebo ve formě poměru jednotlivých buněčných populací prostřednictvím řady indexů. Souhrnně jsou označovány jako tzv. inflammation-based prognostické skórovací systémy a mohou být v běžné klinické praxi využity k predikci prognózy onemocnění u řady malignit^{183,184}.

Současně byly publikovány i práce hodnotící tyto skórovací systémy v populaci pacientů s karcinomem pankreatu, kde bylo opakovaně potvrzeno, že jsou dostatečně robustní a dokážou stratifikovat pacienty dle prognózy^{185–190}.

10. Metodologie

V teoretické části práce byl proveden přehled epidemiologie, etiologie, molekulární biologie, diagnostiky, současných léčebných možností karcinomu pankreatu a potenciálních prognostických faktorů.

V praktické části jsme se zaměřili na identifikaci potenciálních prediktivních a prognostických parametrů u pacientů s karcinomem pankreatu bez ohledu na vstupní stadium onemocnění (resekabilní, hraničně resekabilní, lokálně pokročilé a metastatické), kteří byli léčeni na Onkologické klinice FNKV a 3. LF UK.

11. Cíle a hypotézy

Cílem práce byla identifikace potenciálních prediktivních a prognostických parametrů u pacientů s karcinomem pankreatu, kteří podstupují onkologickou terapii. Konkrétně, práce měla za cíl hodnotit význam tzv. inflammation-based parametrů (CRP, CAR, NLR, PLR, LMR, SIRI, PNI, PI, GPS, mGPS, MPS, ALBI, CEA, Ca19-9 a albumin), význam exprese miRNA (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a, miR-210 a miR-217) a vztah inflammation-based parametrů a genové exprese na úrovni CTC v této populaci nemocných. Současně jsem se pokusil odpovědět na otázku, zde lze tyto získané poznatky využít v terciární prevenci onkologického onemocnění.

Jedná se o retrospektivně-prospektivní studii, která byla zaměřena na identifikaci potenciálních prediktivních a prognostických parametrů u pacientů s karcinomem pankreatu ve vztahu k prognóze tohoto onemocnění.

Byly definovány následující hypotézy:

1. Přítomnost systémového zánětu hodnoceného pomocí inflammation-based parametrů negativně ovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu.
2. Diferenciální exprese vybraných miRNA je asociována s přežíváním pacientů s karcinomem pankreatu.
3. Profil genové exprese CTC se liší v závislosti od hodnoty inflammation-based parametrů (</> cut-off).

12. Materiál a metody

12.1. Inflammation-based parametry u pacientů s karcinomem pankreatu

12.1.1. Design studie

Do studie bylo zařazeno celkem 110 pacientů s diagnostikovaným a léčeným karcinomem pankreatu ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady (FNKV) v období červen 2019 až duben 2023. Pro účely této analýzy bylo hodnoceno celkem 56 pacientů s metastatickým onemocněním, kteří obdrželi terapii první linie. Přítomnost metastatického onemocnění byla verifikována pomocí kontrastního vyšetření počítačovou tomografií (CT), provedeným v období jednoho měsíce před zahájením systémové terapie. Všechny hodnocené vstupní laboratorní parametry u pacientů byly vyšetřeny nejpozději 14 dní před zahájením systémové terapie a zaznamenány ve zdravotnické dokumentaci pacienta. Systémová terapie první linie metastatického onemocnění byla volena dle aktuálních guidelines s ohledem na výkonnostní stav, komorbiditu a preferenci pacienta. Pacienti byli léčeni do progresu onemocnění, nepřijatelné toxicity, nebo odvolání souhlasu. Návštěvy pacientů, kontrolní laboratorní a zobrazovací vyšetření, byly pravidelně zaznamenávány ve zdravotnické dokumentaci pacientů. Všechny procedury v rámci studie byly prováděny v souladu etickými standardy FNKV a Helsinskou deklarací. Studie byla schválena etickou komisí FNKV.

12.1.2. Léčebné schémata a hodnocení odpovědi

Gemcitabin + nab-paclitaxel (GnP) byl podáván ve schématu: gemcitabin 1000 mg/m² a nab-paclitaxel 125 mg/m² ve dnech 1, 8 a 15 každé 4 týdny. mFOLFIRINOX byl podáván ve schématu: oxaliplatina 85 mg/m², leukovorin 200 mg/m², irinotecan 150 mg/m² a kontinuální infuze 5-fluorouracilu 2400 mg/m² po dobu 46 hodin každé 2 týdny. Kapecitabin byl podáván ve schématu 1000 mg/m² dvakrát denně, den 1-14, každé 3 týdny. Doxorubicin byl podáván ve schématu 75 mg/m² každé 3 týdny.

Staging onemocnění u pacientů ve studii byl prováděn dle American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union against Cancer (UICC), verze 8. U léčených pacientů byl re-staging prováděn pomocí kontrastního CT vyšetření v intervalu +/- 12 týdnů.

OS pacientů ve studii byl kalkulován od data zahájení podání paliativní chemoterapie první linie až do doby úmrtí, nebo cenzorován v době konečného cut-off studie v případě, že byl pacient naživu.

12.1.3. Definice studovaných inflammation-based parametrů

Studované inflammation-based parametry v této studii shrnuje tabulka 4. Cut-off hodnoty pro jednotlivé parametry byly převzaty z obdobných, dříve publikovaných studií. Následně, dle hodnoty cut-off jednotlivých parametrů byli pacienti rozděleni do odpovídajících skupin.

Tab. 4 Přehled inflammation-based prognostických parametrů

Definice	Skóre, poměr, hodnota
<i>C-reaktivní protein</i> (mg/l)	5
<i>CAR (C-reactive protein-to-albumin ratio)</i>	
C-reaktivní protein (mg/l)/albumin (g/l)	≤0.5
C-reaktivní protein (mg/l)/albumin (g/l)	≥0.5
<i>NLR (neutrophil-to-lymphocyte ratio)</i>	
Počet neutrofilů (/μl)/počet lymfocytů (/μl)	≤5
Počet neutrofilů (/μl)/počet lymfocytů (/μl)	≥5
<i>PLR (platelet-to-lymphocyte ratio)</i>	
Počet trombocytů (/μl)/počet lymfocytů (/μl)	≤300
Počet trombocytů (/μl)/počet lymfocytů (/μl)	≥300
<i>LMR (lymphocyte-to-monocyte ratio)</i>	
Počet lymfocytů (/μl)/počet monocytů (/μl)	≤3
Počet lymfocytů (/μl)/počet monocytů (/μl)	≥3

<i>SIRI (systemic inflammatory response index)</i>	
Počet neutrofilů (/μl) × 10 × počet trombocytů (/μl)/počet lymfocytů (/μl)	≤2.3
Počet neutrofilů (/μl) × 10 × počet trombocytů (/μl)/počet lymfocytů (/μl)	≥2.3
<i>PNI (prognostic nutritional index)</i>	
albumin (g/l) + 5 × počet lymfocytů (/μl)	≤45
albumin (g/l) + 5 × počet lymfocytů (/μl)	≥45
<i>PI (prognostic index)</i>	
C-reaktivní protein ≤10 (mg/l) a počet leukocytů ≤11,000 (/μl)	0
C-reaktivní protein >10 (mg/l) nebo počet leukocytů >11,000 (/μl)	1
C-reaktivní protein >10 (mg/l) a počet leukocytů >11,000 (/μl)	2
<i>GPS (Glasgow prognostic score)</i>	
C-reaktivní protein ≤10 (mg/l) a albumin ≥35 (g/l)	0
C-reaktivní protein ≤10 (mg/l) a albumin <35 (g/l)	1
C-reaktivní protein >10 (mg/l) nebo albumin >35 (g/l)	1
C-reaktivní protein >10 (mg/l) nebo albumin <35 (g/l)	2
<i>mGPS (modified Glasgow prognostic score)</i>	
C-reaktivní protein ≤10 (mg/l) a jakýkoliv albumin (g/l)	0
C-reaktivní protein >10 (mg/l) nebo albumin >35 (g/l)	1
C-reaktivní protein >10 (mg/l) a albumin <35 (g/l)	2

<i>MPS (Memorial Sloan Kettering prognostic score)</i>	
Albumin ≥ 4 g/dl a NLR ≤ 4	0
Albumin < 4 g/dl nebo NLR > 4	1
Albumin < 4 g/dl a NLR > 4	2
<i>ALBI score (albumin-bilirubin score)</i>	
$(\log_{10} \text{bilirubin} \times 0.66) + (\text{albumin} \times -0.085) < -2.6$	1
$(\log_{10} \text{bilirubin} \times 0.66) + (\text{albumin} \times -0.085) > -2.6 \text{ to } < -1.39$	2
$(\log_{10} \text{bilirubin} \times 0.66) + (\text{albumin} \times -0.085) > -1.39$	3
Karcinoembryonální antigen ($\mu\text{g/l}$)	2,5
Karbohydrát antigen 19-9 (kU/l)	30
<i>Albumin</i> (g/l)	35

12.1.4. Statistická analýza

Data pacientů byly sbírány lékaři se zkušenostmi v rámci klinického výzkumu ve spolupráci se statistikem a následně centrálně zpracovány. Přežívání pacientů bylo odhadováno pomocí Kaplan-Meier (KM) metody s následným srovnáním pravděpodobnosti přežití pomocí log-rank testu. Log-rank test byl použit k odhadu odpovídajícího hazard ratio (HR). HR je vyjádřeno s 95% konfidenčním intervalem (CI). Univariační analýzy byly provedeny pomocí Studentova t-testu. P-hodnoty $< 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

12.2. Exprese vybraných miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu

12.2.1. Design studie

Pro tuto studii byly použity vzorky tkáně pacientů, kteří podstoupili chirurgickou resekci (Whipple, Traverso-Longmire, distální pankreatektomii, nebo totální pankreatektomii) pro karcinom pankreatu v období 2007-2015 ve FNKV. Formalinem fixované, parafinem zalité (FFPE) bločky nádorové tkáně a normálního pankreatického parenchymu (negativní kontrola) byly získány z archivu Ústavu patologie FNKV. Nádorová tkáň představovala minimálně 2/3 plochy bločku. Negativní kontrola nenádorové tkáně pankreatu byla získána z tkáně ve vzdálenosti alespoň 15 mm od nádoru. Z klinické databáze byly získány údaje o zařazených pacientech (věk, pohlaví, grade nádoru, TNM stadium). Pacienti byli sledováni až do ledna 2018, s mediánem sledování 19 měsíců. Všichni pacienti podepsali souhlas s využitím jejich odebrané tkáně pro výzkumné účely. Studie byla prováděna v souladu etickými standardy FNKV a Helsinskou deklarací. Studie byla schválena etickou komisí FNKV.

12.2.2. Izolace miRNA a reverzní transkripce

Tři 6um silné neobarvené řezy z FFPE bločků, kde nádor zaujímal alespoň 2/3 plochy byly použity k extrakci RNA pomocí miRNeasy FFPE kitu (Quiagen) dle instrukcí výrobce. Po provedení reverzní transkripce a komplementární DNA (cDNA) byla cDNA amplifikována pomocí Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR systému a Hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne). Reakční směs obsahovala 10 pmol každého miRNA primeru a 2 µl cDNA. Amplifikace cDNA byla provedena následovně: denaturace při teplotě 94 °C po dobu 15 minut, následovně 40 cyklech sestávajících z denaturací při 94 °C po dobu 15 sekund, annealingem při teplotě 62 °C po dobu 60 sekund, a konečně syntézou DNA při teplotě 72 °C po dobu 40 sekund. Specificita reakčního produktu byla kontrolována dle odpovídajících křivek tání. K měření exprese miRNA byla použita metoda $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

12.2.3. Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí GenEx 6, S.A.S., verze 9,4 (SAS Inc., Cary, NC, USA), a SPSS 25 (IBM Corporation). Exprese miRNA v nádorové a nenádorové tkáni byla porovnávána pomocí Wilcoxonova párového testu. Pro analýzu OS a PFS byl použit Coxův model poměrného hazardu. P-hodnota <0,05 byla považována za statisticky signifikantní.

12.3. Genová exprese CTC u pacientů s karcinomem pankreatu

12.3.1. Design studie

V rámci této předběžné explorativní analýzy byla analyzována diferenciální genová exprese CTC pacientů s metastatickým onemocněním ve vztahu k inflammation-based prognostickým parametrům (stratifikováno dle hodnoty cut-off parametru). Tato analýza zahrnovala 15 pacientů s metastatickým onemocněním ze skupiny 44 pacientů, u kterých byl hodnocen a prokázán vztah inflammation-based parametrů na prognózu onemocnění (viz kapitola 13.1.), kde jsou specifikovány i zařazovací kritéria a průběh sledování, hodnocení odpovědi.

12.3.2. Vyšetření CTC

Odběr periferní krve a izolace CTC

Izolace CTC z periferní krve byla u pacientů provedena pomocí separace dle velikosti, MetaCell (MetaCell s.r.o., Česká republika) ¹⁹¹. Přítomnost CTC byla následně hodnocena pomocí cytomorfologie, která mohla být následována molekulárním vyšetřením, například kvantitativní polymerázou řetězovou reakcí (qPCR), mutační analýzou, nebo pomocí standardních imunohistochemických metod. U každého pacienta bylo pro izolaci CTC odebráno 2 x 8ml venózní periferní krve z žíly předloktí do Vacuette EDTA zkumavek (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Rakousko). Vzorky byly zpracovány při pokojové teplotě do 24 hodin od odběru periferní krve.

V rámci MetaCell zkumavky je periferní krev filtrována přes separační membránu, které je bezprostředně po filtraci s izolovanými buňkami přemístěna do 6jamkové kultivační destičky. Následně je přidáno 4ml RPMI média k membráně a izolované buňky jsou kultivovány in vitro při standardních podmínkách pro buněčné kultury (37 °C, 5 % CO₂ atmosféra) a hodnoceny pomocí invertovaného mikroskopu. CTC jsou kultivovány v FBS obohaceném RPMI médiu (10 %) po dobu minimálně 3-5 dnů. Pod separační membránu může být umístěno mikroskopické sklíčko a CTC mohou přirozeně invazivně růst a vytvářet nové buněčné kolonie na mikroskopickém sklíčku. Pokud se plánuje imunohistochemická a/nebo imunofluorescenční analýza, upřednostňuje se kultivace na mikroskopickém sklíčku. Buňky obohacené na separačních membránách mohou být také fixovány paraformaldehydem a

obarveny za účelem vizualizace aktinových vláken (ActiGreen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a to i zpětně, pokud je separační membrána uložena.

Cytomorfologická analýza CTC

Obohacené životaschopné buňky se barví pomocí vitálních fluorescenčních barviv (Celltracker®, NucBlue®, Mitotracker®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) přímo na separační membráně. Buňky se hodnotí pomocí fluorescenční mikroskopie ve třech krocích: (i) screening při zvětšení $\times 20$ pro lokalizaci buněk. (ii) pozorování při zvětšení $\times 40/\times 60$ pro podrobnou cytomorfologickou analýzu. Izolované buňky a/nebo shluky zájmových buněk jsou vybrány, digitalizovány a vyšetřeny zkušeným výzkumníkem a/nebo patologem. (iii) hodnocení počtu CTC.

CTC byly definovány jako buňky vykazující následující charakteristiky: (a) velikost jádra rovná nebo větší než $15\ \mu\text{m}$; (b) nepravidelnost jaderného obrysu; (c) přítomnost viditelné cytoplazmy a velikost buňky; (d) přítomnost výrazných nukleolů a jejich počet; (e) vysoký poměr jader a cytoplazmy. Jaderně-cytoplazmatický poměr (N/C) se hodnotí s ohledem na odlišnou morfologii rostoucích buněk ve srovnání s poměrem N/C ve vzorcích tkání (viz příloha 4). CTC pozitivita v periferní krvi byla definována pozitivitou na základě mikroskopického hodnocení a molekulární analýzy.

Profilování genové exprese

Zpracování celé periferní krve pro získání frakce bílých krvinek (WBC): 200 μl periferní krve a 800 μl pufru EL (Qiagen, Německo) bylo smícháno a inkubováno na ledu po dobu 10-15 minut. Suspenze byla odstředěna při $400\times g$ po dobu 10 min při $4\ ^\circ\text{C}$. Supernatant byl zcela odstraněn a zlikvidován. K buněčné peletě se přidalo 400 μl pufru EL a pipetováním se resuspendovala. Suspenze byla odstředěna při $400\times g$ po dobu 10 min při $4\ ^\circ\text{C}$ a supernatant byl zcela odstraněn a zlikvidován. K peletě bílých krvinek bylo přidáno 600 μl pufru RLT doplněného β -merkptoethanolem (VWR, USA); suspenze byla promíchána pipetováním a uložena při $-20\ ^\circ\text{C}$.

Obohacení CTC pro izolaci RNA: 8 ml periferní krve bylo přefiltrováno přes separační membránu (8 μm póry) zařízení Metacell® tube (Metacell s.r.o., Česká republika). Separovaná frakce buněk zachycených na membráně byla rozrušena 600 μl pufru RLT + β -merkptoethanolu a suspenze byla uložena při $-20\ ^\circ\text{C}$.

Izolace RNA a příprava cDNA: Pro izolaci RNA z uložených vzorků byla použita sada RNeasy Mini Kit (Qiagen, Německo). Byly rozmrazeny frakce ze zpracování periferní krve (1. bílé krvinky (WBC), 2. obohacené buňky (CTCs-enriched), 3. kultivované buňky na membráně a 4. kultivované buňky pod membránou) smíchané s pufrem RLT doplněným β -merkaptoethanolem. Přidalo se 600 μ l 70 % ethanolu (Fagron a.s., Česká republika) a pipetováním se promíchalo. Koncentrace RNA byla měřena spektrofotometrem NanoDropTM 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro syntézu cDNA byla použita sada High-Capacity RNA-to-cDNATM Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Reakční komponenty byly přidány podle výrobních pokynů. Zkumavky s reakční směsí byly odstředěny a vloženy do termálního cykléru (Biometra, Biomed CZ). Podmínky v termocykleru byly nastaveny podle výrobního návodu.

Analýza genové exprese: Rozdíly mezi frakcí obohacenou o WBC a CTCs byly zjišťovány pomocí qPCR analýzy genů asociovaných s nádorem a/nebo chemorezistencí. Pro testování genové exprese ve vzorcích byly použity testy TaqManTM Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, USA): Bylo testováno následujících 24 genů: ACTB, VEGF, PGC, CDC6, KNTC, LYRM1, IGF2, FLT1, CD45, VIM, POU5F, ZEB1, TWIST1, KRT18, KRT19, KRT20, SOX2, NANOG, SLUG, SNAIL1, HIF1alfa, CXCR4, GATA6, CPT1A.

Analýza genové exprese byla měřena přístrojem COBAS[®]480 (Roche s.r.o., Česká republika). Teplotní podmínky byly nastaveny podle výrobního návodu TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA).

Na základě analýzy genové exprese byly vzorky obohacené o CTC se zvýšenou relativní hladinou exprese dvou nebo více genů TA považovány za CTC pozitivní ve srovnání s odpovídajícími vzorky WBC.

Data byla analyzována a porovnávána pomocí softwaru GENex v.s 6 (MultiD, Švédsko).

12.3.3. Statistická analýza

Data byla porovnána standardními testy pomocí softwaru GraphPad Prism vs. 9.1.0 (GraphPad Prism, USA). Vyhodnocení qPCR dat bylo založeno na standardní metodě ddCT. qPCR výsledky byly analyzovány pomocí softwaru GenEx Professional (MultiD, SE), který umožnil vícefaktorové srovnání mezi zúčastněnými skupinami. Rozdíly mezi vzorky byly

porovnány pomocí U Mannova-Whitneyho testu (hladina významnosti na úrovni $P < 0,05$, pokud nebyla automaticky nastavena programem GenEx).

13. Výsledky

13.1. Inflammation-based parametry u pacientů s karcinomem pankreatu

13.1.1. Charakteristiky pacientů

V období června 2019 až dubna 2023 bylo do studie zařazeno celkem 110 pacientů s výkonnostním stavem PS 0-2 WHO, kteří byli diagnostikováni a léčeni na Onkologické klinice FNKV. Po vyřazení 54 pacientů s nemetastatickým onemocněním bylo dále analyzováno 54 pacientů s potvrzeným metastatickým onemocněním. Charakteristiky pacientů jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab. 5 Charakteristiky pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu

	n	%
<i>Celkem</i>	56	100
Muži	15	26,8
Ženy	41	73,2
<i>Věková distribuce</i>		
>65 let	29	51,8
>70 let	20	35,7
> 75 let	7	12,5
> 80 let	1	1,8
Medián věku: 65 let (rozsah 41–82 let)		
<i>Body mass index</i>		
<18,5	1	1,8
18,5 – 25	36	64,3

25 – 30	14	7,8
>30	5	2,8
<i>Diabetes mellitus</i>		
Bez medikace	39	69,6
Perorální antidiabetika	7	12,5
Inzulín	6	10,7
Perorální antidiabetika + inzulin	4	7,1
<i>Výkonnostní stav dle WHO</i>		
PS 0 WHO	20	35,7
PS 1 WHO	23	41,4
PS 2 WHO	13	23,2
<i>Histologie</i>		
Adenokarcinom duktální	46	82,1
Adenoskvamózní karcinom	1	1,8
Anaplastický karcinom	1	1,8
Leiomyosarkom	1	1,8
Pancreatická intraepiteliální neoplázie I-III	3	5,4
Jiná	4 ¹	7,1
<i>Grade</i>		
Grade 1	1	1,8
Grade 2	16	28,6
Grade 3	18	32,1

Grade 4	1	1,8
Grade X	20 ²	35,7
<i>T-stadium</i>		
T1	3	5,4
T2	9	16,1
T3	18	32,1
T4	25	44,6
TX	1	1,8
<i>N-stadium</i>		
N0	12	21,4
N1	41	73,2
N2	2	3,6
NX	1	1,8
M – stadium	56	100
<i>Lokalizace metastáz</i>		
Játra	42	75
Neregionální lymfatické uzliny	9	16
Plíce	5	9
Peritoneum	10	18
<i>Jiné</i>	7	13
<i>Markery</i>		
Vstupní hodnota CEA: medián 7,7 µg/l (rozsah 0,5 – 909,6 µg/l)		

Vstupní hodnota Ca19-9: medián 1629,2 kU/l (rozsah 1,2 – 70000 kU/l)		
<i>Systémová terapie</i>		
<u>První linie</u>	56	100
Gemcitabin	11	19,6
Gemcitabin + nab-paclitaxel	27	48,2
mFOLFIRINOX	16	28,6
Kaprecitabin	1	1,8
Doxorubicin	1	1,8
<u>Druhá linie</u>	22	39,3
Založená na gemcitabinu	10	17,9
Založená na 5-fluorouracilu	10	17,9
Jiná	2 ³	3,6
<u>Třetí linie</u>	2 ⁴	3,6
<i>Celkové přežití</i>		
Monoterapie gemcitabinem – mOS: 2,1 měsíce (rozsah 1,3 – 12,1 měsíce)		
Gemcitabin + nab-paclitaxel – mOS: 8,8 měsíce (rozsah 6,3 – 11,4 měsíce)		
mFOLFIRINOX – mOS: 11,4 měsíce (rozsah 8,0 – 14,7 měsíce)		

¹u 4 pacientů nebylo možné identifikovat dyplastické, nebo maligní buňky v biopsii z důvodu limitovaného množství materiálu; tito pacienti byli považováni za pacienty s metastatickým onemocněním z důvodu elevace markerů (CEA, Ca19-9) a průkazem metastatického onemocnění v rámci kontrastního CT vyšetření;

²grade nebyl stanoven z důvodu limitovaného množství bioptického materiálu;

³jeden pacient s BRCA2 mutací byl léčen olaparibem a jeden pacient s leiomyosarkomem byl léčen pazopanibem;

⁴jeden pacient s leiomyosarkomem byl léčen kombinací gemcitabin + docetaxel a jeden pacient s duktálním adenokarcinomem byl léčen kombinací cisplatina + gemcitabin (po terapii mFOLFIRINOX v 1.linii léčby a gemcitabin + nab-paclitaxel ve 2. linii léčby)

Medián věku pacientů byl 65 let (rozsah 41-82 let). Celkem, 41 (73,2 %) zařazených pacientů byli ženy. Výkonnostní stav byl 0, 1 a 2 u 20 (35,7 %), 23 (41,4 %) a 13 (23,2 %) pacientů, respektive. Naprostá většina zařazených pacientů, 46 (82,1 %) měla histologicky verifikovaný invazivní duktální adenokarcinom. Do studie byli zařazeni i pacienti s dalšími histologickým typy karcinomu pankreatu. Jeden (1,8 %) pacient měl diagnostikován adenoskvamózní karcinom, jeden (1,8 %) pacient měl diagnostikován anaplastický karcinom, a konečně 1 (1,8 %) pacient měl diagnostikován leiomyosarkom pankreatu. Celkem 3 pacienti (5,4 %) byli diagnostikováni s PanIN I-III. Tito pacienti byli rovněž zahrnuti do analýzy a byli považováni za pacienty s metastatickým onemocněním z důvodu současně přítomné elevace CEA, Ca19-9 a verifikaci metastatického onemocnění pomocí kontrastního CT vyšetření. Konečně, v případě 4 (7,1 %) pacientů nebylo možné prokázat přítomnost dysplastických, nebo maligních buněk v biotickém materiálu z důvodu velmi limitovaného odběru. Nicméně, tyto pacienti byli zahrnuti do analýzy a považováni za pacienty s metastatickým onemocněním dle kritérií, které byly použity v případě pacientů s histologickým průkazem PanIN I-III v biotickém vzorku. S ohledem na grading nádoru byla distribuce následovná: grade 1 byl pozorován u 1 (1,8 %), grade 2 u 16 (28,6 %), grade 3 u 18 (32,1 %) a grade 4 u 1 (1,8 %) pacientů, respektive. V případě 20 (35,7 %) pacientů nebyl grade stanoven z důvodu velmi limitovaného množství buněk v biotickém materiálu.

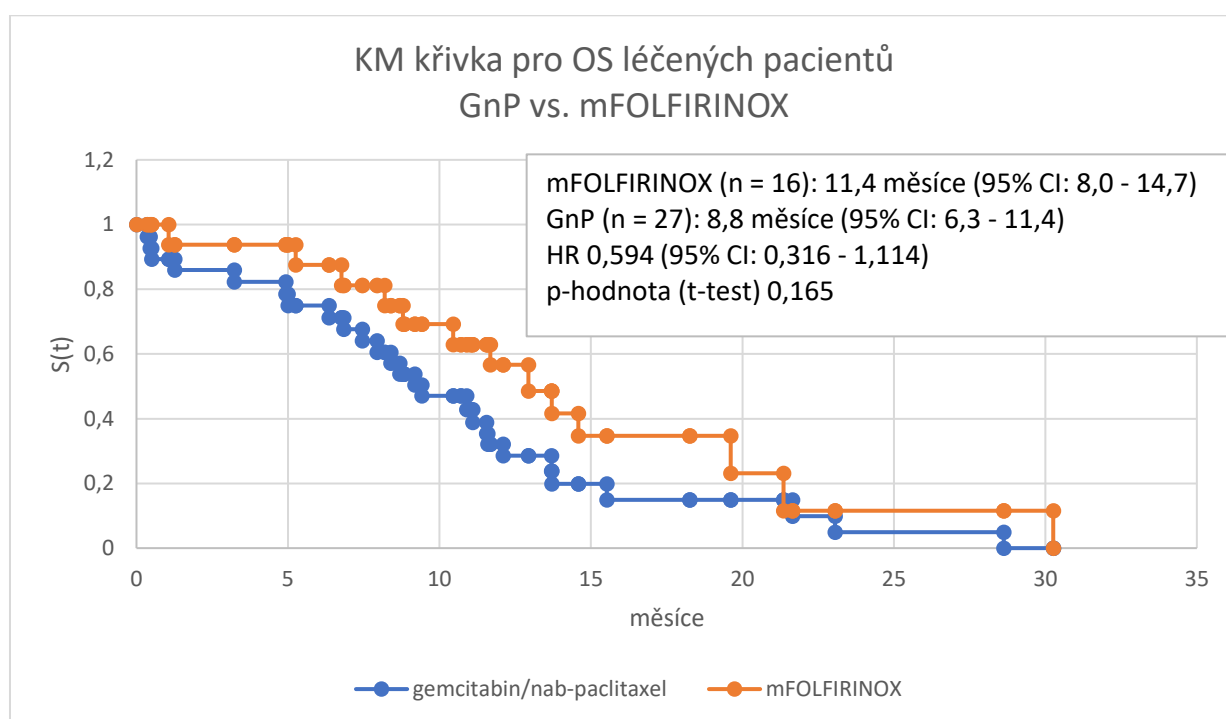
Všech 56 (100 %) zařazených a analyzovaných pacientů v současné studii mělo potvrzenou přítomnost metastatického onemocnění pomocí kontrastního CT vyšetření. Nejčastěji byly přítomny metastázy jater (42 pacientů, 75 %), peritoneální rozsev (10 pacientů, 18 %), neregionální lymfatické uzliny (9 pacientů, 16 %) a plicní metastázy (5 pacientů, 9 %). Celkem 7 (13 %) pacientů mělo metastázy v jiných orgánech (např. slezina, kůže, nadledvina, skelet).

Systémová léčba první linie byla zahájena u všech 56 (100 %) pacientů. Z tohoto souboru bylo 11 (19,6 %) pacientů léčeno monoterapií gemcitabinem, 27 (48,2 %) pacientů bylo léčeno GnP a 16 (28,6 %) pacientů bylo léčeno mFOLFIRINOX. Jeden (1,8 %) pacient byl vstupně léčen monoterapií doxorubicinem (pacient s histologicky verifikovaným leiomyosarkomem pankreatu) a jeden (1,8 %) pacient byl léčen monoterapií kapecitabinem (preferenci pacienta). Po progresi onemocnění na 1. linii paliativní chemoterapie bylo 22 (39,3 %) pacientů léčeno další řadou systémové chemoterapie (převážně režimy založené na gemcitabinu a 5-fluorouracilu). Třetí linie léčby byla indikována naprostém minimu případů.

Pouze 2 (3,6 %) byli léčeni v rámci 3. linie léčby (gemcitabin + docetaxel u pacienta s leiomyosarkomem pankreatu a cisplatina + gemcitabin u pacienta s progresí na mFOLFIRINOX a GnP).

Medián hodnoty CEA byl 7,7 $\mu\text{g/l}$ (rozsah 0,5 – 909,6 $\mu\text{g/l}$); medián hodnoty Ca19-9 byl 1629,2 kU/l (rozsah 1,2 – 70000 kU/l). K datu cut-off (11. prosinec 2023) zemřelo 51 (91,1 %) z 56 pacientů. Všichni pacienti zemřeli na progresi základního onemocnění. Medián OS byl 11,4 měsíce (95% CI: 8,0 – 14,7) pro pacienty léčené mFOLFIRINOX a 8,8 měsíce (95% CI: 6,3 – 13,4) pro pacienty léčené GnP; HR 0,594, 95% CI: 0,316 – 1,114, $p=0,165$); obrázek 2.

Obr. 2 KM křivka přežití pacientů léčených v 1. linii léčby (mFOLFIRINOX a GnP)



13.1.2. Inflammation-based prognostické markery u pacientů léčených chemoterapií

Analyzovali jsme prognostický vliv řady tzv. inflammation-based parametrů s ohledem na mOS pacientů léčených chemoterapií mFOLFIRINOX a GnP. Přehled analyzovaných prognostických markerů je sumarizován v tabulce 4. Výsledky pro všechny analyzované parametry jsou uvedeny v tabulce 6 a tabulce 7. V této kohortě (43 pacientů) jsme identifikovali 6 parametrů, které byly signifikantně asociovány s mOS pacientů, konkrétně: CEA, LMR, NLR, SIRI, MPS a PI (sumarizováno v tabulce 8 a 9).

Tab. 6 Prognostický význam analyzovaných inflammation-based parametrů u pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP) na základě hodnot cut-off

		albumin	Ca19-9	CAR	CEA	CRP	LMR	NLR	PLR	PNI	SIRI
počet pacientů	≥ cut-off	36	40	15	29	31	19	15	8	34	20
mOS (měsíce)		10,8	10,8	6,8	8,8	8,8	12,1	7,5	8,2	11,0	7,1
95% CI		(8,5 - 13,1)	(8,6 - 13)	(2,7 - 10,8)	(6,7 - 11)	(6,3 - 11,3)	(8,9 - 15,3)	(5 - 9,9)	(5,7 - 10,6)	(8,6 - 13,3)	(5,1 - 9,1)
počet pacientů	< cut-off	2	3	23	14	10	24	28	35	4	23
mOS (měsíce)		8,6	6,8	11,6	14,1	12,6	8,3	11,3	11,0	6,8	11,7
95% CI		(8,3 - 8,9)	(5 - 8,5)	(9,3 - 13,9)	(10,5 - 17,8)	(9,5 - 15,8)	(6,5 - 10,1)	(8,7 - 13,9)	(8,6 - 13,4)	(3,6 - 10,1)	(8,9 - 14,4)
p-hodnota		0,649	0,308	0,056	0,004	0,140	0,001	0,012	0,128	0,126	0,0002

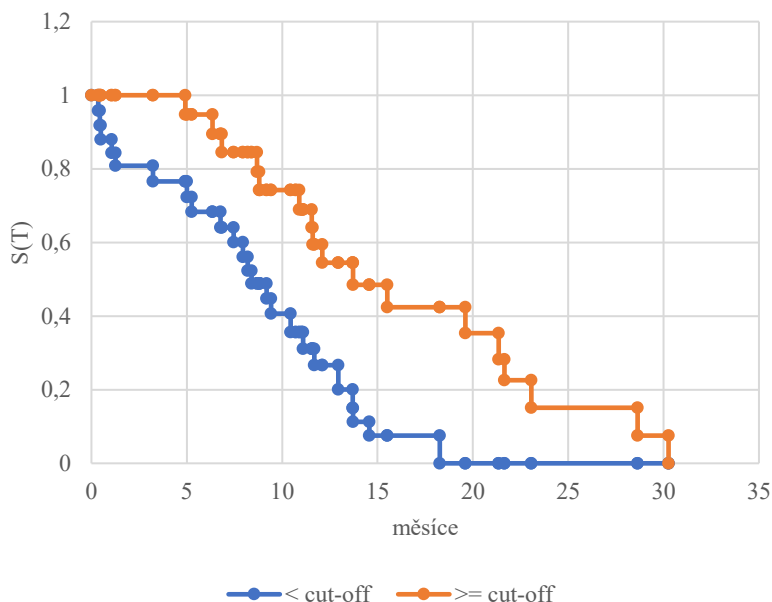
Tab. 7 Prognostický význam analyzovaných inflammation-based parametrů u pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP) na základě hodnot skóre

	Skóre	ALBI grade	GPS	mGPS	MPS	PI
počet pacientů	0		17	17	16	14
mOS (měsíce)			11,6	11,6	11,3	11,3
95% CI			(9,4 - 13,7)	(9,4 - 13,7)	(8,2 - 14,4)	(8,8 - 13,7)
počet pacientů	1	28	19	19	14	17
mOS (měsíce)		10,9	9,4	9,4	11,3	11,1
95% CI		(8,6 - 13,1)	(5,5 - 13,3)	(5,5 - 13,3)	(8,3 - 14,4)	(7,7 - 14,5)
p-hodnota			0,417	0,417	0,999	0,870
počet pacientů	2	10	2	2	8	10
mOS (měsíce)		8,8	8,6	8,6	1,2	6,0
95% CI		(3,3 - 14,3)	(8,3 - 8,9)	(8,3 - 8,9)	(-1,2 - 3,5)	(3,9 - 8,1)
p-hodnota		0,760	0,649	0,649	0,0002	0,001
počet pacientů	3					
mOS (měsíce)						
95% CI						
p-hodnota						

Konkrétně, pacienti s LMR ≥ 3 měli mOS 12,1 měsíce (95% CI: 8,9 – 15,3) ve srovnání s pacienty s LMR < 3 , kteří měli mOS 8,3 měsíce (95% CI: 6,5 – 10,1); HR 2,357, 95% CI: 1,223 – 4,453, $p=0,001$ (obrázek 3A). Pacienti se SIRI $< 2,3$ měli mOS 11,7 měsíce (95% CI: 8,9 – 14,4) ve srovnání s pacienty se SIRI $> 2,3$, kteří měli mOS 7,1 měsíce (95% CI: 5,1 – 9,1); HR 2,638, 95% CI: 1,295 – 5,373, $p<0,001$ (obrázek 3B). Pacienti s CEA $< 2,5$ $\mu\text{g/l}$ měli mOS 14,1 měsíce (95% CI: 10,5 – 17,8) ve srovnání s pacienty s CEA $> 2,5$ $\mu\text{g/l}$, kteří měli mOS 8,8 měsíce (95% CI: 6,7 – 11,0); HR 1,992, 95% CI: 1,062 – 3,7436, $p=0,004$ (obrázek 3C). Dále jsme prokázali, že pacienti s NLR < 5 měli mOS 11,3 měsíce (95% CI: 8,7 – 13,9) ve srovnání s pacienty s NLR > 5 , kteří měli mOS 7,5 měsíce (95% CI: 5,0 - 9,9); HR 1,813, 95% CI: 0,846 – 3,886, $p=0,012$ (obrázek 3D). Navíc, pacienti s MPS 0/1 měli mOS 11,3 měsíce (95% CI: 8,3 – 14,4) ve srovnání s pacienty s MPS 2, kteří měli mOS 1,2 měsíce (95% CI: -1,2 – 3,5); HR 4,288, 95% CI: 1,006 – 18,272, $p<0,001$ (obrázek 3E). A konečně, pacienti s PI 0/1 měli mOS 11,1 měsíce (95% CI: 7,7 – 14,5) ve srovnání s pacienty s PI 2, kteří měli mOS 6,0 měsíce (95% CI: 3,9 – 8,1); HR 1,229, 95% CI: 1,155 – 10,114, $p=0,001$ (obrázek 3F).

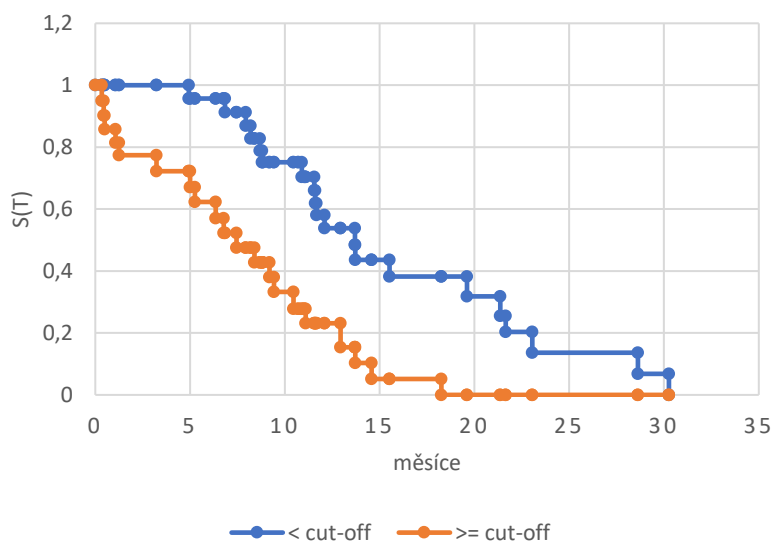
Obr. 3 KM křivky pro mOS pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP) dle baseline hodnoty A) LMR, B) SIRI, C) CEA, D) NLR, E) MPS a F) PI

3A KM křivka pro OS (dle LMR)



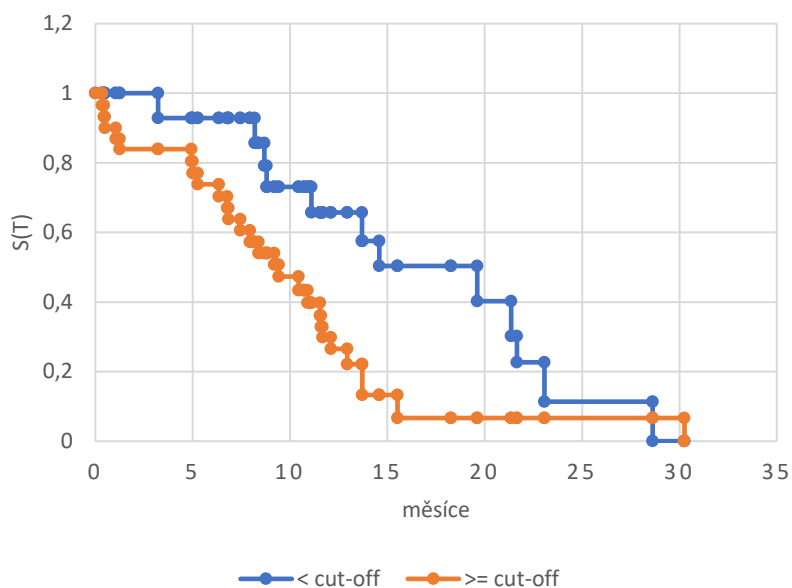
	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
LMR					
> 3	12,1	(8,9 - 15,3)	0,001	2,357	(1,223 - 4,543)
< 3	8,3	(6,5 - 10,1)			

3B KM křivka pro OS (dle SIRI)



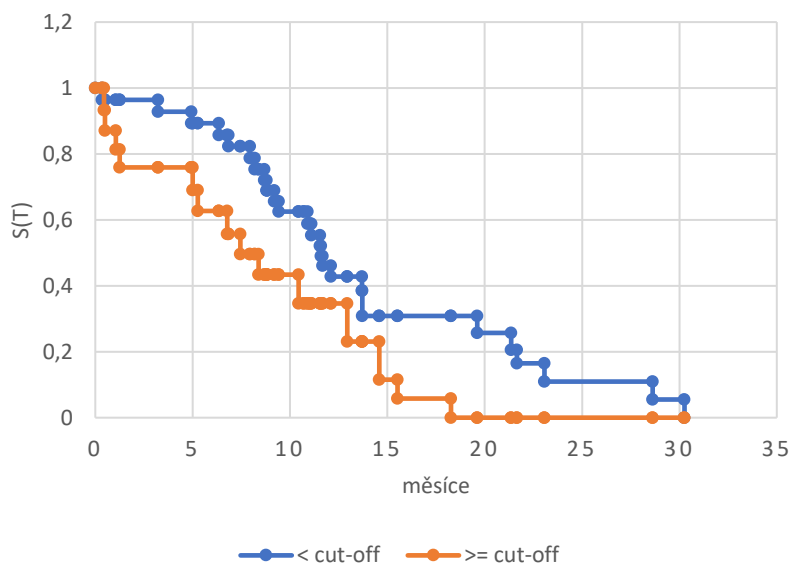
	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
SIRI					
< 2,3	11,7	(8,9 - 14,4)	<0,001	2,638	(1,295 - 5,373)
> 2,3	7,1	(5,1 - 9,1)			

3C KM křivka pro OS (dle CEA)



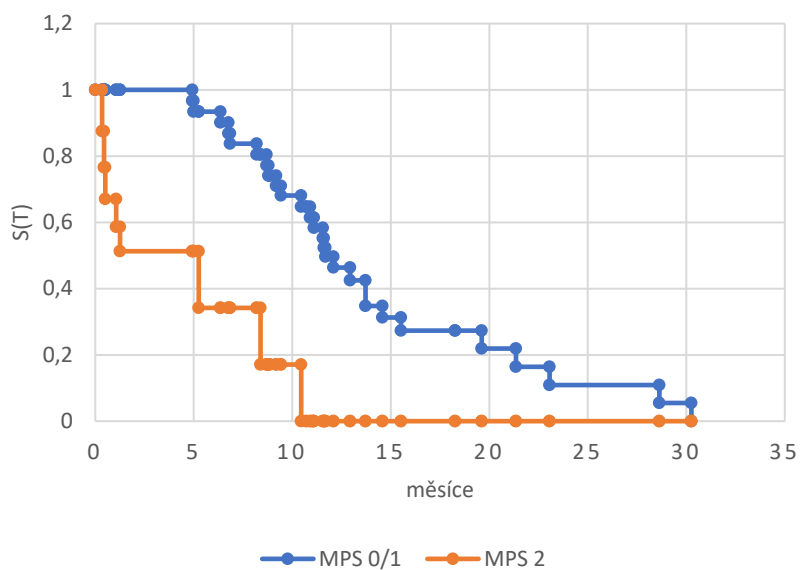
	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
CEA					
< 2,5	14,1	(10,5 - 17,8)	0,004	1,992	(1,062 - 3,736)
> 2,5	8,8	(6,7 - 11)			

3D KM křivka pro OS (dle NLR)



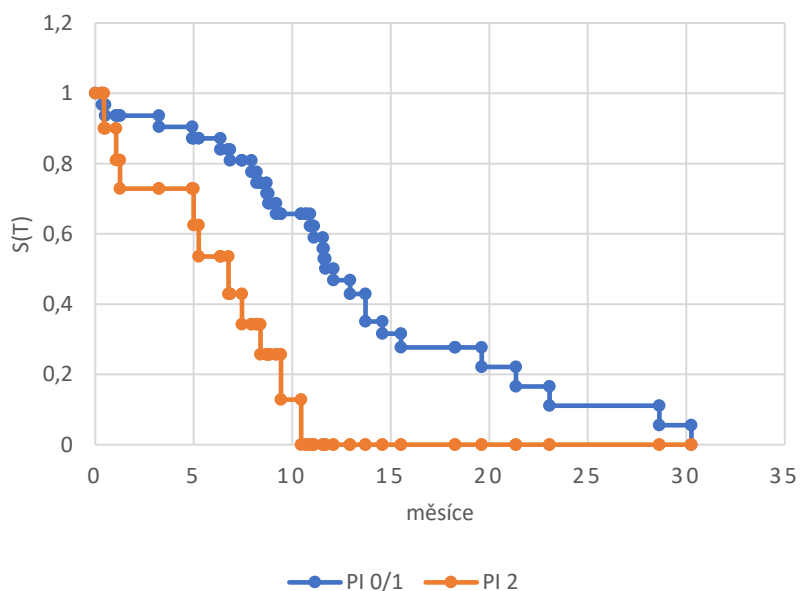
	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
NLR					
< 5	11,3	(8,7 - 13,9)	0,012	1,813	(0,846 - 3,886)
> 5	7,5	(5,0 - 9,9)			

3E KM křivka pro OS (dle MPS)



	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
MPS					
0/1	11,3	(8,3 - 14,4)	<0,001	4,288	(1,006 - 18,272)
2	1,2	(-1,2 - 3,5)			

3F KM křivka pro OS (dle PI)



	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
PI					
0/1	11,1	(7,7 - 14,5)	0,001	1,229	(1,155 - 10,114)
2	6,0	(3,9 - 8,1)			

Tab. 8 Distribuce inflammation-based prognostických parametrů < nebo > cut-off u pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP)

Marker	Počet pacientů (n)	Cut-off	n < cut-off	%	n > cut-off	%
LMR	43	3	24	55,8%	19	44,2%
SIRI	43	2,3	23	53,5%	20	46,5%
CEA	43	2,5	14	32,6%	29	67,4%
NLR	43	5	28	65,1%	15	34,9%
MPS	38	1	30	78,9%	8	21,1%
PI	41	1	31	75,6%	10	24,4%

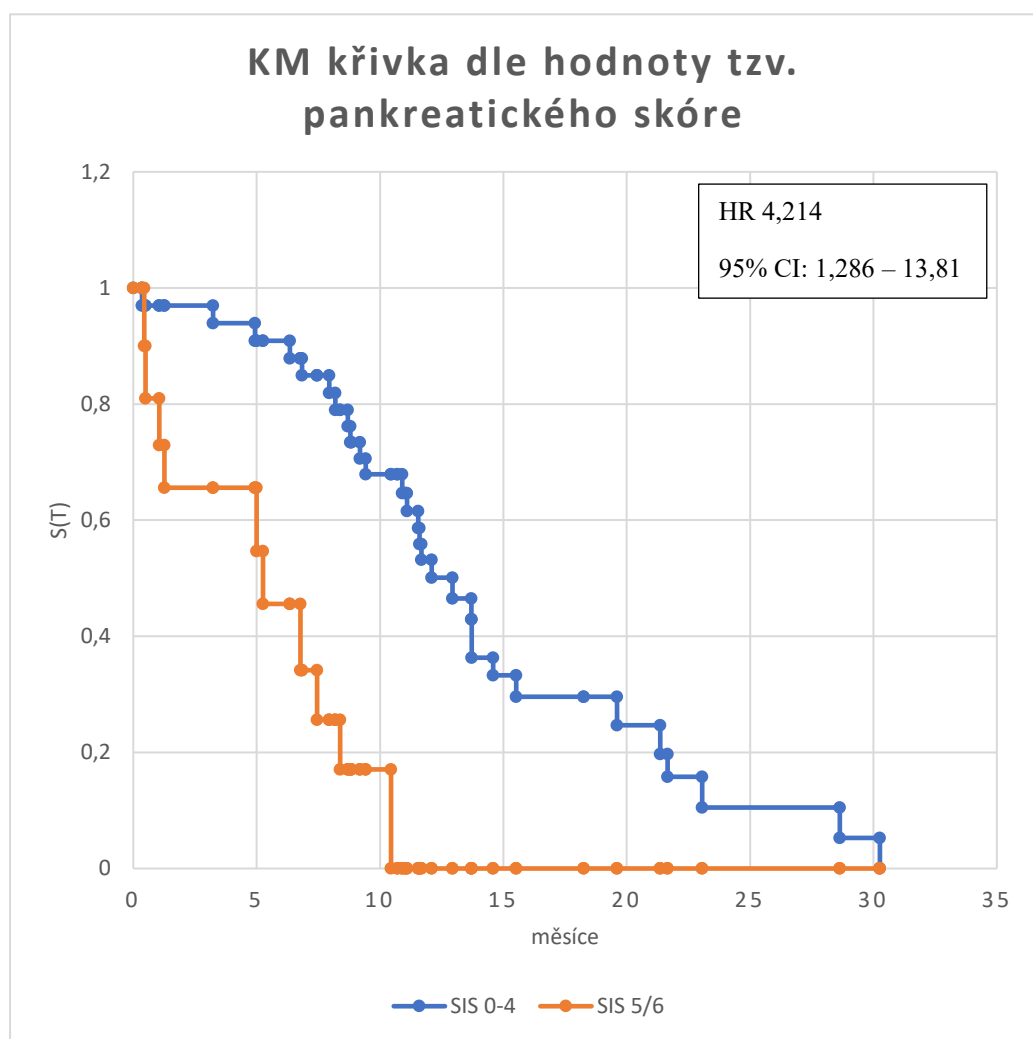
Tab. 9 Statisticky signifikantní inflammation-based prognostické parametry u pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP)

	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
LMR					
> 3	12,1	(8,9 - 15,3)	0,001	2,357	(1,223 - 4,543)
< 3	8,3	(6,5 - 10,1)			
SIRI					
< 2,3	11,7	(8,9 - 14,4)	<0,001	2,638	(1,295 - 5,373)
> 2,3	7,1	(5,1 - 9,1)			
CEA					
< 2,5	14,1	(10,5 - 17,8)	0,004	1,992	(1,062 - 3,736)
> 2,5	8,8	(6,7 - 11)			
NLR					
< 5	11,3	(8,7 - 13,9)	0,012	1,813	(0,846 - 3,886)
> 5	7,5	(5,0 - 9,9)			
MPS					
0/1	11,3	(8,3 - 14,4)	<0,001	4,288	(1,006 - 18,272)
2	1,2	(-1,2 - 3,5)			
PI					
0/1	11,1	(7,7 - 14,5)	0,001	1,229	(1,155 - 10,114)
2	6,0	(3,9 - 8,1)			

Následně, jsme ověřovali, zda kombinace (současná přítomnost) statisticky signifikantních parametrů (CEA, LMR, NLR, SIRI, MPS a PI) bude schopna lépe stratifikovat pacienty do odlišných prognostických skupin. Navrhli jsme tzv. pankreatické skóre, kde jsme přiřadili 1 bod v případě přítomnosti „rizikového“ markeru ($CEA \geq 2,5$, $LMR < 3$, $NLR \geq 5$, $SIRI \geq 2,3$, $MPS > 0/1$ a $PI > 0/1$). Nejdřív jsme pacienty rozdělily do skupin dle počtu „rizikových“ markerů (0, 1, 2, 3, 4, 5 a 6 bodů) a srovnávali tyto skupiny s ohledem na dosažený

mOS. Pacienti, kteří neměli ani jeden „rizikový“ marker měli nejlepší prognózu s mOS 19,6 měsíce (95% CI: 15,3 – 23,9). Na druhou stranu, pacienti, kteří měli přítomné všechny „rizikové“ markery měli jednoznačně horší prognózu s mOS 1,3 měsíce (95% CI: -1,4 – 3,9). Na základě pozorovaných hodnot mOS jsme definovali 2 prognostické skupiny pacientů. Pacienti s 0 – 4 „rizikovými“ markery měli signifikantně delší mOS 11,9 měsíce (95% CI: 8,0 – 15,7) ve srovnání s pacienty s 5 – 6 „rizikovými“ markery, kteří měli mOS 7,5 měsíce (95% CI: 5,4 – 9,5); HR 4,214, 95% CI: 1,286 – 13,81, $p < 0,001$ (obrázek 4, tabulka 10).

Obr. 4 KM křivka pro OS u pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP) dle hodnoty tzv. pankreatického skóre



Tab. 10 Medián OS u pacientů léčených chemoterapií (mFOLFIRINOX a GnP) dle počtu rizikových faktorů v rámci tzv. pankreatického skóre

	Počet pacientů	%	Měsíce	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)
Rizikové markery							
0	9	20,9%	19,6	(15,3 - 23,9)	n.a		
1	10	23,3%	11,6	(7,5 - 15,6)	0,104		
2	6	14,0%	9,5	(6,3 - 12,7)	0,020		
3	3	7,0%	13,7	(11 - 16,4)	0,235		
4	5	11,6%	9,4	(5,6 - 13,2)	0,022		
5	5	11,6%	6,8	(3,9 - 9,6)	0,004		
6	5	11,6%	1,3	(-1,4 - 3,9)	0,001		
Kombinace							
0-4	33	76,7%	11,6	(9,3 - 13,8)	<0,001	4,214	(1,286 - 13,81)
5/6	10	23,3%	5,1	(3,0 - 7,3)			

13.2. Exprese vybraných miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu

13.2.1. Charakteristiky pacientů

Do studie bylo zařazeno 54 pacientů s karcinomem pankreatu. V souboru bylo celkem 27 (50 %) mužů a 27 (50 % žen). Medián věku zařazených pacientů byl 63 let. Celkem 4 nádory byly grade 1, 27 nádorů bylo grade 2 a konečně 23 nádorů bylo hodnoceno jako grade 3. Další klinicko-patologické charakteristiky souboru pacientů jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11 Klinicko-patologické charakteristiky pacientů

Medián věku	63
Pohlaví (muž/žena)	27/27
Grade nádoru (1/2/3)	4/27/23
Stadium nádoru (pT1/pT2/pT3/pT4)	4/7/41/2
Uzlinové metastázy (N0/N1)	16/37
Perineurální invaze (ano/ne)	47/7

Lymfatická invaze (ano/ne)	29/25
Resekční okraj (R0/R1)	40/14
PFS (rozsah, měsíce)	0 – 81
PFS (medián)	13
OS (rozsah, měsíce)	5 – 81
OS (medián)	19

13.2.2. Expres vybraných miRNA a vztah k přežívání

V rámci souboru pacientů jsme identifikovali odlišnosti v expresi hodnocených miRNA mezi nádorovou a nenádorovou tkání (tabulka 12). Zjistili jsme signifikantní overexpresi miR-21, miR-155 a miR-210 (72,62 násobná, 232,36 násobná a 181,38 násobná resp., $p < 0,01$) v nádorové tkáni ve srovnání s nenádorovou. Na druhou stranu, exprese miR-96 byla signifikantně downregulována v nádorové tkáni (-1,4 násobně, $p < 0,01$). Obdobně, exprese miR-217 byla až 100násobně nižší v nádorové tkáni, a navíc nebyla vůbec detekována u 15 vzorků. Současně jsme neidentifikovali signifikantní rozdíl v expresi mezi nádorovou a nenádorovou tkání s ohledem na expresi miR-148a a miR-196a ($p > 0,05$).

Tab. 12 Průměrná násobná změna exprese miRNA mezi nádorovou a nenádorovou tkání

miRNA	násobná změna exprese miRNA		
	minimální	maximální	střední +/- SD
miR-21	-16,12	72,62	12,01 ± 14,242 p<0,001
miR-96	-18,52	6,22	-1,42 ± 3,981 p<0,001
miR-148a	-55,56	42,3	-1,63 ± 10,762 p=0,08
miR-155	-13,16	232,36	22,91 ± 38,526 p<0,001
miR-196a	-15,38	25,9	0,913 ± 5,574 p=0,91
miR-210	-4	181,38	15,68 ± 28,869 p<0,001
miR-217	-100 (0)*	15,87	-7,45 ± 16,537 p<0,001

Celkový počet pacientů 54. Data jsou prezentovány jako průměry $\pm$ SD. Negativní násobná změna znamená dowregulaci miRNA v nádorové tkáni. *exprese miR-217 nebyla detekována v 15 vzorkách. $p < 0,05$ je považováno za statisticky signifikantní; signifikantní p-hodnoty Wilcoxonova testu jsou uvedeny tučně

Srovnání exprese jednotlivých miRNA s klinicko-patologickými charakteristikami pacientů prokázalo pozitivní korelaci exprese miR-210 a věku pacienta ($p < 0,01$). Současně, ale exprese všech 7 hodnocených miRNA neprokázala signifikantní korelaci s dalšími parametry (stadium onemocnění, grade nádoru, postižení lymfatických uzlin, perineurální a vaskulární invaze).

Při analýze exprese 7 hodnocených miRNA a přežívání pacientů nebyl prokázán prognostický význam ve vztahu k OS ($p > 0,05$) ani PFS ($p > 0,05$) u žádné z 7 analyzovaných miRNA, tabulka 13 a 14.

Tab. 13 Expresse miRNA a OS u pacientů s karcinomem pankreatu

miRNA	odhad parametru	standardní chyba	chí-kvadrát	p-hodnota	HR	95% HR CI
miR-21	0,004	0,01	0,156	0,69	1,004	0,984 1,025
miR-96	0,023	0,143	0,026	0,87	1,023	0,772 1,356
miR-148a	0,003	0,022	0,023	0,87	1,003	0,961 1,048
miR-155	0,002	0,004	0,556	0,45	1,003	0,995 1,011
miR-196a	-0,017	0,045	0,147	0,7	0,983	0,899 1,074
miR-210	0,004	0,005	0,699	0,4	1,004	0,994 1,014
miR-217	0,07	0,08	0,776	0,37	1,073	0,917 1,255

Coxův model proporčních rizik byl použit k odhadu prognostického významu miRNA. $p < 0,05$ je považována za statisticky signifikantní

Tab. 14 Expresse miRNA a PFS u pacientů s karcinomem pankreatu

miRNA	odhad parametru	standardní chyba	chí-kvadrát	p-hodnota	HR	95% HR CI
miR-21	0,007	0,009	0,502	0,47	1,007	0,988 1,027
miR-96	0,014	0,131	0,011	0,91	1,014	0,783 1,313
miR-148a	0,046	0,024	3,605	0,06	1,047	0,999 1,099
miR-155	0,003	0,003	0,991	0,31	1,004	0,997 1,011
miR-196a	-0,029	0,043	0,44	0,5	0,971	0,892 1,058
miR-210	0,005	0,004	1,527	0,21	1,006	0,997 1,015
miR-217	0,047	0,076	0,387	0,53	1,049	0,903 1,218

Coxův model proporčních rizik byl použit k odhadu prognostického významu miRNA. $p < 0,05$ je považována za statisticky signifikantní

13.3. Genová exprese CTC u pacientů s karcinomem pankreatu

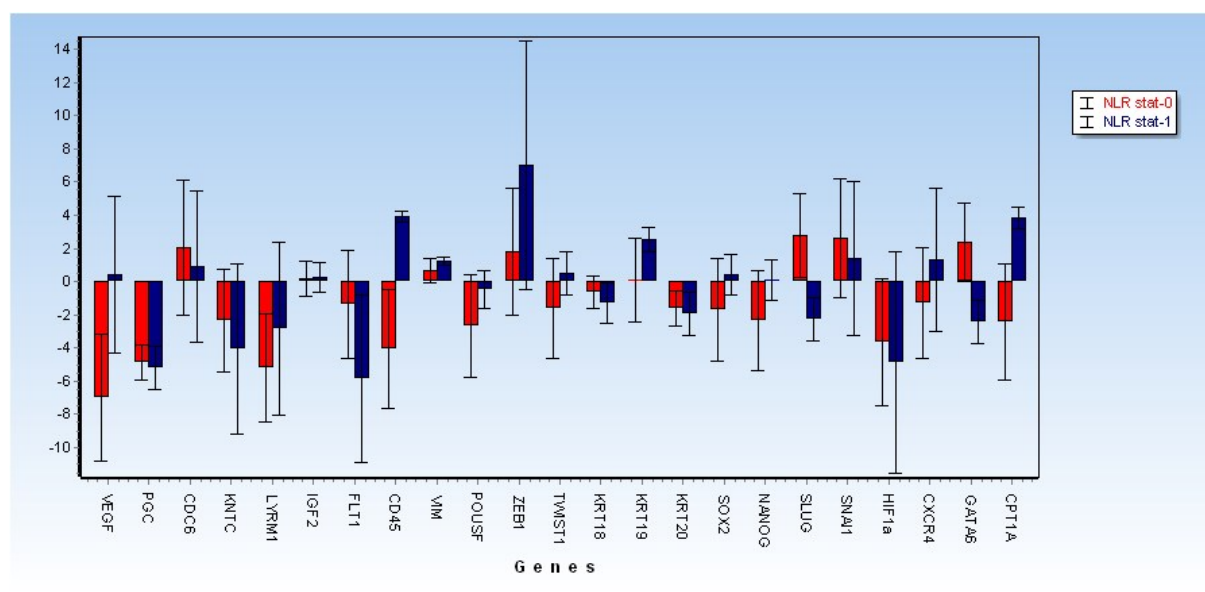
13.3.1. Charakteristiky pacientů

Do studie bylo zařazeno 15 pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu. Jednalo se o pacienty, u kterých byl k dispozici odběr CTC, a kteří měli současně provedeny odběry k stanovení inflammation-based parametrů; obojí před zahájením terapie. Kompletní klinická data analyzovaných pacientů jsou uvedena v příloze č.3.

13.3.2. Analýza genové exprese CTC ve vztahu k inflammation-based parametrům

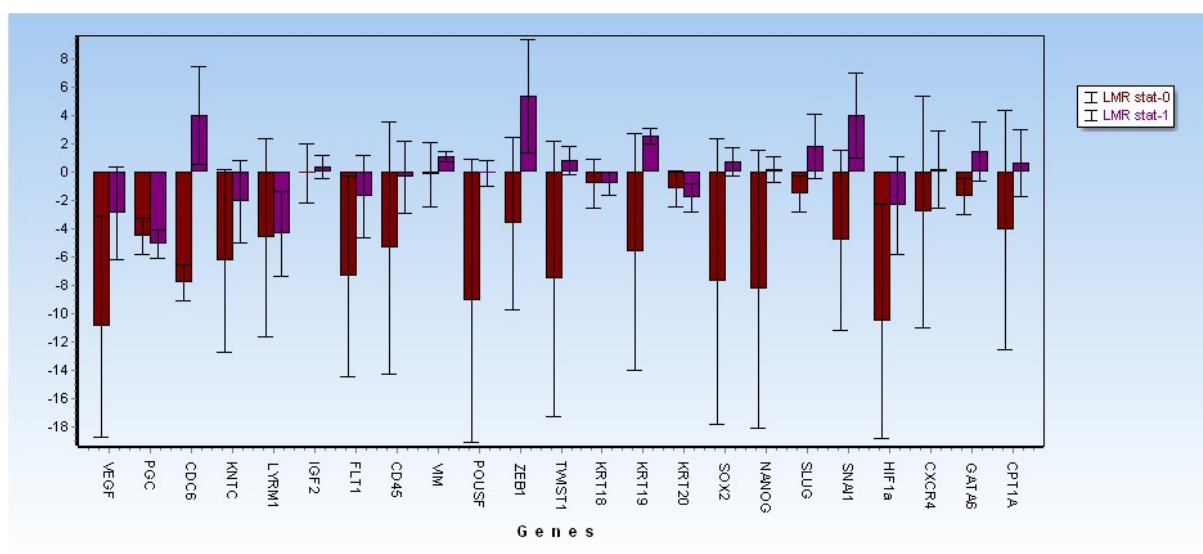
Pacienti s $NLR > 5$ vykazovali v CTC zvýšenou expresi CD45, ZEB1, KRT19 a CPT1A; zatímco pacienti s $NLR < 5$ měli v CTC zvýšenou expresi SLUG a GATA6 a současně sníženou expresi VEGF, CD45 a CPT1A (obrázek 5).

Obr. 5 Genová exprese CTC a $NLR < \text{cut-off}$ ($NLR \text{ stat } 0$) vs. $NLR > \text{cut-off}$ ($NLR \text{ stat } 1$)



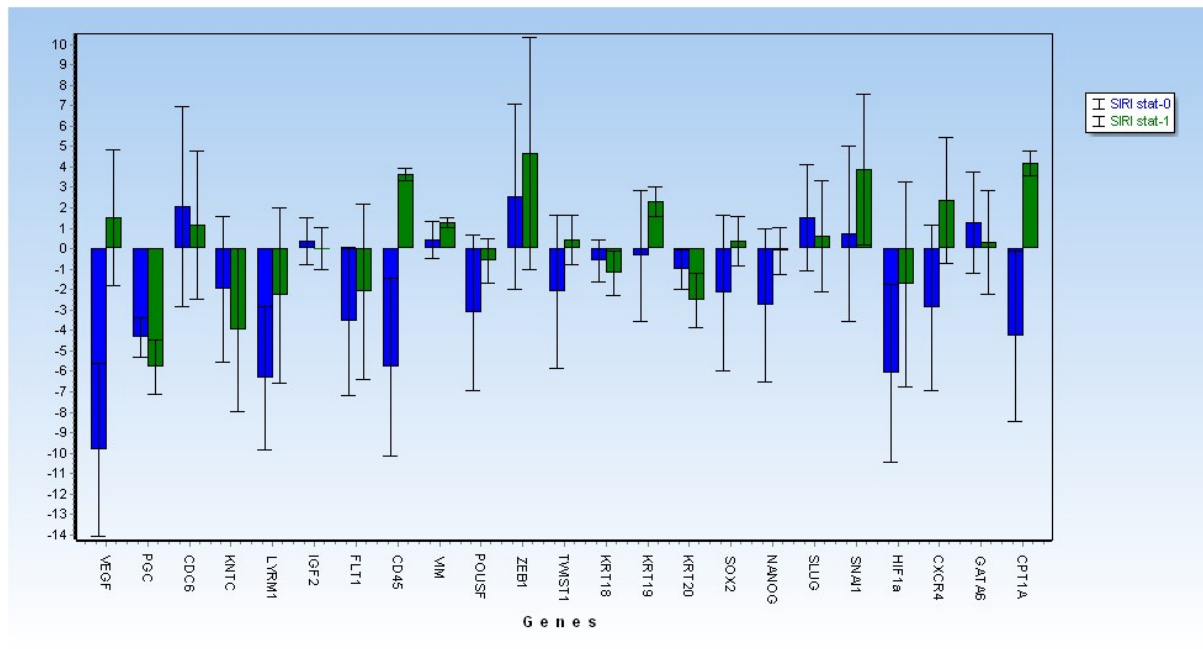
Pacienti s $LMR < 3$ vykazovali v CTC zvýšenou expresi CDC6, ZEB1, SNAIL1 a KRT19; zatímco pacienti s $LMR > 3$ měli v CTC sníženou expresi NANOG, TWIST1, SOX2, POU5F a KRT19 (obrázek 6)

Obr. 6 Genová exprese CTC a LMR cut-off (LMR stat 0) vs. LMR <cut-off (LMR stat 1)



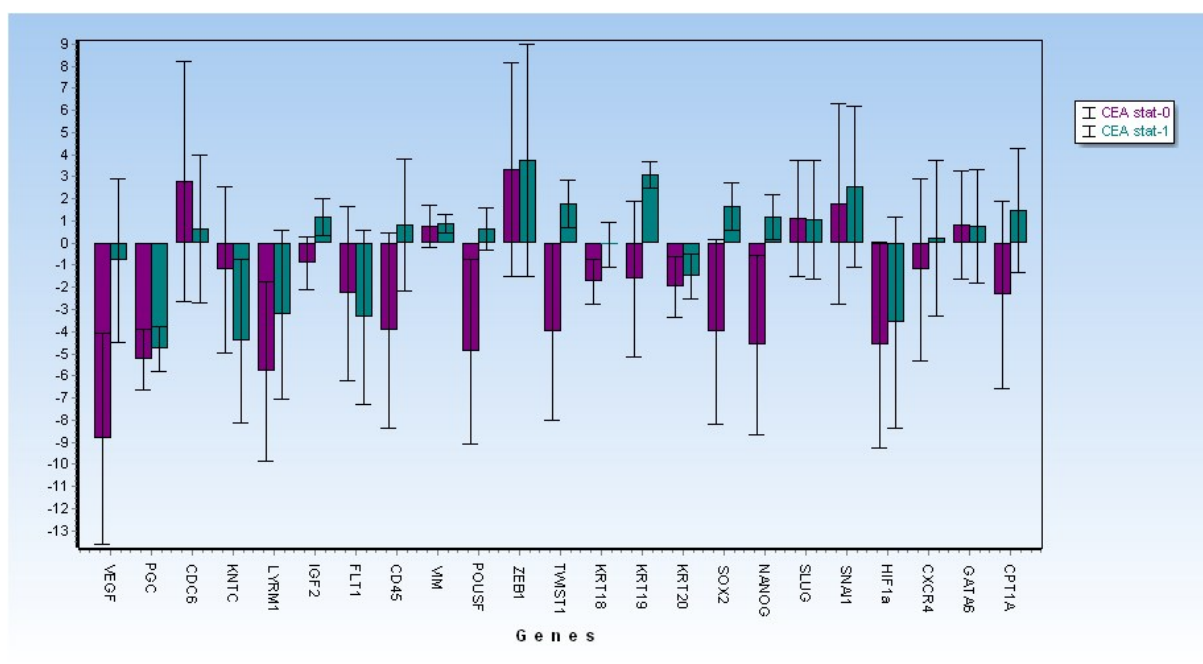
Pacienti se SIRI >2,3 vykazovali v CTC zvýšenou expresi CD45, CPT1A, SNAIL1, ZEB1; zatímco pacienti se SIRI <2,3 měli v CTC sníženou expresi VEGF, CD45, CXCR4 a CPT1A (obrázek 7).

Obr. 7 Genová exprese CTC a SIRI <cut-off (SIRI stat 0) vs. SIRI >cut-off (SIRI stat 1)



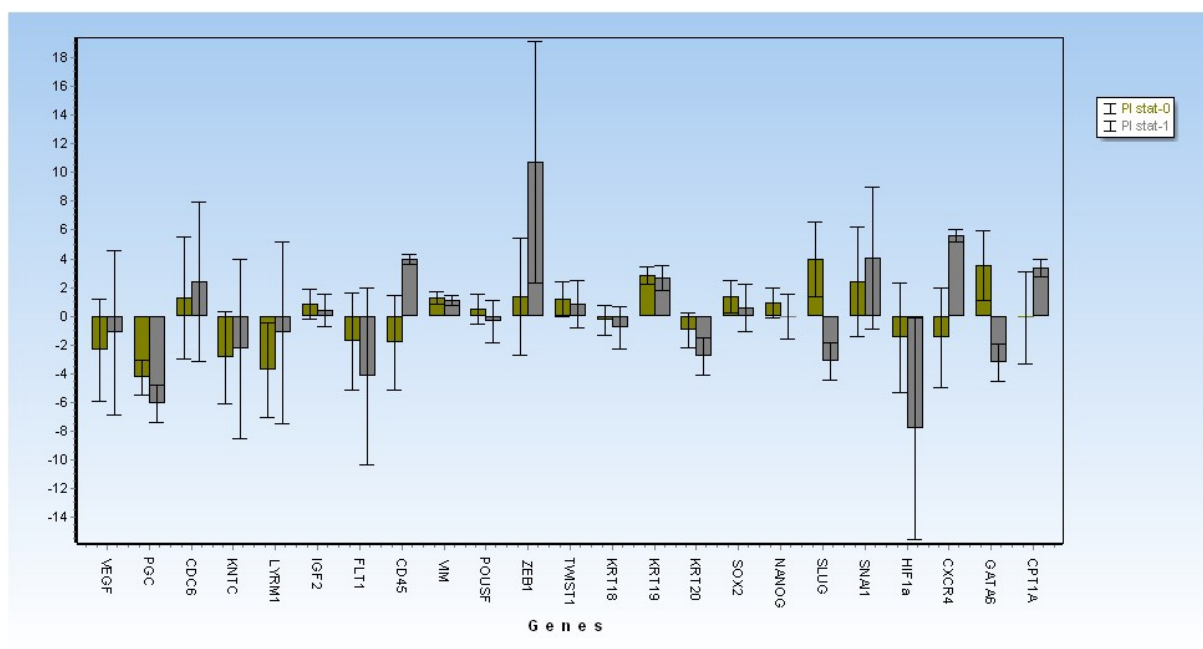
Pacienti s CEA >2,5 vykazovali v CTC zvýšenou expresi TWIST, SOX2, NANOG, IGF2 a KRT19; zatímco pacienti s CEA <2,5 měli v CTC sníženou expresi VEGF, POU5F, TWIST, SOX2, NANOG a KRT19 (obrázek 8).

Obr. 8 Genová exprese CTC a CEA <cut-off (CEA stat 0) vs. CEA >cut-off (CEA stat 1)



Pacienti s PI 2 vykazovali v CTC zvýšenou expresi CXCR4, CD45 a ZEB1; zatímco pacienti s PI 0/1 měli v CTC zvýšenou expresi GATA6, SLUG (obrázek 9).

Obr. 9 Genová exprese CTC a PI <cut-off (PI stat 0) vs. PI >cut-off (PI stat 1)



Diferenciální genová exprese CTC ve vztahu k parametru MPS nebyla hodnocena vzhledem ke skutečnosti, že pouze 1 pacient měl hodnotu MPS 2 a ostatní pacienti měli MPS 0/1.

13.4. Souhrn výsledků ve vztahu k cílům a hypotézám práce

1. Hypotéza, že přítomnost systémového zánětlivého stavu organismu u pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu má vliv na prognózu pacientů podstupujících terapii, se potvrdila. Elevace NLR, SIRI, CEA nad hodnotu cut-off jednotlivých parametrů je spojena se signifikantně horším přežíváním. Současně jako negativní prognostický parametr celkového přežití byla identifikována hodnota PI >0/1 a rovněž hodnota MPS >0/1. S ohledem na parametr LMR lze konstatovat, že hodnota parametru pod cut-off je spojena s horším celkovým přežíváním pacientů.
2. Hypotéza, že diferenciální exprese vybraných miRNA má vliv na prognózu pacientů s karcinomem pankreatu, se nepotvrdila. Byla nalezena odlišná exprese vybraných miRNA mezi nádorovou a nenádorovou tkání; nicméně v rámci analyzovaného souboru pacientů s adenokarcinomem pankreatu nebyly hodnocené miRNA identifikovány jako prognostické ve vztahu k přežívání.
3. Hypotéza, že profil genové exprese CTC se liší v závislosti od hodnoty inflammation-based parametrů (definovaného </> cut-off), se potvrdila. Byla identifikována diferenciální exprese hodnocených genů v závislosti od příslušné prognostické skupiny. Ve skupině pacientů s prognosticky nepříznivými inflammation-based parametry byla pozorována zvýšená exprese genů majících vztah ke zvýšené invazivitě CTC, vedoucích k indukci EMT programu a konečně i k vlastnostem CSC. Vzhledem k malé velikosti tohoto souboru jsou ale tyto výsledky čistě popisné, neumožňující validní statistické testování. Nabízí se otázka, zda zánětlivý stav organismu u pacientů s karcinomem pankreatu, vede k zvýšené expresi genů, které jsou asociovány se zvýšenou agresivitou CTC, resp. onemocněním. Nebo vlastnosti CTC díky expresi specifických genů vedou v konečném důsledku k systémovému zánětlivému stavu pacientů s karcinomem pankreatu. Tato prvotní pozorování jsou příslibem pro další výzkum v této oblasti.

14. Diskuse

14.1. Inflammation-based parametry u pacientů s karcinomem pankreatu

Karcinom pankreatu představuje onemocnění se špatnou prognózou. Většina pacientů s metastatickým onemocněním umírá do roku od stanovení diagnózy. Většina pacientů s touto malignitou je léčena neselektivně systémovou paliativní chemoterapií. Z běžné klinické praxe je známo, že prognóza pacientů se může významně odlišovat i když mají podobný rozsah onemocnění a jsou léčeni stejným režimem. V současnosti nemáme k dispozici robustní prognostické markery, které by nám pomohly při volbě specifického režimu.

V této práci jsme hodnotili význam tzv. inflammation-based prognostických parametrů, které jsou rychle, levně a jednoduše vyšetřitelné v rámci standardního odběru periferní krve u pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu před zahájením systémové terapie (mFOLFIRINOX a GnP).

I přes limitovanou velikost našeho souboru jsme pozorovali velmi podobné hodnoty mOS pacientů léčených mFOLFIRINOX a GnP. Pacienti léčení režimem mFOLFIRINOX dosáhli v naší studii mOS 11,4 měsíce, což je ekvivalentní výsledkům registrační studie PRODIGE/ACCORD 11 (11,1 měsíce)¹⁰⁸. Při pohledu na počty pacientů, kteří po progresi na 1. linii systémové léčby pokračovali v další terapii, více pacientů našeho souboru obdrželo další terapii ve srovnání s pacienty v registrační studii (62,5 % vs. 46,8 %). Nicméně, je potřeba konstatovat, že malý počet pacientů v naší studii může být příčinou tohoto rozdílu. Dále, v populaci pacientů léčených GnP jsme pozorovali mOS 8,8 měsíce, který je prakticky identický s mOS v rámci registrační studie MPAC, a sice 8,5 měsíce⁸⁹. Navíc, menší část pacientů v naší studii, která byla léčena režimem GnP, pokračovala v další linii systémové terapie při progresi onemocnění ve srovnání se studií MPACT (33,3 % vs. 38 %). Toto zjištění nám umožňuje formulovat předpoklad, že i přes nižší proporci pacientů v naší studii, kteří obdrželi další systémovou léčbu a pozorovaný prakticky stejný mOS jako v registrační studii, může to být způsobeno větším zastoupením pacientů s příznivými inflammation-based parametry v rámci naší studie.

V rámci našeho souboru pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu (n = 56) jsme pozorovali, že celkem 39,3 % pacientů pokračovalo v další léčbě po progresi na 1. linii terapie.

Naše pozorování velmi dobře koreluje s daty z reálné klinické praxe 38,3 %¹⁹² a 46 %¹⁹³, které byly publikovány recentně.

Obdobně, ve shodě se současnou literaturou, jsme v naší analýze neprokázali statisticky signifikantní rozdíl v mOS mezi režimy mFOLFIRINOX a GnP (HR 0,594, 95% CI: 0,316 – 1,114, p=0,165). Jsou k dispozici práce, které dokladují obdobnou efektivitu těchto režimů dle dat z reálné klinické praxe^{109 110}. Vzhledem k obdobnému mOS těchto režimů je lze považovat za rovnocenné z hlediska účinnosti, je potřeba však přihlédnout k odlišnému profilu toxicity.

S ohledem na karcinom pankreatu byla studována řada inflammation-based prognostických markerů s cílem predikce prognózy pacienta, závažnosti onemocnění a případné volby terapie. Obecně, tyto prognostické markery reflektují protinádorovou zánětlivou odpověď a mají prognostický význam u pacientů s karcinomem pankreatu¹⁹⁴.

V našem souboru jsme potvrdili prognostický význam LMR na přežívání pacientů léčených mFOLFIRINOX a GnP v 1.linii metastatického karcinomu pankreatu. Jednoznačný mechanismus, který by vysvětloval asociaci vstupní hodnoty LMR a prognózy není v současnosti jasný. Nicméně, lymfocyty jsou důležitou komponentou protinádorové imunity, zejména tumor infiltruující lymfocyty (TIL) a současně monocyty mohou v blízkosti nádoru diferencovat do podoby tumor asociovaných makrofágů (TAM). Ty mohou stimulovat angiogenezi, remodelaci extracelulární matrix, invazi nádorových buněk a metastazování^{47,48}. Význam LMR (zejména LMR> cut-off) jako prognostického markeru u pacientů s karcinomem pankreatu lze tedy vysvětlit převahou protinádorového působení TIL ve srovnání s pronádorově působícími TAM.

Současně, není definován jednoznačný cut-off pro LMR, jak je zřejmé i z metaanalýzy 3338 pacientů s karcinomem pankreatu¹⁹⁵. V této práci (cut-off pro LMR byl v rozmezí 2,05 – 4,6) nicméně autoři prokázali, že LMR> jakýkoliv cut-off byl asociován s delším mOS pacientů¹⁹⁵.

SIRI je parametr, který integruje počet neutrofilů, monocytů a lymfocytů v jedné veličině a poskytuje tak komplexnější obraz stavu pro- a protizánětlivé nádorové odpovědi. Byl v první řadě hodnocen na kohortě pacientů s karcinomem pankreatu léčených monoterapií gemcitabinem, kde bylo prokázáno, že pacienti s hodnotou SIRI< cut-off mají signifikantně delší mOS ve srovnání s pacienty s hodnotou SIRI> cut-off¹⁸⁹. Později byl prognostický

význam SIRI ověřen i v populaci pacientů léčených moderními režimy (mFOLFIRINOX a GnP), kde se opět prokázalo, že SIRI je nezávislý prognostickým ukazatelem¹⁹⁶. Naše výsledky jsou tak v souladu s dříve publikovanými.

Nádorové markery jsou obecně spojovány s horší prognózou pacientů, bez ohledu na typ malignity. Na druhou stranu jejich senzitivita a specificita je různá. Konkrétně, v případě karcinomu pankreatu je Ca19-9 spojován s horší prognózou pacientů. Je ale potřeba konstatovat, že jeho hodnota může být falešně vyšší u nemocí jater nebo žlučového stromu. Současně je zde ale i riziko falešné negativity tohoto markeru u části populace. Vedle Ca19-9 bývá u pacientů s karcinomem pankreatu často zvýšená i hodnota CEA. O jeho případném prognostickém významu je k dispozici méně dat. V našem souboru jsme elevaci CEA identifikovali jako negativní prognostický marker. Existuje několik prací, které podporují naše pozorování. Imaoka et al. hodnotili prognostický význam CEA v kohortě 433 pacientů s metastatickým onemocněním. Prokázali, že elevace CEA > 5 µg/l je asociována se signifikantně kratším přežíváním ve srovnání s hodnotou CEA < 5 µg/l¹⁹⁷. Prognostický význam CEA byl prokázán i v metaanalýze 3650 pacientů zařazených v 19 studiích. Autoři zjistili, že elevace CEA (nejčastější cut-off pro CEA byl 5 µg/l) je signifikantně asociována s horším mOS (HR 1,43, 95% CI: 1,31 – 1,56), a proto by CEA mělo být standardně vyšetřováno u pacientů s karcinomem pankreatu¹⁹⁸.

Dalším parametrem, který prokázal asociaci s prognózou pacientů v našem souboru, je NLR. Zánět, zejména chronický, je obecně přijímán jako faktor podílející se na iniciaci a progresi nádorového onemocnění. Elevace hodnot neutrofilů je jedním z hlavních znaků systémového zánětu. Navíc, neutrofily secernují proinflamatorní cytokiny jako interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a proangiogenní faktory včetně vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), které v konečném důsledku vytvářejí vhodné mikroprostředí pro progresi onemocnění. Současně, elevace IL-10 a TNF- α) vede k depleci počtu lymfocytů, které hrají důležitou roli v imunitním dozoru před nádory. Lze tedy konstatovat, že vysoké NLR je pravděpodobně spojeno se zvýšenou neutrofily mediovanou zánětlivou pronádorovou odpovědí a současně sníženou lymfocyty mediovanou protinádorovou imunitní odpovědí, která vede k progresi onemocnění a nedobré prognóze^{47,48}. První studie, která hodnotila NLR u pacientů s karcinomem pankreatu byla publikována již v roce 2010 a týkala se pacientů, kteří podstoupili operační výkon. Bylo prokázáno, že elevace NLR byla spojena s horší prognózou¹⁹⁹. Později byl negativní

prognostický význam elevace NLR prokázán i v populaci pacientů s pokročilým onemocněním²⁰⁰. V současnosti je k dispozici celá řada prací (44 studií), která potvrzuje prognostický význam NLR u pacientů s karcinomem pankreatu bez ohledu na použitý cut-off (1,7 – 14,1) NLR²⁰¹.

Parametr MPS byl zaveden poměrně nedávno. Kombinuje hodnotu NLR a hladiny albuminu a je snadno použitelný v klinické praxi. Lebenthal a kol. zjistili prognostický význam MPS v souboru pacientů s metastazujícím karcinomem pankreatu léčených různými režimy první linie (mOS: 12,9 měsíce, 9,0 měsíce a 5,4 měsíce pro MPS 0, 1 a 2)¹⁹⁰. Tyto výsledky byly potvrzeny i v jiné kohortě pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu léčených různými režimy první linie¹⁸⁸. V našem souboru jsme ověřili a potvrdili prognostický význam MPS u pacientů léčených GnP a mFOLFIRINOX.

Konečně, prognostický význam PI byl poprvé popsán v kohortě pacientů s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic, kde prokázal prognostický význam pro přežití²⁰². Existuje také studie, která prokázala jeho prognostickou hodnotu u pacientů s karcinomem pankreatu podstupujících resekci²⁰³. Přesto, pokud je nám známo, jeho vliv na přežití v kohortě pacientů s metastazujícím karcinomem pankreatu nebyl dosud v reálném prostředí zkoumán. Zde jsme prokázali, že PI má prognostický význam v kohortě metastatických pacientů léčených GnP a mFOLFIRINOXEM.

14.2. Exprese vybraných miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu

Prokázali jsme, že miRNA v případě karcinomu pankreatu vykazují jednak zvýšenou, jednak sníženou expresi ve srovnání s nenádorovým parenchymem pankreatu. Zvolené miRNA byli identifikovány na základě dostupné literatury s ohledem na jejich častou deregulaci v případě pacientů s karcinomem pankreatu^{204–207}. Kromě odlišností v míře exprese jednotlivých miRNA jsme současně prokázali pozitivní korelaci mezi zvýšenou expresí miR-21, miR-155a a miR-210. Tyto 3 aberantně exprimované miRNA mohou vést k iniciaci a progresi malignity^{208–211}. Současně byla nalezena pozitivní korelace mezi sníženou expresí miR-148a a miR-217. Oba tyto miRNA mají negativní vliv na proliferaci buněk, a jejich inhibice je tedy pravděpodobně nezbytná pro zdárnou karcinogenezi^{170,212}. Navíc, byla prokázána pozitivní korelace mezi sníženou expresí miR-96 a zvýšenou expresí miR-196a. miR-96 působí jako inhibitor Kras, což vede k omezení proliferace^{213–215}, na druhou stranu miR-196a působí proonkogenně, inhibicí apoptózy a stimulací buněčné proliferace a migrace

^{208,216}. Současně přítomná alterace exprese těchto miRNA tedy může signifikantně přispívat k přežívání nádorových buněk a k nádorové progresi. V 5 ze 7 studovaných miRNA byla prokázána odlišná míra exprese ve srovnání s nenádorovým parenchymem pankreatu, a proto tato odlišná exprese může sloužit jako senzitivní metoda k diagnostice tohoto onemocnění již v časných stádiích.

Karcinom pankreatu je charakterizován nedobrou prognózou bez ohledu na stadium onemocnění. V klinické praxi je často využívána hodnota Ca19-9 jako prognostického markerů, nicméně jeho hodnota může být falešně pozitivní u řady nenádorových onemocnění a současně může být falešně negativní u části populace. Ukazuje se, že exprese miRNA může poskytnout cenné prognostické informace ^{217,218}. V tomto ohledu je nejlépe studovanou miR-21. V řadě metaanalýz, zahrnujících celkem více než 2000 pacientů s karcinomem pankreatu bylo prokázáno, že zvýšená exprese miR-21 v nádorové tkáni je spojena s horším PFS a OS ^{217–221}. Navíc, negativní vliv zvýšené exprese miR-21 na OS byl prokázán i při analýze tohoto biomarkeru z plazmy pacientů ²²². Nicméně jsou k dispozici i práce, které negativní prognostický význam zvýšené exprese miR-21 nepotvrzují ^{223,224}. Dále se vedou diskuse, zde je za negativní prognostický vliv zvýšené exprese miR-21 odpovědná exprese této molekuly v nádorovém parenchymu, nebo v s nádorem asociovaných fibroblastech. Bylo prokázáno, že zvýšená míra exprese miR-21 ve fibroblastech asociovaných s nádorem byla spojena s horším OS a uzlinovými metastázami, zatímco zvýšená exprese miR-21 v nádoru neměla vliv na OS ²²⁵. Podobně heterogenní výsledky s ohledem na sníženou, resp. zvýšenou míru exprese studovaných miRNA a jejich vlivem na PFS a OS pacientů byly publikovány. Závěrem lze konstatovat, že v našem souboru nebyl prokázán signifikantní vliv na PFS a OS u žádné ze 7 (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a, miR210 a miR-217) sledovaných miRNA.

V současnosti jsou data o prognostickém významu exprese miRNA ne zcela dostatečné a je zde prostor pro diskusi a zlepšení. Existuje řada faktorů, které mohou být odpovědné za tyto heterogenní výsledky. Využití různého vstupního materiálu (čerstvě mražené vzorky, FFPE vzorky, plazma, sérum), nutnost použití odlišných metod ke kvantifikaci exprese miRNA představuje limitaci srovnání výsledků mezi jednotlivými studiemi a současně i doba skladování FFPE může ovlivnit v konečném důsledku množství miRNA vzhledem k degradaci miRNA ^{226–230}.

Detekce miRNA tak v konečném důsledku závisí na řadě faktorů, včetně manipulace se vzorky, volby miRNA izolačního protokolu, metod detekce apod. Je proto potřeba dalších

velkých studií se standardizovanými postupy odběru, zpracování a analýzy získaných dat k objektivizaci případného prognostického významu miRNA v populaci pacientů s karcinomem pankreatu.

14.3. Genová exprese CTC u pacientů s karcinomem pankreatu

V rámci pilotní analýzy diferenciální genové exprese vybraných genů CTC pacientů s karcinomem pankreatu majících vztah k prognóze, progresi onemocnění jsme ve skupině pacientů s prognosticky negativními inflammation-based parametry pozorovali trend ke zvýšené expresi genů, které mají vztah k buněčné motilitě, invazivitě, indukci EMT programu a k CSC.

Konkrétně ze skupiny analyzovaných genů, byl pozorován trend ke zvýšené expresi TWIST, SOX2, NANOG, SNAIL1 a ZEB1 v prognosticky nepříznivé skupině pacientů. Recipročně, ve skupině pacientů s dobrou prognózou byla exprese těchto genů snížena. Navíc, prognosticky dobrá skupina vykazovala trend ke snížené expresi POU5F a CPT1A.

Zvýšená exprese TWIST, SOX2, NANOG, SNAIL, ZEB1 je prokazatelně asociována s indukcí programu EMT, který v konečném důsledku vede ke zvýšení invazivity buněk, vede k indukci drah neo/angiogeneze, zvyšuje rezistenci nádorových buněk vůči apoptóze¹⁵². Konkrétně, zvýšená exprese TWIST, SNAIL1 vede k ochraně CTC v cirkulaci před anoikis^{231–233}. Dále, zvýšená exprese SNAIL1 vede k expresi enzymů: matrixových metaloproteináz, které mají schopnost rozrušovat extracelulární matrix a tím je umožněna zvýšená mobilita, invazivita buněk²³⁴. Konečně, SNAIL1 indukuje expresi VEGF epiteliálními buňkami se stimulací neo/angiogeneze jako nezbytného předpokladu metastatického rozsevu²³⁵.

Expresi POU5F, známého rovněž jako OCT4, vykazovala trend ke snížené expresi v prognosticky dobré skupině. Gen POU5F/OCT4 kóduje transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v embryonálním vývoji a udržení pluripotentnosti kmenových buněk; aberantní exprese tohoto genu v dospělých tkáních je spojena s tumorigenezí²³⁶.

Zvýšená exprese POU5F/OCT4 a SOX2 vedoucí k indukci EMT programu a generování CSC je v pankreatických modelech během terapie upregulována a asociována s rezistencí vůči terapii²³⁷. Současně existují důkazy, že pankreatické modely s knockdown POU5F/OCT4 a NANOG vedou k inhibici proliferace, migrace, invaze, chemorezistence, snížené generaci CSC jak in vitro, tak in vivo²³⁸.

CPT1A hraje kritickou roli v metabolismu nádoru a progresi onemocnění. Overexprese CPT1A v buňkách adenokarcinomu pankreatu je spojena s kratším přežíváním. Bylo prokázáno, že overexprese CPT1A vede ke zvýšení proliferace, EMT a glykolytického metabolismu v buňkách adenokarcinomu pankreatu. CPT1A se váže na SNAIL1 a vede k progresi onemocnění současně i stabilizací SNAIL1. Blokování osy CPT1A/SNAIL1 tak představuje potenciální způsob zlepšení prognózy a efektu terapie u pacientů s karcinomem pankreatu ²³⁹.

Existují i klinická data potvrzující negativní prognostický význam zvýšené exprese námi sledovaných genů. Amantini et al. hodnotili CTC u 20 pacientů s karcinomem pankreatu, kteří podstupovali onkologickou terapii. Hodnotili profil genové exprese CTC u pacientů před a po terapii. Identifikovali změnu exprese v 19 genech, včetně genů majících vztah k EMT, CSC (POU5F, ZEB), kde zvýšená exprese byla asociována s horším přežíváním. Současně, vlivem terapie došlo k vzestupu tzv. mesenchymálních CTC z 5 % na 16 % vlivem indukce EMT programu ²⁴⁰. Obdobně byla přítomnost tzv. mesenchymálních CTC, resp. CTC se znaky CSC spojena s horším přežíváním ve srovnání s tzv. epiteliálními CTC i v dalších studiích ^{241,242}. Prognostický význam analýzy a změn genové exprese CTC vlivem podávané terapie byl prokázán i v recentní studii 15 pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu ²⁴³.

Naše první data s ohledem na charakter a vztah genové exprese CTC a přežívání pacientů jsou v souladu s dosud publikovanými daty. Nabízí se otázka, zda systémový zánětlivý stav vede ke zvýšené expresi genů v CTC asociovaných s nedobrou prognózou a rezistencí na terapii, nebo zda zvýšená exprese těchto genů vede v konečném důsledku k indukci systémového zánětlivého stavu. Tyto skutečnosti jsou hypotézu generující a je potřeba je dále zkoumat na větším souboru pacientů s karcinomem pankreatu.

15. Závěry

V práci byla potvrzena hypotéza, že přítomnost systémového zánětu, hodnoceného pomocí inflammation-based parametrů, negativně ovlivňuje prognózu pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu, kteří podstupují paliativní chemoterapii. I přes limitovanou velikost našeho souboru pacientů s metastatickým onemocněním lze na validitu námi získaných výsledků usuzovat ze skutečnosti, že pozorované hodnoty mOS, počty pacientů pokračujících v léčbě druhé linie, byly prakticky identické s výsledky prokázanými v registračních studiích jednotlivých režimů.

Byl prokázán prognostický význam řady zástupných parametrů systémového zánětu. Výhodou těchto parametrů je skutečnost, že je lze využít jednoduše v reálné klinické praxi. Jsou snadno vyšetřitelné a rychle dostupné z běžných laboratorních hodnot, které jsou rutinně vyšetřovány u pacientů s nádorovým onemocněním. Nepředstavují další finanční zátěž pro zdravotnický systém. Tyto inflammation-based parametry lze použít k lepší stratifikaci pacientů a identifikaci těch s dobrou nebo špatnou prognózou. Naše výsledky jsou ve shodě se závěry jiných autorů studujících obdobnou problematiku.

Námi prezentované výsledky jsou dalším důkazem skutečnosti, že přítomnost systémového zánětlivého stavu, který je indukován nádorovými buňkami může v konečném důsledku negativně ovlivnit prognózu pacientů s nádorovým onemocněním. Pravděpodobnou příčinou je „switch“ protinádorové imunity na pronádorovou vlivem řady působků produkovaných nádorovými buňkami. Vzájemný vztah jednotlivých imunokompetentních buněk ve vztahu k prognóze onemocnění lze velmi zjednodušeně popsat právě pomocí inflammation-based parametrů, které mohou sloužit jako zástupný ukazatel pronádorového systémového zánětlivého stavu.

Jejich klinický dopad lze přímo využít v reálné klinické praxi při odhadu biologické povahy onemocnění při iniciaci onkologické léčby. Současně mohou pomoci k lepší komunikaci prognózy onemocnění nad rámec dat z klinických studií u konkrétního pacienta. Nepříznivé vstupní inflammation-based parametry mohou klinika rovněž motivovat k časnému zahájení komunikace stran prognózy s konkrétním pacientem, ovlivnit plán hodnocení efektivity terapie prostřednictvím časnějšího přehodnocení odpovědi na léčbu. Zůstává nevyřešenou otázkou, zda intenzifikace chemoterapie u pacientů s negativními vstupními parametry může vést ke zlepšení jejich přežívání. Současně naše pozorování negativního

prognostického významu specifických inflammation-based parametrů lze využít v terciární prevenci. Konkrétně, jejich přítomnost může být signálem pro zintenzivnění poléčebného sledování k včasnému odhalení recidivy onemocnění. U pacientů s metastatickým onemocněním znalost těchto parametrů může vést ke zkrácení standardního intervalu re-stagingových vyšetření s cílem včas odhalit progresi onemocnění na léčbě a potenciálně změnou léčby zlepšit onkologické výsledky. Současně znalost nepříznivé biologie onemocnění může vést klinika ke zvýšené snaze o dovyšetření pacienta s cílem nabídnout potenciálně více specifickou, personalizovanou terapii, nebo případně zařadit pacienta do vhodné klinické studie.

Hypotéza, že odlišná exprese miRNA ovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu se nepotvrdila. I přes odlišnou expresi (sníženou/zvýšenou) miRNA ve srovnání s nenádorovým parenchymem nebyl prokázán vliv diferenciální exprese ve vztahu k OS a PFS pacientů s karcinomem pankreatu. Na druhou stranu je zřejmé, že exprese miRNA je odlišná mezi nádorovou a nenádorovou tkání. Toho lze potenciálně využít v rámci časné diagnostiky onemocnění, nebo při diagnostických rozpacích při hodnocení limitovaného množství biotického materiálu.

Možné důvody neprokázání odlišnosti OS a PFS dle diferenciální exprese miRNA jsou diskutovány v příslušném oddílu a svou roli může hrát velikost souboru, doba a způsob skladování FFPE, samotný proces izolace miRNA a její detekce. K validaci miRNA jako prognostického markeru u pacientů s karcinomem pankreatu je tedy potřeba dalších studií se standardizovanými postupy odběru, zpracování a analýzy získaných dat.

V rámci pilotního projektu analýzy genové exprese CTC pacientů s karcinomem pankreatu ve vztahu k inflammation-based parametrů byl identifikován signál ke zvýšené expresi genů majících vztah k EMT, CSC ve skupinách s negativními inflammation-based parametry. Hypotéza odlišné genové exprese v závislosti na příslušné prognostické skupině se potvrdila. Definitivní závěry vyžadují další výzkum v této oblasti na větším souboru pacientů.

16. Abstrakt

Východiska/Cíl: Karcinom pankreatu se řadí mezi onemocnění s tristní prognózou. S cílem personalizace terapie je potřeba identifikovat prognostické parametry ve vztahu k přežívání pacientů. Prognostické parametry založené na přítomnosti systémového zánětu mají významnou roli u řady nádorových onemocnění. Je známo, že zánět podporuje progresi nádoru, což vede ke zkrácení přežití. U karcinomu pankreatu je systémový zánět běžný a přispívá k jeho nepříznivé prognóze. Cílem této studie bylo vyhodnotit prognostické parametry založené na přítomnosti systémového zánětu u pacientů s metastazujícím karcinomem pankreatu, kteří dostávají chemoterapii první linie a současně popsat jejich vztah k charakteristikám CTC těchto pacientů.

Pacienti a metody: Do studie byli zařazeni pacienti s metastatickým karcinomem pankreatu podstupujících chemoterapii první linie v našem zařízení. Byly shromážděny základní klinicko-patologické a vstupní parametry před léčbou (tzv. inflammation-based parametry, CTC). Přežití bylo odhadnuto pomocí Kaplan-Meierovy metody a rozdíly v přežití byly hodnoceny pomocí log-rank testu.

Výsledky: V souboru jsme identifikovali poměr lymfocytů k monocytům ≥ 3 , index systémové zánětlivé odpovědi $< 2,3$, karcinoembryonální antigen $< 2,5$, poměr neutrofilů k lymfocytům < 5 , Memorial Sloane Kettering skóre < 2 a prognostický index < 2 jako prognostické markery spojené se zlepšením celkového přežití u pacientů podstupujících chemoterapii první linie. Současně jsme v rámci pilotní analýzy prokázali změny na úrovni genové exprese CTC pacientů v závislosti od příslušnosti k dobré/špatné prognostické skupině.

Závěr: Současná analýza prokázala souvislost mezi prognostickými markery založenými na přítomnosti systémového zánětu a celkovým přežitím u pacientů s metastazujícím karcinomem pankreatu léčených v reálném prostředí jedné instituce. Přítomnost negativních prognostických ukazatelů systémového zánětu byla asociována se zvýšenou expresí genů souvisejících se zvýšenou agresivitou onemocnění prostřednictvím analýzy CTC.

17. Abstract

Introduction: Pancreatic cancer has a poor prognosis. In order to personalize therapy, there is a need to identify prognostic parameters in relation to patient survival. Prognostic parameters based on the presence of systemic inflammation have a significant role in many cancers. Inflammation is known to promote tumor progression, leading to shortened survival. In pancreatic cancer, systemic inflammation is common and contributes to its unfavorable prognosis. The aim of this study was to evaluate prognostic parameters based on the presence of systemic inflammation in patients with metastatic pancreatic cancer receiving first-line chemotherapy, while describing their relationship to the CTC characteristics of these patients.

Patients and Methods: Patients with metastatic pancreatic cancer undergoing first-line chemotherapy at our institution were included in the study. Baseline clinicopathological and pretreatment baseline parameters (inflammation-based parameters, CTCs) were collected. Survival was estimated using the Kaplan-Meier method and differences in survival were evaluated using the log-rank test.

Results: We identified lymphocyte-to-monocyte ratio ≥ 3 , systemic inflammatory response index < 2.3 , carcinoembryonic antigen < 2.5 , neutrophil-to-lymphocyte ratio < 5 , Memorial Sloan Kettering score < 2 , and prognostic index < 2 as prognostic markers associated with improved overall survival in patients undergoing first-line chemotherapy. At the same time, in a pilot analysis, we demonstrated changes in gene expression levels of CTC patients according to their membership in the good/bad prognostic group.

Conclusion: The present analysis demonstrated an association between prognostic markers based on the presence of systemic inflammation and overall survival in patients with metastatic pancreatic cancer treated in a real-world single-institution setting. The presence of negative prognostic markers of systemic inflammation was associated with increased expression of genes associated with increased disease aggressiveness through CTC analysis.

18. Seznam použitých zkratek

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALBI	albumin vůči bilirubinu (poměr)
APC	adenomatous polyposis coli
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
BMI	body mass index
BRCA1	breast cancer type I susceptibility protein
BRCA2	breast cancer type I susceptibility protein
CAPS	cancer of the pancreas screening study
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CAR	C-reaktivním protein vůči albuminu (poměr)
Ca19-9	karbohydrátový antigen 19-9
CD 24	cluster of differentiation 24
CD 44	cluster of differentiation 44
CEA	karcinoembryonální antigen
CI	confidence interval
CPS	combined positive score
CSC	cancer stem cell
CT	computed tomography

CTC	circulating tumor cell
ctDNA	circulating tumor DNA
CR	complete remission
CRP	C-reaktivní protein
DDR	DNA damage response
DFS	disease free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
EORTC	European Organisation For Research And Treatment Of Cancer
EUS	endoscopic ultrasound
FBS	fetal bovine serum
FNAB	fine needle aspiration biopsy
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
GATA6	GATA-binding factor 6
GnP	gemcitabin + nab-paclitaxel
GPS	Glasgowské prognostické skóre
HR	hazard ratio
HRD	homologous repair deficiency
IARC	International Agency For Research On Cancer
IL-2	interleukin 2

IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
IPMN	intraduktální papilární mucinózní neoplázie
KM	Kaplan-Meier
LMR	lymfocyty vůči monocytům (poměr)
MCN	mucinous cystic neoplasia
miRNA	micro RNA
mGPS	modifikované Glasgowské prognostické skóre
MMR	miss-match repair systém
MPS	Memorial Sloane Kettering prognostické skóre
MR	magnetická rezonance
mRNA	messenger RNA
MSI-H	microsatellite instability high
MUTYH	mutY DNA glykosyláza
NGF	nerve growth factor
NGS	next generation sequencing
NLR	neutrofily vůči lymfocytům (poměr)
OR	odds ratio
ORR	overall response rate
OS	overall survival

PALB2	partner and localizer of BRCA2
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplázie
pCR	pathologic complete response
PARP	poly (ADP-ribozo) polymeráza
PCR	polymerase chain reaction
PET/CT	positron emission tomography/computed tomography
PFS	progression free survival
PI	prognostický index
PLR	trombocyty vůči lymfocytům (poměr)
PNI	prognostický nutriční index
PPP	pentose phosphate pathway
PR	partial response
PRSS1	serin proteázu 1 kódující gen
PS	performance status
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RR	relativní riziko
SBRT	stereotactic body radiation technique
SD	stable disease

SIR	standardized incidence ratio
SIRI.	index systémové zánětlivé odpovědi
SPINK1	serine peptidase inhibitor Kazal type 1
STK11	serine/threonine kinase 11
TAM	tumor associated macrophage
TAPS	Trans-Atlantic Pancreatic Surgery Consortium
TIL	tumor infiltrating leucocytes
TMB	tumor mutation burden
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TP53	tumor protein p53
VEGF	vascular endothelial growth factor
UICC	Union for International Cancer Control
WBC	white blood cell
WGS	whole genome sequencing
WHO	World Health Organisation

19. Seznam použité literatury

1. Cancer Today.
https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/tables?mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&types=0.
2. Cancer Tomorrow. <https://gco.iarc.who.int/tomorrow/en/dataviz/isotype>.
3. Rahib, L., Wehner, M. R., Matrisian, L. M. & Nead, K. T. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open* 4, e214708–e214708 (2021).
4. Krejčí, R. D., Mužík, R. J. & Dušek, L. *Současné Epidemiologické Trendy Novotvarů v České Republice Autorský Kolektiv*.
5. Pereira, S. P. *et al.* Early detection of pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5, 698–710 (2020).
6. Lugo, A. *et al.* Strong excess risk of pancreatic cancer for low frequency and duration of cigarette smoking: A comprehensive review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 104, 117–126 (2018).
7. Zou, L. *et al.* Non-linear dose–response relationship between cigarette smoking and pancreatic cancer risk: Evidence from a meta-analysis of 42 observational studies. *Eur J Cancer* 50, 193–203 (2014).
8. Ben, Q. W. *et al.* Cigarette smoking and mortality in patients with pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Pancreas* 48, 985–995 (2019).
9. Hermann, P. C. *et al.* Nicotine promotes initiation and progression of KRAS-induced pancreatic cancer via gata6-dependent dedifferentiation of acinar cells in mice. *Gastroenterology* 147, 1119–1133.e4 (2014).
10. Seitz, H. K. & Stickel, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 2007 7:8 7, 599–612 (2007).
11. Duell, E. J. *et al.* Pancreatitis and pancreatic cancer risk: A pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology* 23, 2964–2970 (2012).
12. Kirkegård, J., Mortensen, F. V. & Cronin-Fenton, D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 112, 1366–1372 (2017).
13. Park, S. M. *et al.* Incidence and risk of pancreatic cancer in patients with acute or chronic pancreatitis: a population-based cohort study. *Scientific Reports* 2023 13:1 13, 1–12 (2023).

14. Kim, H. S. *et al.* Incidence and risk of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: defining the optimal subgroup for surveillance. *Scientific Reports* 2023 13:1 13, 1–10 (2023).
15. Donohoe, C. L., Doyle, S. L. & Reynolds, J. V. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetol Metab Syndr* 3, (2011).
16. Li, D. *et al.* Body Mass Index and Risk, Age of Onset, and Survival in Patients With Pancreatic Cancer. *JAMA* 301, 2553–2562 (2009).
17. Rosato, V. *et al.* Metabolic syndrome and pancreatic cancer risk: a case-control study in Italy and meta-analysis. *Metabolism* 60, 1372–1378 (2011).
18. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25, 4–7 (2004).
19. Carreras-Torres, R. *et al.* Obesity, metabolic factors and risk of different histological types of lung cancer: A Mendelian randomization study. *PLoS One* 12, e0177875 (2017).
20. Molina-Montes, E. *et al.* Deciphering the complex interplay between pancreatic cancer, diabetes mellitus subtypes and obesity/BMI through causal inference and mediation analyses. *Gut* 70, 319–329 (2021).
21. Singh, S. *et al.* Anti-diabetic medications and risk of pancreatic cancer in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology* 108, 510–519 (2013).
22. Franciosi, M. *et al.* Metformin Therapy and Risk of Cancer in Patients with Type 2 Diabetes: Systematic Review. *PLoS One* 8, (2013).
23. Soranna, D. *et al.* Cancer Risk Associated with Use of Metformin and Sulfonylurea in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Oncologist* 17, 813–822 (2012).
24. Wang, Z. *et al.* Metformin is associated with reduced risk of pancreatic cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 106, 19–26 (2014).
25. Zanini, S. *et al.* A review of lifestyle and environment risk factors for pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 145, 53–70 (2021).
26. Conroy, T. *et al.* Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up 5 on behalf of the ESMO Guidelines Committee. (2023) doi:10.1016/j.annonc.2023.08.009.
27. Shindo, K. *et al.* Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 35, 3382–3390 (2017).

28. Hu, C. *et al.* Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA* 319, 2401–2409 (2018).
29. Yurgelun, M. B. *et al.* Germline cancer susceptibility gene variants, somatic second hits, and survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer. *Genet Med* 21, 213–223 (2019).
30. Roberts, N. J. *et al.* Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer The Genomes of Patients with Familial Pancreatic Cancer. *Noushin Niknafs* 15, 23 (2016).
31. Porter, N. *et al.* Risk of Pancreatic Cancer in the Long-Term Prospective Follow-Up of Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *J Natl Cancer Inst* 114, 1681–1688 (2022).
32. Abe, K., Kitago, M., Kitagawa, Y. & Hirasawa, A. Hereditary pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol* 26, 1784 (2021).
33. Kasuga, A. *et al.* Molecular Features and Clinical Management of Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 1205 23, 1205 (2022).
34. Canto, M. I. *et al.* International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut* 62, 339–347 (2013).
35. Goggins, M. *et al.* Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut* 69, 7–17 (2020).
36. Dbouk, M. *et al.* The Multicenter Cancer of Pancreas Screening Study: Impact on Stage and Survival. *J Clin Oncol* 40, (2022).
37. Blackford, A. L. *et al.* Pancreatic Cancer Surveillance and Survival of High-Risk Individuals. *JAMA Oncol* 10, 1087–1096 (2024).
38. Vaněk, P. *et al.* Pancreatic cancer screening: ready for prime time? *Gastroenterologie a Hepatologie* 75, 390–398 (2021).
39. Vaněk, P. *et al.* Pancreatic cancer surveillance in high-risk individuals Position statement of professional societies. *Gastroenterologie a Hepatologie* 77, 529–538 (2023).
40. Balduzzi, A., Salvia, R. & Löhr, M. Risk stratification tools for branch-duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *United European Gastroenterol J* 10, 145 (2022).
41. Wu, Y. H. A. *et al.* Ductal Dilatation of ≥ 5 mm in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Should Trigger the Consideration for Pancreatectomy: A Meta-Analysis and Systematic Review of Resected Cases. *Cancers (Basel)* 13, (2021).

42. Singhi, A. D., Koay, E. J., Chari, S. T. & Maitra, A. Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges. *Gastroenterology* 156, 2024–2040 (2019).
43. Kanda, M. *et al.* Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, (2012).
44. Guo, J., Xie, K. & Zheng, S. Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer. *Int J Biol Sci* 12, 292–301 (2016).
45. Gupta, P. B., Mani, S., Yang, J., Hartwell, K. & Weinberg, R. A. The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 291–297 (2005).
46. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:4 9, 265–273 (2009).
47. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
48. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31–46 (2022).
49. Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9, 302–312 (2009).
50. Rhim, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361 (2012).
51. Hermann, P. C. *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313–323 (2007).
52. Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030–1037 (2007).
53. Feig, C. *et al.* The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18, 4266–4276 (2012).
54. Buerlein, R. C. D. & Shami, V. M. Management of pancreatic cysts and guidelines: what the gastroenterologist needs to know. *Ther Adv Gastrointest Endosc* 14, (2021).
55. Rishi, A., Goggins, M., Wood, L. D. & Hruban, R. H. Pathological and molecular evaluation of pancreatic neoplasms. *Semin Oncol* 42, 28–39 (2015).
56. Egal, A. *et al.* Prognostic Factors of Acinar Cell Carcinomas: A Study of 44 Patients. *Pancreas* 48, 1393–1396 (2019).
57. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501 (2015).

58. Sahin, I. H., Askan, G., I. Hu, Z. & O'Reilly, E. M. Immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma: an emerging entity? *Ann Oncol* 28, 2950–2961 (2017).
59. Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature Medicine* 2011 17:4 17, 500–503 (2011).
60. Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 47, 1168–1178 (2015).
61. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 2016 531:7592 531, 47–52 (2016).
62. Martens, S. *et al.* Different shades of pancreatic ductal adenocarcinoma, different paths towards precision therapeutic applications. *Ann Oncol* 30, 1428–1436 (2019).
63. Aung, K. L. *et al.* Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clin Cancer Res* 24, 1344–1354 (2018).
64. O’Kane, G. M. *et al.* GATA6 Expression Distinguishes Classical and Basal-like Subtypes in Advanced Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 26, 4901–4910 (2020).
65. Zins, M., Matos, C. & Cassinotto, C. Pancreatic adenocarcinoma staging in the era of preoperative chemotherapy and radiation therapy. *Radiology* 287, 374–390 (2018).
66. Fukukura, Y. *et al.* Adding delayed phase images to dual-phase contrast-enhanced CT increases sensitivity for small pancreatic ductal adenocarcinoma. *American Journal of Roentgenology* 217, 888–897 (2021).
67. Hong, S. B. *et al.* Meta-analysis of MRI for the diagnosis of liver metastasis in patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Magn Reson Imaging* 51, 1737–1744 (2020).
68. Wu, L. M. *et al.* Diagnostic value of diffusion-weighted magnetic resonance imaging compared with fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for pancreatic malignancy: A meta-analysis using a hierarchical regression model. *J Gastroenterol Hepatol* 27, 1027–1035 (2012).
69. Wang, L., Dong, P., Wang, W. G. & Tian, B. L. Positron emission tomography modalities prevent futile radical resection of pancreatic cancer: A meta-analysis. *International Journal of Surgery* 46, 119–125 (2017).
70. Al-Hawary, M. M. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the society of abdominal radiology and the american pancreatic association. *Gastroenterology* 146, (2014).
71. Isaji, S. *et al.* International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology* 18, 2–11 (2018).

72. Hartwig, W. *et al.* CA19-9 in potentially resectable pancreatic cancer: Perspective to adjust surgical and perioperative therapy. *Ann Surg Oncol* 20, 2188–2196 (2013).
73. Isaji, S., Kishiwada, M. & Kato, H. Surgery for borderline resectable pancreatic cancer: The Japanese experience. *Multimodality Management of Borderline Resectable Pancreatic Cancer* 265–287 (2015) doi:10.1007/978-3-319-22780-1_17/FIGURES/21.
74. Tas, F. *et al.* Performance status of patients is the major prognostic factor at all stages of pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol* 18, 839–846 (2013).
75. Dekker, E. N. *et al.* Improved Clinical Staging System for Localized Pancreatic Cancer Using the ABC Factors: A TAPS Consortium Study. *J Clin Oncol* 42, 1357–1367 (2024).
76. Delpero, J. R. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma with venous involvement: is up-front synchronous portal-superior mesenteric vein resection still justified? A survey of the Association Française de Chirurgie. *Ann Surg Oncol* 22, 1874–1883 (2015).
77. Van Der Gaag, N. A. *et al.* Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas. *N Engl J Med* 362, 1305 (2010).
78. Ostapoff, K. T. *et al.* Does adjuvant therapy improve overall survival for stage IA/B pancreatic adenocarcinoma? *HPB (Oxford)* 19, 587–594 (2017).
79. Gervaso, L., Lordick, F. & Fazio, N. Adjuvant Chemotherapy for Stage I Pancreatic Ductal Adenocarcinoma—Is It Based on Evidence or Clinical Wisdom? *JAMA Oncol* 7, 1759–1760 (2021).
80. Ma, S. J. *et al.* Association of Timing of Adjuvant Therapy With Survival in Patients With Resected Stage I to II Pancreatic Cancer. *JAMA Netw Open* 2, e199126–e199126 (2019).
81. Conroy, T. *et al.* Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 8, 1571–1578 (2022).
82. Altman, A. M. *et al.* Completion of Adjuvant Chemotherapy After Upfront Surgical Resection for Pancreatic Cancer Is Uncommon Yet Associated With Improved Survival. *Ann Surg Oncol* 26, 4108–4116 (2019).
83. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: A randomised controlled trial. *Lancet* 358, 1576–1585 (2001).
84. Neoptolemos, J. P. *et al.* A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* 350, 1200–1210 (2004).

85. Oettle, H. *et al.* Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297, 267–277 (2007).
86. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 304, 1073–1081 (2010).
87. Neoptolemos, J. P. *et al.* Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet* 389, 1011–1024 (2017).
88. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* 379, 2395–2406 (2018).
89. Von Hoff, D. D. *et al.* Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine* 369, 1691–1703 (2013).
90. Tempero, M. A. *et al.* Adjuvant nab-Paclitaxel + Gemcitabine in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Results From a Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *J Clin Oncol* 41, 2007–2019 (2023).
91. Evans, D. B., Wolff, R. A. & Hess, K. R. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region. *Ann Surg* 232, 727 (2000).
92. Neoptolemos, J. P. *et al.* A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350, 1200–1210 (2004).
93. Versteijne, E. *et al.* Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. *Journal of Clinical Oncology* 38, 1763–1773 (2020).
94. Versteijne, E. *et al.* Neoadjuvant Chemoradiotherapy Versus Upfront Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Long-Term Results of the Dutch Randomized PREOPANC Trial. *J Clin Oncol* 40, 1220–1230 (2022).
95. Groot Koerkamp, B. *et al.* LBA83 Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX versus neoadjuvant gemcitabine-based chemoradiotherapy for borderline resectable and resectable pancreatic cancer (PREOPANC-2): A multicenter randomized controlled trial. *Annals of Oncology* 34, S1323 (2023).
96. Ghaneh, P. *et al.* Immediate surgery compared with short-course neoadjuvant gemcitabine plus capecitabine, FOLFIRINOX, or chemoradiotherapy in patients with borderline resectable pancreatic cancer (ESPAC5): a four-arm, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 8, 157–168 (2023).

97. Katz, M. H. G. *et al.* Preoperative Modified FOLFIRINOX Treatment Followed by Capecitabine-Based Chemoradiation for Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Alliance for Clinical Trials in Oncology Trial A021101. *JAMA Surg* 151, e161137 (2016).
98. Murphy, J. E. *et al.* Total Neoadjuvant Therapy With FOLFIRINOX Followed by Individualized Chemoradiotherapy for Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 4, 963–969 (2018).
99. Murphy, J. E. *et al.* Total Neoadjuvant Therapy With FOLFIRINOX in Combination With Losartan Followed by Chemoradiotherapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 5, 1020–1027 (2019).
100. Tran, N. H. *et al.* Phase 2 Trial of Neoadjuvant FOLFIRINOX and Intensity Modulated Radiation Therapy Concurrent With Fixed-Dose Rate-Gemcitabine in Patients With Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 106, 124–133 (2020).
101. Katz, M. H. G. *et al.* Efficacy of Preoperative mFOLFIRINOX vs mFOLFIRINOX Plus Hypofractionated Radiotherapy for Borderline Resectable Adenocarcinoma of the Pancreas: The A021501 Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 8, 1263–1270 (2022).
102. Lambert, A. *et al.* LBA62 Preoperative modified FOLFIRINOX (mFOLFIRINOX) with or without chemoradiation (CRT) in borderline resectable pancreatic cancer (BRPC): Results from the randomized phase II trial PANDAS/PRODIGE 44. *Annals of Oncology* 35, S1252 (2024).
103. Philip, P. A. *et al.* Nab-paclitaxel plus gemcitabine in patients with locally advanced pancreatic cancer (LAPACT): a multicentre, open-label phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5, 285–294 (2020).
104. Suker, M. *et al.* FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol* 17, 801–810 (2016).
105. Hammel, P. *et al.* Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315, 1844–1853 (2016).
106. Fietkau, R. *et al.* Randomized phase III trial of induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy or chemotherapy alone for nonresectable locally advanced pancreatic cancer: First results of the CONKO-007 trial. *Journal of Clinical Oncology* 40, 4008–4008 (2022).

107. Burris, H. A. *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* 15, 2403–2413 (1997).
108. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* 364, 1817–1825 (2011).
109. Riedl, J. M. *et al.* Gemcitabine/nab-Paclitaxel versus FOLFIRINOX for palliative first-line treatment of advanced pancreatic cancer: A propensity score analysis. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 151, 3–13 (2021).
110. ORLANDI, E., CITTERIO, C., ANSELMi, E., CAVANNA, L. & VECCHIA, S. FOLFIRINOX or Gemcitabine Plus Nab-paclitaxel as First Line Treatment in Pancreatic Cancer: A Real-World Comparison. *Cancer Diagnosis & Prognosis* 4, 165 (2024).
111. Wainberg, Z. A. *et al.* NALIRIFOX versus nab-paclitaxel and gemcitabine in treatment-naïve patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (NAPOLI 3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 402, 1272–1281 (2023).
112. Oettle, H. *et al.* Second-line oxaliplatin, folinic acid, and fluorouracil versus folinic acid and fluorouracil alone for gemcitabine-refractory pancreatic cancer: outcomes from the CONKO-003 trial. *J Clin Oncol* 32, 2423–2429 (2014).
113. Gill, S. *et al.* PANCREOX: A Randomized Phase III Study of Fluorouracil/Leucovorin With or Without Oxaliplatin for Second-Line Advanced Pancreatic Cancer in Patients Who Have Received Gemcitabine-Based Chemotherapy. *J Clin Oncol* 34, 3914–3920 (2016).
114. Wang-Gillam, A. *et al.* NAPOLI-1 phase 3 study of liposomal irinotecan in metastatic pancreatic cancer: Final overall survival analysis and characteristics of long-term survivors. *Eur J Cancer* 108, 78–87 (2019).
115. Raphael, B. J. *et al.* Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203.e13 (2017).
116. Ghiorzo, P. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20, 10778–10789 (2014).
117. Holter, S. *et al.* Germline BRCA Mutations in a Large Clinic-Based Cohort of Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 33, 3124–3129 (2015).
118. Golan, T. *et al.* Geographic and ethnic heterogeneity in the BRCA1/2 pre-screening population for the randomized phase III POLO study of olaparib maintenance in metastatic pancreatic cancer (mPC). *Journal of Clinical Oncology* 36, 4115–4115 (2018).

119. O'Connor, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell* 60, 547–560 (2015).
120. Kaufman, B. *et al.* Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol* 33, 244–250 (2015).
121. Shroff, R. T. *et al.* Rucaparib Monotherapy in Patients With Pancreatic Cancer and a Known Deleterious BRCA Mutation. *JCO Precis Oncol* 2018, 1–15 (2018).
122. Reiss, K. A. *et al.* Phase II Study of Maintenance Rucaparib in Patients With Platinum-Sensitive Advanced Pancreatic Cancer and a Pathogenic Germline or Somatic Variant in BRCA1, BRCA2, or PALB2. *J Clin Oncol* 39, 2497–2505 (2021).
123. O'Reilly, E. M. *et al.* Randomized, Multicenter, Phase II Trial of Gemcitabine and Cisplatin With or Without Veliparib in Patients With Pancreas Adenocarcinoma and a Germline BRCA/PALB2 Mutation. *J Clin Oncol* 38, 1378–1388 (2020).
124. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 381, 317–327 (2019).
125. Kindler, H. L. *et al.* Overall Survival Results From the POLO Trial: A Phase III Study of Active Maintenance Olaparib Versus Placebo for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 40, 3929 (2022).
126. Casolino, R. *et al.* Homologous Recombination Deficiency in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Prevalence Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology* 39, 2617 (2021).
127. Golan, T. *et al.* Genomic Features and Classification of Homologous Recombination Deficient Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 160, 2119–2132.e9 (2021).
128. Pishvaian, M. J. *et al.* Molecular Profiling of Patients with Pancreatic Cancer: Initial Results from the Know Your Tumor Initiative. *Clin Cancer Res* 24, 5018–5027 (2018).
129. Aguirre, A. J. *et al.* Real-time genomic characterization of advanced pancreatic cancer to enable precision medicine. *Cancer Discov* 8, 1096–1111 (2018).
130. Pishvaian, M. J. *et al.* Outcomes in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma With Genetic Mutations in DNA Damage Response Pathways: Results From the Know Your Tumor Program. *JCO Precis Oncol* 3, 1–10 (2019).
131. Park, W. *et al.* Genomic Methods Identify Homologous Recombination Deficiency in Pancreas Adenocarcinoma and Optimize Treatment Selection. *Clin Cancer Res* 26, 3239–3247 (2020).
132. Umemoto, K. *et al.* The Molecular Landscape of Pancreatobiliary Cancers for Novel Targeted Therapies From Real-World Genomic Profiling. *J Natl Cancer Inst* 114, 1279–1286 (2022).

133. Philip, P. A. *et al.* Molecular Characterization of KRAS Wild-type Tumors in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 28, 2704–2714 (2022).
134. Singh, H. *et al.* Oncogenic Drivers and Therapeutic Vulnerabilities in KRAS Wild-Type Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 29, 4627–4643 (2023).
135. Mosele, F. *et al.* Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology* 31, 1491–1505 (2020).
136. Topham, J. T., Renouf, D. J. & Schaeffer, D. F. Circulating tumor DNA: toward evolving the clinical paradigm of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ther Adv Med Oncol* 15, (2023).
137. Jahr, S. *et al.* DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells 1. *Cancer Res* 61, 1659–1665 (2001).
138. Earl, J. *et al.* Circulating tumor cells (Ctc) and kras mutant circulating free Dna (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15, (2015).
139. Takai, E. *et al.* Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Scientific Reports* 2015 5:1 5, 1–10 (2015).
140. Botrus, G. *et al.* Circulating Tumor DNA-Based Testing and Actionable Findings in Patients with Advanced and Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Oncologist* 26, 569–578 (2021).
141. Xiong, A. *et al.* Genomic alterations in tumor tissue and ctDNA from Chinese pancreatic cancer patients. *Am J Cancer Res* 11, 4551 (2021).
142. Renouf, D. J. *et al.* The CCTG PA.7 phase II trial of gemcitabine and nab-paclitaxel with or without durvalumab and tremelimumab as initial therapy in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Commun* 13, (2022).
143. Yamaguchi, T. *et al.* Clinical Implications of Pre- and Postoperative Circulating Tumor DNA in Patients with Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 28, 3135–3144 (2021).
144. Groot, V. P. *et al.* Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 25, 4973–4984 (2019).
145. Lee, B. *et al.* Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann Oncol* 30, 1472–1478 (2019).
146. Botta, G. P. *et al.* Association of personalized and tumor-informed ctDNA with patient survival outcomes in pancreatic adenocarcinoma. *Oncologist* 29, 859–869 (2024).

147. Kruger, S. *et al.* Repeated mutKRAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 29, 2348–2355 (2018).
148. Pietrasz, D. *et al.* Circulating tumour DNA: a challenging innovation to develop ‘precision onco-surgery’ in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 126, 1676–1683 (2022).
149. Patel, H. *et al.* Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol* 12, 1–12 (2019).
150. Their, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2002 2:6 2, 442–454 (2002).
151. Maheswaran, S. & Haber, D. A. Circulating Tumor Cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev* 20, 96 (2010).
152. Liberko, M., Kolostova, K. & Bobek, V. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice. *Crit Rev Oncol Hematol* 88, 338–356 (2013).
153. Agarwal, A., Balic, M., El-Ashry, D. & Cote, R. J. Circulating Tumor Cells: Strategies for Capture, Analyses, and Propagation. *Cancer J* 24, 70 (2018).
154. Bobek, V., Gurlich, R., Eliasova, P. & Kolostova, K. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: Enrichment and cultivation. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20, 17163 (2014).
155. Tiriach, H. *et al.* Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Discov* 8, 1112–1129 (2018).
156. Boilève, A. *et al.* Organoids for Functional Precision Medicine in Advanced Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 167, 961-976.e13 (2024).
157. Martini, V., Timme-Bronsert, S., Fichtner-Feigl, S., Hoepfner, J. & Kulemann, B. Circulating Tumor Cells in Pancreatic Cancer: Current Perspectives. *Cancers (Basel)* 11, (2019).
158. Habib, J. R. & Yu, J. Circulating tumor cells in pancreatic cancer: A review. *J Pancreatol* 2, 54–59 (2019).
159. Ma, X. L. *et al.* Prognostic role of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 15, 6015–6020 (2014).
160. Han, L., Chen, W. & Zhao, Q. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35, 2473–2480 (2014).
161. Stephenson, D. *et al.* Circulating and disseminated tumor cells in pancreatic cancer and their role in patient prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8, 107223 (2017).

162. Pang, T. C. Y. *et al.* Circulating tumour cells in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis of clinicopathological implications. *Pancreatology* 21, 103–114 (2021).
163. Freed, I. M. *et al.* Circulating Tumor Cell Subpopulations Predict Treatment Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patients. *Cells* 12, 2266 (2023).
164. Tang, J. *et al.* CTC-derived pancreatic cancer models serve as research tools and are suitable for precision medicine approaches. *Cell Rep Med* 5, 101692 (2024).
165. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10, 704–714 (2009).
166. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92–105 (2009).
167. Slack, F. J. & Weidhaas, J. B. MicroRNA in cancer prognosis. *N Engl J Med* 359, 2720–2722 (2008).
168. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302, 1–12 (2007).
169. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:4 6, 259–269 (2006).
170. Zhao, W. G. *et al.* The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* 31, 1726–1733 (2010).
171. Yu, S. *et al.* miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70, 6015–6025 (2010).
172. Jiao, L. R. *et al.* MicroRNAs Targeting Oncogenes Are Down-Regulated in Pancreatic Malignant Transformation from Benign Tumors. *PLoS One* 7, e32068 (2012).
173. Tesfaye, A. A., Azmi, A. S. & Philip, P. A. miRNA and Gene Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Pathol* 189, 58–70 (2019).
174. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860 (2002).
175. Singh, N. *et al.* Inflammation and Cancer. *Ann Afr Med* 18, 121 (2019).
176. Zitvogel, L., Pietrocola, F. & Kroemer, G. Nutrition, inflammation and cancer. *Nat Immunol* 18, 843–850 (2017).
177. Hotamisligil, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 2017 542:7640 542, 177–185 (2017).
178. Pagès, F. *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093–1102 (2010).

179. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081 (2009).
180. DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 29, 309–316 (2010).
181. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899 (2010).
182. Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51 (2010).
183. Proctor, M. J. *et al.* An inflammation-based prognostic score (mGPS) predicts cancer survival independent of tumour site: a Glasgow Inflammation Outcome Study. *Br J Cancer* 104, 726–734 (2011).
184. Proctor, M. J. *et al.* A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. *Eur J Cancer* 47, 2633–2641 (2011).
185. Neumann, C. C. M. *et al.* Inflammation-Based Prognostic Scores in Pancreatic Cancer Patients-A Single-Center Analysis of 1294 Patients within the Last Decade. *Cancers (Basel)* 15, (2023).
186. Kamposioras, K. *et al.* Markers of tumor inflammation as prognostic factors for overall survival in patients with advanced pancreatic cancer receiving first-line FOLFIRINOX chemotherapy. *Acta Oncol* 61, 583–590 (2022).
187. Kubota, K. *et al.* Preoperative Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Long-Term Outcome for Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 29, 1437–1448 (2022).
188. Ma, L. X. *et al.* Systemic inflammatory prognostic scores in advanced pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 128, 1916–1921 (2023).
189. Qi, Q. *et al.* A novel systemic inflammation response index (SIRI) for predicting the survival of patients with pancreatic cancer after chemotherapy. *Cancer* 122, 2158–2167 (2016).
190. Leberthal, J. M. *et al.* Prognostic value of the Memorial Sloan Kettering prognostic score (MPS) in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 127, 1568 (2021).
191. BOBEK, V., KACPRZAK, G., RZETCHONEK, A. & KOLOSTOVA, K. Detection and Cultivation of Circulating Tumor Cells in Malignant Pleural Mesothelioma. *Anticancer Res* 34, (2014).

192. Elias, R. *et al.* Real-world Impact of Age at Diagnosis on Treatment Patterns and Survival Outcomes of Patients with Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncologist* 27, 469–475 (2022).
193. King, G. *et al.* Treatment Patterns in US Patients Receiving First-Line and Second-Line Therapy for Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in the Real World. *Adv Ther* 39, 5433–5452 (2022).
194. Rho, Y. S. *et al.* Prognostic value of neutrophil-lymphocyte ratio in first line treatment for metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Annals of Oncology* 28, v258 (2017).
195. Lin, S. *et al.* Prognostic value of lymphocyte to monocyte ratio in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis including 3338 patients. *World J Surg Oncol* 18, (2020).
196. Pacheco-Barcia, V. *et al.* A systemic inflammation response index (SIRI) correlates with survival and predicts oncological outcome for mFOLFIRINOX therapy in metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology* 20, 254–264 (2020).
197. Imaoka, H. *et al.* Prognostic impact of carcinoembryonic antigen (CEA) on patients with metastatic pancreatic cancer: A retrospective cohort study. *Pancreatology* 16, 859–864 (2016).
198. Meng, Q. *et al.* Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* 10, 4591 (2017).
199. Bhatti, I., Peacock, O., Lloyd, G., Larvin, M. & Hall, R. I. Preoperative hematologic markers as independent predictors of prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: Neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio. *Am J Surg* 200, 197–203 (2010).
200. An, X. *et al.* Elevated neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival in advanced pancreatic cancer. *Biomarkers* 15, 516–522 (2010).
201. Aoyama, T., Maezawa, Y., Hashimoto, I., Rino, Y. & Oshima, T. Clinical Impact of Nutrition and Inflammation Assessment Tools in Pancreatic Cancer Treatment. *Anticancer Res* 43, 3849–3860 (2023).
202. Kasymjanova, G. *et al.* The predictive value of pre-treatment inflammatory markers in advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol* 17, 52–58 (2010).
203. Gruber, E. S. *et al.* The Prognostic Index Independently Predicts Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoing Resection. *Ann Surg Oncol* 27, 2017–2024 (2020).

204. Bloomston, M. *et al.* MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297, 1901–1908 (2007).
205. Wang, J. *et al.* MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 807–813 (2009).
206. Zhang, Y. *et al.* Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 33, 698–709 (2009).
207. Hong, T. H. & Park, I. Y. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Ann Surg Treat Res* 87, 290–297 (2014).
208. Schultz, N. A. *et al.* MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol* 25, 1609–1622 (2012).
209. Qi, L. *et al.* Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer* 9, 163 (2009).
210. Ho, A. S. *et al.* Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 3, 109–113 (2010).
211. Huang, X., Le, Q. T. & Giaccia, A. J. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med* 16, 230–237 (2010).
212. Feng, H. *et al.* MicroRNA-148a Suppresses the Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cells by Down-regulating ErbB3. *Pancreas* 45, 1263–1271 (2016).
213. Yu, S. *et al.* miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70, 6015–6025 (2010).
214. Feng, J. *et al.* HERG1 functions as an oncogene in pancreatic cancer and is downregulated by miR-96. *Oncotarget* 5, 5832–5844 (2014).
215. Chang, X. Y., Yu, C. K., Li, J., Yu, S. & Chen, J. hsa-miR-96 and hsa-miR-217 Expression Down-Regulates with Increasing Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Int J Med Sci* 14, 412 (2017).
216. Habbe, N. *et al.* MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther* 8, 340–346 (2009).
217. Wald, P. *et al.* Prognostic value of microRNA expression levels in pancreatic adenocarcinoma: a review of the literature. *Oncotarget* 8, 73345–73361 (2017).
218. Hu, G. yuan, Tao, F., Wang, W. & Ji, K. wei. Prognostic value of microRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma: a meta-analysis. *World J Surg Oncol* 14, 82 (2016).

219. Negoi, I., Hostiuc, S., Sartelli, M., Negoi, R. I. & Beuran, M. MicroRNA-21 as a prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer - A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg* 214, 515–524 (2017).
220. Zhu, W. & Xu, B. MicroRNA-21 Identified as Predictor of Cancer Outcome: A Meta-Analysis. *PLoS One* 9, e103373 (2014).
221. Frampton, A. E. *et al.* microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 51, 1389–1404 (2015).
222. Karasek, P. *et al.* Pre-operative Plasma miR-21-5p Is a Sensitive Biomarker and Independent Prognostic Factor in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoing Surgical Resection. *Cancer Genomics Proteomics* 15, 321 (2018).
223. Schultz, N. A. *et al.* Prognostic microRNAs in cancer tissue from patients operated for pancreatic cancer--five microRNAs in a prognostic index. *World J Surg* 36, 2699–2707 (2012).
224. Calatayud, D. *et al.* Tissue MicroRNA profiles as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and periampullary cancers. *Biomark Res* 5, 1–18 (2017).
225. Kadera, B. E. *et al.* MicroRNA-21 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Tumor-Associated Fibroblasts Promotes Metastasis. *PLoS One* 8, e71978 (2013).
226. Boisen, M. K. *et al.* MicroRNA Expression in Formalin-fixed Paraffin-embedded Cancer Tissue: Identifying Reference MicroRNAs and Variability. *BMC Cancer* 15, 1–11 (2015).
227. Vojtechova, Z., Zavadil, J., Klozar, J., Grega, M. & Tachezy, R. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS One* 12, e0179645 (2017).
228. Le Large, T. Y. S. *et al.* Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 15, 1525–1529 (2015).
229. Carlsson, J. *et al.* Quantity and quality of nucleic acids extracted from archival formalin fixed paraffin embedded prostate biopsies. *BMC Med Res Methodol* 18, 161 (2018).
230. Szafranska, A. E. *et al.* Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn* 10, 415–423 (2008).
231. Kajita, M., McClinic, K. N. & Wade, P. A. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24, 7559–7566 (2004).

232. Vega, S. *et al.* Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 18, 1131–1143 (2004).
233. Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161 (2005).
234. Ota, I., Li, X. Y., Hu, Y. & Weiss, S. J. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20318–20323 (2009).
235. Peinado, H. *et al.* Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* 117, 2827–2839 (2004).
236. POU5F1 POU class 5 homeobox 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460>.
237. Roy, S. *et al.* SOX2 and OCT4 mediate radiation and drug resistance in pancreatic tumor organoids. *Cell Death Discovery* 2024 10:1 10, 1–8 (2024).
238. Lu, Y. *et al.* Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 340, 113–123 (2013).
239. Yang, S. *et al.* The CPT1A/Snail axis promotes pancreatic adenocarcinoma progression and metastasis by activating the glycolytic pathway. *iScience* 26, 107869 (2023).
240. Amantini, C. *et al.* Expression Profiling of Circulating Tumor Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients: Biomarkers Predicting Overall Survival. *Front Oncol* 9, 874 (2019).
241. Zhao, X. H. *et al.* Molecular detection of epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells from pancreatic cancer patients: Potential role in clinical practice. *World J Gastroenterol* 25, 138 (2019).
242. Poruk, K. E. *et al.* Circulating Tumor Cells Expressing Markers of Tumor-Initiating Cells Predict Poor Survival and Cancer Recurrence in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 23, 2681–2690 (2017).
243. Owen, S., Prantzos, E., Gunchick, V., Sahai, V. & Negrath, S. Synergistic Analysis of Circulating Tumor Cells Reveals Prognostic Signatures in Pilot Study of Treatment-Naïve Metastatic Pancreatic Cancer Patients. *Biomedicines* 10, (2022).

20. Přílohy

Příloha 1 Strukturovaný popis CT vyšetření pacientů s karcinomem pankreatu

Klinické informace	
Vyšetření ke srovnání	
Počet fází	
Množství a název i.v. kontrastní látky	
Reakce na i.v. aplikaci k.l.	
Perorální k.l.	

Nález:

Morfologie ložiska pankreatu	
Sycení v pankreatické fázi	Hypo/ Izo/ Hyperdenzní
Maximální velikost (mm)	
Lokalizace	Hlava/ uncinatus (vpravo od VMS)/ Krček (ventrálně od VMS)/ Tělo, ocas (vlevo od VMS)
Pankreatický vývod amputovaný, zúžený nebo periferně dilatovaný	Ano/ Ne
Hepatocholedochus amputovaný, zúžený nebo centrálně dilatovaný	Ano/ Ne

Hodnocení tepen	
Kontakt s AMS	Ano/ Ne
Kontakt solidní složky	<=180°/ >180°/ Nepřítomná
Kontakt infiltrátu v tuku	<=180°/ >180°/ Nepřítomný
Zúžení či nepravidelnost lumen	Ano/ Ne
Dosah k první větvi AMS	Ano/ Ne
Kontakt s tr. coeliacus	Ano/ Ne
Kontakt solidní složky	<=180°/ >180°/ Nepřítomná
Kontakt infiltrátu v tuku	<=180°/ >180°/ Nepřítomný
Zúžení či nepravidelnost lumen	Ano/ Ne
Kontakt s a. hepatica comm.	Ano/ Ne
Kontakt solidní složky	<=180°/ >180°/ Nepřítomná
Kontakt infiltrátu v tuku	<=180°/ >180°/ Nepřítomný
Zúžení či nepravidelnost lumen	Ano/ Ne
Dosah k tr. coeliacus	Ano/ Ne
Dosah k odstupu a. hepatica sin./ dx.	Ano/ Ne
Varianty tepen	Ano/ Ne

Anatomická varianta	Akcesorní a. hepatica dx./ variační odstup a. hepatica dx./ variační odstup a. hepatica comm./ jiné
Kontakt s variační tepnou	Ano/ Ne
Kontakt solidní složky	<=180°/ >180°/ Nepřítomná
Kontakt infiltrátu v tuku	<=180°/ >180°/ Nepřítomný
Zúžení či nepravidelnost lumen	Ano/ Ne

Hodnocení žil	
Kontakt s kmenem porty	Ano/ Ne/ Kompletní okluze
Kontakt solidní složky	<=180°/ >180°/ Nepřítomná
Kontakt infiltrátu v tuku	<=180°/ >180°/ Nepřítomný
Zúžení či nepravidelnost lumen	Ano/ Ne
Kontakt s VMS	
Kontakt solidní složky	<=180°/ >180°/ Nepřítomná
Kontakt infiltrátu v tuku	<=180°/ >180°/ Nepřítomný
Zúžení či nepravidelnost lumen	Ano/ Ne
Šíření k první jejunální větvi	Ano/ Ne
Jiné	
Trombus v žíle	Ano (VMS, kmen porty, VL)/ Ne
Venózní kolaterály	Ano (kolem hlavy, v portě hepatis, v mezenteriu, v levém horním kvadrantu)/ Ne

Extrapankreatické nálezy	
Jaterní léze	Ano (suspektní metastázy/ nejisté/ susp. benigní)/ Ne
Peritoneální a/ nebo omentální noduly	Ano/ Ne
Ascites	Ano/ Ne
Podezřelá uzliny	Ano (v portě hepatis, kolem tr. coeliacus, v hilu sleziny, paraaortální, aortokavální, jiné)/ Ne
Invaze tumoru do okolních orgánů	Ano (kam)/ Ne
Jiné mimopankreatické nálezy:	

Závěr	
Velikost tumoru:	
Lokalizace tumoru:	
Vaskulární kontakt	Ano (poškozená céva, rozsah)/ Ne
Metastázy:	Ano/ Ne
Jiné:	

Příloha 2 Kritéria resekability v době diagnózy (dle NCCN guidelines)

Stav resekability	Artérie	Vény
Resekabilní	Bez kontaktu nádoru s arteriemi (truncus coeliacus, arteria mesenterica superior, arteria hepatica communis)	Bez kontaktu nádoru s vena mesenterica superior, nebo $<180^\circ$ bez nepravidelnosti žilní kontury
Hraničně resekabilní	<u>Nádory hlavy pankreatu/processus uncinatus:</u> Kontakt solidního nádoru s arteria hepatica communis bez šíření na truncus coeliacus nebo bifurkaci arteria hepatica umožňující bezpečnou a kompletní resekci a odstranění nádoru a rekonstrukci Kontakt solidního nádoru s arteria mesenterica superior $\leq 180^\circ$ Kontakt solidního nádoru s variantní arteriální anatomíí (např. s akcesorní pravou jaterní tepnou, nahrazenou pravou jaterní tepnou, nahrazenou arteria hepatica communis, a počátkem nahrazené nebo akcesorní tepny). Přítomnost a stupeň kontaktu nádoru by měly být zaznamenány, pokud jsou přítomny, protože mohou ovlivnit plánování operace <u>Tělo/ocas pankreatu:</u> Kontakt solidního nádoru s truncus coeliacus $\leq 180^\circ$	Kontakt solidního tumoru se vena mesenterica superior nebo vena portae $>180^\circ$, kontakt $\leq 180^\circ$ s nepravidelností obrysu žíly nebo trombózou žíly, ale s vhodnou cévou proximálně a distálně od místa postižení, která umožňuje bezpečnou a úplnou resekci a rekonstrukci žíly. Solidní kontakt nádoru s vena cava inferior
Lokálně pokročilý	<u>Nádory hlavy pankreatu/processus uncinatus:</u> Kontakt solidního nádoru $>180^\circ$ s arteria mesenterica superior nebo truncus coeliacus <u>Tělo/ocas pankreatu:</u> Kontakt solidního nádoru $>180^\circ$ s arteria mesenterica superior nebo truncus coeliacus Kontakt solidního nádoru s truncus coeliacus a postižení aorty	Nerekonstruovatelná vena mesenterica superior a/nebo vena portae z důvodu nádorového postižení nebo okluze (může být způsobena nádorem nebo nijakým trombem)

Příloha 3 Klinické charakteristiky pacientů s analýzou genové exprese CTC a odpovídající inflammation-based parametry, včetně vstupního počtu detekovaných CTC

Pohlaví	Věk	mOS (m)	TNM	Iniciální léčba	CEA	NLR	LMR	PI	SIRI	MPS	CTC (počet)
F	62	13,7	adenoca G2, cT3-4N0M1	gemcitabin/nab-paclitaxel	1,9	3,97	2,87	NA	2,07	NA	100
F	74	21,65	PanIN I-II, cT3N1M1	gemcitabin/nab-paclitaxel	0,7	2,54	4,02	NA	1,55	NA	30
F	66	7,94	adenoca G2, cT4N1M1	gemcitabin/nab-paclitaxel	15	4,3	1,38	1	2,07	NA	200
M	43	8,19	adenoca G1, cT1N1M1	mFOLFIRINOX	2,2	2,4	2,93	1	1,47	1	30
F	67	7,45	adenoca, cT3-4N1M1	gemcitabin/nab-paclitaxel	483,8	6,94	2,4	2	4,44	NA	20
F	71	3,23	atypie nejasného významu, cT2N0M1	gemcitabin/nab-paclitaxel	0,8	3,75	1,05	1	6,45	NA	50
F	55	24,17	leiomyosarkom, cT3N1M1	doxorubicin	7,4	5,13	2,98	2	4,41	1	100
F	46	12,94	adenoca G2, cT3-4N1-2M1	mFOLFIRINOX	38,2	7,3	1	0	8,18	1	5
F	57	1,06	adenoca G3, cT2N0M1	mFOLFIRINOX	842	7,1	1,23	2	8,8	2	100
F	46	6,77	adenoca G2, cT3N0M1	mFOLFIRINOX	11,7	5,86	1,84	2	6,03	1	80
F	69	12,13	PanIN HG, cT4N1M1	gemcitabin	1,7	3,08	2,08	1	2,03	0	10
F	74	9,19	adenoca G3, cT3N1M1	gemcitabin/nab-paclitaxel	10,8	4,21	1,51	0	2,82	1	30
F	64	19,61	adenoca G2, cT4N1M1	mFOLFIRINOX	1,8	3,24	4,03	0	1,9	0	30
M	53	21,36	bez verifikace, cT3N1M1	mFOLFIRINOX	1,5	1,75	5,4	0	0,93	0	100
F	73	2,13	bez verifikace, cT3N1M1	gemcitabin	337,6	2,99	2,36	0	2,01	0	100
dobrá prognostická skupina											
špatná prognostická skupina											

Příloha 4 CTC izolované z periferní krve, fixované a barvené NucBlue a ActiGreen
(úsečka představuje 8 μ m)

