

**Univerzita Karlova**

**1.lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

MUDr. Štěpán Novák

**Vzájemná komunikace a vztah mezi nádorovými buňkami a nádorovým  
mikroprostředím**

*Mutual communication and relationship between tumor cells and the tumor  
microenvironment*

Školitel: RNDr. Pavol Szabo, Ph.D.

Praha, 2023

## **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, 13.7.2023

MUDr. Štěpán Novák  
Podpis

Identifikační záznam:

NOVÁK ŠTĚPÁN. Vzájemná komunikace a vztah mezi nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím. (Mutual communication and relationship between tumor cells and the tumor microenvironment). Praha, 2023. Počet stran 99. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole. Školitel Szabo Pavol.

## **Poděkování:**

Děkuji svému školiteli RNDr. Pavolu Szabovi, Ph.D. za pomoc při stanovení vědeckých cílů, zpracování a hodnocení vzorků a dále za odborné směřování a množství neocenitelných rad v průběhu studia.

Děkuji emeritnímu přednostovi Anatomického ústavu 1.LF UK prof. MUDr. Karlu Smetanovi ml., DrSc za skvělé pracovní zázemí a velkou podporu během celého postgraduálního studia.

Děkuji dalším kolegům z Anatomického ústavu 1.LF UK a BIOCEV 1.LF UK jmenovitě MUDr. Lukáši Lacinovi, Ph.D., RNDr. Mgr. Karolíně Strnadové, Ph.D. a RNDr. Barboře Dvořánkové, Ph.D. za odborné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Děkuji vědeckým pracovníkům z Ústavu molekulární genetiky AV ČR pod vedením Mgr. Michala Koláře, Ph.D. za nezbytnou pomoc při statistickém zpracování dat.

Děkuji RNDr. Peteru Gálovi, DrSc., MBA a kolektivu jeho spolupracovníků z Lékařské fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika za příkladnou interinstitucionální spolupráci.

Dále děkuji současnému přednostovi Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole prof. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D. a emeritnímu přednostovi prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc., FCMA za jejich velkou vstřícnost a možnost absolvovat postgraduální studium.

## ABSTRAKT:

Vzájemná komunikace a vztah mezi nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím (tumor microenvironment, TME) představuje esenciální roli v pochopení nádorové ekologie. Stanovení rozdílů mezi nádorovou a zdravou/nenádorovou tkání na molekulární a genetické úrovni je klíčové pro popsání biologie tumoru.

Předložená disertační práce se věnuje dvěma hlavními cílům.

Jako první byla zkoumána interakce mezi čtyřmi buněčnými liniemi pankreatického duktálního adenokarcinomu (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) a kondiciovaných médií z normálních/zdravých fibroblastů (healthy fibroblasts, HF) a nádorově-asociovaných fibroblastů (cancer associated fibroblasts, CAFs) odvozených z PDAC (PDAC-derived CAFs, PANFs). Dále byl určen a porovnán fenotyp buněk odvozených z ascitické tekutiny pacientů v terminálním stádiu PDAC s testovanými buněčnými liniemi PDAC a histologickými řezy primárního tumoru. Následně byl stanoven celogenomový profil PANF.

Druhým cílem bylo imunohistochemicky, pomocí detekce tenascinu (Ten), fibronectinu (Fn) a galectinu-1 (Gal-1), odlišit buňky spinocelulárního karcinomu (SCC), buňky z okraje chirurgického resektátu (MSR) a buňky normální sliznice (NM) u pacientů operovaných pro spinocelulární karcinom hlavy a krku (HNSCC) a tyto výsledky korelovat s jejich klinickými charakteristikami. Následně byl proveden celogenomový profil vzorků SCC, MSR a NM na základě stratifikace exprese Ten.

### Výsledky

#### Cíl 1

Kultivace čtyř linií PDAC pod vlivem kondiciovaných médií z HF a PANF měla heterogenní charakter. Po stimulaci bylo nejvíce agresivní chování získáno u buněčné linie Panc-1 zatímco linie PaTu-8902 byla médií spíše inhibována. Transkriptom PANF prokázal zvýšenou expresi některých genů (např. IL-6, IL-8, MFG8, periostin), které mohou přispívat k nádorové progresi a agresivitě.

#### Cíl 2

Byl prokázán statisticky významný rozdíl koexprese Ten, Fn, Gal-1 mezi vzorky SCC, NM i MSR ( $p < 0,01$  resp.  $p < 0,05$ ). Microarray analýza genové exprese zjistila zvýšenou expresi několika genů souvisejících s nádorovou progresí u Ten<sup>+</sup> (tenascin pozitivní) SCC a silnou aktivitou genů souvisejících s metabolismem lipidů v MSR Ten<sup>-</sup> (tenascin negativní) SCC. Rozdíl v genovém profilu NM na základě Ten stratifikace nebyl významný.

## Závěr

TME významně ovlivňuje chování buněk PDAC. Na základě jejich vysoké variability a jejich rozdílné interakce s TME, lze předpokládat obtíže při determinování universální léčebné strategie PDAC. Další výzkum může cílit na stanovení individualizovaného nádorově specifického léčebného protokolu, případně na odhalení spolehlivého prognostického markeru pro včasnou diagnostiku nádoru. Genová analýza prokázala významné a specifické změny na základě Ten stratifikace u SCC pacientů, nicméně bez vlivu na prognózu onemocnění.

## Klíčová slova

nádorové mikroprostředí, pankreatický duktální adenokarcinom, fibroblasty, nádorově-asociované fibroblasty, transkripční profil, tenascin, fibronectin, galektin-1, dlaždicový karcinom, chirurgický resektát, sliznice

## **SUMMARY:**

Intercommunication and the relationship between tumor cells and the tumor microenvironment (TME) is essential for understanding tumor ecology.

Determining the differences between tumor and healthy/non-tumor tissues at the molecular and genetic level is crucial for describing tumor biology.

The present dissertation addresses two main goals.

First, the interaction between four pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines and conditioned media from normal fibroblasts (HF) and PDAC-derived tumor-associated fibroblasts (PANF). Furthermore, the phenotype of cells derived from ascitic fluid of patients with terminal stage PDAC was determined and compared with PDAC cell lines and histological sections of the primary tumor. Subsequently, the whole-genome profile of PANF was determined.

The focus of the second goal was to distinguish cells from the squamous cell carcinoma (SCC), surgical resection margin (MSR), and normal mucosa (NM) of patients operated for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by immunohistochemistry, using detection of tenascin (Ten), fibronectin (Fn), and galectin-1 (Gal-1), and to correlate these results with their clinical characteristics. Subsequently, whole-genome profiling of SCC, MSR and NM samples was performed based on Ten expression stratification.

### **Results**

#### **The first goal**

Cultivation of the four PDAC lines under the influence of conditioned media from HF and PANF was heterogeneous.

After stimulation, the most aggressive behavior was obtained in the Panc-1 cell line while the PaTu-8902 line was rather inhibited by the media. The PANF transcriptome showed increased expression of some genes (e.g. IL-6, IL-8, MFG8, periostin) that may contribute to tumor progression and aggressiveness.

#### **The second goal**

There was a statistically significant difference in co-expression of Ten, Fn, Gal-1 between SCC, NM and MSR samples ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively).

Microarray analysis of gene expression revealed increased expression of several genes related to tumor progression in Ten<sup>+</sup> SCC and strong upregulation of genes related to lipid metabolism

in MSR Ten– SCC. The difference in NM gene profile based on Ten stratification was not significant.

### Conclusion

Based on the high variability of PDAC cells and their differential interaction with TME, the difficulty of determining the universal treatment strategy for PDAC can be anticipated, and further research may aim to establish the individualized tumor-specific treatment protocol or to discover the reliable prognostic marker for early cancer diagnosis.

Gene analysis showed significant and specific changes based on Ten stratification in SCC patients, however without affecting the prognosis of the disease.

### Keywords

tumor microenvironment, pancreatic ductal adenocarcinoma, healthy fibroblasts, cancer associated fibroblasts, cancer associated fibroblasts from pancreatic ductal adenocarcinoma, whole genome profile, tenascin, fibronectin, galectin-1, squamous cell carcinoma, surgical resection margin, normal mucosa, head and neck squamous cell carcinoma



## **Seznam zkratek**

5-FU: 5-fluorouracil  
ATM: Ataxia telangiectasia mutated  
BCAM: Basal-cell adhesion molecule  
BMP-4: Bone morphogenetic protein 4  
BRCA1/2: Breast cancer gene 1/2  
BSA: Bovine serum albumin  
CAF: Cancer associated fibroblasts  
CAPAN-2: linie PDAC  
CARs: Chimeric antigen receptors  
CCL: C-C motif ligand  
CCND1: Cyclin-D1  
CD: Cluster of differentiation  
CSC: Cancer stem cells  
CSF-1R: Colony stimulating factor 1 receptor  
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4  
CTRL: kontrolní/běžné médium  
CXCL: C-X-C motif chemokine ligand  
CXCR: C-X-C chemokine receptor  
DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium  
ECL: Enhanced chemiluminescence  
ECM: Extracellular matrix  
EGF: Epidermal growth factor  
EGFR: Epidermal growth factor receptor  
ELISA: Enzyme-linked immuno sorbent assay  
EMT: Epithelial–mesenchymal transition  
ERBB: Erb-B2 receptor tyrosine kinase  
ESC: Epidermal stem cells  
FAK: Focal adhesion kinase  
FAP: Fibroblast activation protein  
FasL: Fas ligand  
FBS: Fetal bovine serum  
FGF: Fibroblast growth factor

FGFR: Fibroblast growth factor receptor  
Fn: Fibronektin  
Fn-: Fibronektin negativní  
Fn+: Fibronektin pozitivní  
FOLFIRINOX (FOL – folinic acid, F-5-FU, IRIN – irinotecan, OX – oxaliplatin)  
FSP-1: Fibroblast specific protein-1  
Gal: Galektin  
Gal-1-: Galektin-1 negativní  
Gal-1+: Galektin-1 pozitivní  
GVAX: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected tumor cell vaccine  
HaCaT: linie nenádorových keratinocytů  
HF: Healthy fibroblasts  
HGF: Hepatocyte growth factor  
HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma  
HPV: Human papillomavirus  
HRAS: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog  
HRP: Horse radish peroxidase  
CHRT: chemoradioterapie  
CHT: chemoterapie  
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1  
ICOS: Inducible T-cell COStimulator  
IDO: Indoleamine 2,3dioxygenasa  
IFN- $\alpha$ : Interferon  $\alpha$   
IGF-1: Insulin-like growth factor 1  
IGF-2: Insulin-like growth factor 2  
IGFBP-7: Insulin-like growth factor-binding protein 7  
IHC: Immunohistochemistry  
IL: Interleukin  
IL6R/IL8R: IL6/IL8 receptor  
IMRT: Intensity modulated radiotherapy  
JAK2: Janus kináza 2  
K: Cytokeratin  
LC: Laryngeal cancer

LEP: Leptin  
LIF: Leukemia inhibitory factor  
McCoy: McCoy medium  
MELF: Melanoma derived CAFs  
MFGE8: Milk fat globule-EGF factor 8  
MHC: Major histocompatibility complex  
MIAPaCa-2: linie PDAC  
MIF: Macrophage migration inhibitory factor  
miRNA: microRNA  
MMPs: Matrix metalloproteinases  
MSDC: Myeloid derivated suppressor cells  
MSR: Surgical resection margin cells  
ND: Node dissection  
NF1: Neurofibromin 1  
NFDM: Non-fat dry milk  
NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-light-chain  
NK: Natural killer cells  
NM: Normal mucosa cells  
Oct-4: Octamer-binding transcription factor 4  
OPSCC: Oropharyngeal squamous cell carcinoma  
OSCC: Oral squamous cell carcinoma  
P10 a P11: buňky primárního PDAC  
Panc-1: linie PDAC  
PANFs: PDAC derived CAFs  
PaTu-8902: linie PDAC  
PBS: Phosphate-buffered saline  
PD-1: Programed cell death 1  
PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma  
PDGF: Platelet-derived growth factor  
PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor  
PDL-1: Programed cell death ligand 1  
PEGPH20: Pegylated recombinant human hyaluronidase PH20  
PSC: Pancreatic stellate cell  
PVDF: Polyvinylidene difluorid

R1 resekce: mikroskopické rezidum nádoru  
RIN: RNA integrity number  
RT: radioterapie  
S100A4: S100 calcium-binding protein A4  
SC: Stem cells  
SCC: Squamous cell carcinoma  
SDS: Sodium dodecyl sulfate  
SDS-PAGE gel: Sodium dodecylsulphatepolyacrylamide gel electrophoresis  
SHH: Sonic hedgehog  
STAT-3: Signal transducer and activator of transcription 3  
STING: Stimulator of interferon genes  
TAMs: Tumor-associated macrophages  
TANs: Tumor associated neutrophils  
TBS: Tris-buffered saline  
TCR: T-cell receptor  
Ten: Tenascin  
Ten-: Tenascin negativní  
Ten+: Tenascin pozitivní  
TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$   
TIL: Tumor-infiltrating lymphocytes  
TIMP: Tissue inhibitors of metalloproteinases  
TL: Total laryngectomy  
TLM: Trans-oral laser microsurgery  
TME: Tumor microenvironment  
TNFRSF: Tumor necrosis factor receptor superfamily  
TORS: Trans-oral robotic surgery  
TP53: Tumor protein 53  
Treg: Regulatory T cells  
VEGF: Vascular endothelial growth factor  
VEGFAR1/VEGFAR2: Vascular endothelial growth factor receptor  
VICAM-1: Vascular-cell adhesion molecule  
WNT16B: Wnt Family Member 16  
WSK: Wide-spectrum keratin  
YAP: Yes-associated protein

$\alpha$ SMA: Alpha smooth muscle actin

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 1. ÚVOD .....   | 16 |
| 1.1 Karcinom pankreatu .....  | 16 |
| 1.1.1 Incidence a mortalita .....   | 16 |
| 1.1.2 Etiologie .....   | 17 |
| 1.1.3 Histologie .....  | 17 |
| 1.1.4 Současná terapie .....  | 18 |
| 1.2 Karcinomy hlavy a krku .....  | 19 |
| 1.2.1 Incidence a mortalita .....   | 19 |
| 1.2.2 Etiologie .....   | 20 |
| 1.2.3 Současná terapie .....  | 21 |
| 1.3 Nádorové mikroprostředí .....   | 23 |
| 1.3.1 Kmenové buňky .....   | 24 |
| 1.3.2 Nádorově asociované fibroblasty .....   | 25 |
| 1.3.3 Růstové faktory, cytokininy a interleukiny .....  | 27 |
| 1.3.4 Extracelulární matrix a její remodelace u nádorů .....  | 30 |
| 1.3.5 Galektiny .....   | 31 |
| 1.3.6 Imunitní systém: bojovník proti nádoru, nebo jeho pomocník .....                                      | 32 |
| 1.4 Nádorová genetiká .....   | 36 |
| 2. CÍL PRÁCE .....  | 40 |
| 3. MATERIÁL A METODIKA .....  | 42 |
| 3.1 Cíl I .....   | 42 |
| 3.1.1 Buněčné linie .....   | 42 |
| 3.1.2 Lidské primární kultury buněk a odběr vzorků tkání .....  | 42 |
| 3.1.3 Nádorové buňky z punktátu ascitu .....  | 43 |
| 3.1.4 Nádorové linie kultivované v kondiciovaných médiích z PANF a HF .....                                 | 44 |
| 3.1.5 Efekt kondiciovaných médií na formování buněčných kolonií linií PDAC .....                            | 44 |
| 3.1.6 Western blot analýza buněčných linií PDAC pod vlivem kondiciovaných médií .....                       | 45 |
| 3.1.7 Imunofluorescenční analýza linií PDAC .....   | 46 |
| 3.1.8 Bright-field imunohistochemická analýza linií PDAC, buněk z ascitu a nádorové tkáně z pankreatu ..... | 47 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.9 ELISA detekce IL-6, IL-8 a MFGE8 linií PDAC a HF/PANF .....   | 48 |
| 3.1.10 Expresní celogenomové profilování transcriptomu HF, PANF a MELF .....                                      | 49 |
| 3.1.11 Statistická analýza .....  | 50 |
| 3.2 Cíl II.....   | 50 |
| 3.2.1 Odběr tkání .....   | 50 |
| 3.2.2 Zpracování tkání .....  | 51 |
| 3.2.3 Imunofluorescenční detekce tenascin (Ten), fibronektinu (Fn) a galektinu-1<br>(Gal-1) u SCC, NM a MSR ..... | 51 |
| 3.2.4 Microarray analýza .....  | 51 |
| 4. VÝSLEDKY.....  | 53 |
| 4.1 Cíl I .....   | 53 |
| 4.1.1 Efekt kondiciovaných médií na formování buněčných kolonií buněčných linií<br>PDAC. ....                     | 53 |
| 4.1.2 Western blot analýza PDAC buněčných linií pod vlivem kondiciovaných médií.....                              | 54 |
| 4.1.2 Imunofluorescenční analýza buněčných linií PDAC.....  | 55 |
| 4.1.3 Imunohistochemická analýza v bright-field mikroskopii buněčných linií PDAC a buněk<br>z ascitu.....         | 57 |
| 4.1.4 Imunohistopatologie PDAC vzorků.....  | 58 |
| 4.1.5 Imunohistochemická a Western blot analýza PANF.....   | 59 |
| 4.1.6 ELISA detekce IL-6, IL-8 a MFGE8 linií PDAC a HF/PANF .....   | 60 |
| 4.1.7 Expresní celogenomové profilování transcriptomu HF, PANF a MELF .....                                       | 62 |
| 4.2 Cíl II .....  | 64 |
| 4.2.1 Imunofluorescenční detekce Ten, Fn a Gal-1 u SCC, NM a MSR .....  | 64 |
| 4.2.2 Vztah mezi expresí Ten, Fn, Gal-1 a přítomností uzlinových metastáz .....                                   | 66 |
| 4.2.3 Vztah mezi expresí Ten, Fn a Gal-1 a přežitím pacienta .....  | 66 |
| 4.2.4 Microarray analýza Ten– a Ten+ vzorků SCC .....   | 67 |
| 5. DISKUZE .....  | 71 |
| 5.1 Cíl I .....   | 71 |
| 5.2 Cíl II .....  | 74 |
| 6. ZÁVĚR .....  | 76 |
| 7. LITERATURA .....   | 77 |
| 8. PŘÍLOHY .....  | 98 |
| 8.1 Publikace, které jsou podkladem disertace .....   | 98 |

8.2 Publikace bez vztahu k disertaci .....99

---

# 1. ÚVOD

Incidence nádorových onemocnění má v posledních desetiletích vzestupnou tendenci (Melaku et al. 2018). Vyrůstající počet nových onemocnění je na jedné straně způsoben špatným životním stylem a na druhé straně stárnutím populace a tím podmíněnou nestabilitou genomu u starších jedinců (Smetana et al. 2016). Na vzniku nádorů se podílejí genetické a regulační změny, na jejichž základě nastává funkční deregulace dělení a přirozeného zániku buněk. Nekontrolované dělení nádorových buněk vede k jejich enormní akumulaci a ztrátě nezávislosti na regulačních mechanismech okolí (Sulic et al. 2005).

## 1.1 Karcinom pankreatu

### 1.1.1 Incidence a mortalita

PDAC je jednou z nej malignějších forem nádorového bujení, představuje 1,8 % všech nádorových onemocnění a způsobuje 4,6 % všech úmrtí na rakovinu (Lippi and Mattiuzzi 2020). Incidence, prevalence a úmrtnost se za posledních 25 let zvýšily o 55 %, 63 % a 53 %. Nelze pozorovat žádné rozdíly mezi pohlavími. Očekává se, že do roku 2060 se počet úmrtí na rakovinu slinivky břišní zvýší přibližně dvakrát (Lippi and Mattiuzzi 2020).

Symptomy jsou relativně nespecifické, mohou být snadno chybně interpretovány a mohou tak vést k pozdní diagnóze. Pouze 20 % PDAC se zachytí v časném lokálním stádiu, které je možno brát jako potenciálně kurabilní (Lambin et al. 2022). V poslední době byla popsána nová metoda diagnostiky časných stádií PDAC na základě stanovení lipidomického profilu séra pacienta, která má potenciál zachytit pacientů v časném stádiu zvýšit (Wolrab et al. 2022). PDAC je charakterizován agresivní povahou a rychlou tvorbou metastáz. 5leté přežití se pohybuje pouze kolem 7 %. (Chen et al. 2017).



### 1.1.2 Etiologie

Faktory které zvyšují riziko PDAC jsou kouření (Ryan, Hong, and Bardeesy 2014), chronická pankreatitida, excesivní konzumpce alkoholu a vyšší věk (Yadav and Lowenfels 2013; Henley et al. 2020). PDAC vychází nejčastěji z premaligních lézí jako je PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia), která s postupnou progresí dysplastických změn dosáhne stádia invazivního karcinomu (Opitz et al. 2021). V PDAC vznikají paralelně se akumulující mutace v protoonkogenech a tumor supresorových genech. Mezi nejznámější patří tumor supresorový gen *TP53*, charakterizovaný jako strážce genomu, nebo gen *CDKN2A*, kódující protein p16, který reguluje G1-S přechod buněčného cyklu. Změna těchto 2 genů umožní buňce pokračovat v buněčném cyklu bez opravy DNA (Cicenas et al. 2017). Dále se často se jedná o geny přímo opravující DNA, jako jsou *BRC1/2* (breast cancer gene 1/2) a *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) (Vietri et al. 2022; Perkhofner et al. 2021). Mezi další mutované geny patří onkogen *KRAS* nebo gen *SMAD4* vyúsťující v aberantní TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) signalizaci (Robatel and Schenk 2022). Analýza genomu pacientů s PDAC ukázala vysokou individuální genovou heterogenitou (Biankin and Maitra 2015).

### 1.1.3 Histologie

PDAC vychází z buněk exokrinního pankreatu, konkrétně z buněk pankreatických vývodů. Tvoří přibližně 95 % všech karcinomů pankreatu, jedná se tak s přehledem o nejčastější histologický typ (Becker et al. 2014). Kromě epitelových nádorových buněk jsou v PDAC hojně zastoupeny CAF, které vznikají aktivací lokálních fibroblastů a pankreatických hvězdicových buněk (pancreatic stellate cell, PSC). Tento přechod je doprovázen úbytkem intracelulárních lipidových kapének a expresí aktivačního markeru  $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin) (Apte et al. 2004). Pro PDAC je dále charakteristická infiltrace lymfatickými buňkami. Hojně jsou zastoupeny zejména myeloidní supresorové buňky (myeloid derived suppressor cells, MSDC) a nádorově asociované makrofágy (tumor-associated macrophages, TAMs) přispívající k nádorové imunopresi (Dougan 2017). Naopak infiltrace PDAC T lymfocyty je relativně řídká nebo se T lymfocyty nacházejí na okraji nádoru mimo hnízda nádorových buněk. I to je důvodem, proč byly dosavadní strategie imunoterapie cílené na T buňky u PDAC nádorů do značné míry neúspěšné (Hosein et al. 2022).

Histopatologickým znakem PDAC je desmoplastická reakce na nádor, která je přítomna u primárního tumoru i metastáz (Whatcott et al. 2015). Desmoplastické stroma vzniká především interakcí CAF, okolních nádorových buněk a imunitních buněk (Apte et al. 1999). Pochopení desmoplázie jako výlučně protektivního faktoru PDAC je již překonané, současné výzkumy potvrzují komplexnější vnímání TME se snahou o holistický přístup k experimentální terapii (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

PDAC lze rozdělit na 2 molekulární subtypy klasický a basal-like. Klasický subtyp je charakteristický vyšší diferenciací, fibrózou a zánětlivou infiltrací. Basal-like subtyp je charakteristický ztrátou buněčné diferenciaci a je asociován s horším přežitím a špatnou odpovědí na existující režimy chemoterapie (Moffitt et al. 2015). PDAC vykazuje vysokou variabilitu a obtížnou možnost unifikované léčby a spíše podporuje myšlenku na adaptaci léčby pro jednotlivé buněčné subtypy (Robatel and Schenk 2022).

#### 1.1.4 Současná terapie

Navzdory pokroku onkologické léčby, zůstává chirurgie jedinou kurativní metodou PDAC. Nádor je možné resekovat pouze v časných stádiích a, bohužel, je chirurgická resekce vhodná pro méně než 20 % pacientů (Lindgaard et al. 2022). Recentní analýza navíc ukázala že až 75 % nádorů bylo resekováno s ponecháním mikroskopického rezidua nádoru (R1 resekce) (Esposito et al. 2008). Chirurgická léčba je navíc spojena s vysokou morbiditou, kdy je, v závislosti na postižení různých anatomických částí pankreatu, často nutné odstranit i okolní struktury jako žlučovod, část žaludku, slezin nebo část tenkého střeva (Hamad et al. 2022). V případě odstranění celého pankreatu je nutná celoživotní závislost na podávání inzulínu a pankreatických enzymů (Ludwig et al. 2022).

Standardní součástí pooperační léčby je adjuvantní chemoterapie 5-FU (fluorouracil), gemcitabine nebo nověji kombinace 4 chemoterapeutik nazvaná FOLFIRINOX (FOL – folinic acid, F–5–FU, IRIN – irinotecan, OX – oxaliplatin) (Conroy et al. 2018). Randomizovaná studie srovnávající přežití u pacientů s adjuvantní terapií FOLFIRINOX vs. Gemcitabine vyšla výrazně lépe pro FOLFIRINOX (Conroy et al. 2018). FOLFIRINOX je proto doporučen jako adjuvantní terapie u pacientů s dobrým zdravotním stavem. Pro pacienty v horším zdravotním stavu je metodou volby gemcitabine (Conroy et al. 2022). V poslední době se zvažuje i zavedení neoadjuvantní chemoterapie jako standardní součást léčby pro potencionálně resekabilní nádory. Pro definitivní doporučení není v současnosti dostatek randomizovaných

studií (Robatel and Schenk 2022) nicméně několik metaanalýz ukazuje na možný benefit neoadjuvantního podání FOLFIRINOXU v porovnání se standardní terapií (Petrelli et al. 2015; Versteijne et al. 2018).

Terapie pro inoperabilní lokálně pokročilý PDAC spočívá v podání chemoterapie, která má za cíl kontrolu onemocnění. Standardně se skládá z podání FOLFIRINOXu nebo nabpaclitaxelu s gemcitabinem (Tempero et al. 2021). Klinické studie ukazují na podobnou odpověď a efektivitu (Von Hoff et al. 2013). Přežití u takto pokročilých tumorů ovšem nedosahuje ani 1 rok (Loehrer et al. 2011).

Pro metastazující PDAC je standardní terapie FOLFIRINOX, který zásadně zvýšil dobu přežití v porovnání s gemcitabinem (Conroy et al. 2011). V nedávné době byla dokonce popsána kazuistika o kompletní remisi metastazujícího PDAC u 59leté pacientky s více než 5letým přežitím, což činí tuto terapii velice povzbuzující (Shelemey et al. 2021).

Nejnovějším trendem ve fázi klinických studií je použití mRNA vakcín, které vykazují velmi povzbudivé výsledky (Bird 2023).

## 1.2 Karcinomy hlavy a krku

### 1.2.1 Incidence a mortalita

HNSCC je celosvětově šestým nejčastějším nádorovým onemocněním, v roce 2018 se vyskytlo 890 000 nových případů a 450 000 úmrtí. Incidence HNSCC stále stoupá a předpokládá se, že se do roku 2030 zvýší o 30 % (Johnson et al. 2020). HNSCC tvoří velmi různorodou skupinu odlišných anatomických lokalit, jejichž incidence je často odlišná.

Velké evropské i americké epidemiologické studie popisují v posledních 40 letech vzestupný trend v incidenci karcinomů orofaryngu (oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC), a to zejména u mladších jedinců (Gudleviciene et al. 2014; Hammarstedt et al. 2006; Ellington et al. 2020). Naopak incidence karcinomu hrtanu (laryngeal cancer, LC) má sestupnou tendenci (Nasman et al. 2009). Incidence OPSCC a karcinomu dutiny ústní (oral squamous cell carcinoma, OSCC) byla v USA za rok 2016 17.3/100 000 (muži) a 6.2/100 000 (ženy) (Nocini et al. 2020). Nejvyšší hodnota incidence LC v roce 2017 byla v Evropě 5.45/100 000, přičemž jsou muži postiženi až 5krát častěji (Nocini et al. 2020).

V posledních třech desetiletích se přežití u HNSCC mírně zlepšilo; pětileté přežití se zvýšilo z 55 % v období 1992-1996 na 66 % v období 2002-2006. (Johnson et al. 2020).

## 1.2.2 Etiologie

Mezi hlavní etiologické faktory patří kouření, konzumace alkoholu a infekce HPV (human papillomavirus). Další minoritní rizikové faktory jsou azbest, polycyklické aromatické uhlovodíky nebo zvýšená konzumace uzeného masa. Jako protektivní faktor se uvádí vyvážená dieta s množstvím zeleniny a ovoce (Moro et al. 2018; Schneider et al. 2014). Těžcí kuřáci mají až 30krát vyšší riziko vzniku LC (Kuper, Boffetta, and Adami 2002). V případě simultánního kouření a abusu alkoholu se riziko maligního zvratu multiplikuje (Talamini et al. 2002).

Vzestup počtu nově diagnostikovaných případů OPSCC (a to i u nekuřáků) je přisuzován zvyšující se prevalenci vysoce rizikových typů HPV u mladších jedinců (Smith et al. 2004). Meta-analýza reportující 5681 pacientů prokázala prevalenci HPV pozitivních OPSCC u 22 % (Dayyani et al. 2010). Silná predilekce HPV je typická pro orofarynx v důsledku hojné přítomnosti lymfoidní tkáně (Stevens and Bishop 2017). HPV infikuje hluboké tonzilární krypty. Jde o imunologicky privilegovaná místa, která tolerují vstup antigenu bez vyvolání zánětlivé reakce. Tato vlastnost může vést k inhibici efektorové funkce HPV specifických T lymfocytů, což usnadňuje imunitní toleranci HPV (Best, Niparko, and Pai 2012). Ačkoliv zůstává kouření hlavním rizikovým faktorem pro vznik OPSCC, u HPV pozitivních OPSCC je tato souvislost méně významná. Analýzy uvádějí přibližně 30 % zastoupení nekuřáků u HPV pozitivních OPSCC, ve skupině HPV negativních OPSCC je to přibližně 5 % (Hong et al. 2013). HPV pozitivní OPSCC jsou častější u mladších pacientů a více postihují bílé muže s dobrým socioekonomickým statutem (Mellin et al. 2000; Chaturvedi et al. 2008; Smith et al. 2004). HPV pozitivní OPSCC jsou charakteristické menší velikostí nádoru s většími, často cystickými uzlinovými metastázami (Pytynia, Dahlstrom, and Sturgis 2014; Goldenberg et al. 2008). Navzdory pokročilému uzlinovému nálezu, který je tradičně spojen s horším přežitím, mají HPV pozitivní OPSCC výrazně lepší prognózu (Dayyani et al. 2010). Z těchto důvodů je u HPV pozitivních OPSCC zvažována deescalace léčby (Hay and Nixon 2018).

Pro klinickou praxi je přítomnost HPV detekována pomocí exprese proteinu p16 (Shinn et al. 2021). Je všeobecně známo, že signifikantní minorita p16 pozitivních OPSCC není ve skutečnosti také HPV pozitivní. Nicméně bylo zjištěno, že samotná p16 pozitivita bez ohledu na HPV statut je příznivým prognostickým faktorem (Lewis et al. 2010).

Klinické rozdíly mezi HPV pozitivními a negativními OPSCC vedly k jejich samostatnému odlišení v klinické i patologické TNM klasifikaci v poslední 8. edici UICC/AJCC (Union for

International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer) (Huang and O'Sullivan 2017).

Dříve se myslelo, že HPV infekce nebo p16 pozitivita nahraje u LC významnou roli. Dnes se prevalence HPV pozitivních LC odhaduje mezi 20-30 % (Gama et al. 2016). Klinická relevance HPV positivity u LC však zůstává nadále nejasná a k plnému pochopení je třeba dalších studií (Chernock et al. 2013; Young et al. 2015; Jacobs et al. 1992).

### 1.2.3 Současná terapie

Časná stádia OPSCC jsou léčena jednou terapeutickou modalitou: chirurgií nebo radioterapií (RT) (Hay and Nixon 2018). U pokročilých stádií volíme mezi chirurgií s adjuvantní RT nebo konkomitantní chemoradioterapií (CHRT) (Hay and Nixon 2018). Pro metastazující OPSCC je základem chemoterapeutická léčba (CHT) založená na platinových derivátech s eventuálním doplněním 5-FU (Jacobs et al. 1992). Alternativou je nahrazení chemoterapeutik monoklonální protilátkou cetuximab cílenou na extracelulární doménu EGFR (epidermal growth factor receptor) (Hay and Nixon 2018).

V poslední době je patrných ústup od rozsáhlých, silně mutilujících chirurgických výkonů. Prosazuje se minimálně invazivní chirurgie nejčastěji ve formě TORS (trans-oral robotic surgery) nebo TLM (trans-oral laser microsurgery) (Sievert et al. 2021). TORS vykazuje na základě randomizovaných studií výborné přežití spolu s dobrými funkční výsledky (Hutcheson et al. 2015; de Almeida et al. 2015).

Moderní, běžně používanou formou RT je IMRT (intensity modulated radiotherapy). Tato metoda umožňuje zvýšení přesnosti ozáření a redukci dávky RT na okolní struktury, jako slinné žlázy a hltan, což vede k minimalizaci xerostomie a dysfagie (Nutting et al. 2011; Petkar et al. 2016). Na základě Evropské studie analyzující přežití a toxicitu IMRT bylo prokázáno přežití nad 77 % u HPV negativních a více než 90 % u HPV pozitivních OPSCC s přijatelnou úrovní toxicity (Bird et al. 2017).

U pokročilých onkologicky léčených OPSCC je standardem konkomitantní CHRT která zásadně zlepšuje přežití v porovnání se samotnou RT (Pignon et al. 2000).

Pokud je pro léčbu pokročilých OPSCC zvolena primárně chirurgická modalita následuje adjuvantní RT. V případě většího množství rizikových faktorů nebo pozitivních pooperačních okrajů je zvažována i adjuvantní CHRT (Hay and Nixon 2018).

U OPSCC je i v časných stádiích doporučeno ošetření lokálních lymfatických uzlin o to buď ve formě blokované krční disekce (ND) při primárně chirurgickém řešení nebo zahrnutí lymfatických uzlin do ozařovaného pole při primární onkologické léčbě (Van Abel and Moore 2012).

Pro rekurentní nebo metastatické tumory OPSCC i LC které progredují na léčbě platinovými deriváty je v současné době možná cílená imunoterapie, nejčastěji blokací PD-1 (programed cell death 1) receptoru pomocí lidské IgG4 protilátky. Tato terapie má v této indikaci vyšší procento odpovědi na léčbu a delší přežití pacientů v porovnání s chemoterapií (Huang et al. 2022).

U LC je v časných stádiích (T1 až T2) možné zvolit mezi TLM a RT (Hartl and Brasnu 2015). Obě metody mají výborné výsledky přežití a minimální morbiditu. V současné době volí většina světových pracovišť u karcinomu hlasivek nepostihující přední komisuru jako první volbu TLM z důvodu dobré lokoregionální kontroly a ponecháním RT jako záložní možnost při recidivě nádoru (Hartl and Brasnu 2015). U karcinomů hlasivek postihující přední komisuru a supraglotických karcinomů je často jako první modalita volena RT, ačkoliv u supraglotických karcinomů rozsahu T2 léčených TLM byla v rozsáhlé studii prokázána 100 % lokoregionální kontrola (Sperry et al. 2013). Data ukazují, že pacienti podstupující TLM pro karcinom hlasivek mají podobné hlasové postižení jako pacienti léčení RT (Wedman et al. 2002).

Do 90. let 20. století byly všechny pokročilé nádory hrtanu léčeny totální laryngektomií (TL). Vše změnila takzvaná Veteránská studie, která analyzovala rozdíl přežití mezi CHRT a TL u pokročilých LC. Bylo zjištěno, že při indukční CH a následné RT je přežití stejné jako u TL, ale s velkou šancí na zachování hrtanu (Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study et al. 1991). Schéma léčby bylo na základě studie z roku 2003 modifikováno na konkomitantní CHRT, které je nadřazené dříve používané indukční CH následované RT (Forastiere et al. 2003).

Pro metastazující LC je stejně jako u OPSCC základem chemoterapeutická léčba založená na platinových derivátech spolu s 5-FU nebo taxany (Steuer et al. 2017).

Použití cetuximabu které je u OPSCC ekvivalentní cisplatině nemá u LC pravděpodobně takový efekt. Lze jej zvážit například u metastazujících LC (Steuer et al. 2017).

V roce 2006 bylo ovšem zjištěno, že za posledních 20 let, tedy od doby přijetí primární onkologické léčby pokročilého LC, přežití pacientů kleslo (Hoffman et al. 2006). Od té doby několik studií prokázalo lepší přežití u pacientů s LC rozsahu T4 léčených primárně TL (Grover et al. 2015). Vzhledem k poměrně velké mutilaci pacienta po TL, a to i přes značný

pokrok v praktickém využití náhradních hlasových mechanismů, je modalita léčby individualizována na základě rozhodnutí konkrétního pacienta.

U klinicky negativního uzlinového nálezu je ND doporučena pro supraglotické karcinomy T2 a více a pro glotické karcinomy T3 a více (Steuer et al. 2017).

Po TL následuje v případě přítomnosti rizikových faktorů (perineurální invaze, angioinvaze, blízké okraje, mnohočetné uzlinové metastázy) adjuvantní RT. Pokud je LC operován neradikálně nebo je přítomna extrakapsulární propagace uzlinové metastázy je terapie doplněna adjuvantní CHRT (Steuer et al. 2017).

I přes značný pokrok v diagnostice a léčbě jsou dvě třetiny HNSCC diagnostikovány v pozdních stádiích onemocnění a uvádí se, že přibližně 50 % pacientů s HNSCC zemře do dvou let od stanovení diagnózy (Duray et al. 2010). O OPSCC lze říct, že vzhledem ke stoupající incidenci HPV pozitivních nádorů a jejich lepšímu přežití celková křivka přežití stoupá (Pulte and Brenner 2010), naopak LC je jednou z mála onkologických chorob u kterých 5leté přežití v posledních 40 letech pokleslo (z 66 % na 63 %) (Siegel, Miller, and Jemal 2016).

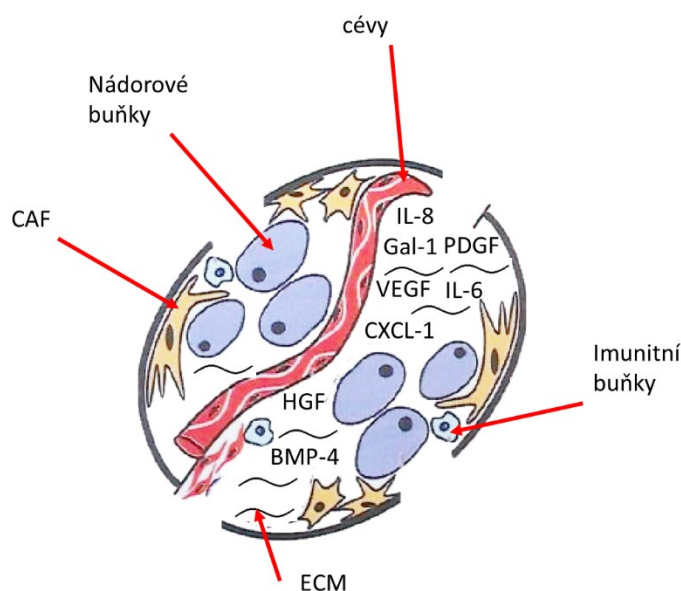
Navzdory neustálému zlepšování chirurgických i onkologických metod, jsou současné možnosti léčby stále zatíženy nežádoucími účinky, a to buď mutilací po rozsáhlejších chirurgických výkonech nebo časnou a pozdní toxicitou CHRT (Steuer et al. 2017).

### 1.3 Nádorové mikroprostředí

Je evidentní, že interakce maligně transformované buněčné populace a okolní tkáně (stroma), je podstatným faktorem v patogenezi nádorových onemocnění (Peltanova, Raudenska, and Masarik 2019). Kooperace tumor-stroma sehrává významnou roli při formování reaktivního prostředí, kde dochází k vzájemnému ovlivnění jak nádorového parenchymu, tak i TME (Fidler 2003). Dřívější předpoklad, že TME má pouze podpůrnou funkci je již překonán a v současné nádorové biologii je mu připisována významná role umožňující přímé ovlivnění funkce nádorového parenchymu (Li, Fan, and Houghton 2007; Lorusso and Ruegg 2008; Plzak et al. 2010). Prognostický význam vyššího objemu stromatu (desmoplastické stroma) byl potvrzen u řady typů nádorů včetně PDAC, karcinomů prsu, tlustého střeva, plic a jícnu (Mesker et al. 2007; de Kruijf et al. 2011; Wang et al. 2013; Wang et al. 2012). U PDAC je desmoplastické stroma přítomno jak u primárního tumoru, tak u metastáz (Whatcott et al. 2015). Desmoplasie podmiňuje mechanickou bariéru kolem nádorových buněk, je limitujícím faktorem, který

omezuje úspěch aplikované chemoterapie a znesnadňuje imunitní protinádorou odpověď (Provenzano et al. 2012).

TME tvoří populace CAF, jiných mezenchymových buněk, imunitních buněk, kmenových buněk, vláken extracelulární matrix (ECM), cév a signálních molekul. (Metwaly et al. 2012; Polyak, Haviv, and Campbell 2009; Hamburger and Salmon 1977) (Obr. 1).



Obr. 1

Nádor a jeho mikroprostředí. Nádor představuje složitý buněčný ekosystém, na jehož funkci se vedle nádorových buněk podílejí i buňky nenádorové. Vyznačeny jsou i hlavní faktory, které se na mezibuněčné komunikaci podílejí.

### 1.3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (stem cells, SC) u dospělého organismu jsou málo diferencované, převážně monopotentní nebo multipotentní buňky nacházející se ve většině lidských tkání. Jejich základní funkcí je obnova poškozené nebo opotřebované tkáně, udržují tak homeostázu organismu (Zakrzewski et al. 2019). Za jistých okolností je ovšem možná jejich přeměna v maligní kmenové buňky (cancer stem cells, CSC). Existence CSC byla nejdříve popsána u hematologických malignit, jejich přítomnost byla později prokázána i u solidních tumorů (Hamburger and Salmon 1977). Například epidermové kmenové buňky (epidermal stem cells ESC) představují jeden ze zdrojů SCC (Perez-Losada and Balmain 2003). Pro zachování málo diferencovaného fenotypu SC včetně CSC je velmi důležité okolní mikroprostředí nazvané niche (Walker, Patel, and Stappenbeck 2009). Toto mikroprostředí s jeho specifickými



cytokiny může být (například u chronického zánětu) spouštěčem maligního reprogramování CSC (Song and Balmain 2015). Vzhledem k pomalému proliferačnímu cyklu CSC a jejich schopnosti vyloučit z cytoplazmy xenobiotika, je velmi obtížné tyto buňky účinně terapeuticky ovlivnit [24]. Tato vlastnost může být vysvětlením selhání nádorové chemoterapie nebo minimálního reziduálního onemocnění (Motlik et al. 2007).

### 1.3.2 Nádorově asociované fibroblasty

Jednu z nejpočetnějších buněčných populací nádorového stromatu představují CAF. Morfologicky se jedná o vřetenité buňky, které jsou charakteristické expresí vimentinu,  $\alpha$ -SMA a FAP (fibroblast activation protein). Další z proteinů asociovanými s CAF jsou FSP-1 (fibroblast specific protein-1), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), podoplanin-a, S100A4 (S100 calcium-binding protein A4) a IGFBP-7 (insulin-like growth factor-binding protein 7) (Kim, Jung, and Koo 2015; Cirri and Chiarugi 2011; Rupp et al. 2015). Známostou funkcí CAF je produkce proteinů extracelulární matrix. Jsou také důležitým zdrojem růstových faktorů, cytokinů a chemokinů. Podporují tak tumorigenezi, angiinvazi, nádorovou imunosupresi a zakládání metastáz (Chen and Song 2019). CAF můžeme na základě biologických vlastností zjednodušeně rozdělit do 3 subpopulací: zánětlivé CAF s vyšší produkcí interleukinů (např. IL-6), myofibroblastické CAF obsahující kontraktilní elementy a antigen prezentující CAF exprimující molekuly MHC II třídy se schopností prezentace antigenů CD4<sup>+</sup> T buňkám (Hu et al. 2022). Interakce s T lymfocyty naznačuje vliv CAF na protinádorovou imunitu (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Rozdíl mezi HF a CAF lze prokázat na podkladě významné změny expresního profilu (u CAF z bazocelulárního karcinomu se jedná o 640 genů) (Micke et al. 2007). Fenotyp CAF se nápadně podobá aktivovaným fibroblastům v hojící se ráně (tedy myofibroblastům), které exprimují  $\alpha$ -SMA (Chatzistamou et al. 2011) a jsou zodpovědné za kontrakci hojící se rány. Tato podoba byla popsána již před 35 lety (Dvorak 1986). Zásadní rozdíl spočívá v časově neomezené aktivaci CAF v nádorovém mikroprostředí (Szabo et al. 2013). Původ CAF nebude u všech nádorů identický. Existuje nejspíš hned několik zdrojů, ze kterých mohou nádorově asociované fibroblasty vzniknout: 1) aktivací lokálních fibroblastů; 2) epitelově-mezenchymovým přechodem (epithelial–mesenchymal transition, EMT) vlastních nádorových buněk; 3) diferenciací z migrujících mezenchymových SC pocházejících z kostní dřene atrahovaných do místa nádoru (Mishra et al. 2009). Připustit lze pravděpodobně i kombinaci

mechanizmů vzniku v závislosti na buněčném typu a signálech okolí (Li, Fan, and Houghton 2007). Data z experimentů na myších modelech s transplantovanými lidskými nádorovými buňkami naznačují, že CAF vznikají především aktivací lokálního mezenchymu hostitele (Dvorankova et al. 2015). Proces aktivace CAF z HF je způsoben jak parakrinně pomocí IL-1 (interleukin 1), TGF- $\beta$ , EGF (epidermal growth factor), PDGF, FGF-2 (fibroblast growth factor 2) nebo CXCL-12 (C-X-C motif chemokine ligand 12) (Rasanen and Vaheri 2010; Biffi et al. 2019) tak i přímým kontaktem buněk pomocí adhezivních molekul jako ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) nebo VICAM-1 (vascular-cell adhesion molecule 1) (Clayton et al. 1998). Nejnovější způsob aktivace CAF je popsán pomocí specifických microRNA (miRNA) (např. u ovariálního karcinomu (Mitra et al. 2012).

CAF mají klíčovou roli v utváření a udržování reaktivního nádorového mikroprostředí, nezbytného pro přežití a progresi nádorových buněk včetně kmenových nádorových buněk (Marsh, Pietras, and McAllister 2013). Je prokázána schopnost CAF transformovat fibroblasty na buňky podobné SC např. u PDAC (Gore and Korc 2014), které pak ovlivňují růst nádoru. CAF z bazocelulárního karcinomu jsou schopné indukovat expresi markerů embryonálních SC jako Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4) a Nanog u myších HF a tyto HF jsou dále schopné transformace v rozsahu podobném CSC (Szabo et al. 2011).

CAF mají výrazný efekt na proliferaci, EMT a migraci nádorových buněk u různých typů nádorů (Orimo et al. 2005; Fujita et al. 2009; Martin et al. 2010). Také vytváření a růst sekundárních nádorových ložisek je podpořeno aktivitou CAF (Kwa, Herum, and Brakebusch 2019). Tumor podporující funkce jsou amplifikovány především v pozdní fázi nádorové proliferace, v počáteční fázi jsou u některých typů nádorů popsány subpopulace CAF s tumor restriktivní funkcí (Wang et al. 2021). U karcinomu prsu byla přítomnost CAF asociovaná s produkcí CXCL-12 a IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Tyto faktory jsou u nádoru prsu specifické pro kostní metastázy, lze zvažovat, zda lze analýzou CAF predikovat typ metastatického postižení (Zhang et al. 2013).

CAF jsou při kokultivaci se zdravými keratinocyty schopné vyvolat u epitelových buněk expresi mezenchymového znaku vimentinu, jehož společná koexprese s keratinem je jedním ze znaků EMT (Thiery et al. 2009). Interakce CAF s nádorovou buňkou se jeví jako nespecifická. Bez ohledu na svůj původ, jsou CAF získané z různých typů nádorů schopné u zdravých keratinocytů a buněk karcinomu prsu indukovat expresi cytokeratinů (K) 8, 14 a 19 jejichž společná koexprese je znakem nízce diferencovaných keratinocytů a je špatným prognostickým znakem například u pacientů s HNSCC (Lacina et al. 2007; Dvorankova et al. 2012).

Aktivita CAF je možným faktorem selhání protinádorové léčby cílené pouze na vlastní nádorové buňky (Sun 2015; Slany et al. 2015). Samotné CAF jsou v porovnání s karcinomovými buňkami geneticky stabilnější, méně heterogenní skupina s menší šancí na vznik nádorové chemorezistence (Correia and Bissell 2012; Kerbel 1997). CAF jsou však schopné vyvolat mechanismy, kterými nádorové buňky uniknou terapii. Například růstový faktor HGF (hepatocyte growth factor) produkovaný CAF způsobuje rezistenci vůči kinázovým inhibitorům (např. vemurafenib u maligního melanomu) (Wilson et al. 2012; Straussman et al. 2012).

Předpokládá se, že eliminace nebo modifikace CAF může být jednou z cest protinádorové terapie. Zacílení na CAF bylo nejprve hodnoceno pomocí inhibitorů FAP. Při použití monoklonální protilátky proti FAP byla experimentálně prokázána kompletní regrese růstů nádoru plic, PDAC a HNSCC (Ostermann et al. 2008). První klinická studie s inhibicí FAP použila humanizovanou monoklonální protilátku sibrotuzumab k potlačení CAF u pacientů s kolorektálním karcinomem. Tato studie nesplnila svůj konečný cíl a sibrotuzumab se tak dále nezkoumá (Hofheinz et al. 2003). Klinické studie s inhibitory FAP u PDAC měly také velmi omezenou účinnost (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Na druhé straně se jako nadějný jeví adoptivní převod T lymfocytů upravených pomocí chimérických antigenních receptorů (CARs, chimeric antigen receptors) cílených na FAP (Bughda et al. 2021). Jiná práce ukázala, že zmenšení počtu FAP pozitivních CAF mělo za následek imunitní kontrolu růstu nádoru a účinnou odpověď na checkpoint inhibitory (Feig et al. 2013). V současné době probíhá klinické testování zkoumající účinnost kombinace protilátky anti-PD-1 (pembrolizumab) a inhibitoru FAP (talabostat) (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Nejdůležitější molekuly produkované CAF jsou shrnuty v tbl. 1.

### 1.3.3 Růstové faktory, cytokiny a interleukiny

Tyto molekuly působí parakrinně jako lokální mediátory v místě svého vzniku. Účastní se řady buněčných dějů, jako je proliferace, diferenciací nebo přežívání buněk. Typicky se váží na receptory s tyrosinkinázovou aktivitou (Stone, Leavitt, and Varacallo 2022). Jejich deregulace může vést k imortalizaci a nekontrolované proliferaci buněk (Witsch, Sela, and Yarden 2010). Jedním z důležitých producentů růstových faktorů jsou CAF, které produkují klasické proonkogenní molekuly jako EGF a HGF, proangiogenní faktory jako VEGF (vascular endothelial growth factor) a PDGF (Ferrara 2010) nebo proteiny BMP-4 (bone morphogenetic

protein 4) a IGF-2 (insulin-like growth factor 2), které se mohou podílet na dediferenciaci buněk (Strnad et al. 2010a). Mimo ně produkují CAF specifické molekuly jako je YAP (yes-associated protein), který podporuje tvorbu metastáz (Calvo et al. 2013) nebo protein WNT16B (wnt family member 16), který umožňuje nádorovým buňkám uniknout apoptóze a jeho blokáce prokazatelně zvyšuje účinnost chemoterapie (Sun et al. 2012).

V současné době patří protilátky proti růstovým faktorům mezi léčebné modalit u pokročilých stádií tumorů. Jako první byla v roce 2004 schválena protilátka anti-VEGF (bevacizumab). Nyní patří ke schválené léčbě následujících metastatických nádorů: karcinom prsu, nemalobuněčný karcinom plic, glioblastom, renální karcinom, karcinom vaječníků a karcinom děložního čípku (Garcia et al. 2020). V případě EGF jsou terapeutika cílena na jeho receptor (EGFR). Cetuximab a Erlotinib jsou inhibitory EGFR, jejich použití je v USA schváleno Food and Drug Administration (FDA) v následujících indikacích: kolorektální karcinom, karcinom hlavy a krku, nemalobuněčný karcinom plic a PDAC (Carter and Tadi 2022; Chidharla, Parsi, and Kasi 2022).

Na mezibuněčné interakci se také podílí FAK (focal adhesion kinase). FAK je nереceptorová tyrosinkináza, která zajišťuje signalizaci v místech adheze integrinu. Reguluje buněčnou adhezi, migraci a přežití. Podílí na procesech hojení ran a patologicky na orgánové fibróze (Parsons 2003). Overexprese FAK byla prokázána v TME PDAC (Murphy et al. 2022). Inhibice FAK potlačuje růst, šíření a přežití nádorových buněk a podporuje nádorovou imunotoleranci (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Cytokiny mají pleiotropní účinky na organismus, to znamená že jeden může působit na více funkcí u různých buněčných typů. Naproti tomu více druhů cytokinů má podobný efekt na jednu buňku. Navzájem jsou schopné působit synergicky nebo antagonisticky, takže plní funkci inhibitorů nebo stimulátorů pro buněčné děje. Z výše uvedených faktů vyplývá, že síť vzájemných interakcí cytokinů je velice složitým a propojeným komplexem (Rakesh and Agrawal 2005). Jejich zvýšená produkce může vést ke vzniku autoimunitních onemocnění, ale také přispět k rozvoji nádorového bujení. Mezi nejdůležitější cytokiny účastníci se nádorové progresi a rezistence k protinádorové terapii patří chemokiny a interleukiny, které se podílí na intenzitě imunitní odpovědi (Briukhovetska et al. 2021).

Chemokiny atrahují imunitní buňky do oblasti nádorů. Byl prokázán význam CXCL-2 při rezistenci ovariálního karcinomu na chemoterapii (paclitaxel a docetaxel) (Moisan et al. 2014). Při použití blokačních protilátek proti tomuto chemokinu je efektivita protinádorové terapie zvýšena (Moisan et al. 2014). Přerušování signální cesty CXCR-4 (C-X-C chemokine receptor-4)/CXCL-12 zvýšilo senzitivitu chemoterapie (docetaxel) u nádorů prostaty (Domanska et al.

2012), tlustého střeva (Heckmann et al. 2013) a plic (Burger et al. 2011). Chemokiny CXCL-12, CXCL-14 a CCL-5 (C-C motif ligand-5) jsou spojeny se zvýšeným rizikem metastáz. (Luker et al. 2012; Augsten et al. 2014). U PDAC probíhá několik klinických studií zkoumající inhibitory CXCR4 podané konkomitantně se standardní chemoterapií nebo imunoterapií s povzbuzivým výsledky (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Strategie cílená na CXCR2 byla zkoumána za účelem inhibice infiltrace TME nádorově asociovanými neutrofily (tumor associated neutrophils, TANs). Inhibice CXCR2 zabránila akumulaci TANs v PDAC. V jejich nepřítomnosti aktivované a funkční T buňky infiltrovaly PDAC (které jinak postrádají efektorové T buňky) a pomohly tak vytvořit imunosupresivní mikroprostředí (Chao, Furth, and Vonderheide 2016). Preklinicky bylo prokázáno, že inhibice CXCR2 společně s anti-PD-1 terapií vedla ke zlepšení přežití u PDAC (Steele et al. 2016). Klinické studie zatím nevykazují přesvědčivé výsledky (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Původně se předpokládalo, že výhradní producenti IL jsou lymfocyty, ale mohou je produkovat i další buněčné typy včetně CAF. Hladina IL-1 $\beta$  je zvýšena u pacientů s nádory žaludku a jater (Glas et al. 2004; Sakurai et al. 2008b). Pronádorový účinek IL-6 byl prokázán u nádorů prsu, ovaria, prostaty a plic (Bromberg and Wang 2009). IL-6 působí také proangiogenně (Nagasaki et al. 2014) a jeho overexprese je spojena s rezistencí k inhibitoru EGFR (erlotinibu) (Gao et al. 2007; Yao et al. 2010) stejně jako inhibitoru estrogenových receptorů (tamoxifenu) u karcinomu prsu (Sun et al. 2014). Je popsána korelace mezi zvýšenou hladinou IL-6, IL-8 a progresí tumoru (Dhawan and Richmond 2002; Yurkovetsky et al. 2007). Společná exprese molekul IL-6, IL-8 a CXCL-1 je typická pro TME HNSCC a synergické působení těchto molekul je zodpovědné za změnu fenotypu zdravých keratinocytů na stav nízké diferenciaci podobný nádorovým epitelovým buňkám (v in vitro podmínkách) (Kolar et al. 2012b). Protilátkami proti IL-6, IL-8 a CXCL-1 je možné výše popsanou transformaci zastavit (Kolar et al. 2012b).

Efekt blokace různých cytokinů byl potvrzen v mnoha preklinických studiích. Můžeme uvést blokaci receptorů IL-6 a IL-8 (tocilizumab a reparixin), která u zvířecího modelu významně snížila schopnost tvorby vzdálených metastáz u karcinomu prsu (Jayatilaka et al. 2017). Blokace MIF (macrophage migration inhibitory factor) snížila schopnost angiogeneze a lymfangiogeneze na modelu myšího osteosarkomu (Kubota et al. 2009). Podobně blokací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain) aktivovaného cytokiny a jeho STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3) signální dráhy lze zabránit růstu tumoru prostaty (Civenni et al. 2016).

TGF- $\beta$  je cytokin, který reguluje mnoho buněčných funkcí včetně buněčné proliferace, diferenciace, adheze a migrace. U nádorů má ambivalentní účinky. Zpočátku potlačuje proliferaci epiteliálních buněk, později podporuje růst buněk TME (Miyazono, Ehata, and Koinuma 2012). TGF- $\beta$  indukuje pomocné T-lymfocyty (Treg) a přímo potlačuje několik efektorových T buněk funkcí (Principe et al. 2014). Vzhledem k pleiotropní povaze TGF- $\beta$ , je obtížné předvídat klinický výsledek a cílení TGF- $\beta$  může záviset na tom, s jakou modalitou je inhibice TGF- $\beta$  kombinována. K plnému pochopení nádorové funkce TGF- $\beta$  je třeba dalších studií (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Zvláště molekuly IL-6, IL-8, CXCL-1 a TGF- $\beta$  se zdají být vhodnými kandidáty k dalším experimentům za účelem možné klinické aplikace (Bierie et al. 2008; Kolar et al. 2012a; Strnad et al. 2010b). Potencionální terapeutické cíle protinádorové léčby jsou shrnuty v tbl.2.

#### 1.3.4 Extracelulární matrix a její remodelace u nádorů

ECM představuje nebuněčnou část mikroprostředí. Skládá se velkého počtu stavebních jednotek jako složitý komplex vzájemně interagujících proteinů a sacharidových molekul. ECM lze rozdělit na 3 základní komponenty: proteiny, glykosaminoglykany a glykoproteiny (Theocharis et al. 2016). ECM vytvořená CAF hraje důležitou roli při utváření reaktivního nádorového mikroprostředí (Li, Fan, and Houghton 2007). Aktivitou CAF dochází k neustálé remodelaci ECM, a to jak novotvorbou, tak degradací proteázami (Bonnans, Chou, and Werb 2014). Degradace ECM patří mezi esenciální kroky při invazi tumoru a tvorbě metastáz. Na degradaci ECM se významně podílí matrixové metaloproteinázy (matrix metalloproteinases, MMP), jejichž aktivita je závislá na tkáňových inhibitech MMP (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) (Jablonska-Trypuc, Matejczyk, and Rosochacki 2016). Byla prokázána rozdílná exprese MMP a TIMP mezi zdravou pankreatickou tkání a PDAC, s vyšší expresí určitých MMP asociovaných s metastazujícím PDAC (Bramhall et al. 1997). Zvýšená exprese MMP2 (collagenasa typ IV), detekovaná ve stromální komponentě PDAC, in vitro zvyšovala invazivitu a korelovala se stupněm desmoplasie (Okada et al. 2004). MMP7 (zinek-dependentní endopeptidasa) je zvýšeně exprimována v PaIN a PDAC, u myšího modelu přispívá k růstu tumoru a metastázování (Yamamoto et al. 2001; Fukuda et al. 2011). Jedním z induktorů MMP (především MMP2 a MMP9) je i protein EMMPRIN. Je zvýšeně exprimován v PDAC a je produkován jak stromálními tak nádorovými buňkami (Tang et al. 2004). Role multi-MMP inhibitorů při léčbě nádorů byla prokázána preklinickými studiemi,

například u myšších modelů B16 melanomu nebo karcinomu žaludku a střev (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Navzdory zjevné důležitosti MMP a TIMP a nadějným preklinickým studiím, nevykázaly TIMP (jako marimastat a tanomastad) signifikantní klinickou aktivitu u pacientů s pokročilým PDAC (Ho, Jaffee, and Zheng 2020), což naznačuje, že nespecifické cílení na MMP u PDAC není klinicky efektivní.

Mezi zástupce glykosaminoglykanů v ECM podílejícím se na nádorové transformaci patří kyselina hyaluronová. Ta je hlavní komponentou stromální ECM a jeho vysoké množství je asociováno s horší prognózou u PDAC (Whatcott et al. 2015). Na myším modelu PDAC byla provedena studie zkoumající efekt lidské pegylované rekombinantní PH20 hyaluronidasy (pegylated recombinant human hyaluronidase PH20, PEGPH20) spolu se standardními chemoterapeutiky používanými v léčbě PDAC. Použití PEGPH20 vedlo ke zlepšení vaskulární permeability a zvýšené koncentraci chemoterapeutika v nádoru (Jacobetz et al. 2013). Následné klinické studie bohužel efekt PEGPH20 nepotvrdily (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Glykoprotein tenascin-c/w je přítomen v ECM nádorů nebo v hojící se ráně. Stimulační účinek tenascin-u-c/w na růst nádorových buněk byl prokázán u mnoha typů nádorů (Berndt et al. 2015). Fibronectin, další z proteinů ECM, se podílí na proliferaci fibroblastů, stimuluje chemotaxi imunokompetentních buněk a podporuje vaskularizaci nádoru (Mhawech et al. 2005; Ritzenthaler, Han, and Roman 2008; Van Obberghen-Schilling et al. 2011). V HNSCC je přítomnost fibronektinu asociována s přítomností uzlinových metastáz, a tudíž s celkově horší prognózou pro pacienta (Mhawech et al. 2005). K molekulám ECM podporující růst nádoru patří dále např. lamin (Franz et al. 2006), periostin (Tilman et al. 2007) nebo heparan sulfát (Gomes, Stelling, and Pavao 2013).

Selhání potencionálních protinádorových léčiv cílených na ECM může naznačovat, že tato složka desmoplastické bariéry nezodpovídá za neúčinnost chemoterapeutik, nebo je nutné jejich účinky lépe a cíleně specifikovat.

### 1.3.4 Galektiny

Většina proteinů prochází posttranslační modifikací například glykosilací. Endogenní lektiny jsou proteiny, které jsou schopny rozlišit specifický sacharidový motiv. Specifická sekvence sacharidů tak může být médiem pro uložení biologické informace (Solis et al. 2015). Gal z rodiny endogenních lektinů se významně podílí na komunikaci mezi nádorem a TME. Nemají charakter enzymů či protilátek, ale jsou schopny specificky rozpoznat  $\beta$ -galaktosidy. Gal se

uplatňují v široké škále biologických dějů, kde se podílejí na regulaci proliferace, diferenciace, apoptóze a mezibuněčné interakce. Je prokázán jejich významný vliv na nádorovou proliferaci (Sun et al. 2019). Mezi nejlépe prozkoumané patří především gal-1, -3, -7 (Plzak et al. 2001; Lohr et al. 2007). Přítomnost gal-1 ve stromatu nádorů hlavy a krku je doprovázena zvýšeným výskytem CAF (sami jsou rovněž producenty gal-1) a zároveň je špatným prognostickým faktorem pro vývoj onemocnění (Wu et al. 2011). Gal-1 je, nezávisle na funkci TGF- $\beta$ , schopný transformovat fibroblasty na myofibroblasty a při in vitro kultivaci stimulovat ECM bohatou na fibronectin, tenascin a gal-1 (Dvorankova et al. 2011; Valach et al. 2012). Jeho přítomnost je spojena se zvýšenou nádorovou invazivitou, metastázováním buněk a zesílenou produkcí růstových faktorů (např. VEGF) (Smetana et al. 2013; Wiest et al. 2012; Amano et al. 2012; Timoshenko et al. 2010). Gal-1 umožňuje nádorovým buňkám uniknout protinádorové imunitě modifikací cytotoxických T lymfocytů a Treg (Cedeno-Laurent and Dimitroff 2012; Toscano et al. 2007). Je také zodpovědný za apoptózu aktivovaných T lymfocytů (Perillo et al. 1995; He and Baum 2004). Důležitou roli v nádorové progresi hraje i gal-3 (Dvorankova et al. 2011), který podporuje produkci mnoha prozánětlivých chemokinů jako CCL-2, -5, -8 a -20 nebo CXCL-8 (Papaspyridonos et al. 2008) a také modifikuje imunologickou odpověď T lymfocytů a NK buněk na přítomnost nádorové tkáně (Ruvolo 2016).

### 1.3.5 Imunitní systém: bojovník proti nádoru, nebo jeho pomocník

Buňky imunitního systému představují významnou komponentu nádorového stromatu. U zdravého organismu slouží imunitní buňky k eliminaci buněk s aberantním genomem a zabraňují tak vzniku maligního tumoru (Kareva 2011; Amend and Pienta 2015).

Během maligní transformace získávají nádorové buňky řadu funkcí, kterými mohou uniknout imunitnímu systému. Je prokázáno, že nádory HNSC a PDAC jsou schopny modifikovat imunologickou odpověď (Duray et al. 2010; Robotel and Schenk 2022).

Dispozice uniknout buněčné imunitě je u nádorových buněk podmíněna sníženou expresí hlavního histokompatibilního komplexu MHC-I (major histocompatibility complex) (Young 2006; Ogino et al. 2006). Buňky PDAC down-regulují expresi MHC-I a znemožňují tak jejich rozeznání efektorovými T lymfocyty (Ryschich et al. 2005). Další schopností nádorových buněk je indukce apoptózy T-lymfocytů např. pomocí exprese Fas ligandu (FasL) (Whiteside 2005).



Hlavním hráčem protinádorové imunitní odpovědi jsou T- lymfocyty, které spouštějí adaptivní imunitní reakci a jsou zodpovědně za cytotoxickou destrukci nádorových buněk pokud nesou nádorově specifické antigeny (Whiteside 2005). V případě významné přítomnosti Treg v TME je popsána defektní protinádorová imunitní odpověď, nádorová progresse a horší prognóza pacienta (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Cytokiny TGF- $\beta$  a IL-10 umožňují diferenciaci naivních T lymfocytů v Treg, které podporují supresi cytotoxických T-lymfocytů (Ferris, Whiteside, and Ferrone 2006).

Jedním z dobře prostudovaných příkladů terapeutického ovlivnění Treg je použití cyklofosfamidu. Bylo prokázáno, že nízké dávky cyklofosfamidu selektivně eliminují Treg buňky (Le and Jaffee 2012). Terapeutické strategie úspěšně využily cyklofosfamid v kombinaci s GVAX (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected tumor cell vaccine) k posílení imunitních odpovědí při léčbě PDAC (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Zásadní postavení v protinádorové imunitní odezvě zastávají inhibitory kontrolních bodů imunitní reakce (checkpoint inhibitory). Nejdůležitější jsou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) a PD-1 (Buchbinder and Desai 2016).

Zvýšená exprese ligandu PD-L1 který se váže na PD-1 receptor CD 8<sup>+</sup> T lymfocytů, je prokázána u nádorových buněk a CAF (Strome et al. 2003). Vlastností PD-L1 je anergie a apoptóza CD 8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Cho et al. 2011). PD-L1 exprimován u přibližně 13 % pacientů s PDAC a přispívá tak k imunitnímu úniku maligních buněk (Basso et al. 2013).

CTLA-4 je od PD-L1 odlišný v několika charakteristikách, jejich společnou vlastností je schopnost redukovat proliferaci a přežití T-lymfocytů a CTLA-4 je tak v konečném důsledku zodpovědný za supresi protinádorové imunitní odpovědi (Hoos et al. 2010; Buchbinder and Desai 2016).

Inhibitor PD-1 (nivolumab) je společně s inhibitorem CTLA-4 (ipilimumab) součástí terapie u metastazujících tumorů různé etiologie refrakterních k běžné onkologické léčbě (Buchbinder and Desai 2016). Navzdory tomu že je léčba inhibitory PD-L1 a CTLA-4 běžnou součástí klinické praxe, nejsou u PDAC její výsledky zcela uspokojivé (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Příčinou může být imunologicky relativně chladné TME v porovnání s nádory melanomu nebo plic (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Jiný způsob úniku protinádorové imunitní odpovědi je popsán u PDAC, který může indukovat produkci indoleamine 2,3dioxygenasy (IDO). IDO katalyzuje degradaci tryptofanu, který je potřebný pro přežití a aktivaci T lymfocytů. Jeho degradace způsobí jejich anergii a

apoptozu (Uyttenhove et al. 2003). Navíc bylo zjištěno, žeIDO podporuje akumulaci Treg v TME (Witkiewicz et al. 2008).

Nádorové buňky využívají glutamin jako palivo pro anaerobní metabolismus, který je jejich dominantním zdrojem energie. Přežití T lymfocytů závisí na podobných metabolických drahách nutných pro jejich aktivaci a proliferaci. Vzájemnou kompeticí o společný energetický zdroj tak nádorové buňky brání T lymfocytům vytvářet správné protinádorové imunitní reakce. Bylo prokázáno, že při blokaci glutaminové energetické dráhy jsou T lymfocyty schopny adaptace přechodem na aerobní metabolismus, čímž se zvyšuje protinádorová imunita (Leone et al. 2019).

Dendritické buňky jsou neúčinnější antigen prezentující buňky. Podílejí se na vyžrávání a aktivaci cytotoxických T-lymfocytů a tvoří tak spojovací článek mezi vrozenou a adaptivní imunitní odpovědí. V případě působení TGF- $\beta$  a IL-10 podporují diferenciaci supresorových T-lymfocytů a tím zvyšují nádorovou imunotoleranci (Hawiger et al. 2001; Charalambous et al. 2006).

Na zlepšení prezentace a následné expanzi nádorově specifických klonů T buněk, jako způsob jak vyvolat nové nebo posílit již existující imunitní reakce v důsledku neadekvátní odezvy imunitního rozpoznání u PDAC, může být použita vakcinační terapie (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Studie také prokázaly, že použití smrtelně ozářených alogenních vakcín založených na buňkách navržených tak, aby exprimovaly GM-CSF (granulocyte–macrophage colony – stimulating factor), úspěšně rekrutuje agregáty imunitních buněk do TME (Hopkins et al. 2018). V poslední době prokázaly svoji účinnost ve fázi klinických studií mRNA vakcíny, které vykazují velmi povzbudivé výsledky (Bird 2023).

Makrofágy přítomné v nádorovém stromatu vznikají z monocytů. Po kontaktu s nádorovými buňkami se diferencují v TAM. Můžeme je rozdělit na 2 typy: M1 (prozánětlivé a protinádorové) a M2 (supresorové). M1 přispívají k protinádorové imunitní odpovědi produkcí zánětlivých cytokinů jako IL-12, IL-23 a interferonu- $\gamma$  (Mantovani et al. 1992; Sica et al. 2006). Naopak M2 podporují zvětšování parenchymu tumorů produkcí růstových faktorů a cytokinů jako jsou VEGF, HGF, MMP2 nebo IL-8 (Li, Fan, and Houghton 2007). M2 se také podílí na nádorové imunotoleranci a to jak produkcí cytokinů jako TGF- $\alpha$ , IL-10, IL-13 (Li et al. 2002; El-Rouby 2010), tak expresí ne-klasických MHC molekul I třídy (např. HLA-G) nebo expresí PD-L1 nebo CTLA-4 (Liou et al. 2017). U SCC je zastoupení M2 spojeno s vyšším stagingem nádorů, metastatickým postižením uzlin s častější extrakapsulární propagací (Marcus et al. 2004; Liu et al. 2008). TAM dále produkují MIF, který do TME atrahuje neutrofilní

granulocyty, což je sekundárně spojeno s angiogenezí a vyšší invazivitou nádoru (Dumitru et al. 2011; Galdiero et al. 2013).

Přítomnost TAM v TME je možné antagonizovat blokací CSF-1R (colony stimulating factor 1 receptor). CSF-1R je členem tyrosin-kinázové rodiny receptorů růstových faktorů, které jsou exprimovány u TAM a jiných imunitních buněk (Cannarile et al. 2017). Bylo prokázáno, že inhibice CSF-1R podstatně vyčerpává TAM a zvyšuje poměr CD8<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup> T buněk. Klinicky se účinnost blokace CSF-1R projevila u pacientů s obrovskobuněčným tumorem (Ries et al. 2014). Blokace CSF-1R působí na nádorové imunitní prostředí komplexně a vede například ke zlepšení odpovědi anti- PD-1 a anti-CTLA-4 terapie (Zhu et al. 2014).

Důležitou roli v iniciaci a propagaci buněčné a humorální adaptivní imunity hraje receptor CD40 (cluster of differentiation), patřící do TNFRSF (tumor necrosis factor receptor superfamily) (Elgueta et al. 2009). Aktivace CD40 protilátkou indukovala u TAM expresi vyššího množství CD86 a molekul MHC II třídy, což vedlo k tumoricidní aktivitě proti buňkám PDAC a podstatné degradaci TME (Beatty et al. 2011). Klinické studie s použitím protilátky CD40 spolu s gemcitabinem a/nebo nivolumabem vykazují slibné výsledky (Vonderheide 2020).

Protinádorový efekt byl popsán i u molekul STING (stimulator of interferon genes) a ICOS (inducible T-cell costimulator). Jejich stimulace pomocí protilátek je ve fázi klinických studií (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

Přítomnost TAN v TME obecně souvisí se špatnou prognózou (Shen et al. 2014). Pomocí vyřazení CXCR2 klíčového receptoru pro IL-8 je snížena nádorová chemotaxe leukocytů včetně TAN, což vedlo k potlačení růstu nádorů (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Z výsledků je zjevné, že TAN spolu s Treg a TAM zásadně modulují TME a jsou tak možným cílem snah o kontrolu nádorového bujení.

MSDC jsou heterogenní populace buněk, která svou aktivitou negativně ovlivňuje imunitní odpověď organismu během zánětů, nádorových nebo autoimunitních onemocnění (Mantovani 2010). MDSC jsou součástí TME u PDAC (Thyagarajan et al. 2019). U MDSC se uplatňuje především jejich imunosupresivní efekt na T lymfocyty například prostřednictvím TGFβ nebo IL-10 (Gabrilovich 2017).

U PDAC byl popsán specifický typ CAF, který exprimuje molekuly MHC třídy II se schopností antigenní prezentace CD4<sup>+</sup> T buňkám a může tak modulovat nádorovou imunitní odpověď (Elyada et al. 2019).

I ECM složka TME se může podílet na snížené nádorové imunitní odpovědi. Potvrdila to studie o zvýšení účinku protinádorové vakcíny cílené na PDAC, ve které přidání PEGPH20 významně zvýšilo infiltraci T buněk v TME a tím zvýšilo účinek vakcíny (Blair et al. 2019).

### 1.3.5 Nádorová genetika

Cancer Genome Atlas Research Program (TCGA) provedl genovou analýzu u 279 HNSCC. Výsledky ukázaly na potencionální terapeutické cíle zahrnující tyrosinkinázové receptory: *EGFR*, *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1), *ERBB2* (erb-B2 receptor tyrosine kinase 2), onkogeny: *CCND1* (cyclin-D1), *HRAS* (harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), tumor supresorové geny: *TP53*, *NF1* (neurofibromin 1), phosphoinositide 3-kinase pathway (Steuer et al. 2017).

*SHH* (sonic hedgehog) je důležitou signalizační drahou v průběhu pankreatické embryogeneze, její represe vede k pankreatické diferenciaci. Inhibitor *SHH* (cyclopamine) podporuje heteretopickou pankreatickou expanzi do okolní tkáně (Hebrok et al. 2000). Není tak překvapivé, že dysregulovaná SHH dráha může vést k pankreatické karcinogenezi (Zhuang et al. 2022). Overexprese *SHH* je spojena se zvýšenou desmoplasií a myofibroblastovou invazí nádorového mikroprostředí (Kong et al. 2012). Preklinické studie na myších modelech PDAC zabránily inhibicí SHH nádorové progresi a prodloužily jejich přežití (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Inhibice *SHH* byla také spojena s lepší vaskulární denzitou tumoru a následným vyšším antitumorozním efektem gemcitabinu (Meng et al. 2013). Na druhou stranu experimenty na myších modelech s knockoutem *SHH* genu vedly k očekávanému snížení desmoplastického stromatu a hustoty myofibroblastů, překvapivě však s horším přežitím subjektů (Rhim et al. 2014). Antagonistické výsledky mohou být částečně v souladu s rozdíly v trvání inhibice *SHH*. Krátkodobá blokáce aktivity *SHH* pomáhá prolomit bariéru a usnadňuje průnik chemoterapeutik k nádoru, ale chronická inhibice *SHH* nakonec nádoru prospívá. Zavedení inhibitorů *SHH* do klinické praxe bylo ovšem prozatím do značné míry zklamáním (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Mutace genů *Kras* nebo *TP53* souvisí na jedné straně se zvýšením množství Treg a MDSC, na straně druhé se snížením hladiny neaktivovaných efektorových T buněk v TME (Domvri et al. 2021). Analogicky k nálezům na myších modelech, přináší zvýšená prevalence Treg buněk pacientům s PDAC špatnou prognózu (Hiraoka et al. 2006).

**Tbl. 1**

Biologicky aktivní látky produkované CAF podílející se na vytváření nádorového mikroprostředí

| Typ molekuly              | Název        | Typ nádoru   | Biologický význam   |
|---------------------------|--------------|--|---|
| <b>Membránový protein</b> | FAP -1       | Nemalobuněčný nádor plic (Kilvaer et al. 2018)                                 | Růst a progresse tumoru (Du et al. 2017)  |
| <b>Receptor</b>           | PDGF-R       | Karcinom prsu (Jansson et al. 2018)  | Růst a progresse tumoru (Gialeli et al. 2014)   |
| <b>Růstový faktor</b>     | TGF- $\beta$ | SCC hlavy a krku (Curry et al. 2014)   | Aktivace CAF (Rasanen and Vaheri 2010), tvorba metastáz (Sica et al. 2006), imunosuprese (Curry et al. 2014), diferenciaci naivních T lymfocytů v supresorové T lymfocyty (Ferris, Whiteside, and Ferrone 2006) |
|                           | EGF          | Kolorektální karcinom (Tommelein et al. 2015)                                  | Proliferace, rezistence k apoptóze, angiogeneze, invazivita (Tommelein et al. 2015), aktivace CAF (Rasanen and Vaheri 2010)   |
|                           | HGF          | HNSCC (Curry et al. 2014) kolorektální karcinom (Tommelein et al. 2015)        | Proliferace, rezistence k apoptóze, angiogeneze, invazivita (Tommelein et al. 2015), rezistence ke kinázovým inhibitorům (Martin et al. 2010)   |
|                           | VEGF         | Karcinom prsu (Du et al. 2017)   | Angiogeneze (Gudleviciene et al. 2014), proliferace a rezistence k apoptóze (Tommelein et al. 2015)   |
|                           | PDGF         | SCC hlavy a krku (Curry et al. 2014), kolorektální karcinom (Sica et al. 2006) | Angiogeneze (Gudleviciene et al. 2014) , aktivace CAF (Rasanen and Vaheri 2010), proliferace, rezistence k apoptóze, invazivita (Sica et al. 2006)  |
|                           | BMP-4        | Nemalobuněčný nádor plic (Wu et al. 2017)                                      | Dediferenciace keratinocytů (Hamburger and Salmon 1977)   |
|                           | IGF-1/2      | Karcinomu prsu (Franz et al. 2006) kolorektální karcinom (Sica et al. 2006)    | Dediferenciace keratinocytů (Hamburger and Salmon 1977), proliferace a rezistence k apoptóze (Tommelein et al. 2015), kostní metastázy (Zhang et al. 2013)  |
|                           | YAP          | Karcinom děložního čípku (Buglioni et al. 2016)                                | Metastázy (Hammarstedt et al. 2006)   |
|                           | WNT16B       | Karcinom prostaty (Sun et al. 2012)  | Rezistence k apoptóze (Hawiger et al. 2001) a chemoterapii (Hawiger et al. 2001)  |
|                           | FGF-2        | Kolorektální karcinom (Sica et al. 2006)                                       | Aktivace CAF (Rasanen and Vaheri 2010), proliferace, rezistence k apoptóze, invazivita (Sica et al. 2006)   |
| <b>Chemokin</b>           | CXCL-1       | SCC hlavy a krku (Lee et al. 2017)   | Dediferenciace keratinocytů (Lee et al. 2017)   |
|                           | CXCL-2       | Kolorektální karcinom (Sica et al. 2006)                                       | Rezistence k chemoterapii (Honjo et al. 2000), nádorová imunosuprese (Sica et al. 2006)   |
|                           | CXCL-12      | SCC hlavy a krku (Curry et al. 2014) karcinomu prsu (Franz et al. 2006)        | Rezistence k chemoterapii (Hoos et al. 2010), tvorba metastáz (Cho et al. 2011), aktivace CAF (Rasanen and Vaheri 2010), angiogeneze (Nasman et al. 2009), proliferace tumoru (Sica et al. 2006)                |
|                           | CXCL-14      | Karcinom prostaty (Augsten et al. 2009)  | Tvorba metastáz (Cho et al. 2011), proliferace tumoru (Nasman et al. 2009)  |
|                           | IL-8         | SCC hlavy a krku (127)   | Dediferenciace keratinocytů (Lee et al. 2017), tvorba metastáz (Li et al. 2002)   |
|                           | CCL5         | Karcinom prostaty (Yeh et al. 2016)  | Tvorba metastáz (Cho et al. 2011)   |

|                    |        |  |   |
|--------------------|--------|--|---|
|                    | MIF    | Osteosarkom (Li, Fan, and Houghton 2007)   | Angiogeneze a lymfangiogeneze (Li, Fan, and Houghton 2007)  |
| <b>Interleukin</b> | IL-6   | SCC hlavy a krku (Lee et al. 2017), karcinom prsu, ovaria, prostaty a plic (Kilvaer et al. 2018) | Angiogeneze (Kim, Hong, et al. 2017), rezistence k chemoterapii (Kim, Jung, and Koo 2015), progresu tumoru (Kubota et al. 2009), dediferenciace keratinocytů (Lee et al. 2017), tvorba metastáz (Li et al. 2002)  |
|                    | IL- 22 | Karcinom žaludku (Fukui et al. 2014)   | Invazivita (Fukui et al. 2014)  |
| <b>Galektin</b>    | Gal-1  | SCC hlavy a krku (Ostermann et al. 2008)   | Aktivace CAF (Ostermann et al. 2008), špatný prognostický faktor (Ostermann et al. 2008) , nádorová invazivita, tvorba metastáz, zvýšená produkce růstových faktorů (Polyak, Haviv, and Campbell 2009), nádorová imunosuprese (Rasanen and Vaheri 2010) |
|                    | Gal-3  | Karcinom jazyka (Honjo et al. 2000)  | Nádorová imunosuprese (Sakurai et al. 2008a)  |

**Tbl. 2**

Potencionální terapeutické cíle protinádorové léčby

| <b>Kategorie</b>            | <b>Cílová struktura</b>  | <b>Stádium využití</b> |
|-----------------------------|--|------------------------|
| <b>CAF</b>                  | Anti-FAP protilátka (Ostermann et al. 2008; Bughda et al. 2021)      | Klinické studie        |
| <b>Proteázový inhibitor</b> | MMP inhibitor (Appleby et al. 2017; Winer, Adams, and Mignatti 2018) |                        |
| <b>Receptor</b>             | PDGF-R (Sun et al. 2022)   | Registrovaný lék       |
|                             | TGF-β-R (Huang et al. 2021)  | Klinické studie        |
|                             | Anti-EGFR protilátka (Cai et al. 2020)                               | Registrovaný lék       |
|                             | Anti-IL-6R protilátka (Chen et al. 2022)                             | Klinické studie        |
|                             | Anti-IL-8R (Schott et al. 2017)                                      | Klinické studie        |
| <b>Růstový faktor</b>       | Anti-VEGF protilátka (Tewari et al. 2017)                            | Registrovaný lék       |
|                             | Anti-HGF protilátka (Kim et al. 2020)                                | Klinické studie        |

|                           |   |                    |
|---------------------------|---|--------------------|
| <b>Chemokin</b>           | Anti-CXCL-2 protilátka (Moisan et al. 2014; Pan et al. 2021)  | Preklinické studie |
|                           | Anti-CXCR-4/CXCL-12 protilátka (Zhou et al. 2019; Domanska et al. 2012)                                     |                    |
|                           | Anti-IL-6 protilátka (Kolar et al. 2012b), (Jayatilaka et al. 2017)   | Klinické studie    |
|                           | Anti-IL-8 protilátka (Kolar et al. 2012b), (Jayatilaka et al. 2017; Gonzalez-Aparicio and Alfaro 2020)      |                    |
|                           | Anti-CXCL-1 protilátka (Kolar et al. 2012b)   |                    |
|                           | Anti-MIF protilátka (Kubota et al. 2009; Noe and Mitchell 2020)   |                    |
| <b>Kinázový inhibitor</b> | BRAF kinázový inhibitor (Bollag et al. 2012; Proietti et al. 2020)  | Registrovaný lék   |
|                           | NF- $\kappa$ B (STAT3 signalizační dráha) (Civenni et al. 2016; Rasmi, Sakthivel, and Guruvayoorappan 2020) | Klinické studie    |
| <b>Imunitní buňky</b>     | Inhibitor PD-1 (Gettinger et al. 2018; Ai et al. 2020)  | Registrovaný lék   |
|                           | Inhibitor CTLA-4 (Wolchok, Rollin, and Larkin 2017)   | Registrovaný lék   |
|                           | CAR T-buněčná terapie (Liu et al. 2017)   | Registrovaná léčba |
|                           | TCR (T-cell receptor) therapy (Shafer, Kelly, and Hoyos 2022)   | Registrovaná léčba |
|                           | TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)  | Klinické studie    |
|                           | IFN $\alpha$ (Asmana Ningrum 2014)  | Registrovaný lék   |

## 2. CÍL PRÁCE

### Cíl 1

Prvním cílem disertační práce bylo popsat chování a vzájemnou interakci mezi HF, PANF a komerčními liniemi buněk PDAC. Stanovení genetického profilu HF a PANF a vzájemné srovnání fenotypu nádorových buněk buněčných linií PDAC s nádorovými buňkami z ascitické tekutiny u pacientů v terminálním stádiu PDAC.

Tento cíl můžeme rozdělit do 4 bodů.

Bod A: Porovnání rychlosti růstu buněk čtyř komerčních PDAC linií kultivovaných v běžném kultivačním médiu a při použití kondiciovaných médií z HF a PANF.

Bod B: Určení rozdílné exprese specifických buněčných markerů spojených s nízkou buněčnou diferenciací a epitelo-mezenchymálním přechodem u komerčních linií PDAC ve standardním kultivačním médiu a po jejich stimulaci kondiciovanými médii z HF a PANF.

Bod C: Srovnání exprese vybraných specifických markerů IL-6, IL-8 a MFGE8 a jejich receptorů u komerčních buněčných linií PDAC (stimulovaných a nestimulovaných kondiciovanými médii), u buněk z punktátu ascitu PDAC a u nádorových buněk ze vzorků PDAC.

Bod D: Srovnání vzájemné genové exprese HF, PANF a CAF z maligního melanomu.

### Cíl 2

Druhým cílem bylo srovnání fenotypu a genetického profilu mezi NM, MSR a SCC u pacientů s HNSCC. Tento cíl můžeme rozdělit do 3 bodů.

Bod A: Analýza imunohistochemického profilu markerů ten, fn a gal u NM, MSR a SCC.



Bod B: Nalezení vztahu mezi metastatickým postižením krčních uzlin a přežitím pacienta na podkladě exprese ten, fn a gal u MSR a SCC.

Bod C: Porovnání genové exprese na podkladě DNA microarray analýzy ten pozitivních a ten negativních vzorků SCC.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Cíl 1

##### 3.1.1 Buněčné linie

V experimentech byly použity 4 buněčné linie PDAC: CAPAN-2, MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1. Tyto linie jsou standardně používány ke studiu biologických vlastností nádorového parenchymu. CAPAN-2, MIAPaCa-2, PaTu-8902 byly získány jako dar od prof. Libora Vítka z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze.

Panc-1 byly zakoupeny od ATCC (CRL-1469, Old Town Manassas, VA, USA). Línii CAPAN-2 byla kultivována v médiu McCoy (BioConcept, Allschwil, Switzerland) suplementovaného 10 % FBS (fetální bovinní sérum) a antibiotikem (penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 ug/ml)). Ostatní linie byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) s 10 % FBS a antibiotikem (penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 ug/ml)). Kultivace buněk probíhala za teploty 37 °C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Dále byla jako negativní kontrola u metody Western blot použita linie nenádorových keratinocytů HaCaT.

##### 3.1.2 Lidské primární kultury buněk a odběr vzorků tkání

Veškerý biologický materiál pacientů byl získán se souhlasem Etické komise Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze v souladu s Helsinskou deklarací (Shrestha and Dunn 2020). HF byly izolovány z kůže zdravých dárců, kteří podstoupili zákrok na Klinice estetické chirurgie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. HF byly kultivovány v mediu DMEM s 10 % FBS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml) při teplotě 37°C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Vzorky tkáně od pacientů s PDAC byly získány z Ústavu patologie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze.

PANF byly izolovány od 11 pacientů (P1-P11, tbl. 3) na základě protokolu (Dvorankova, Lacina, and Smetana 2019; Szabo et al. 2011). Morfologické a fenotypové znaky typické pro fibroblasty byly ověřeny imunohistochemicky pomocí markerů (vimentin+, keratin-, CD34-, CD45-, MITF-, HMB45-, MelanA-) a Western blotem pomocí markerů (high molekular weight cytokeratin-, vimentin+, PDGFRβ) V následujících experimentech byly použity PANF

pacientů (P10 a P11). Získání tkáně ze zdravého pankreatu je z mnoha důvodů obtížné, proto byli PANF srovnávané s HF a MELF (melanoma derived CAFs). MELF byli fenotypově charakterizované v publikaci (Kodet et al. 2018). HF i PANF byly nasazeny na mikroskopická podložní sklička v hustotě 1500 buněk/cm<sup>2</sup> a kultivovány 120 hodin v DMEM mediu. Kultivační media byla vyměněna po 48 a 120 hodinách. V získaných médiích byla analyzována koncentrace IL- 6, IL-8 a MFG8 pomocí ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) metody. Podložní sklička s fibroblasty byla opláchnuta 3x PBS (phosphate-buffered saline), usušena a skladována v teplotě – 20 °C pro další imunofluorescenční a Western blot analýzu.

**Tbl. 3**

Charakteristika dárců PANF a dárců nádorových pankreatických buněk z ascitu

|                       | Pacient  | Pohlaví   | Věk<br>(roky) | Lokalita<br>nádoru v<br>pankreatu | Klasifikace           |
|-----------------------|--|-----------|---------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <b>Dárci<br/>PANF</b> | <b>P1</b>  | Žena      | 72            | Hlava                             | T3/N0/M0              |
|                       | <b>P2</b>  | Žena      | 50            | Tělo                              | T3/N1/M1 (játra)      |
|                       | <b>P3</b>  | Muž       | 60            | Tělo                              | T3/N1/M0              |
|                       | <b>P4</b>  | Žena      | 80            | Hlava                             | T3/N0/M0              |
|                       | <b>P5</b>  | Muž       | 56            | Tělo                              | T3/N1/M0              |
|                       | <b>P7</b>  | Žena      | 78            | Tělo                              | T3/N1/M1 (játra)      |
|                       | <b>P8</b>  | Muž       | 74            | Hlava                             | T3/N0/M0              |
|                       | <b>P9</b>  | Muž       | 77            | Tělo                              | T3/N0/M0              |
|                       | <b>P10</b>   | Žena      | 68            | Hlava                             | T4/N0/M0              |
|                       | <b>P11</b>   | Muž       | 63            | Hlava                             | T3/N1/M0              |
|                       | <b>Dárci<br/>nádorových<br/>buněk z<br/>ascitu</b> | <b>A1</b> | Žena          | 65                                | Hlava                 |
| <b>A2</b>             |  | Žena      | 70            | Tělo                              | T4/N1/M1 (peritoneum) |
| <b>A3</b>             |  | Žena      | 65            | Hlava                             | T4/N1/M0              |
| <b>A4</b>             |  | Muž       | 60            | Hlava                             | T3/N1/M1 (játra)      |

### 3.1.3 Nádorové buňky z punktátu ascitu

Buňky z punktátu ascitu byly získány od pacientů v terminálním stádiu PDAC (tbl.3), hospitalizovaných na Onkologické klinice 1. LF UK a Fakultní Thomayerovy nemocnice v Praze se souhlasem Etické komise České republiky v souladu s Helsinskou deklarácí. Suspenze ascitu byla centrifugována (odstředivá síla 400 x g), resuspendována v PBS a následně znovu centrifugována za stejných podmínek. Pelet buněk z ascitu buněk byl znovu resuspendován v DMEM s 10 % FBS a ATB (penicilin/streptomycin) a kultivován v inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Ascitické buňky byly následně kultivovány na podložních skličkách v hustotě 20 000 buněk/cm<sup>2</sup> v DMEM s 10 % FBS a ATB

(penicilin/streptomycin) 24 hodin. Podložní sklíčka s buňkami byla 3x opláchnuta PBS, usušena a skladována v teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další analýzu.

### 3.1.4 Nádorové linie kultivované v kondiciovaných médiích z PANF a HF

PANF a HF byly kultivovány o hustotě  $6000\text{ buněk}/\text{cm}^2$ . Po dosažení 80 % konfluence bylo médium vyměněno za čerstvé kultivační médium DMEM nebo McCoy. Po 24 hodinách bylo médium centrifugováno (odstředivá síla  $400\text{ x g}$ ), byl odebrán supernatan a skladován při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Do 24 hodin bylo toto kondiciované médium použito ke kultivaci PDAC. Nádorové linie PANC-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902 byly kultivované na podložních sklíčkách o hustotě  $5000\text{ buněk}/\text{cm}^2$  pod vlivem DMEM kondiciovaného média. Nádorová linie CAPAN-2 byla kultivována na podložních sklíčkách o hustotě  $10\,000\text{ buněk}/\text{cm}^2$  pod vlivem McCoy kondiciovaného média. Po 48 a 120 hodinách byl supernatan odebrán k analýze pomocí ELISA metody. Nakonec byla skla s buňkami 3x omyta v PBS, usušena a skladována v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další IHC (immunohistochemistry) analýzu.

Pro Western blot analýzu byly buněčné linie MIAPaCa-2, PaTu-8902 and Panc-1 nasazeny v hustotě  $5000\text{ buněk}/\text{cm}^2$  a buněčná linie CAPAN-2 v hustotě  $10\,000\text{ buněk}/\text{cm}^2$  do Petriho misek a kultivovány 2 dny ve standardních a kondiciovaných médiích DMEM (MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1) a McCoy (CAPAN-2). Část buněk byla trypsinizována po 48 hodinách a druhá část buněk po 120 hodinách kultivace.

### 3.1.5 Efekt kondiciovaných médií na formování buněčných kolonií linií PDAC

Klonogenní test (Clonogenic assay) určuje počet proliferujících kolonií buněk, kdy je kolonie definována jako skupina minimálně 50 buněk (Franken et al. 2006). Buněčné linie MIAPaCa-2, PaTu-8902, Panc-1 a CAPAN-2 byly nasazeny v hustotě  $100\text{ buněk}/\text{cm}^2$  a kultivovány ve standardních médiích DMEM (MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1) a McCoy (CAPAN-2) a kondiciovaných médiích z PANF a HF které byly získány dříve popsáním způsobem. Buňky byly kultivovány 2 týdny při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a atmosféře 5 %  $\text{CO}_2$ , média byla měněna každých 72 hodin. Kolonie buněk byly fixovány 70,0 % ethanolem a obarveny 0,5 % genciánovou violetí. Počet kolonií byl hodnocen mikroskopicky pomocí LED transluminátoru Universal Imager Hood (Gel Company, Inc., San Francisco, CA, USA). Výsledky byly analyzovány pomocí ImageJ softwaru.

### 3.1.6 Western blot analýza buněčných linií PDAC pod vlivem kondiciovaných médií

Buněčné linie MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1 byly nasazeny v hustotě 5000 buněk/cm<sup>2</sup> a buněčná linie CAPAN-2 v hustotě 10 000 buněk/cm<sup>2</sup> do Petriho misek. Linie byly kultivovány 2 dny v kondiciovaných médiích z PANF/HF a standardních médiích DMEM (MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1) a McCoy (CAPAN-2). Následně byly buňky omyty v PBS, seškrabány z povrchu Petriho misek a byl přidán Laemmliho buffer (100 mmol, Tris HCl (Tris hydrochloride), 10% glycerol, 2 % SDS (sodium dodecyl sulfate) pH~6.8). Buňky byly následně desintegrovány pomocí ultrazvukového sonikátoru (QSonica, 40 % amplituda, 15 s) a centrifugovány (odstředivá síla 10 000 x g, 10 min). Koncentrace a čistota proteinů byla změřena pomocí nanofotometru (Implen).

Western blot byl provede následovně: Po denuraci (vaření v 95°C, 5 min) byly proteiny separovány elektroforézou v SDS-PAGE gelu (sodium dodecylsulphatepolyacrylamide gel electrophoresis). Po separaci byly proteiny transferovány na PVDF (polyvinylidene difluorid) membránu pomocí blotovacího systému iBlot2 (Thermo Fisher Scientific). Nespecifická reakce protilátek byla na membránách blokována hodinovou inkubací v 5 % NFDM (non-fat dry milk) nebo BSA (bovine serum albumin). Proteiny byly stabilizovány v TBS (tris-buffered saline) s 0,1 % Tween při pokojové teplotě. Membrány s proteiny byly přes noc inkubovány s primární protilátkou při teplotě 4 °C. Nekonjugovaná primární protilátka byla smyta PBS. Následně byly membrány inkubovány v sekundární protilátce s HRP (horse radish peroxidase) aktivitou po dobu 1 hodiny. Po přidání substrátu ECL (enhanced chemiluminescence) k imunoblotu byl k detekci signálu z HRP použit přístroj MF-ChemiBis 2.0 (DNR Bio-Imaging Systems). Jako kontrolu správného provedení byla detekována přítomnost  $\beta$ -actinu. Seznam použitých protilátek je shrnut v tbl. 4.

**Tbl. 4**

Seznam použitých protilátek pro Western blot

| <b>Primární protilátka</b> | <b>Druh</b> | <b>Izotyp</b> | <b>Klonalita</b> | <b>Výrobce</b>   |
|----------------------------|-------------|---------------|------------------|------------------|
| E-cadherin                 | Krysa       | IgG           | Monoklonální     | eBioscience, USA |
| N-cadherin                 | Králík      | IgG           | Polyklonální     | Invitrogen, USA  |
| Keratin 8                  | Myš         | IgG           | Monoklonální     | Invitrogen, USA  |
| Keratin 14                 | Králík      | IgG           | Polyklonální     | Invitrogen, USA  |
| Keratin 19                 | Myš         | IgG           | Monoklonální     | Invitrogen, USA  |
| PDGFR $\beta$              | Králík      | IgG           | Monoklonální     | CST, USA         |
| Slug                       | Králík      | IgG           | Polyklonální     | Invitrogen, USA  |

| Snail                                    | Myš         | IgG           | Monoklonální   | eBioscience, USA |
|--|-------------|---------------|----------------|------------------|
| Vimentin                                 | Králík      | IgG           | Monoklonální   | CST, USA         |
| WSC <sup>1</sup>                         | Králík      | IgG           | Polyklonální   | Abcam, USA       |
| β-actin                                  | Králík      | IgG           | Monoklonální   | CST, USA         |
| <b>Sekundární protilátka</b>             | <b>Druh</b> | <b>Izotyp</b> | <b>Výrobce</b> |                  |
| Anti-králičí, HRP <sup>2</sup> -aktivita | Koza        | IgG           | CST, USA       |                  |
| Anti-kryší, HRP <sup>2</sup> -aktivita   | Koza        | IgG           | CST, USA       |                  |
| Anti-myší, HRP <sup>2</sup> -aktivita    | Kůň         | IgG           | CST, USA       |                  |

<sup>1</sup>WSC: Wide spectrum cytokeratin <sup>2</sup> HRP Horse Radish Peroxidase

### 3.1.7 Imunofluorescenční analýza linií PDAC

Buněčné linie MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1 a CAPAN-2 byly kultivované o hustotě 7500 buněk/cm<sup>2</sup> v kondiciovaných médiích z PANF/HF a standardních médiích DMEM (MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1) a McCoy (CAPAN-2) a v médiích DMEM (MIAPaCa-2, PaTu-8902 a Panc-1) a McCoy (CAPAN-2) obohacených o IL-6, IL-8 a MFGE8 na podložních sklech. Buňky na podložních sklech byly fixovány v roztoku 2 % pufrovaného paraformaldehydu (pH=7.2.), omyty v PBS a permeabilizovány pomocí 0,1 % Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich). Jako prevence nespecifické vazby sekundární protilátky byla sklíčka 30 minut inkubována v albuminu z prasečího séra (DAKO, Glostrup, Denmark). Primární a sekundární protilátky byly zředěny dle doporučení výrobce. Skla byla inkubována s primární protilátkou po dobu 90 minut. Nekonjugovaná primární protilátka byla smyta PBS. Následně byla skla inkubována v sekundární protilátce s imunofluorescenční aktivitou po dobu 45 minut. Seznam použitých protilátek je uveden v tbl. 5.

Ke kontrole specificity byly použity irelevantní protilátky stejného isotypu jako primární protilátky. Buněčná jádra byla kontrastně obarvena DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich). Skla byla zamontována do Vectashieldu (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a prohlédnuta pod fluorescenčním mikroskopem Eclipse 90i (Nikon, Tokyo, Japan) vybaveným filtry pro fluorochromy FITC, TRITC, DAPI a kamerou Cool-1300Q CCD (Vosskühler, Osnabrück, Germany). Obrazová data byla vyhodnocena pomocí analytického systému LUCIA 5.1 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic).

**Tbl. 5**

Seznam použitých protilátek pro imunohistochemické barvení

| <b>Antigen</b>           | <b>Typ protilátky</b> | <b>Výrobce</b>   | <b>Sekundární protilátka</b>  |
|--------------------------|-----------------------|------------------|---|
| Keratin 19               | Myší monoklonální     | Dako             | Kozí anti-myší (TRITC conjugated) Sigma-Aldrich   |
| Keratin 17               | Myší monoklonální     | Sigma-Aldrich    |   |
| HMB45                    | Myší monoklonální     | Invitrogen       |   |
| Ki67                     | Myší monoklonální     | Dako             |   |
| Melan-A                  | Myší monoklonální     | Dako             |   |
| Smooth muscle actin      | Myší monoklonální     | Dako             |   |
| CD 34                    | Myší monoklonální     | Dako             |   |
| CD 45                    | Myší monoklonální     | Dako             |   |
| Vimentin                 | Myší monoklonální     | Dako             |   |
| Keratins (wide spectrum) | Králičí polyklonální  | Abcam            | Prasečí anti-králičí (FITC conjugated) Dako   |
| Nestin                   | Králičí polyklonální  | Sigma-Aldrich    |   |
| Fibronectin              | Králičí polyklonální  | Dako             |   |
| Keratin 8                | Králičí polyklonální  | Sigma-Aldrich    |   |
| Vimentin                 | Králičí polyklonální  | Abcam            |   |
| VEGFA clone 26503        | Myší monoklonální     | R&D System       | Kozí anti-myší/kryší Histofine (Simple Stain AX PO) Nichirei, Simple Stain AEC Nichirei |
| VEGFAR1                  | Králičí polyklonální  | Abcam            |   |
| VEGFAR2                  | Králičí monoklonální  | Cell Signaling   |   |
| IL-6                     | Myší monoklonální     | Abcam            |   |
| IL-6R                    | Králičí polyklonální  | Abcam            |   |
| IL-8                     | Kozí polyklonální     | R&D System       |   |
| IL-8R1                   | Myší monoklonální     | R&D System       |   |
| IL-8R2                   | Myší monoklonální     | R&D System       |   |
| MFGE-8                   | Myší monoklonální     | Exbio Antibodies |   |
| Keratin 7                | Myší monoklonální     | Abcam            |   |

### 3.1.7 Bright-field imunohistochemická analýza linií PDAC, buněk z ascitu a nádorové tkáně z pankreatu

Buňky MIAPaCa-2, PaTu-8902, Panc-1, CAPAN-2 byly nasazeny o hustotě 7 500 buněk/cm<sup>2</sup>, buňky z ascitu pankreatu byly nasazeny o hustotě 20 000 buněk/cm<sup>2</sup> na podložní sklíčka (Leica X-tra slides 3800050, Leica, Tokyo, Japan) s pozitivně nabitým povrchem. Paralelně byla nakrájena (řezy tloušťky 5 µm) nádorová tkáň PDAC od pacientů P10 a P11 následně fixovaná

v parafínu, usušena na pozitivně nabitých podložních sklíčkách (Leica X-tra slides), deparafinována, rehydratována a ošetřena 1 % peroxidem vodíku při pokojové teplotě. K zabránění nespecifické vazby protilátek bylo aplikováno blokační činidlo (Universal IHC Blocking/Diluent, Leica) po dobu 1 hodiny. Seznam primárních protilátek je uveden v tabulce 3. Protilátky byly zředěny dle doporučení výrobce pomocí Antibody Diluent (Dako REAL S-2022, DAKO) a inkubovány přes noc se vzorky při teplotě 4°C. Nenavázané protilátky byly omyty PBS. Sekundární protilátky (Histofine® Simple Stain™ MAX PO (MULTI) Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) byly zředěny dle pokynů výrobce a inkubovány se vzorky po dobu 20 minut v pokojové teplotě. Řezy byly kontrastně obarveny 3minutovou aplikací hematoxylinu (Gill No. 1 GHS116, Sigma-Aldrich) a namontovány v médiu Hydromount (HS-106, National Diagnostics, Leicestershire, UK) a analyzovány pomocí bright-field mikroskopu. Negativní kontrola byla provedena záměnou primární protilátky za speciální protilátku (Mouse/Rabbit Antibody Isotype Controls 08-6599 and 08-6199, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a vzorky byly dále připraveny za stejných podmínek.

### 3.1.8 ELISA detekce IL-6, IL-8 a MFGE8 linií PDAC a HF/PANF

Pomocí ELISA metody byla v kultivačních médiích všech PDAC liniích MIAPaCa-2, PaTu-8902, Panc-1, CAPAN-2 a HF a PANF měřena produkce IL-6 (EI1006-1, BioVendor, Brno, Czech Republic), IL-8 (EI1008-1, BioVendor) a MFGE8 (DFGE80, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Hodnota IL-6, IL-8 a MFGE8 byla měřena v mikrotitračních 96 jamkových destičkách pomocí Universal Microplate Readeru EL 800 (BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, USA) o vlnové délce 570 nm. Dále byl měřen efekt kondiciovaných médií (z HF a PANF) u buněčných linií PDAC na produkci IL-6, IL-8 a MFGE8. Byl definován relativní produkční faktor (RP) podle vzorce  $RP = (PDAC \text{ v } CM - CM) / PDAC$ . PDAC v CM je hodnota faktorů (IL-6, IL-8 a MFGE8) v pg (pikogramech) produkovaných nádorovými buňkami kultivovaných v kondiciovaném médiu. CM je hodnota faktorů (IL-6, IL-8 a MFGE8) v pg v kondiciovaných médiích. PDAC je hodnota faktorů (IL-6, IL-8 a MFGE8) v pg ve standardním médiu. Hodnota  $RP > 1$  znamená zvýšení produkce faktorů při použití kondiciovaných médií.  $RP < 1$  znamená snížení produkce faktorů při použití kondiciovaných médií.  $RP = 1$  koresponduje s žádnou změnou produkce faktorů při použití kondiciovaných médií.



### 3.1.9 Expresní celogenomové profilování transcriptomu HF, PANF a MELF

HF, PANF a MELF byly kultivované na Petriho miskách (Corning, NY, USA) o hustotě  $1000/\text{cm}^2$  7 dnů do dosažení 95-100 % konfluence. Kultivační médium bylo vyměněno každé 2 dny a 24 hodin před zpracováním buněk. Buňky byly omyty 2x PBS (Biochrom) a následně byl přidán (350  $\mu\text{l}$ ) RLT pufr (Qiagen, Hilden, Germany) s 2-mercaptoethanolem (Sigma-Aldrich). Lyzát buněk byl skladován při teplotě  $-80^\circ\text{C}$ . RNA buněk byla izolována pomocí RNeasy micro kitu (Qiagen). Kvantita a kvalita izolované RNA byla analyzována přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Všechny použité RNA vzorky měli RIN (RNA integrity number) nad 9. Kompletní RNA (200 ng) byla amplifikována na Illumina TotalPrep RNA kitu (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 750 ng amplifikované RNA bylo hybridizováno na Illumina HumanHT-12 v4 chipu (Illumina, San Diego, CA, USA) podle protokolu výrobce. Analýza byla provedena na 3 biologických replikátech pro HF, 8 biologických replikátech pro PANF a 4 biologických replikátech pro MELF. Základní data byla zpracována pomocí GenomeStudio softwaru (version 1.9.0.24624; Illumina) pro další analýzu byly použity oligo (Carvalho and Irizarry 2010) a limma (Ritchie et al. 2015) balíčky od Bioconductoru (Huber et al. 2015). Transkripční profil byl zpětně opraven pomocí exponenciálního modelu, normalizovaného kvantilu a rozptylu stabilizovaného pomocí logaritmické transformace základu. Moderovaný t-test byl použit pro detekci rozdílně vyjádřených transkriptů. Storeyho q-hodnota  $<0.05$  (Storey and Tibshirani 2003) a minimálně dvojnásobné změny v intenzitě exprese byly požadovány jako důkaz rozdílně transkribovaných genů. Data vyhovující MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) byla uložena do databáze ArrayExpress (E-MTAB-8764). GSEA (Gene set enrichment analysis) byla provedena s použitím Fisherova exaktního testu na genových souborech definovaných KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) cestami (Kanehisa et al. 2017). Pouze dráhy KEGG s GSEA  $p < 0,0001$ , minimálním překrytím deseti genů a odds ratio  $>2$  byly považovány za statisticky významné.

### 3.1.10 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v R statistickém prostředí (<https://www.r-project.org>), pokud není uvedeno jinak, pomocí softwaru Past3 3.x. Pro multiple testing adjustment byl použit Storeyho test (q-hodnota). Statistická analýza velikosti a počtu kolonie byla vypočtena jednocestnou analýzou rozptylu (ANOVA) následovanou Tukeyho post-hoc testem.

## 3.2 Cíl 2

### 3.2.1 Odběr tkání

Od pacientů s HNSCC operovaných na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole byl odebrán soubor vzorků z SCC, MSR a NM. Všechny vzorky tkáně byly odebrány s informovaným souhlasem pacientů po schválení studie místní etickou komisí podle Helsinské deklarace. Staging a grading vzorků HNSCC je shrnut v tbl. 6. Anatomická lokalita vzorků HNSCC je shrnuta v tbl. 7.

**Tbl. 6**

Staging a grading vzorků HNSCC

| Hodnota | Grade | T<br>(velikost<br>tumoru) | N<br>(metastatické<br>postižení<br>krčních uzlin) | Stage |
|---------|-------|---------------------------|---|-------|
| 0       | 0     | 0                         | 24  | 0     |
| 1       | 14    | 16                        | 15  | 4     |
| 2       | 39    | 36                        | 38  | 8     |
| 3       | 27    | 17                        | 3   | 21    |
| 4       | 0     | 11                        | 0   | 47    |

**Tbl. 7**

Anatomická lokalita vzorků HNSCC

| Anatomická lokalita | Počet pacientů/microarray |
|---------------------|---------------------------|
| Dutina ústní        | 11/4                      |
| Orofarynx           | 51/13                     |
| Hypofarynx          | 5/1                       |
| Larynx              | 13/8                      |

### 3.2.2 Zpracování tkání

Vzorky SCC, MSR a NM byly ponechány 1 hodinu v kryoprotektivního gelu Tissue-Tek (Sakkura, Zoeterwoude, The Netherlands) při 4°C a následně zmrazeny v tekutém dusíku. Zmrazené vzorky byly nakrájeny na 7 µm silné řezy pomocí microtomu Cryocut-E (Reichert-Jung, Vienna, Austria).

### 3.2.3 Imunofluorescenční detekce Ten, Fn a Gal-1 u SCC, NM a MSR

Řezy byly omyty v PBS a fixovány v 2 % pufrovaného paraformaldehydu. Fixované řezy byly omyty 3x v PBS. Následně byly vzorky permeabilizovány 0,2 % Tritonem X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a omyty v PBS. Nespecifická vazba protilátek byla vyloučena inkubací vzorků v prasečím séru (DAKO, Glostrup, Denmark), které bylo zředěno dle pokynů dodavatele. Po omytí v PBS byla aplikována myší monoklonální protilátka proti ten-C, králičí polyklonální protilátka proti fn a cíleně vyrobená králičí polyklonální protilátka proti gal-1. Protilátka proti gal-1 byla před použitím důkladně otestována na zkříženou reaktivitu s jinými členy rodiny gal a použita v ředění 1:50. Protilátky byly inkubovány se vzorky po dobu 90 minut. Po omytí nekonjugované primární protilátky PBS, byly použity sekundární protilátky se značeným fluorochromem s anti-myší a anti-králičí aktivitou. Všechny protilátky byly zředěny dle instrukcí dodavatele. Specificita imunodetekce byla ověřena nahrazením protilátky prvního kroku irelevantní protilátkou stejného izotypu v případě monoklonální protilátky, v případě polyklonální protilátky pak vynecháním samotné primární protilátky. Jaderná DNA byla zobrazena pomocí DAPI (Vector-Laboratories, Burlingame, CA, USA). Skla byla namontována ve Vectashieldu a zkoumána pod fluorescenčním mikroskopem Eclipse 90i vybaveným filtry pro fluorochromy FITC, TRITC, DAPI a kamerou Cool- 1300Q CCD. Obrazová data byla vyhodnocena pomocí analytického systému LUCIA 5.1.

### 3.2.4 Microarray analýza

Vzorky byly nejprve nakrájeny na kryostatu. RNA byla izolována pomocí reagentu RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA), následně bylo postupováno dle procedury optimalizované pro zvířecí buňky. Kvalita a kvantita RNA byla určena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, DE, USA)

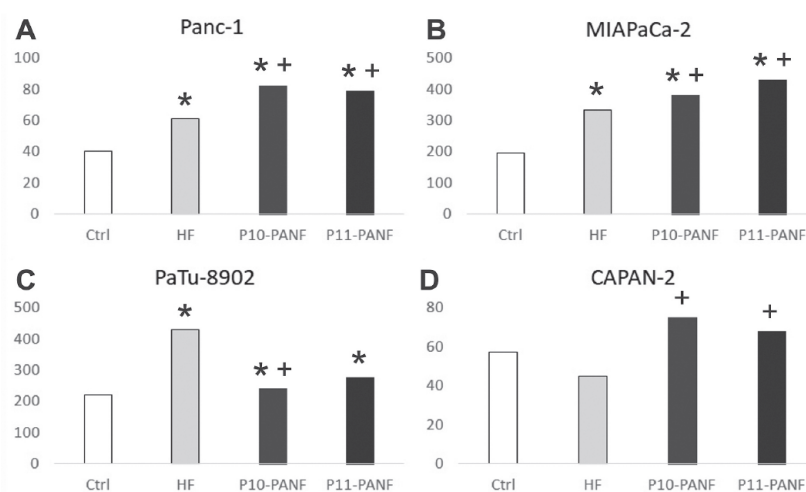
a bioanalyzátoru (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Pro samotnou microarray analýzu byl použit chip Illumina HumanWG-6 V3 (Illumina, San Diego, CA, USA). Bylo postupováno dle standardního protokolu. Celková RNA (150 ng) byla amplifikována pomocí amplifikačního kitu Illumina TotalPrep RNA (Ambion™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Amplifikovaná RNA (1500 ng) byla hybridizována s oligonukleotidy na chipech dle pokynů výrobce. Celkem bylo zpracováno 26 SCC (4x Ten– a 22x Ten+), 22 vzorků MSR (4x Ten– a 18x Ten+) a 25 vzorků NM (4x Ten– a 21x Ten+). Základní data byla zpracována pomocí GenomeStudio softwaru. Pro další analýzu byly použity oligo a limma balíčky od Bioconductoru v prostředí R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org/>). Transkripční profily byly korigovány pomocí exponenciálního modelu, normalizovaného kvantilu a rozptylu stabilizovaného pomocí logaritmické transformace základu. Moderovaný t-test byl použit pro detekci rozdílně vyjádřených transkriptů v nádorovém stromatu. Geny byly považovány za rozdílně transkribované při Storeyho q hodnotě pod 0,25 a minimálně 1,5násobné změně intenzity exprese. Data vyhovující MIAME byla uložena do databáze ArrayExpress. GSEA byla provedena s použitím Fisherova exaktního testu na genových souborech definovaných KEGG a genovou ontologií (15). Statistická významnost byla stanovena na  $p < 0.005$ , odds nejméně 2 a shodě alespoň 3 genů v genovém setu a setu rozdílně transkribovaných genů.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Cíl 1

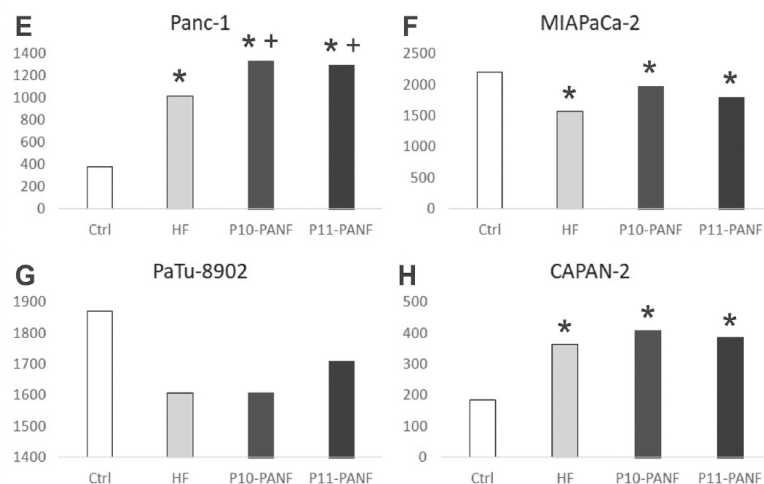
#### 4.1.1 Efekt kondiciovaných médií na formování buněčných kolonií buněčných linií PDAC

Výsledky ukázaly, že efekt kondiciovaných médií na velikost a počet buněčných linií závisí na typu linie PDAC. V 6 případech z 8 převážil pozitivní efekt. Kondicionovaná média z PANF (P10 a P11) zvětšují velikost kolonií u Panc-1, MIAPaCa-2 a CAPAN-2, u PaTu-8902 nebyl pozorován vliv velikost kolonií v porovnání s kultivací v kontrolním/běžném médiu (CTRL). Kondicionovaná média z HF zvětšují velikost kolonií u Panc-1, MIAPaCa-2 a PaTu-8902, u CAPAN-2 byl pozorován mírně negativní vliv na velikost kolonií v porovnání s kultivací v běžném médiu. Velikost kolonií při jejich kultivaci v kondiciovaných médiích je zobrazena na obr. 2. Počet kolonií u Panc-1 a CAPAN-2 stimulovaných kondiciovanými médii z PANF/HF byl větší než při kultivaci v běžném médiu, ale pouze u Panc-1 byl efekt kondiciovaných linií z PANF větší než u kondiciovaných médií z HF. Inhibiční aktivita na počet kolonií byla pozorována u linií MIAPaCa-2 a PaTu-8902 v porovnání s kultivací v běžném médiu. Počet kolonií při jejich kultivaci v kondiciovaných médiích je zobrazen na obr. 3.



Obr. 2 Velikost kolonií (Px<sup>2</sup>)

Hladina statistické významnosti  $p < 0,05$  je označena hvězdičkou (\*). Znakem (+) je označena hladina statistické významnosti  $p < 0,05$  při porovnání s CTRL a HF/PANF kondiciovanými médii.

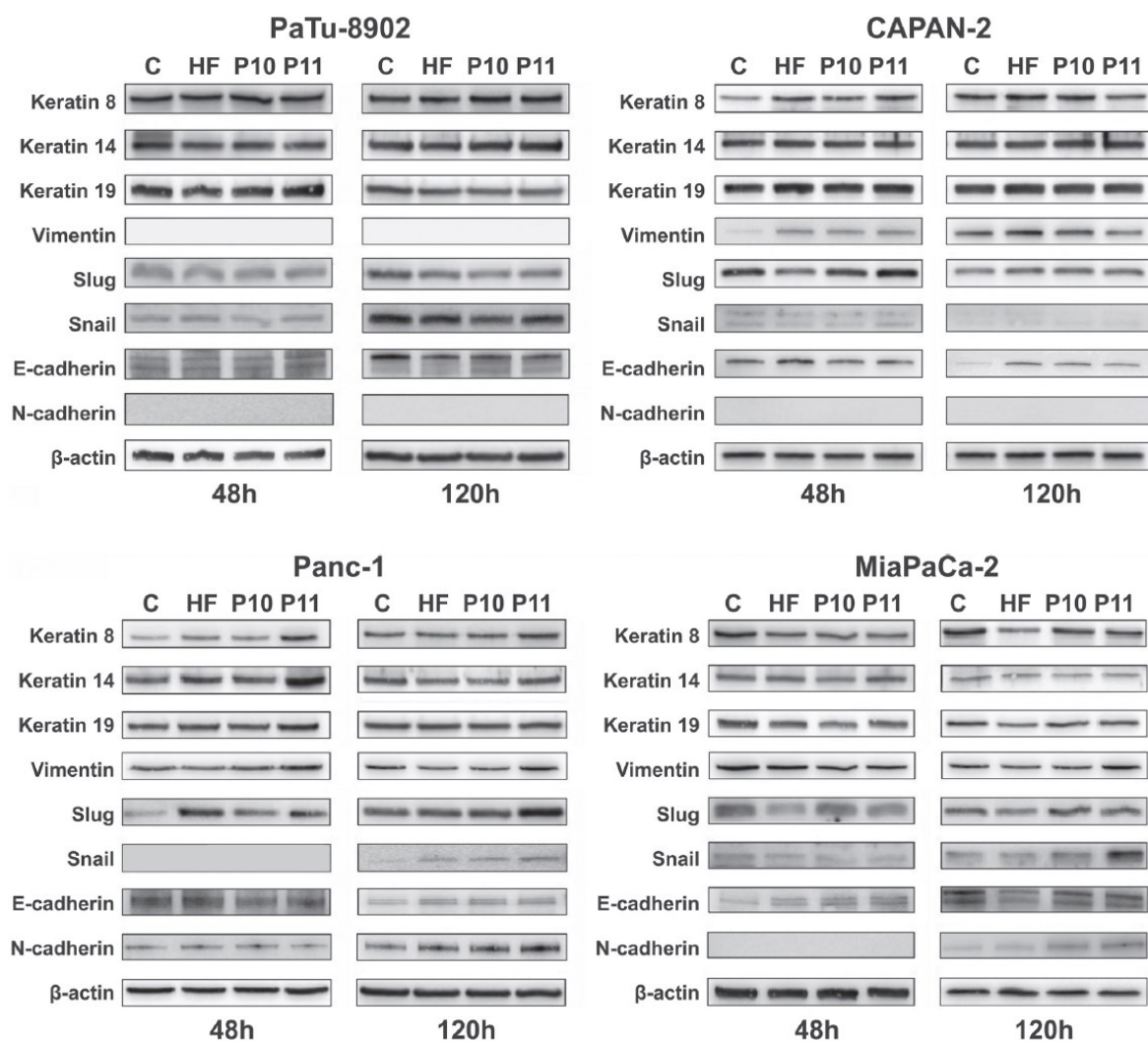


Obr. 3 Počet kolonií (Px<sup>2</sup>)

Hladina statistické významnosti  $p < 0,05$  je označena hvězdičkou (\*). Znakem (+) je označena hladina statistické významnosti  $p < 0,05$  při porovnání s CTRL a HF kondiciovanými médii.

#### 4.1.2 Western blot analýza PDAC buněčných linií pod vlivem kondiciovaných médií

Metodou Western blot byla na proteinové úrovni hodnocena diferenciaci a EMT PDAC linií pod vlivem kondiciovaných médií HF/PANF za 48 a 120 hodin. Diferenciaci nádorových buněk byla hodnocena na podkladě exprese K8, K14, K19. EMT byl hodnocen na základě exprese markerů Slug, Snail, vimentin a E-cadherin/N-cadherin. Největší změnu exprese pod vlivem kondiciovaných médií vykazoval K8, zatímco exprese K14 a K19 zůstala relativně stabilní. Kondicionovaná média indukovala expresi K8 u linií Panc-1 a CAPAN-2 (pouze při kultivaci za 48 hodin), naopak snížila jeho expresi u linie MIA PaCa-2. Expresi K8 u linie PaTu-8902 byla beze změny. Kondicionovaná média indukovala (vyjádřeno nejvíce při kultivaci za 120 hodin) expresi N-cadherinu a Snail a snižovala expresi E-cadherinu u linií Panc-1 a MIA PaCa-2. U linie CAPAN-2 byla při použití kondiciovaných médií minimální změna v expresi Snail a Slug. 120hodinová kultivace v kondiciovaných médiích u linie CAPAN-2 stimulovala polarizaci epitelu charakterizovanou zvýšenou expresí E-cadherinu a absencí N-cadherinu. Kondicionovaná média neměla zásadní vliv na změnu biologických vlastností PaTu-8902 linie. Výsledky Western blot jsou ukázány na obr. 4.



Obr. 4

Výsledky Western blot proteinové exprese vybraných markerů (levý sloupec) u linií Panc-1, MIAPaCa-2 a CAPAN-2, u PaTu-8902 při kultivaci buněk v běžném médiu (C), kondiciovaném médiu z HF (HF), kondiciovaném médiu z PANF (P10, P11) za 48 a 120 hod.

#### 4.1.3 Imunofluorescenční analýza buněčných linií PDAC

Imunofluorescenčním barvením byla na fenotypové úrovni hodnocena diferenciace epiteliálních buněk, EMT a rychlost proliferace. Diferenciace epiteliálních buněk byla hodnocena expresí K8, K17, K19. Nepřímá známka EMT byla hodnocena expresí vimentinu a rychlost proliferace expresí Ki67. Expres K8 byla prokázána u všech linií PDAC, přidání kondiciovaných médií expresi K8 lehce zvýšilo u linií Panc-1 a MIAPaCa-2, snížilo u linie CAPAN-2, u linie PaTu-8902 zůstala exprese K8 neměnná. Expres K19 nevykázala zásadní změnu při kultivaci v kondiciovaných médiích u žádné linie. Signál pro K17 nebyl zjištěn u většiny linií. Linie Panc-1 a MiaPaCa-2 exprimovaly vimentin, linie CAPAN-2 vykazovala

slabší signál pro vimentin, u linie PaTu-8902 byla na přítomnost vimentinu velmi chudá. U Ki67 nebyla prokázána významná změna při použití kondiciovaných médií u linií Panc-1 a MIAPaCa-2. U linií PaTu-8902 a CAPAN-2 byla při použití kondiciovaných médií exprese Ki67 zvýšena. Použití médií obohacených o IL6, IL8 a MFGE8 indukovalo signál pro K19 a inhibovalo pro K8 a vimentin u linie CAPAN-2. Výsledky imunofluorescence jsou shrnuty v tbl.8.

**Tbl. 8**

Imunofluorescenční průkaz exprese K8, K17, K19, Vim u linií Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902 a CAPAN-2, při kultivaci v běžném médiu, kondiciovaném médiu z HF (HF), kondiciovaném médiu z PANF (P10-PANF, P11-PANF) a médiu obohaceném o IL6, IL8, MFGE8. ND (nedeterminováno), (-) exprese nebyla prokázána, (+) střední exprese, (++) silná exprese, (+++) velmi silná exprese, (-/+) hraniční pozitivita

|           |          |       | K8  | K17 | K19 | Vim   |
|-----------|----------|-------|-----|-----|-----|-------|
| Panc-1    | -        | -     | -/+ | +   | +++ | +++   |
|           | HF       |       | -/+ | -   | +++ | ++    |
|           | P10-PANF |       | -/+ | -   | +++ | ++    |
|           | P11-PANF |       | -/+ | -   | -/+ | ++    |
|           | -        | IL6   | -   | ND  | +++ | -     |
|           |          | IL8   | -   | ND  | +++ | -     |
|           |          | MFGE8 | +   | ND  | +++ | -     |
| MIAPaCa-2 | -        | -     | -   | -   | -/+ | +++   |
|           | HF       |       | -/+ | -   | -/+ | +     |
|           | P10-PANF |       | -/+ | -   | -/+ | +++   |
|           | P11-PANF |       | -/+ | -   | -/+ | +     |
|           | -        | IL6   | -   | ND  | ++  | ++    |
|           |          | IL8   | -   | ND  | +   | ++    |
|           |          | MFGE8 | -   | ND  | ++  | -     |
| PaTu-8902 | -        | -     | +++ | -   | -/+ | +++   |
|           | HF       |       | -   | -   | +++ | -     |
|           | P10-PANF |       | -   | -   | +++ | -     |
|           | P11-PANF |       | -   | -   | +++ | -     |
|           | -        | IL6   | -/+ | ND  | -   | -     |
|           |          | IL8   | -/+ | ND  | -   | +     |
|           |          | MFGE8 | -   | ND  | -   | -     |
| CAPAN-2   | -        | -     | +++ | -   | -   | -/+++ |
|           | HF       |       | -/+ | -   | +   | -/+   |
|           | P10-PANF |       | -/+ | -   | -   | -/+   |
|           | P11-PANF |       | -/+ | -   | -/+ | -/+   |
|           | -        | IL6   | -/+ | ND  | ++  | -/+   |
|           |          | IL8   | -/+ | ND  | ++  | -/+   |
|           |          | MFGE8 | -/+ | ND  | ++  | -/+   |



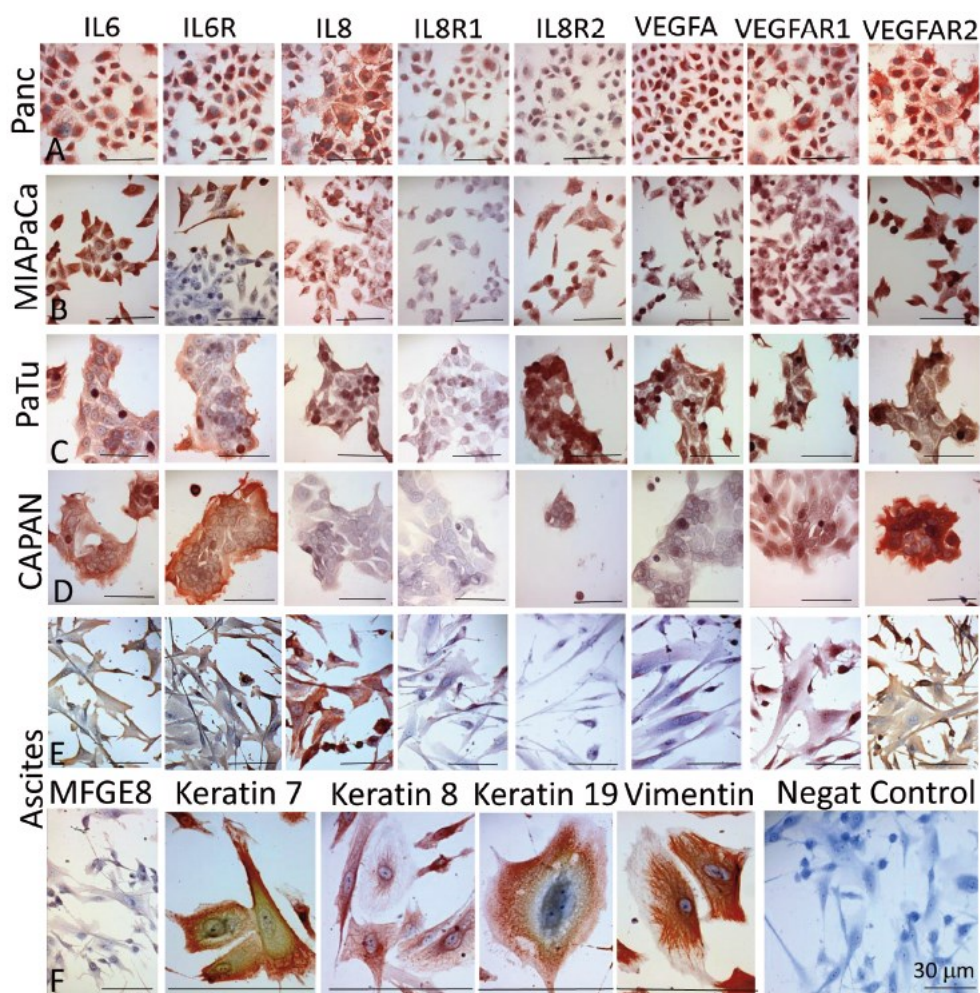
#### 4.1.4 Imunohistochemická analýza v bright-field mikroskopii buněčných linií PDAC a buněk z ascitu

Imunohistochemickou analýzou byla u buněk z ascitu sledována exprese K7, K8 a K19 a vimentinu a exprese MFGE8. Dále byla porovnávána exprese IL6, IL8, VEGFA, receptorů pro IL6 (IL6R), IL8 (IL8R) a VEGFA (VEGFAR1, VEGFAR2) mezi nádorovými liniemi PDAC a buňkami z ascitu. Analýza prokázala že PANC-1 linie byla pozitivní na všechny testované markery. U ostatních linií a buněk z ascitu byla pozorována individuální variabilita mezi sledovanými markery. Obzvlášť se lišila exprese IL8, IL8R1 a IL8R2. Všechny pankreatické linie exprimují VEGFA a oba proteinové receptory VEGFAR1, VEGFAR2 stejně jako IL6 a IL8R2. Pouze Panc-1 byly lehce pozitivní na IL8R1. Slabý signál pro MFGE8 byl detekován pouze pro buňky ascitu. Buňky ascitu také exprimovaly K7, K8, K19 a vimentin. Výsledky jsou přehledně shrnuty v tbl. 9. Imunohistochemická analýza IL6,IL8,VEGFA a jejich receptorů IL6R, IL8R1, IL8R2, VEGFAR1, VEGFAR2 u linií PDAC a buněk z ascitu je ukázána na obr. 5

**Tbl. 9**

Imunohistochemický průkaz exprese IL6, IL8, IL6R, IL8R1, IL8R2, VEGFA, VEGFAR, MFGE8 u linií Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902 a CAPAN-2 a buněk z ascitu od 4 pacientů (Ascites-1, Ascites-2, Ascites-3, Ascites-4). ND (nedeterminováno), (-) exprese nebyla prokázána, (+) slabá exprese, (++) střední exprese, (+++) silná exprese, (-/+) hraniční pozitivita

| Cell line | IL6 | IL6R  | IL8 | IL8R1 | IL8R2 | VEGFA | VEGFAR1 | VEGFAR2 | MFGE8 | VIM | K19 | K8  |
|-----------|-----|-------|-----|-------|-------|-------|---------|---------|-------|-----|-----|-----|
| Panc-1    | +++ | +++   | +++ | ++    | ++    | +++   | +++     | +++     | +     |     |     |     |
| MIAPaCa   | +++ | -/+++ | ++  | +     | ++    | +++   | +++     | +++     | +     |     |     |     |
| Patu-8902 | +++ | ++    | +++ | +     | +++   | +++   | +++     | +++     | +     |     |     |     |
| CAPAN-2   | +++ | +++   | +   | +     | +++   | ++    | ++      | +++     | +     |     |     |     |
| Ascites-1 | ++  | ++    | +++ | +     | +     | +     | +++     | +++     | +     | ND  | ND  | ND  |
| Ascites-2 | +++ | ++    | +++ | +     | +     | +     | ++      | +++     | +     | +++ | +++ | ++  |
| Ascites-3 | ++  | ++    | ++  | +     | +     | +     | ++      | ++      | ND    | +++ | +++ | ++  |
| Ascites-4 | +++ | +++   | ++  | +     | -     | +     | ++      | +++     | ND    | +++ | +++ | +++ |



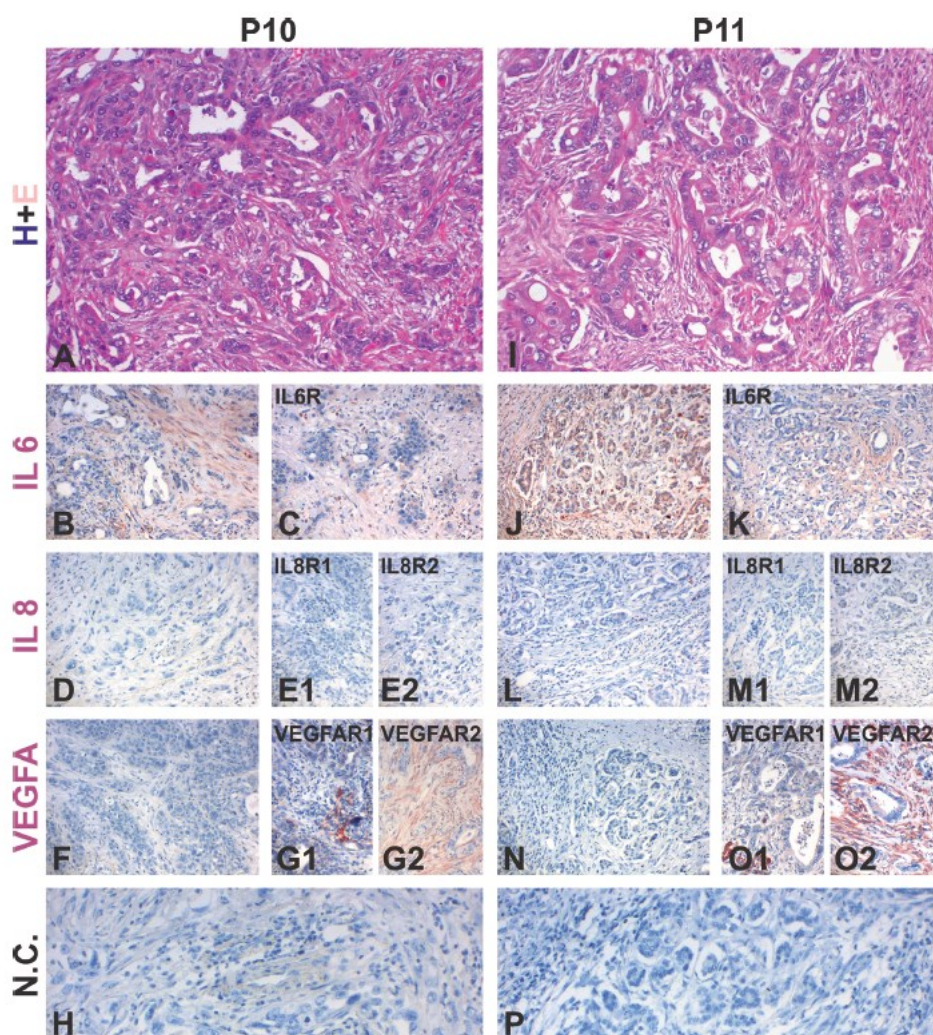
Obr. 5

Srovnání buněčných linií PDAC a nádorových buněk izolovaných z ascitické tekutiny pomocí imunohistochemického značení molekul (IL6, IL8, VEGFA) a příslušných receptorů (IL6R, IL8R1, IL8R2, VEGFAR1, VEGFAR2)

#### 4.1.5 Imunohistopatologie PDAC vzorků

Analyzované vzorky od pacientů P10 a P11 vykazovaly typické morfologické charakteristiky PDAC charakterizované extensivním desmoplastickým stromatem s infiltrací skupinami nádorových buněk. U vzorků byla imunohistochemicky hodnocena exprese IL6, IL8, IL6R, IL8R1, IL8R2 a VEGFA. Exprese IL6 a IL6R byla prokázána v nádorových buňkách i nádorovém stromatu. Signál exprese IL8, obou receptorů IL8R1, IL8R2 chyběl v 8 z 11 sledovaných vzorků. Ačkoliv protein VEGFA chyběl u většiny vzorků byly detekovány oba receptory VEGFAR1 a VEGFAR2 v nádorových buňkách i nádorovém stromatu.

Histologické a imunohistochemické zobrazení molekul IL6, IL8, VEGFA a IL6R, IL8R, VEGFR1, VEGFR2 u nádorů P10 a P11 je na obr. 6.

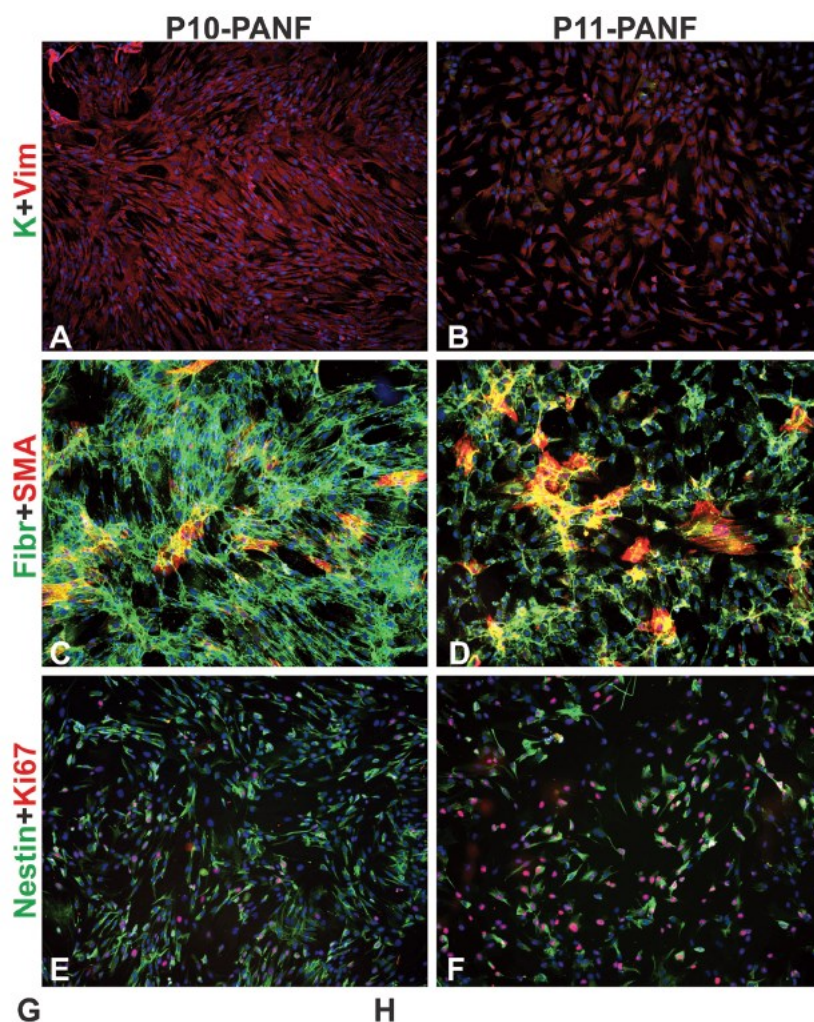


Obr. 6  
 Základní histologická (H+E) a imunohistochemická analýza molekul IL6, IL8, VEGFA a jejich receptorů IL6R, IL8R, VEGFR1, VEGFR2 u parafinových řezů nádorů P10 a P11. Negativní kontrola pro validaci protilátek (H,P)

#### 4.1.6 Imunohistochemická a Western blot analýza PANF

Imunohistochemicky byla zjišťována přítomnost markerů vimentin, WSK (wide-spectrum keratin),  $\alpha$ -SMA, fibronectin, nestin a Ki67 u PANF a HF. U PANF byla zřetelná exprese vimentinu, fibronectinu,  $\alpha$ -SMA a nestinu naopak HF  $\alpha$ -SMA a nestin neexprimují. Metodou Western blot byla analyzována přítomnost PDGFR- $\beta$ , vimentinu, WSK u PANF a HF. Western blot ukázal pouze slabou expresi PDGFR- $\beta$  u PANF v porovnání s HF.

Imunofluorescenční analýza vimentinu, K, Ki67,  $\alpha$ -SMA a nestinu u P10 a P11 je na obr. 7.

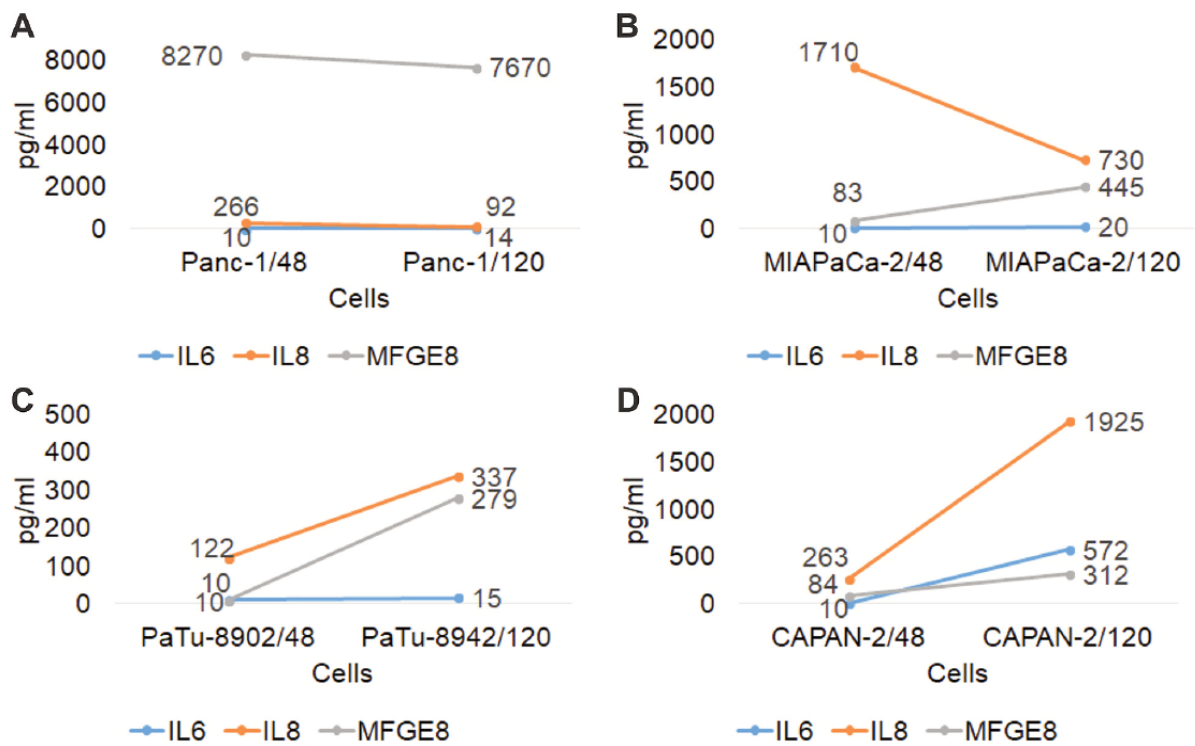


Obr. 7

Imunofluorescenční analýza vimentinu (Vim), K, Ki67, fibronektinu,  $\alpha$ -SMA (SMA) a nestinu izolovaných z primárních kultur P10 a P11.

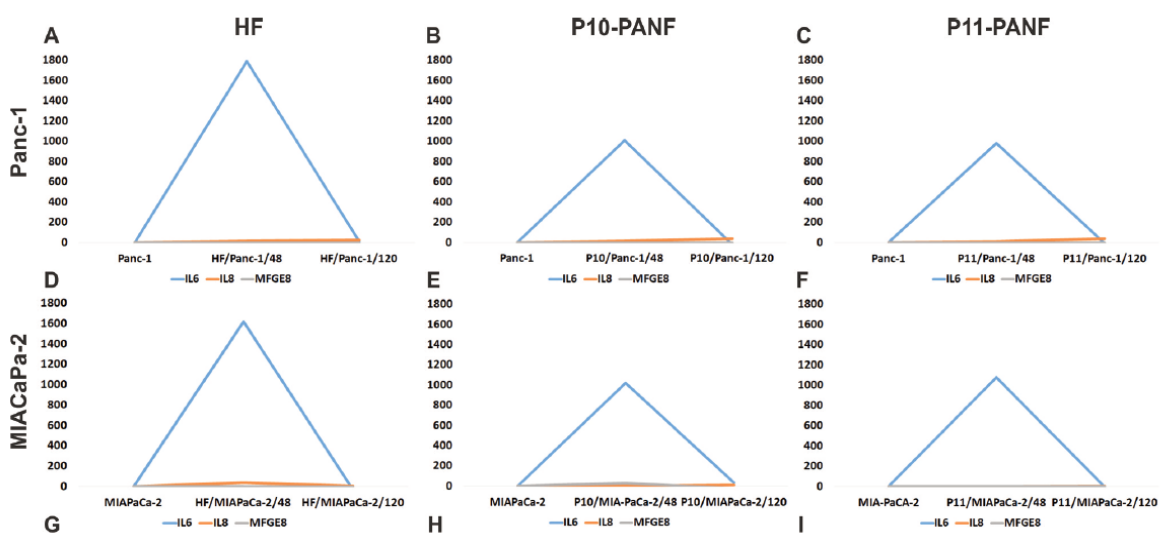
### 1.7 ELISA detekce IL6, IL8 a MFGE8 linií PDAC a HF/PANF

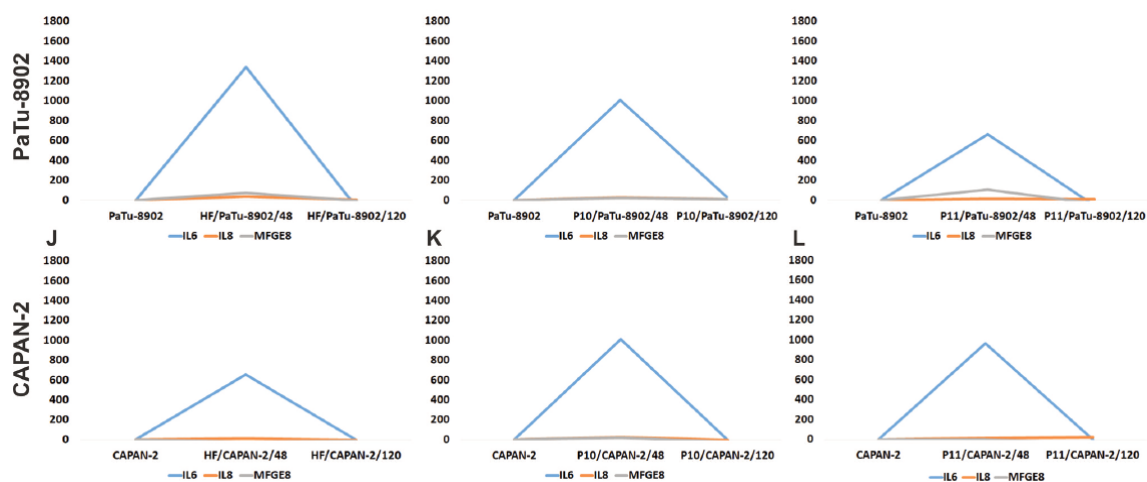
Produkce sledovaných faktorů prokázala individuální variabilitu u PDAC s nízkou produkcí IL-6. Sekrece všech sledovaných faktorů u HF i PANF byla časově dependentní se zvýšením sekrece při 120hodinové kultivaci. Sekrece IL-6, IL-8 a MFGE8 u linií PDAC za 48 a 120 hod je znázorněna na obr. 8. Při kultivaci PDAC v kondicionovaných médiích z HF/PANF (za 48 hodin) se silně zvýšila produkce IL6. Použití kondicionovaných médií z HF/PANF nemělo vliv na produkci IL8 a MFGE8. Sekrece IL-6, IL-8 a MFGE8 u linií PDAC při jejich kokultivaci s HF a PANF je znázorněna na obr. 9.



Obr. 8

ELISA analýza produkce IL-6, IL-8 a MFGE8 u linií Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902, CAPAN-2 při 48 a 120hodinové kultivaci.





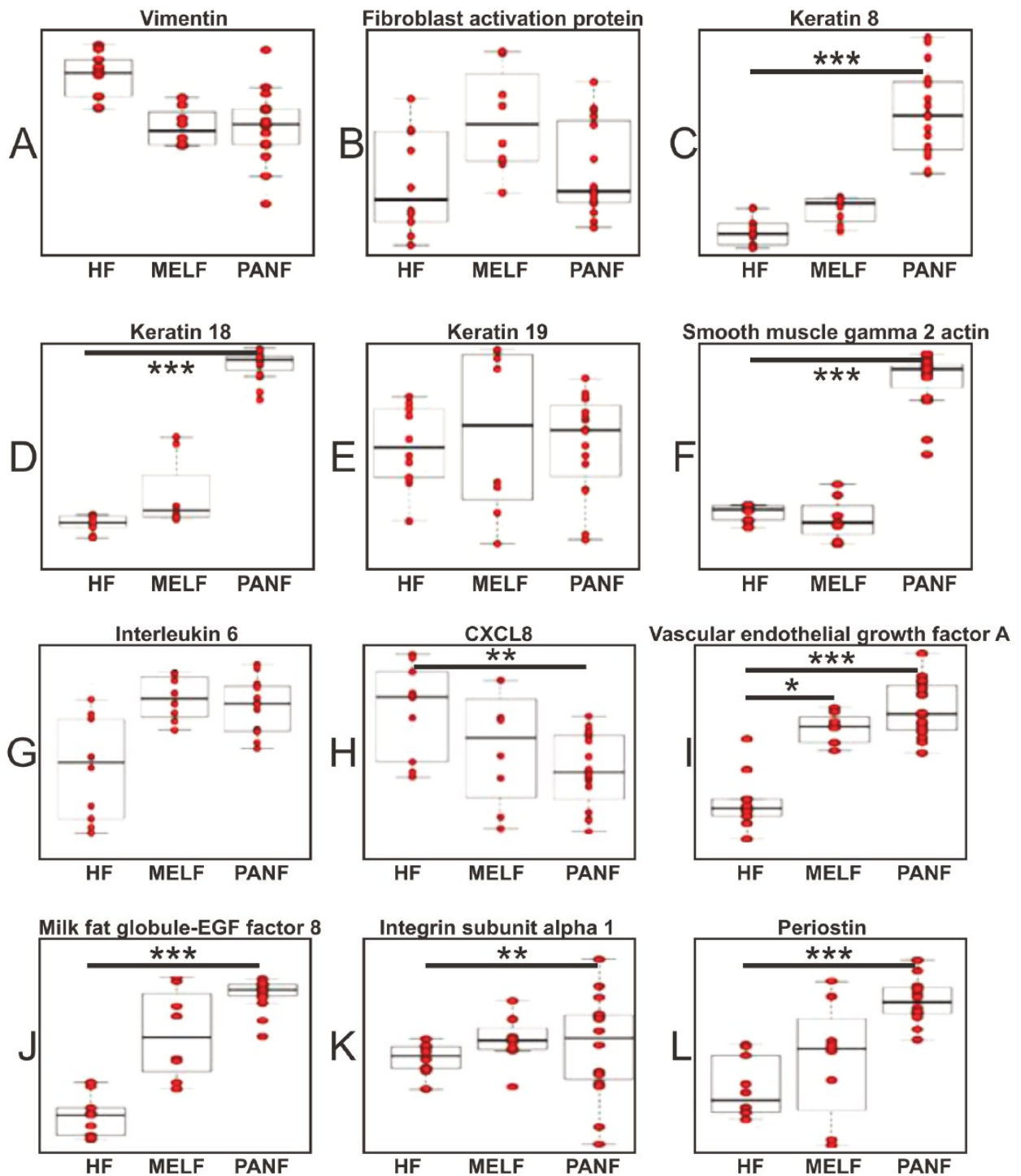
Obr. 9

ELISA analýza srovnání produkce IL-6, IL-8 a MFGES u linií Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902, CAPAN-2 při jejich kultivaci v běžném médiu (Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902, CAPAN-2), kondiciovaném médiu z HF za 48 (HF/48) a 120 (HF/120) hodin a kondiciovaném médiu z PANF P10/P11 za 48 (P10/P11/48) a 120 (P10/P11/120) hodin.

#### 4.1.8 Expresní celogenomové profilování transcriptomu HF, PANF a MELF

PANF se odlišuje od MELF a HF v transkripční aktivitě 1521 genů. Na podkladě Gene set enrichment analýzy KEGG cest byl prokázán rozdíl v následujících drahách souvisejících s karcinogenezí: *TGF-β signaling pathway*, *Transcriptional misregulation in cancer*, *Focal adhesion*, *ECM-receptor interaction*.

Ačkoliv je *vimentin* exprimován ve všech studovaných fibroblastech, jeho exprese v PANF a MELF je nižší než u HF. Exprese *FAP* typická pro CAF byla přítomna ve všech typech fibroblastů. Další rozdíl mezi HF, PANF a MELF byl pozorován v transkripci *K8* a *K18*, která byla pozorována pouze u PANF. Všechny studované fibroblasty překvapivě exprimovaly *K19*. PANF vykazovaly významně silnější expresi SMA v porovnání s HF/MELF. Hladina transkriptů *IL6*, *VEGFA* a *MFGES* byla zvýšena u PANF/MELF v porovnání s HF. Na druhou stranu koncentrace *IL8* (*CXCL8*) byla nižší u PANF než u HF/MELF. Exprese *integrinu* a *periostinu* byla vyšší u PANF a MELF v porovnání s HF. Výsledky jsou shrnuty na obr. 10.



Obr. 10

Rozdíl genové exprese na příkladech vybraných genů vimentinu, FAP, K8, K18, K19, SMA, IL-6, IL-8 (CXCL8), VEGFA, MFGE8, integrin subunit alfa 1 a periostinu u HF, MELF a PANF. Statistická významnost je značena \*pro Storeyho hodnotu (q-hodnotu) <0,1, \*\* pro Storeyho hodnotu <0,05, \*\*\* pro Storeyho hodnotu 0,005

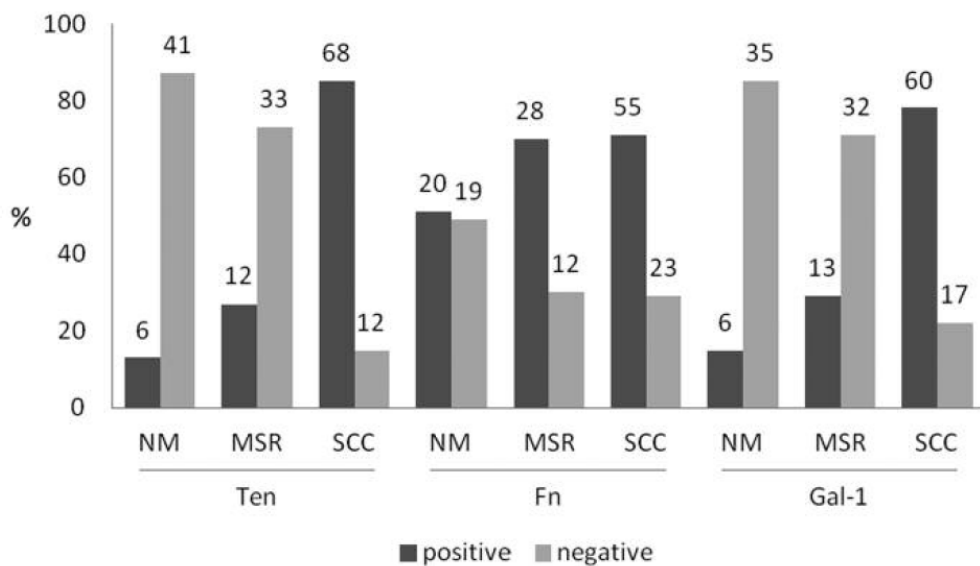
## 4.2 Cíl 2

### 4.2.1 Imunofluorescenční detekce Ten, Fn a Gal-1 u SCC, NM a MSR

Ten a Gal-1 často chyběly v NM a MSR, ale byly silně exprimovány v SCC (NM nebo MSR vs. SCC;  $p < 0.01$ ). Exprese Fn byla v NM rovnoměrná, kdy polovina vzorků byla pozitivní (Fn+) a druhá polovina negativní (Fn-). U MSR a SCC byla exprese převážně Fn+ (NM vs. MSR nebo SCC;  $p < 0.01$ ). Procentuálního zastoupení Ten, Fn a Gal-1 u NM, MSR a SCC je znázorněno na obr. 11.

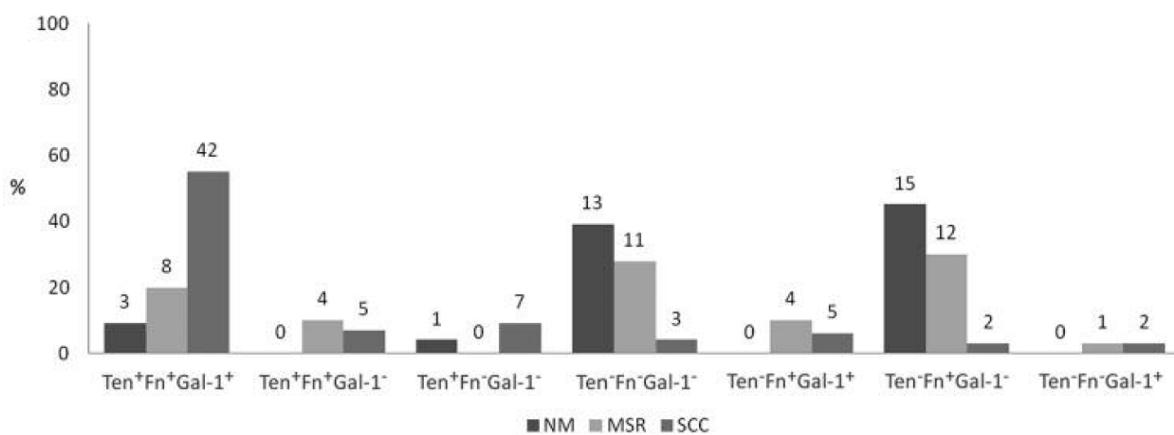
Společná koexprese Ten+, Fn+, Gal-1 pozitivních (Gal-1+) vzorků se vyskytovala častěji u SCC ( $n=42$ , 55 %) než u NM ( $n=3$ , 9 %  $p < 0.01$ ). Nejčastější kombinace markerů u NM byla Ten- Fn+, Gal-1 negativních (Gal-1-) ( $n=15$ , 45 %) a Ten- Fn+, Gal-1- ( $n=13$ ; 39 %). Tyto kombinace byly naopak vzácné u SCC Ten- Fn+, Gal-1- (3 %) a Ten- Fn+, Gal-1- (4 %;  $p < 0.01$ ). U vzorků MSR se vyskytovali kombinace Ten+ Fn+ Gal-1+ ( $n=8$ ; 24 %), Ten-Fn+Gal-1- ( $n=12$ ; 36 %) and Ten-Fn-Gal-1- ( $n=11$ ; 33 %) s podobnou četností ( $p=0.568$ ). Rozdíly v koexpresi jednotlivých markerů mezi SCC a MSR jsou statisticky významné ( $p < 0.05$ ). Procentuální zastoupení koexprese Ten, Fn a Gal-1 u NM, MSR a SCC je znázorněno na obr. 12.





**Obr. 11**

Imunohistochemická analýza procentuálního zastoupení Ten,Fn a Gal-1 u NM, MSR a SCC. Nad sloupce je uveden absolutní počet pozitivních/negativní vzorků. Na ose y procentuální zastoupení positivity/negativity sledovaného markeru  
 positive: prokázána přítomnost sledovaného markeru. negative: neprokázána přítomnost sledovaného markeru



**Obr. 12**

Procentuální rozdělení (%) vzorků podle kategorií imunohistochemické negativity (-) /pozitivity (+) pro Ten, Fn a Gal-1 u NM, MSR a SCC. Počet pacientů je uveden nad každým sloupcem. Na ose y procentuální zastoupení NM, MSR a SCC

#### 4.2.2 Vztah mezi expresí Ten, Fn, Gal-1 a přítomností uzlinových metastáz

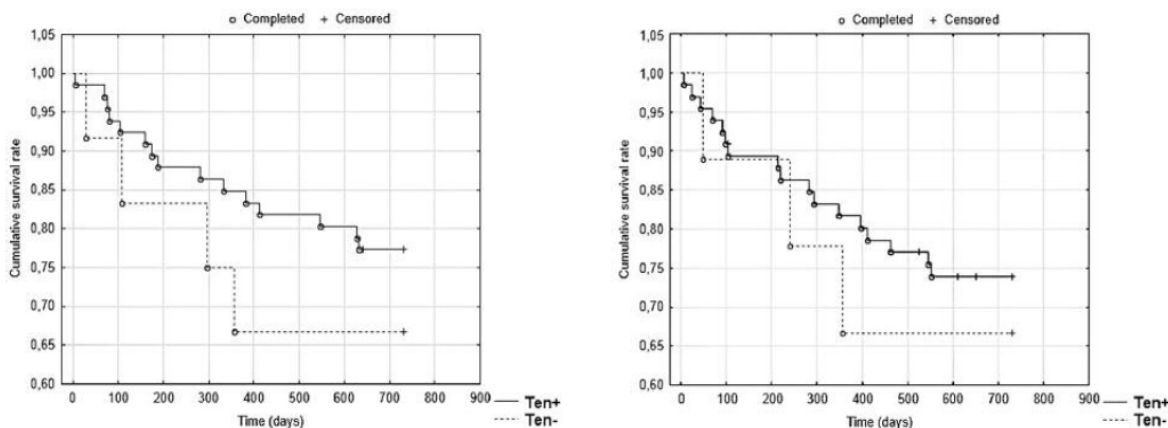
Nebyla zjištěna žádná statisticky signifikantní korelace mezi pozitivitou jednotlivých markerů a přítomností uzlinových metastáz (Ten:  $p=0.0715$ ; Fn:  $p=0.906$ ; Gal-1:  $p=0.963$ ).

#### 4.2.3 Vztah mezi expresí Ten, Fn a Gal-1 a přežitím pacienta

Bylo hodnoceno přežití pacienta (overall survival, OS) i přežití pacientů bez návratu onemocnění (disease free survival DFS), kde nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi 2letým a 5letým OS a DFS, u Ten+ a Ten- pacientů s SCC (obr. 13). U pacientů s Ten+ a Ten- resektátem (MSR) byl rozdíl mezi 2letým a 5letým OS a DFS významnější, nedosáhl ovšem statistické významnosti (2roky OS:  $p=0.168$ ; 5let OS:  $p=0.218$ ; 2roky DFS:  $p=0.0742$ ; 5let DFS:  $p=0.122$ ). U pacientů NM pozitivita pro tenascin (Ten+) statisticky významně zhoršila 5leté OS a DFS ( $p < 0.05$ ) (obr. 14).

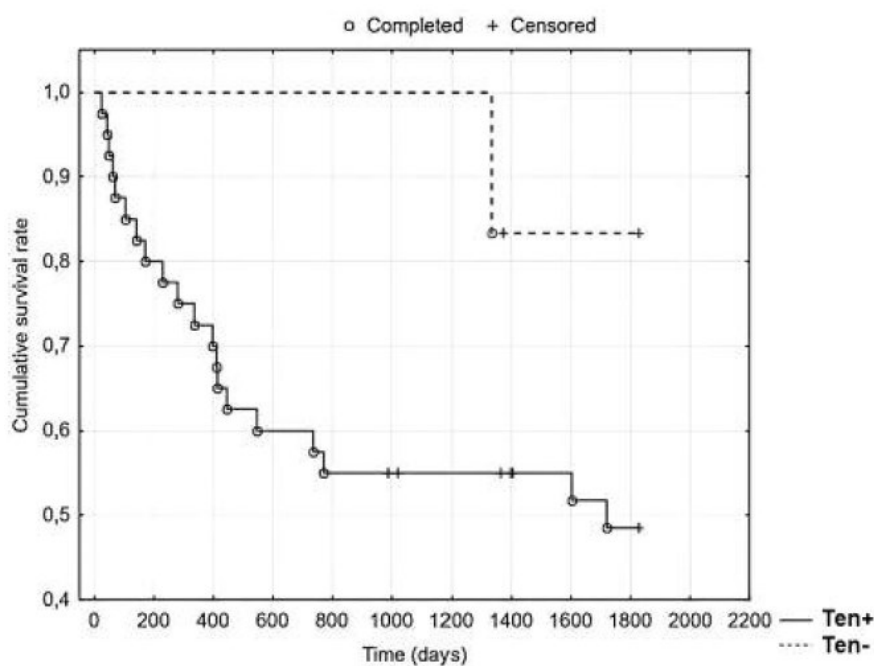
Nebyla zjištěna žádná signifikantní korelace mezi Fn + a Fn- pacienty s SCC, MSR a NM a 2/5letým a přežitím (OS a DFS).

2leté OS u Gal-1- SCC ukazovalo na lepší prognózu, data však nedosáhla statistické významnosti. Žádná další statisticky významná korelace mezi Gal-1+ a Gal-1- SCC, MSR a NM nebyla zjištěna.



Obr.13

Kaplan-Meierova křivka 2letého (obrázek vlevo – OS, obrázek vpravo – DFS) u Ten+ a Ten – SCC.



Obr. 14

Kaplan-Meierova křivka 5letého DFS u Ten+ a Ten – NM.

#### 4.2.4 Microarray analýza Ten– a Ten+ vzorků SCC

Při porovnání RNA profilu Ten– a Ten+ SCC byl zjištěn rozdíl v expresi 115 genů.

Analýza GSEA ontologie biologického procesu GO ukazuje na asociaci rozdílně transkribovaných genů ( $p < 0.005$ , odds ratio  $> 4$ , a minimálně 3 DEG v genovém setu) v *JAK-STAT* signalizační dráze (GO:0046427), *Gamma-aminobutyric acid* signalizační dráze (GO:0007214), *ncRNA* zpracování (GO:0034470) a *Positive regulation of STAT cascade* (GO:1904894). Výsledky shrnuty v tbl. 10.

Geny se zvýšenou expresí u Ten+ SCC jsou *argonaute 2 (AGO2)*, *pseudouridylate synthase 7 (PUS7)* a *preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)*. Naopak geny se sníženou expresí u Ten+ SCC jsou *V-set and transmembrane domain containing 2 like (VSTM2L)*, *iduronidase alpha-L- (IDUA)*, *beta-ureidopropionase 1 (UPB1)*, *cerebellin 2 precursor (CBLN2)*, *myosin light chain 9 (MYL9)*, *basal cell adhesion molecule (BCAM)*, *C1q and TNF related 1 (CIQTNF1)*, *glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3 (G6PC3)*, *claudin 18*

(*CLDN18*), *lysyl oxidase like 1 (LOXL1)*, *aldo-keto reductase family 7 member A3 (AKR7A3)*, *cathepsin E (CTSE)*, *LIF*, *interleukin 6 family cytokine (LIF)*, *retrotransposon gag like 8B (RTL8B)*. Výsledky jsou shrnuty v tbl. 11.

**Tbl. 10**

Analýza GSEA ontologie biologického procesu GO pro geny které jsou rozdílně transkribovány (DEG) u Ten+ a Ten- SCC ( $p < 0,005$ , odds ratio  $> 4$ , nejméně 3 DEG v genovém setu).

| Go Id      | GO term                                   | No. of genes with term | No. of DEG with term | Odds ratio | p-Value  |
|------------|---|------------------------|----------------------|------------|----------|
| GO:0007214 | Gamma-aminobutyric acid signaling pathway | 23                     | 3                    | 25.5       | 0.000345 |
| GO:0034470 | ncRNA processing                          | 392                    | 9                    | 4.17       | 0.000597 |
| GO:0046427 | Positive regulation of JAK-STAT cascade   | 73                     | 4                    | 9.92       | 0.000984 |
| GO:1904894 | Positive regulation of STAT cascade       | 73                     | 4                    | 9.92       | 0.000984 |

**Tbl. 11**

Srovnání genové exprese Ten+ a Ten – SCC. Up-regulated: zvýšená transkripce u Ten+ SCC ( $\log_{2}FC > 1$ ,  $q < 0,1$ ). Down-regulated: snížená transkripce genu u Ten+ SCC ( $\log_{2}FC < -1$ ,  $q < 0,1$ ).

| Entrez gene Id                | Gene symbol | Definition  | log <sub>2</sub> FC | q-Value |
|-------------------------------|-------------|---|---------------------|---------|
| Up-regulated in Ten+ tumors   |             |   |                     |         |
| 23532                         | PRAME       | Preferentially expressed antigen in melanoma        | 1.74                | 0.08    |
| 27161                         | AGO2        | Argonaute 2, RISC catalytic component               | 1.65                | 0.0386  |
| 54517                         | PUS7        | Pseudouridylylate synthase 7 (putative)             | 1.15                | 0.062   |
| Down-regulated in Ten+ tumors |             |   |                     |         |
| 128434                        | VSTM2L      | V-set and transmembrane domain containing 2 like    | -1.72               | 0.03    |
| 3425                          | IDUA        | Iduronidase, alpha-L-                               | -1.36               | 0.062   |
| 51733                         | UPB1        | Beta-ureidopropionase 1                             | -1.34               | 0.0375  |
| 147381                        | CBLN2       | Cerebellin 2 precursor                              | -1.31               | 0.03    |
| 10398                         | MYL9        | Myosin light chain 9                                | -1.22               | 0.062   |
| 4059                          | BCAM        | Basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group) | -1.19               | 0.00674 |
| 114897                        | C1QTNF1     | C1q and TNF related 1                               | -1.16               | 0.0364  |
| 92579                         | G6PC3       | Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3           | -1.14               | 0.0798  |
| 51208                         | CLDN18      | Claudin 18  | -1.12               | 0.0832  |
| 4016                          | LOXL1       | Lysyl oxidase like 1                                | -1.07               | 0.00485 |
| 22977                         | AKR7A3      | Aldo-keto reductase family 7 member A3              | -1.06               | 0.0832  |
| 1510                          | CTSE        | Cathepsin E   | -1.05               | 0.061   |
| 3976                          | LIF         | LIF, interleukin 6 family cytokine                  | -1.04               | 0.0832  |
| 441518                        | RTL8B       | Retrotransposon Gag like 8B                         | -1.01               | 0.0422  |

Při porovnání RNA profilu MSR mezi Ten– a Ten+ SCC byl zjištěn rozdíl ve 154 genech.

Analýza GSEA ontologie biologického procesu GO ukazuje na asociaci rozdílně transkribovaných genů ( $p < 0,005$ , odds ratio  $> 4$ , a minimálně 3 DEG v genovém setu) v *acylglycerol acyl-chain remodeling (GO:0036155)*, *regulation of sequestering of triglyceride (GO:0010889)*, *lipid storage (GO:0019915)*, *triglyceride biosynthetic process (GO:0019432)*, *fatty acid homeostasis (GO:0055089)*, *neutral lipid biosynthetic process (GO:0046460)*, *acylglycerol biosynthetic process (GO:0046463)*, *sequestering of triglyceride (GO:0030730)*, *brown fat cell differentiation (GO:0050873)*, *regulation of lipid storage (GO:0010883)*, *negative regulation of lipid storage (GO:0010888)*, *positive regulation of microtubule*

*polymerization (GO:0031116), positive regulation of microtubule polymer./depolymer (GO:0031112), response to aktivita (GO:0014823).* Výsledky jsou shrnuty v tbl. 12.

**Tbl. 12**

Analýza GSEA ontologie biologického procesu GO pro geny, které jsou rozdílně transkribovány (DEG) mezi MSR Ten+ a Ten – SCC (p <0,005, odds ration> 10, nejméně 3 DEG v genovém setu).

| Go Id      | GO term  | No. of genes with term | No. of DEG with term | Odds ratio | p-Value |
|------------|--|------------------------|----------------------|------------|---------|
| GO:0036155 | Acylglycerol acyl-chain remodeling                     | 7                      | 3                    | 104        | <0.0001 |
| GO:0010889 | Regulation of sequestering of triglyceride             | 11                     | 3                    | 52         | <0.0001 |
| GO:0019915 | Lipid storage  | 60                     | 5                    | 12.8       | <0.0001 |
| GO:0019432 | Triglyceride biosynthetic process                      | 32                     | 4                    | 20         | <0.0001 |
| GO:0055089 | Fatty acid homeostasis                                 | 13                     | 3                    | 41.6       | 0.0001  |
| GO:0046460 | Neutral lipid biosynthetic process                     | 34                     | 4                    | 18.6       | 0.0001  |
| GO:0046463 | Acylglycerol biosynthetic process                      | 34                     | 4                    | 18.6       | 0.0001  |
| GO:0030730 | Sequestering of triglyceride                           | 14                     | 3                    | 37.8       | 0.0001  |
| GO:0050873 | Brown fat cell differentiation                         | 37                     | 4                    | 16.9       | 0.0002  |
| GO:0010883 | Regulation of lipid storage                            | 40                     | 4                    | 15.5       | 0.0002  |
| GO:0010888 | Negative regulation of lipid storage                   | 17                     | 3                    | 29.7       | 0.0002  |
| GO:0031116 | Positive regulation of microtubule polymerization      | 21                     | 3                    | 23.1       | 0.0005  |
| GO:0031112 | Positive regulation of microtubule polymer./depolymer. | 24                     | 3                    | 19.8       | 0.0007  |
| GO:0014823 | Response to activity                                   | 59                     | 4                    | 10.2       | 0.0009  |

U MSR Ten+ SCC byla zjištěna zvýšená aktivita genu *signal recognition particle 9 (SRP9)*. Naopak geny se sníženou aktivitou byly: *thyroid hormone responsive (THRSP)*, *perilipin 4 (PLIN4)*, *G0/G1 switch 2 (G0S2)*, *perilipin 1 (PLIN1)*, *lipoprotein lipase (LPL)*, *superoxide dismutase 3 (SOD3)*, *regulator of G protein signaling 2 (RGS2)*, *lipase E*, *hormone sensitive type (LIPE)*, *melanocortin 2 receptor accessory protein (MRAP)*, *adiponectin*, *CIQ and collagen domain containing (ADIPOQ)*, *glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1)*, *plasmalemma vesicle associated protein (PLVAP)*, *R-spondin 3 (RSPO3)*, *leptin (LEP)*, *galectin 12 (LGALS12)*, *glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (GPAM)*, *patatin like phospholipase domain containing 2 (PNPLA2)*, *aquaporin 7 pseudogene 1 (AQP7P1)*, *aquaporin 7 (AQP7)*. Výsledky jsou shrnuty v tbl. 13.

**Tbl. 13**

Srovnání genové exprese mezi MSR Ten+ a Ten – SCC Up-regulated: zvýšená transkripce (logFC >1, q <0,1).  
Down-regulated: snížená transkripce genu (logFC < -1, q <0,1).

| Entrez gene Id                                     | Gene symbol    | Definition  | logFC | q-Value |
|--|----------------|---|-------|---------|
| Up-regulated in MSR of patients with Ten+ tumors   |                |   |       |         |
| 6726   | <i>SRP9</i>    | Signal recognition particle 9                       | 1.23  | 0.003   |
| Down-regulated in MSR of patients with Ten+ tumors |                |   |       |         |
| 7069   | <i>THRSP</i>   | Thyroid hormone responsive                          | -3.33 | <0.001  |
| 729359   | <i>PLIN4</i>   | Perilipin 4   | -3.03 | 0.09    |
| 50486  | <i>G0S2</i>    | G0/G1 switch 2                                      | -2.64 | 0.02    |
| 5346   | <i>PLIN1</i>   | Perilipin 1   | -2.47 | 0.08    |
| 4023   | <i>LPL</i>     | Lipoprotein lipase                                  | -2.07 | 0.09    |
| 6649   | <i>SOD3</i>    | Superoxide dismutase 3                              | -2.04 | 0.008   |
| 5997   | <i>RGS2</i>    | Regulator of G protein signaling 2                  | -1.92 | 0.09    |
| 3991   | <i>LIPE</i>    | Lipase E, hormone sensitive type                    | -1.8  | <0.001  |
| 56246  | <i>MRAP</i>    | Melanocortin 2 receptor accessory protein           | -1.8  | 0.008   |
| 9370   | <i>ADIPOQ</i>  | Adiponectin, C1Q and collagen domain containing     | -1.78 | 0.009   |
| 2819   | <i>GPD1</i>    | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1                | -1.7  | 0.01    |
| 83483  | <i>PLVAP</i>   | Plasmalemma vesicle associated protein              | -1.56 | 0.02    |
| 84870  | <i>RSPO3</i>   | R-spondin 3   | -1.51 | 0.1     |
| 3952   | <i>LEP</i>     | Leptin  | -1.39 | 0.008   |
| 85329  | <i>LGALS12</i> | Galectin 12   | -1.38 | 0.005   |
| 57678  | <i>GPAM</i>    | Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial | -1.31 | 0.08    |
| 57104  | <i>PNPLA2</i>  | Patatin like phospholipase domain containing 2      | -1.3  | 0.02    |
| 375719   | <i>AQP7P1</i>  | Aquaporin 7 pseudogene 1                            | -1.28 | 0.01    |
| 364  | <i>AQP7</i>    | Aquaporin 7   | -1.27 | <0.001  |

Expresní profil NM u Ten– a Ten+ SCC je podobný. Byla zjištěna rozdílná exprese u genů pro *RAB11B* (člen rodiny RAS onkogenů) a genu *pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor (PPDPF)*, nebyla ovšem dosažena statistická významnost (p=0.21).

## 5. DISKUZE

### 5.1 Cíl 1

TME má klíčovou roli umožňující přímé biologické ovlivnění nádorového parenchymu. Vzhledem k tomu, že u PDAC tvoří desmoplastické stroma až 90 % objemu nádoru, lze předpokládat jeho kruciólní význam (Opitz et al. 2021). U většiny nádorů je popisován tumor podporující vliv TME s pozitivním efektem na velikost, rychlost dělení a metastatický potenciál nádorových buněk a také schopnost nádoru odolávat imunitní reakci a protinádorové terapii (Li, Fan, and Houghton 2007; Lorusso and Ruegg 2008; Plzak et al. 2010; Anderson and Simon 2020). U nádorů pankreatu je ovšem role TME velmi variabilní a je popsána i jeho supresivní role při progresi nádorového bujení, a to jak experimentálními, tak i klinickými studii (Ho, Jaffee, and Zheng 2020; Ding et al. 2018). Jako příklad supresivního vlivu CAF na PDAC můžeme uvést studii, ve které bylo prokázáno, že deplece SMA pozitivních CAF způsobila řadu nepříznivých biologických efektů s horším přežitím zvířecích subjektů (Ozdemir et al. 2014). Zdá se, že biologický účinek CAF u PDAC, na rozdíl od jiných typů tumorů, má překvapivě spíše inhibiční než pronádorový efekt (Omary et al. 2007). Podobně variabilní výsledek interakce PANF s liniemi PDAC byl pozorován i v našich experimentech. Změna je pravděpodobně vyvolána jak rozdílným fenotypem, tak rozdílnou sensitivitou PDAC na parakrinní stimulaci PANF. Jednotlivé linie PDAC odpovídaly na vliv PANF různorodě z hlediska růstu, velikosti kolonií a variability fenotypu. Nejagresivnější chování bylo pozorováno u linie Panc-1 (zvýšení počtu buněk a velikosti kolonií, současná exprese vimentinu a K8), linie PaTu-8902 byla PANF naopak inhibována. Několik studií prokázalo, že agresivita a invazivita PDAC je závislá na EMT (Rhim et al. 2012; Alderton 2013). Epitelový fenotyp je hodnocen jako stabilní a proliferující, naopak mezenchymový jako schopný metastazovat. Metastazující PDAC měly častěji mezenchymální než epitelální charakter a nádory epitelálního fenotypu byly spojeny s delším přežitím bez metastáz (Ho, Jaffee, and Zheng 2020). Zajímavé je, že mezenchymální a epitelální podtypy vykazovaly různé odpovědi na chemoterapii (Mahadevan et al. 2019). Většina cirkulujících nádorových buněk má fenotyp jak epitelových tak mezenchymových buněk, což zvýrazňuje důležitost EMT v nádorové diseminaci (Thiery and Lim 2013). EMT je regulován sítí interakcí zahrnující epigenetické modifikace, transkripční faktory, alternativní splicing nebo proteinovou stabilitu atd. (Lamouille, Xu, and Derynck 2014). S EMT je spojena zvýšená exprese transkripčních faktorů

Snail, Slug, proteinu vimentinu a změna exprese E-cadherinu na N-cadherinu (Liu et al. 2015; Hotz et al. 2007). V našich experimentech proto byla hodnocena jejich přítomnost, resp. nepřítomnost.

Role PANF byla variabilní. PANF stimulace linií PANC-1 a MiaPaCa-2 prokázala up-regulaci sledovaných znaků. Linie PaTu-8902 a CAPAN-2 na straně druhé projevily jistou rezistenci vůči účinku PANF. Změny v přítomnosti různých keratinů u nádorových buněk PDAC byly popsány v několika studiích. Jejich přesná role v nádorové progresi není zatím jasně definována. Jako příklad můžeme uvést expresi K17 nebo K19. Exprese K19 je u kožních buněk a buněk vlasového folikulu spojována s kmenovým potenciálem, u PDAC je přítomna při maligní transformaci (Brembeck and Rustgi 2000). Abundantní exprese K17 u PDAC byla v některých studiích spojena s nejagresivnějším subtypem malignity pankreatu (Roa-Pena et al. 2019), na druhou stranu v jiných pracích byla up-regulace K17 definována protektivním účinkem, potlačením EMT a supresí nádorové proliferace (Zeng et al. 2020). CAF a jejich kondicionovaná média mají schopnost ovlivnit změnu exprese keratinů u nádorových buněk (Dvorankova et al. 2012). V rámci naší studie byl prokázán minimální vliv PANF na linii PDAC, pouze u linie PaTu-8902 byla kondicionovanými médii potencována exprese K19.

Prozánětlivé cytokiny jsou dysregulovány u mnoha biologických procesů. Při vzájemné interakci nádorová buňka-mikroprostředí je zásadní balance mezi pro a anti-inflamatorními cytokininy. Rozhodující dopad mají IL-6 a IL-8 (Padoan, Plebani, and Basso 2019). Hladina cirkulujícího IL6 je signifikantně zvýšena u pacientů s PDAC a pozitivně koreluje s nádorovou progresí a metastatickým potenciálem (Holmer et al. 2014; Kim, Lee, et al. 2017). Jako další příklad můžeme uvést studii na zvířecím modelu, ve které byla po blokaci IL-6 receptorů zvýšena efektivita chemoterapie (Long et al. 2017) nebo model s *in vitro* down-regulací produkce IL-6 s účinkem inhibice migrace buněk a EMT u PDAC linií Panc-1 a Aspc-1 (Guan et al. 2014). IL-8 je spojen s invazivitou, neovaskularizací a celkovou progresí PDAC (Matsuo et al. 2009). Jeho overexprese může být jedním z prediktivních faktorů PDAC (Chen et al. 2012). Bylo prokázáno, že simultánní blokace IL-6 a IL-8 může být cesta, jak inhibovat migraci nádorových buněk u melanomu a sarkomu (Jobe et al. 2016; Jayatilaka et al. 2017). Pro porovnání vlivu IL-6 a IL-8 v naší práci, byla srovnána jejich exprese a exprese jejich receptorů u linií PDAC, buněk z ascitu a zmražených řezů P10/P11. U všech zkoumaných vzorků byla prokázána vysoká pozitivita pro IL-6 a IL-6R, exprese IL-8 měla větší variabilitu a u zmražených řezů P10/P11 nebyl signál pro IL-8 a IL-8R přítomen vůbec. Proměnlivost v expresi IL-8 a IL-8R byla nicméně publikována i jinými skupinami (Hussain et al. 2010). S úmyslem prokázat nezbytnou minimální koncentraci interleukinů pro adekvátní biologickou



odpověď byla stanovena kvantita syntézy IL-6 a IL-8 PDAC liniemi a PANF a následně byl hodnocen vliv na jejich produkci při vzájemné interakci PDAC a PANF. Jak linie PDAC, tak HF a PANF produkovaly IL-6. Hladina IL-6 byla vyšší u PANF i HF než u všech linií. Linie PDAC secernovaly IL-8 ve větším množství než IL-6, u PANF i HF byla ale jeho produkce variabilnější. Na mRNA úrovni byla exprese IL-8 nižší u HF než u MELF. Při vzájemné interakci mezi PANF a liniemi PDAC se exprese IL 6 výrazně zvýšila. To ukazuje na regulaci produkce IL-6 jak nádorovými buňkami, tak i CAF. Naopak produkce IL-8 nebyla ovlivněna kondicionovanými médii z HF ani PANF, což může poukazovat na relativní autonomii v jeho produkci buňkami PDAC.

MFGE8 je protein vázící integriny a jeho primárně identifikovaná role byla ochrana novorozenců před rotaviróvou infekcí (Newburg et al. 1998). Má schopnost vazby na povrch apoptických buněk s následnou neefektivní imunitní odpovědí, je tak důležitým faktorem nádorové progresy (Sugano et al. 2011). Funkce MFGE8 u PDAC zatím není popsána. Stanovení expresního profilu a produkce proteinů potvrdilo výrazně vyšší expresi MFGE8 u PANF než u kontrolních HF. U linií PDAC byla vyšší sekrece MFGE8 prokázána pouze u Panc-1, nicméně u všech linií byla produkce MFGE8 zvýšena při dlouhodobé kultivaci. Exprese MFGE8 u HF i PANF byla významná a časově dependentní. Kondicionovaná média z HF i PANF ovšem dopad na zvýšení sekrece MFGE8 nádorovými buňkami neměla. To ukazuje na důležitou, relativně autonomní roli PANF v produkci MFGE8.

Zkoumáním transkriptomu HF a CAF se potvrdily rozdílné biologické vlastnosti a chování obou buněčných skupin. CAF mají geny se zvýšenou aktivitou pro cytokiny, které mají schopnost parakrinně stimulovat nádorové buňky a podpořit tak jejich proliferaci, invazivitu, angiogenezu, EMT a metastatický potenciál (Gonzalez et al. 2016; Papaccio et al. 2021). Při porovnání HF, MELF a PANF, které byly použity v předchozích experimentech, byl zjištěn rozdíl v několika KEGG drahách. Deregulována byla například signální dráha *TGF- $\beta$* , jedna z nejdůležitějších drah spojená s EMT (Xu, Lamouille, and Derynck 2009). PANF exprimovaly vyšší hodnoty *periostinu* spojeného s angiogenezí a EMT (Kanno et al. 2008; Liu et al. 2016) a *VEGF-A* který ovlivňuje nejen angiogenezu a vaskulární permeabilitu, ale také formování kmenových nádorových buněk nebo iniciaci nádorového bujení (Goel and Mercurio 2013). Nebyla prokázána významná nadprodukce *IL-6* a *IL-8*, naopak byl zvýšeně aktivován  *$\alpha$ SMA*. PANF představuje heterogenní populaci buněk s možností diversifikace funkcí při tvorbě reaktivního nádorového mikroprostředí. Obecně nejpočetnější zastoupení ve stromatu mají 2 linie PANF. První skupina je spojena s expresí  $\alpha$ SMA a nízkou produkcí zánětlivých cytokinů, zatímco druhou skupinu PANF charakterizuje vysoká produkce zánětlivých cytokinů

a absence  $\alpha$ SMA (Watt and Morton 2021). Expresní profil námi izolovaných PANF odpovídal první skupině s přítomností  $\alpha$ SMA a nízkou expresí zánětlivých cytokinů. Existuje několik hypotéz popisující možný původ CAF. Jedním z hlavních zdrojů CAF jsou lokální HF, podocyty a mezenchymové SC (Dvorankova et al. 2015). Imunohistochemické znázornění izolovaných PANF na vybrané cytokeratiny bylo negativní, ovšem transkript mRNA pro K8 a K19 byl u PANF detekován. Je diskutabilní, zda můžeme tímto způsobem predikovat EMT u CAF, protože exprese cytokeratinů byla zjištěna u HF nebo mezenchymových SC i za jiných podmínek (Yang et al. 2015; Tong et al. 2018; Chen et al. 2018).

U PDAC lze uvažovat, zda může být efekt látek cílených na TME závislý na jeho hustotě nebo charakteru (Torphy et al. 2018). Pomocí expresní aktivace genů lze TME klasifikovat jako normální nebo aktivované, z nichž každé přináší jinou prognózu onemocnění (Moffitt et al. 2015). TME není jednotná entita, ale poměrně heterogenní ekosystém. Zdá se, že terapie cílená na TME by mohla přinášet rozdílné účinky v důsledku jeho molekulární heterogenity.

## 5.1 Cíl 2

Imunohistochemické barvení potvrdilo častější koexpresi Ten, Fn a Gal-1 u vzorků SCC, v porovnání se vzorky NM a MSR. Jejich pozitivní vliv na nádorovou proliferaci, EMT, angiogenezi a nádorovou migraci je všeobecně přijímán (Yoshida, Akatsuka, and Imanaka-Yoshida 2015; Lin et al. 2019; Cousin and Cloninger 2016), ovšem vliv na prognózu pacienta je předmětem diskusí. Exprese Ten u CAF je spojována s vyšším stádiem onemocnění, přítomností uzlinových metastáz, klinickým stádiem a nádorovou rekurencí (Yang et al. 2016). Existují ale i práce, které nepopisují asociaci mezi přežitím a expresí Ten (Atula et al. 2003) nebo je popsána asociace pouze při expresi Ten ve stromální tkáni (Sundquist et al. 2017). Na základě metaanalýz je přítomnost Gal-1 v nádorech spojena s horší prognózou (Wu et al. 2018). Asociace mezi výskytem Fn a přežitím je sporná (Lin et al. 2019). V našem souboru ovšem žádný vztah mezi expresí těchto molekul a klinickým statusem pacientů prokázán nebyl.

V další fázi experimentu byla provedena celogenomová analýza transkriptomu a určen rozdíl v genové expresi mezi Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> SCC. Srovnání genového profilu identifikovalo rozdílnou expresi genů pro kinázy a genů pro receptory související s nádorovou proliferací.

Mezi geny se sníženou aktivitou u Ten<sup>-</sup> SCC patří *JAK2*. Tato strukturně non-receptorová kináza asociovaná s cytokininovými receptory se podílí na buněčné proliferaci, diferenciaci nebo histonové modifikaci a její overexprese je spojena se špatnou prognózou u

nasofaryngeálních karcinomů (He et al. 2016). Druhý prominentní gen se sníženou aktivitou je *Notch1*, který kontroluje diferenciaci buněk včetně EMT (Yu and Li 2022). *Notch1* je tak zapojen v mnoha vývojových procesech a mutacích asociovaných s různými typy leukémií a HNSCC (Leong et al. 2007; Cancer Genome Atlas 2015).

Mezi geny se zvýšenou aktivitou u Ten– SCC patří *LIF* a *BCAM*. *LIF* podporuje aktivaci HF u různých typů nádorů (Albregues et al. 2014). *BCAM* je asociován s nízkou diferencovanými keratinocyty a je exprimován u epiteliálních kožních tumorů nebo u zánětlivého procesu v epidermis (Schon et al. 2000). V další části mapování genové exprese byl hodnocen transkripční profil MSR na základě stratifikace Ten SCC. Ten– SCC měli v okolním MSR silnou aktivitu genů spojených s lipidovým metabolismem. Prominentním genem byl *LEP*, který hraje klíčovou roli v energetické bilanci a adaptaci organismu na hladovění (Mechanick, Zhao, and Garvey 2018), patří ale také mezi tumor podporující geny například u karcinomu prsu nebo jater (Barone et al. 2012; Xiong et al. 2014). *LEP* je zapojen do regulace ERK dráhy a JAK2-STAT signalizace, zároveň se podílí na up-regulaci proteinu BIRC5 a v neposlední řadě koriguje přítomnost MMP a TIMP (Jiang et al. 2008; Jiang, Li, and Rui 2008; Park et al. 2001). Nárůst exprese *LEP* koreloval s nadprodukcí *Gal-12*. *Gal-12* se podílí se na přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu a má vliv na regulaci růstu buněk, může být řazen do skupiny tumor supresorových genů (Yang et al. 2001). Alterovaná exprese *Gal-12* byla pozorována například u kolorektálního karcinomu (Katzenmaier et al. 2017). Dokumentovaná up-regulace *Gal-12* doplňuje mozaiku vědomostí o rodině galektinů, jejichž interakce s nádorovými buňkami byla poprvé popsána před více než 30 lety (Gabius, Engelhardt, and Cramer 1986). Naše výsledky odhalují výrazné rozdíly v genové expresi u vzorků stratifikovaných podle matrixového glykoproteinu Ten, nicméně bez prognostického významu. U MSR byl nejvýraznější rozdíl vyjádřen v genové expresi spojené s lipidovým metabolismem.

## 6. ZÁVĚR

TME má klíčovou roli umožňující přímé biologické ovlivnění nádorového parenchymu PDAC. Při interakci PANF s liniemi PDAC byl zjištěn jejich heterogenní efekt. Nejagresivnější chování z hlediska růstu buněk, velikosti kolonií a fenotypu bylo pozorováno u linie Panc-1, linie PaTu-8902 byla PANF naopak inhibována. PANF zvýšeně exprimovaly markery spojené s EMT (Snail, Slug, N-cadherin a vimentin) u linií Panc-1 a MiaPaCa-2. Vliv PANF na změnu exprese cytokeratinů byl minimální, pouze u linie PaTu-8902 byla potencována exprese K19. U linií PDAC, buněk z ascitu a P10/P11 byla prokázána vysoká pozitivita pro IL-6 a IL-6R. IL-6 produkovaly ve významném množství i samotné HF a PANF. Sekrece IL-6 byla při vzájemné interakci mezi PANF a liniemi PDAC výrazně potencována. Ačkoliv linie PDAC produkovaly významné množství IL-8, nebylo jeho množství ovlivněné kondicionovanými médii z HF ani PANF. Stanovení expresního profilu a produkce proteinů potvrdilo časově dependentní expresi MFGE8 u PANF a linie Panc-1. Stejně jako u IL-8 neměla kondicionovaná média z HF i PANF vliv na jeho sekreci.

Analýza transkriptomu PANF prokázala vyšší hodnoty mRNA u některých genů například *periostinu*, *VEGF-A* a  *$\alpha$ SMA*, překvapivě nebyla prokázána významná exprese *IL-6* a *IL-8*. U PANF byl dále prokázán transkript pro K8 a K19, což by mohla být známka jejich epiteliálního původu a EMT.

Získaná data doplňují mozaiku interakce mezi PANF a buňkami PDAC, vzhledem k její variabilitě lze predikovat budoucnost léčebné strategie PDAC spíše v její individualizaci pro konkrétního pacienta.

Imunohistochemické barvení potvrdilo častější koexpresi Ten, Fn a Gal-1 u vzorků SCC, v porovnání se vzorky NM a MSR. Srovnání genového profilu mezi Ten+ a Ten– SCC identifikovalo rozdílnou expresi genů pro kinázy a genů pro receptory související s nádorovou proliferací.

K důležitým genům se sníženou aktivitou u Ten– SCC patří *JAK2* a *Notch1*. Mezi geny s relevantně zvýšenou aktivitou u Ten– SCC patří *LIF* nebo *BCAM*.

Ten– SCC měli v okolním MSR silnou aktivitu genů spojených s lipidovým metabolismem, prominentním genem byl LEP. Naše výsledky odhalují výrazné rozdíly v genové expresi u vzorků stratifikovaných podle matrixového glykoproteinu Ten, nicméně bez prognostického významu.

## 7. LITERATURA

- Ai, L., J. Chen, H. Yan, Q. He, P. Luo, Z. Xu, and X. Yang. 2020. 'Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy', *Drug Des Devel Ther*, 14: 3625-49.
- Albregues, J., I. Bourget, C. Pons, V. Butet, P. Hofman, S. Tartare-Deckert, C. C. Feral, G. Meneguzzi, and C. Gaggioli. 2014. 'LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer', *Cell Rep*, 7: 1664-78.
- Alderton, G. K. 2013. 'Metastasis: Epithelial to mesenchymal and back again', *Nat Rev Cancer*, 13: 3.
- Amano, M., H. Eriksson, J. C. Manning, K. M. Detjen, S. Andre, S. Nishimura, J. Lehtio, and H. J. Gabius. 2012. 'Tumour suppressor p16(INK4a) - anoikis-favouring decrease in N/O-glycan/cell surface sialylation by down-regulation of enzymes in sialic acid biosynthesis in tandem in a pancreatic carcinoma model', *FEBS J*, 279: 4062-80.
- Amend, S. R., and K. J. Pienta. 2015. 'Ecology meets cancer biology: the cancer swamp promotes the lethal cancer phenotype', *Oncotarget*, 6: 9669-78.
- Anderson, N. M., and M. C. Simon. 2020. 'The tumor microenvironment', *Curr Biol*, 30: R921-R25.
- Appleby, T. C., A. E. Greenstein, M. Hung, A. Licican, M. Velasquez, A. G. Villasenor, R. Wang, M. H. Wong, X. Liu, G. A. Papalia, B. E. Schultz, R. Sakowicz, V. Smith, and H. J. Kwon. 2017. 'Biochemical characterization and structure determination of a potent, selective antibody inhibitor of human MMP9', *J Biol Chem*, 292: 6810-20.
- Apte, M. V., P. S. Haber, S. J. Darby, S. C. Rodgers, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola, and J. S. Wilson. 1999. 'Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis', *Gut*, 44: 534-41.
- Apte, M. V., S. Park, P. A. Phillips, N. Santucci, D. Goldstein, R. K. Kumar, G. A. Ramm, M. Buchler, H. Friess, J. A. McCarroll, G. Keogh, N. Merrett, R. Pirola, and J. S. Wilson. 2004. 'Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells', *Pancreas*, 29: 179-87.
- Asmana Ningrum, R. 2014. 'Human interferon alpha-2b: a therapeutic protein for cancer treatment', *Scientifica (Cairo)*, 2014: 970315.
- Atula, T., J. Hedstrom, P. Finne, I. Leivo, M. Markkanen-Leppanen, and C. Haglund. 2003. 'Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma', *Anticancer Res*, 23: 3051-6.
- Augsten, M., C. Hagglof, E. Olsson, C. Stolz, P. Tsagozis, T. Levchenko, M. J. Frederick, A. Borg, P. Micke, L. Egevad, and A. Ostman. 2009. 'CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 3414-9.
- Augsten, M., E. Sjoberg, O. Frings, S. U. Vorrink, J. Frijhoff, E. Olsson, A. Borg, and A. Ostman. 2014. 'Cancer-associated fibroblasts expressing CXCL14 rely upon NOS1-derived nitric oxide signaling for their tumor-supporting properties', *Cancer Res*, 74: 2999-3010.
- Barone, I., S. Catalano, L. Gelsomino, S. Marsico, C. Giordano, S. Panza, D. Bonofiglio, G. Bossi, K. R. Covington, S. A. Fuqua, and S. Ando. 2012. 'Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells', *Cancer Res*, 72: 1416-27.
- Basso, D., P. Fogar, M. Falconi, E. Fadi, C. Sperti, C. Frasson, E. Greco, D. Tamburrino, S. Teolato, S. Moz, D. Bozzato, M. Pelloso, A. Padoan, G. De Franchis, E. Gnatta, M. Facco, C. F. Zambon, F. Navaglia, C. Pasquali, G. Basso, G. Semenzato, S. Pedrazzoli, P. Pederzoli, and M. Plebani. 2013. 'Pancreatic tumors and immature immunosuppressive myeloid cells in blood and spleen: role of inhibitory co-stimulatory molecules PDL1 and CTLA4. An in vivo and in vitro study', *PLoS One*, 8: e54824.
- Beatty, G. L., E. G. Chiorean, M. P. Fishman, B. Saboury, U. R. Teitelbaum, W. Sun, R. D. Huhn, W. Song, D. Li, L. L. Sharp, D. A. Torigian, P. J. O'Dwyer, and R. H. Vonderheide. 2011. 'CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans', *Science*, 331: 1612-6.

- Becker, A. E., Y. G. Hernandez, H. Frucht, and A. L. Lucas. 2014. 'Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection', *World J Gastroenterol*, 20: 11182-98.
- Berndt, A., P. Richter, H. Kosmehl, and M. Franz. 2015. 'Tenascin-C and carcinoma cell invasion in oral and urinary bladder cancer', *Cell Adh Migr*, 9: 105-11.
- Best, S. R., K. J. Niparko, and S. I. Pai. 2012. 'Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers', *Otolaryngol Clin North Am*, 45: 807-22.
- Biankin, A. V., and A. Maitra. 2015. 'Subtyping Pancreatic Cancer', *Cancer Cell*, 28: 411-13.
- Bierie, B., D. G. Stover, A. Chytil, A. E. Gorska, M. Aakre, E. Forrester, L. Yang, K. U. Wagner, and H. L. Moses. 2008. 'Transforming growth factor-beta regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment', *Cancer Res*, 68: 1809-19.
- Biffi, G., T. E. Oni, B. Spielman, Y. Hao, E. Elyada, Y. Park, J. Preall, and D. A. Tuveson. 2019. 'IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGFbeta to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Discov*, 9: 282-301.
- Bird, L. 2023. 'mRNA vaccine for treating pancreatic cancer', *Nat Rev Immunol*.
- Bird, T., F. De Felice, A. Michaelidou, S. Thavaraj, J. P. Jeannon, A. Lyons, R. Oakley, R. Simo, M. Lei, and T. Guerrero Urbano. 2017. 'Outcomes of intensity-modulated radiotherapy as primary treatment for oropharyngeal squamous cell carcinoma - a European single institution analysis', *Clin Otolaryngol*, 42: 115-22.
- Blair, A. B., V. M. Kim, S. T. Muth, M. T. Saung, N. Lokker, B. Blouw, T. D. Armstrong, E. M. Jaffee, T. Tsujikawa, L. M. Coussens, J. He, R. A. Burkhart, C. L. Wolfgang, and L. Zheng. 2019. 'Dissecting the Stromal Signaling and Regulation of Myeloid Cells and Memory Effector T Cells in Pancreatic Cancer', *Clin Cancer Res*, 25: 5351-63.
- Bollag, G., J. Tsai, J. Zhang, C. Zhang, P. Ibrahim, K. Nolop, and P. Hirth. 2012. 'Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer', *Nat Rev Drug Discov*, 11: 873-86.
- Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb. 2014. 'Remodelling the extracellular matrix in development and disease', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 786-801.
- Bramhall, S. R., J. P. Neoptolemos, G. W. Stamp, and N. R. Lemoine. 1997. 'Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma', *J Pathol*, 182: 347-55.
- Brembeck, F. H., and A. K. Rustgi. 2000. 'The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GSKF/KLF4 and Sp1', *J Biol Chem*, 275: 28230-9.
- Briukhovetska, D., J. Dorr, S. Endres, P. Libby, C. A. Dinarello, and S. Kobold. 2021. 'Interleukins in cancer: from biology to therapy', *Nat Rev Cancer*, 21: 481-99.
- Bromberg, J., and T. C. Wang. 2009. 'Inflammation and Cancer: IL-6 and STAT3 Complete the Link', *Cancer Cell*, 15: 79-80.
- Bughda, R., P. Dimou, R. R. D'Souza, and A. Klampatsa. 2021. 'Fibroblast Activation Protein (FAP)-Targeted CAR-T Cells: Launching an Attack on Tumor Stroma', *Immunotargets Ther*, 10: 313-23.
- Buglioni, S., P. Vici, D. Sergi, L. Pizzuti, L. Di Lauro, B. Antoniani, F. Sperati, I. Terrenato, M. Carosi, T. Gamucci, C. Vincenzoni, L. Mariani, E. Vizza, A. Venuti, G. Sanguineti, A. Gadducci, M. Barba, C. Natoli, I. Vitale, M. Mottolise, R. De Maria, and M. Maugeri-Sacca. 2016. 'Analysis of the hippo transducers TAZ and YAP in cervical cancer and its microenvironment', *Oncoimmunology*, 5: e1160187.
- Buchbinder, E. I., and A. Desai. 2016. 'CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition', *Am J Clin Oncol*, 39: 98-106.
- Burger, J. A., D. J. Stewart, O. Wald, and A. Peled. 2011. 'Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung cancer', *Expert Rev Anticancer Ther*, 11: 621-30.
- Cai, W. Q., L. S. Zeng, L. F. Wang, Y. Y. Wang, J. T. Cheng, Y. Zhang, Z. W. Han, Y. Zhou, S. L. Huang, X. W. Wang, X. C. Peng, Y. Xiang, Z. Ma, S. Z. Cui, and H. W. Xin. 2020. 'The Latest Battles Between EGFR Monoclonal Antibodies and Resistant Tumor Cells', *Front Oncol*, 10: 1249.

- Calvo, F., N. Ege, A. Grande-Garcia, S. Hooper, R. P. Jenkins, S. I. Chaudhry, K. Harrington, P. Williamson, E. Moeendarbary, G. Charras, and E. Sahai. 2013. 'Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts', *Nat Cell Biol*, 15: 637-46.
- Cancer Genome Atlas, Network. 2015. 'Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas', *Nature*, 517: 576-82.
- Cannarile, M. A., M. Weisser, W. Jacob, A. M. Jegg, C. H. Ries, and D. Ruttinger. 2017. 'Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy', *J Immunother Cancer*, 5: 53.
- Carter, J., and P. Tadi. 2022. 'Erlotinib.' in *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Carvalho, B. S., and R. A. Irizarry. 2010. 'A framework for oligonucleotide microarray preprocessing', *Bioinformatics*, 26: 2363-7.
- Cedeno-Laurent, F., and C. J. Dimitroff. 2012. 'Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity', *Glycoconj J*, 29: 619-25.
- Cicenas, J., K. Kvederaviciute, I. Meskinyte, E. Meskinyte-Kausiliene, A. Skeberdyte, and J. Cicenas. 2017. 'KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer', *Cancers (Basel)*, 9.
- Cirri, P., and P. Chiarugi. 2011. 'Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin', *Am J Cancer Res*, 1: 482-97.
- Civenni, G., N. Longoni, P. Costales, C. Dallavalle, C. Garcia Inclan, D. Albino, L. E. Nunez, F. Moris, G. M. Carbone, and C. V. Catapano. 2016. 'EC-70124, a Novel Glycosylated Indolocarbazole Multikinase Inhibitor, Reverts Tumorigenic and Stem Cell Properties in Prostate Cancer by Inhibiting STAT3 and NF-kappaB', *Mol Cancer Ther*, 15: 806-18.
- Clayton, A., R. A. Evans, E. Pettit, M. Hallett, J. D. Williams, and R. Steadman. 1998. 'Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1', *J Cell Sci*, 111 ( Pt 4): 443-53.
- Conroy, T., F. Castan, A. Lopez, A. Turpin, M. Ben Abdelghani, A. C. Wei, E. Mitry, J. J. Biagi, L. Evesque, P. Artru, T. Lecomte, E. Assenat, L. Bauguion, M. Ychou, O. Bouche, L. Monard, A. Lambert, P. Hammel, Group Canadian Cancer Trials, and G. I. Prodiges Group the Unicancer. 2022. 'Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer: A Randomized Clinical Trial', *JAMA Oncol*, 8: 1571-78.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bannoun, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, Unicancer Groupe Tumeurs Digestives of, and Prodiges Intergroup. 2011. 'FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer', *N Engl J Med*, 364: 1817-25.
- Conroy, T., P. Hammel, M. Hebbar, M. Ben Abdelghani, A. C. Wei, J. L. Raoul, L. Chone, E. Francois, P. Artru, J. J. Biagi, T. Lecomte, E. Assenat, R. Faroux, M. Ychou, J. Volet, A. Sauvanet, G. Breysacher, F. Di Fiore, C. Cripps, P. Kavan, P. Texereau, K. Bouhier-Leporrier, F. Khemissa-Akouz, J. L. Legoux, B. Juzyna, S. Gourgou, C. J. O'Callaghan, C. Jouffroy-Zeller, P. Rat, D. Malka, F. Castan, J. B. Bachet, Group Canadian Cancer Trials, and G. I. Prodiges Group the Unicancer. 2018. 'FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer', *N Engl J Med*, 379: 2395-406.
- Correia, A. L., and M. J. Bissell. 2012. 'The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance', *Drug Resist Updat*, 15: 39-49.
- Cousin, J. M., and M. J. Cloninger. 2016. 'The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1', *Int J Mol Sci*, 17.
- Curry, J. M., J. Sprandio, D. Cognetti, A. Luginbuhl, V. Bar-ad, E. Pribitkin, and M. Tuluc. 2014. 'Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma', *Semin Oncol*, 41: 217-34.

- Dayyani, F., C. J. Etzel, M. Liu, C. H. Ho, S. M. Lippman, and A. S. Tsao. 2010. 'Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)', *Head Neck Oncol*, 2: 15.
- de Almeida, J. R., R. Li, J. S. Magnuson, R. V. Smith, E. Moore, G. Lawson, M. Remacle, I. Ganly, D. H. Kraus, M. S. Teng, B. A. Miles, H. White, U. Duvvuri, R. L. Ferris, V. Mehta, K. Kiyosaki, E. J. Damrose, S. J. Wang, M. E. Kupferman, Y. W. Koh, E. M. Genden, and F. C. Holsinger. 2015. 'Oncologic Outcomes After Transoral Robotic Surgery: A Multi-institutional Study', *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 141: 1043-51.
- de Kruijf, E. M., J. G. van Nes, C. J. van de Velde, H. Putter, V. T. Smit, G. J. Liefers, P. J. Kuppen, R. A. Tollenaar, and W. E. Mesker. 2011. 'Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients', *Breast Cancer Res Treat*, 125: 687-96.
- Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study, Group, G. T. Wolf, S. G. Fisher, W. K. Hong, R. Hillman, M. Spaulding, G. E. Laramore, J. W. Endicott, K. McClatchey, and W. G. Henderson. 1991. 'Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer', *N Engl J Med*, 324: 1685-90.
- Dhawan, P., and A. Richmond. 2002. 'Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma', *J Leukoc Biol*, 72: 9-18.
- Ding, S. M., A. L. Lu, W. Zhang, L. Zhou, H. Y. Xie, S. S. Zheng, and Q. Y. Li. 2018. 'The role of cancer-associated fibroblast MRC-5 in pancreatic cancer', *J Cancer*, 9: 614-28.
- Domanska, U. M., H. Timmer-Bosscha, W. B. Nagengast, T. H. Oude Munnink, R. C. Kruizinga, H. J. Ananias, N. M. Kliphuis, G. Huls, E. G. De Vries, I. J. de Jong, and A. M. Walenkamp. 2012. 'CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy', *Neoplasia*, 14: 709-18.
- Domvri, K., S. Petanidis, P. Zarogoulidis, D. Anestakis, D. Tsavlis, C. Bai, H. Huang, L. Freitag, W. Hohenforst-Schmidt, K. Porpodis, and T. Katopodi. 2021. 'Treg-dependent immunosuppression triggers effector T cell dysfunction via the STING/ILC2 axis', *Clin Immunol*, 222: 108620.
- Dougan, S. K. 2017. 'The Pancreatic Cancer Microenvironment', *Cancer J*, 23: 321-25.
- Du, Y. E., G. Tu, G. Yang, G. Li, D. Yang, L. Lang, L. Xi, K. Sun, Y. Chen, K. Shu, H. Liao, M. Liu, and Y. Hou. 2017. 'MiR-205/YAP1 in Activated Fibroblasts of Breast Tumor Promotes VEGF-independent Angiogenesis through STAT3 Signaling', *Theranostics*, 7: 3972-88.
- Dumitru, C. A., H. Gholaman, S. Trellakis, K. Bruderek, N. Dominas, X. Gu, A. Bankfalvi, T. L. Whiteside, S. Lang, and S. Brandau. 2011. 'Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation', *Int J Cancer*, 129: 859-69.
- Duray, A., S. Demoulin, P. Hubert, P. Delvenne, and S. Saussez. 2010. 'Immune suppression in head and neck cancers: a review', *Clin Dev Immunol*, 2010: 701657.
- Dvorak, H. F. 1986. 'Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing', *N Engl J Med*, 315: 1650-9.
- Dvorankova, B., L. Lacina, and K. Smetana, Jr. 2019. 'Isolation of Normal Fibroblasts and Their Cancer-Associated Counterparts (CAFs) for Biomedical Research', *Methods Mol Biol*, 1879: 393-406.
- Dvorankova, B., K. Smetana, Jr., B. Rihova, J. Kucera, R. Mateu, and P. Szabo. 2015. 'Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice', *Histochem Cell Biol*, 143: 463-9.
- Dvorankova, B., P. Szabo, L. Lacina, P. Gal, J. Uhrova, T. Zima, H. Kaltner, S. Andre, H. J. Gabius, E. Sykova, and K. Smetana, Jr. 2011. 'Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair', *Cells Tissues Organs*, 194: 469-80.



- Dvorankova, B., P. Szabo, L. Lacina, O. Kodet, E. Matouskova, and K. Smetana, Jr. 2012. 'Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line', *Histochem Cell Biol*, 137: 679-85.
- El-Rouby, D. H. 2010. 'Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas', *J Oral Pathol Med*, 39: 559-64.
- Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, and R. J. Noelle. 2009. 'Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system', *Immunol Rev*, 229: 152-72.
- Ellington, T. D., S. J. Henley, V. Senkomago, M. E. O'Neil, R. J. Wilson, S. Singh, C. C. Thomas, M. Wu, and L. C. Richardson. 2020. 'Trends in Incidence of Cancers of the Oral Cavity and Pharynx - United States 2007-2016', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 69: 433-38.
- Elyada, E., M. Bolisetty, P. Laise, W. F. Flynn, E. T. Courtois, R. A. Burkhart, J. A. Teinor, P. Belleau, G. Biffi, M. S. Lucito, S. Sivajothi, T. D. Armstrong, D. D. Engle, K. H. Yu, Y. Hao, C. L. Wolfgang, Y. Park, J. Preall, E. M. Jaffee, A. Califano, P. Robson, and D. A. Tuveson. 2019. 'Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts', *Cancer Discov*, 9: 1102-23.
- Esposito, I., J. Kleeff, F. Bergmann, C. Reiser, E. Herpel, H. Friess, P. Schirmacher, and M. W. Buchler. 2008. 'Most pancreatic cancer resections are R1 resections', *Ann Surg Oncol*, 15: 1651-60.
- Feig, C., J. O. Jones, M. Kraman, R. J. Wells, A. Deonarine, D. S. Chan, C. M. Connell, E. W. Roberts, Q. Zhao, O. L. Caballero, S. A. Teichmann, T. Janowitz, D. I. Jodrell, D. A. Tuveson, and D. T. Fearon. 2013. 'Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 20212-7.
- Ferrara, N. 2010. 'Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis', *Cytokine Growth Factor Rev*, 21: 21-6.
- Ferris, R. L., T. L. Whiteside, and S. Ferrone. 2006. 'Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer', *Clin Cancer Res*, 12: 3890-5.
- Fidler, I. J. 2003. 'The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited', *Nat Rev Cancer*, 3: 453-8.
- Forastiere, A. A., H. Goepfert, M. Maor, T. F. Pajak, R. Weber, W. Morrison, B. Glisson, A. Trotti, J. A. Ridge, C. Chao, G. Peters, D. J. Lee, A. Leaf, J. Ensley, and J. Cooper. 2003. 'Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer', *N Engl J Med*, 349: 2091-8.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree. 2006. 'Clonogenic assay of cells in vitro', *Nat Protoc*, 1: 2315-9.
- Franz, M., T. Hansen, P. Richter, L. Borsi, F. D. Bohmer, P. Hyclel, P. Schleier, D. Katenkamp, L. Zardi, H. Kosmehl, and A. Berndt. 2006. 'Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front', *Histochem Cell Biol*, 126: 125-31.
- Fujita, H., K. Ohuchida, K. Mizumoto, T. Egami, K. Miyoshi, T. Moriyama, L. Cui, J. Yu, M. Zhao, T. Manabe, and M. Tanaka. 2009. 'Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells', *Cancer Sci*, 100: 2309-17.
- Fukuda, A., S. C. Wang, J. P. th Morris, A. E. Folias, A. Liou, G. E. Kim, S. Akira, K. M. Boucher, M. A. Firpo, S. J. Mulvihill, and M. Hebrok. 2011. 'Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression', *Cancer Cell*, 19: 441-55.
- Fukui, H., X. Zhang, C. Sun, K. Hara, S. Kikuchi, T. Yamasaki, T. Kondo, T. Tomita, T. Oshima, J. Watari, J. Imura, T. Fujimori, M. Sasako, and H. Miwa. 2014. 'IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling', *Br J Cancer*, 111: 763-71.

- Gabius, H. J., R. Engelhardt, and F. Cramer. 1986. 'Endogenous tumor lectins: overview and perspectives', *Anticancer Res*, 6: 573-8.
- Gabrilovich, D. I. 2017. 'Myeloid-Derived Suppressor Cells', *Cancer Immunol Res*, 5: 3-8.
- Galdiero, M. R., C. Garlanda, S. Jaillon, G. Marone, and A. Mantovani. 2013. 'Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression', *J Cell Physiol*, 228: 1404-12.
- Gama, R. R., A. L. Carvalho, A. Longatto Filho, A. P. Scorsato, R. V. Lopez, J. Rautava, S. Syrjanen, and K. Syrjanen. 2016. 'Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis', *Laryngoscope*, 126: 885-93.
- Gao, S. P., K. G. Mark, K. Leslie, W. Pao, N. Motoi, W. L. Gerald, W. D. Travis, W. Bornmann, D. Veach, B. Clarkson, and J. F. Bromberg. 2007. 'Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas', *J Clin Invest*, 117: 3846-56.
- Garcia, J., H. I. Hurwitz, A. B. Sandler, D. Miles, R. L. Coleman, R. Deurloo, and O. L. Chinot. 2020. 'Bevacizumab (Avastin(R)) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook', *Cancer Treat Rev*, 86: 102017.
- Gettinger, S., L. Horn, D. Jackman, D. Spigel, S. Antonia, M. Hellmann, J. Powderly, R. Heist, L. V. Sequist, D. C. Smith, P. Leming, W. J. Geese, D. Yoon, A. Li, and J. Brahmer. 2018. 'Five-Year Follow-Up of Nivolumab in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From the CA209-003 Study', *J Clin Oncol*, 36: 1675-84.
- Gialeli, C., D. Nikitovic, D. Kletsas, A. D. Theocharis, G. N. Tzanakakis, and N. K. Karamanos. 2014. 'PDGF/PDGFR signaling and targeting in cancer growth and progression: Focus on tumor microenvironment and cancer-associated fibroblasts', *Curr Pharm Des*, 20: 2843-8.
- Glas, J., H. P. Toeroek, A. Schneider, G. Bruennler, R. Kopp, E. D. Albert, M. Stolte, C. Folwaczny, and C. Folwaczny. 2004. 'Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene: An independent genetic risk factor in early gastric cancer', *Gastroenterology*, 126: A453-A53.
- Goel, H. L., and A. M. Mercurio. 2013. 'VEGF targets the tumour cell', *Nat Rev Cancer*, 13: 871-82.
- Goldenberg, D., S. Begum, W. H. Westra, Z. Khan, J. Sciubba, S. I. Pai, J. A. Califano, R. P. Tufano, and W. M. Koch. 2008. 'Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon', *Head Neck*, 30: 898-903.
- Gomes, A. M., M. P. Stelling, and M. S. Pavao. 2013. 'Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression', *Biomed Res Int*, 2013: 852093.
- Gonzalez-Aparicio, M., and C. Alfaro. 2020. 'Significance of the IL-8 pathway for immunotherapy', *Hum Vaccin Immunother*, 16: 2312-17.
- Gonzalez, L., N. Eiro, B. Fernandez-Garcia, L. O. Gonzalez, F. Dominguez, and F. J. Vizoso. 2016. 'Gene expression profile of normal and cancer-associated fibroblasts according to intratumoral inflammatory cells phenotype from breast cancer tissue', *Mol Carcinog*, 55: 1489-502.
- Gore, J., and M. Korc. 2014. 'Pancreatic cancer stroma: friend or foe?', *Cancer Cell*, 25: 711-2.
- Grover, S., S. Swisher-McClure, N. Mitra, J. Li, R. B. Cohen, P. H. Ahn, J. N. Lukens, A. A. Chalian, G. S. Weinstein, B. W. O'Malley, Jr., and A. Lin. 2015. 'Total Laryngectomy Versus Larynx Preservation for T4a Larynx Cancer: Patterns of Care and Survival Outcomes', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 92: 594-601.
- Guan, J., H. Zhang, Z. Wen, Y. Gu, Y. Cheng, Y. Sun, T. Zhang, C. Jia, Z. Lu, and J. Chen. 2014. 'Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells', *Cancer Lett*, 345: 132-9.
- Gudleviciene, Z., J. Didziapetriene, I. Mackeviciene, S. Cicenias, R. Smolyakova, and A. Zhukavetc. 2014. 'Prevalence of human papillomaviruses in patients with head and neck squamous cell carcinoma in Lithuania and Belarus', *J Med Virol*, 86: 531-5.
- Hamad, A., J. Underhill, A. Ansari, V. Thayaparan, J. M. Cloyd, Y. Li, T. M. Pawlik, A. Tsung, L. Abushahin, and A. Ejaz. 2022. 'Surgical treatment of hepatic oligometastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: An analysis of the National Cancer Database', *Surgery*, 171: 1464-70.

- Hamburger, A. W., and S. E. Salmon. 1977. 'Primary bioassay of human tumor stem cells', *Science*, 197: 461-3.
- Hammarstedt, L., D. Lindquist, H. Dahlstrand, M. Romanitan, L. O. Dahlgren, J. Joneberg, N. Creson, J. Lindholm, W. Ye, T. Dalianis, and E. Munck-Wikland. 2006. 'Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer', *Int J Cancer*, 119: 2620-3.
- Hartl, D. M., and D. F. Brasnu. 2015. 'Contemporary Surgical Management of Early Glottic Cancer', *Otolaryngol Clin North Am*, 48: 611-25.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2001. 'Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo', *J Exp Med*, 194: 769-79.
- Hay, A., and I. J. Nixon. 2018. 'Recent advances in the understanding and management of oropharyngeal cancer', *F1000Res*, 7.
- He, H. L., Y. E. Lee, P. I. Liang, S. W. Lee, T. J. Chen, T. C. Chan, C. H. Hsing, I. W. Chang, Y. L. Shiue, and C. F. Li. 2016. 'Overexpression of JAK2: a predictor of unfavorable prognosis for nasopharyngeal carcinoma', *Future Oncol*, 12: 1887-96.
- He, J., and L. G. Baum. 2004. 'Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death', *J Biol Chem*, 279: 4705-12.
- Hebrok, M., S. K. Kim, B. St Jacques, A. P. McMahon, and D. A. Melton. 2000. 'Regulation of pancreas development by hedgehog signaling', *Development*, 127: 4905-13.
- Heckmann, D., P. Maier, S. Laufs, F. Wenz, W. J. Zeller, S. Fruehauf, and H. Allgayer. 2013. 'CXCR4 Expression and Treatment with SDF-1alpha or Plerixafor Modulate Proliferation and Chemosensitivity of Colon Cancer Cells', *Transl Oncol*, 6: 124-32.
- Henley, S. J., E. M. Ward, S. Scott, J. Ma, R. N. Anderson, A. U. Firth, C. C. Thomas, F. Islami, H. K. Weir, D. R. Lewis, R. L. Sherman, M. Wu, V. B. Benard, L. C. Richardson, A. Jemal, K. Cronin, and B. A. Kohler. 2020. 'Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics', *Cancer*, 126: 2225-49.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. 'Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions', *Clin Cancer Res*, 12: 5423-34.
- Ho, W. J., E. M. Jaffee, and L. Zheng. 2020. 'The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities', *Nat Rev Clin Oncol*, 17: 527-40.
- Hoffman, H. T., K. Porter, L. H. Karnell, J. S. Cooper, R. S. Weber, C. J. Langer, K. K. Ang, G. Gay, A. Stewart, and R. A. Robinson. 2006. 'Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival', *Laryngoscope*, 116: 1-13.
- Hofheinz, R. D., S. E. al-Batran, F. Hartmann, G. Hartung, D. Jager, C. Renner, P. Tanswell, U. Kunz, A. Amelsberg, H. Kuthan, and G. Stehle. 2003. 'Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer', *Onkologie*, 26: 44-8.
- Holmer, R., F. A. Goumas, G. H. Waetzig, S. Rose-John, and H. Kalthoff. 2014. 'Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression', *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 13: 371-80.
- Hong, A. M., A. Martin, M. Chatfield, D. Jones, M. Zhang, B. Armstrong, C. S. Lee, G. Harnett, C. Milross, J. Clark, M. Elliott, R. Smee, J. Corry, C. Liu, S. Porceddu, G. Rees, and B. Rose. 2013. 'Human papillomavirus, smoking status and outcomes in tonsillar squamous cell carcinoma', *Int J Cancer*, 132: 2748-54.
- Honjo, Y., H. Inohara, S. Akahani, T. Yoshii, Y. Takenaka, J. Yoshida, K. Hattori, Y. Tomiyama, A. Raz, and T. Kubo. 2000. 'Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma', *Clin Cancer Res*, 6: 4635-40.
- Hoos, A., R. Ibrahim, A. Korman, K. Abdallah, D. Berman, V. Shahabi, K. Chin, R. Canetta, and R. Humphrey. 2010. 'Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy', *Semin Oncol*, 37: 533-46.

- Hopkins, A. C., M. Yarchoan, J. N. Durham, E. C. Yusko, J. A. Rytlewski, H. S. Robins, D. A. Laheru, D. T. Le, E. R. Lutz, and E. M. Jaffee. 2018. 'T cell receptor repertoire features associated with survival in immunotherapy-treated pancreatic ductal adenocarcinoma', *JCI Insight*, 3.
- Hosein, A. N., S. K. Dougan, A. J. Aguirre, and A. Maitra. 2022. 'Translational advances in pancreatic ductal adenocarcinoma therapy', *Nat Cancer*, 3: 272-86.
- Hotz, B., M. Arndt, S. Dullat, S. Bhargava, H. J. Buhr, and H. G. Hotz. 2007. 'Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer', *Clin Cancer Res*, 13: 4769-76.
- Hu, B., C. Wu, H. Mao, H. Gu, H. Dong, J. Yan, Z. Qi, L. Yuan, Q. Dong, and J. Long. 2022. 'Subpopulations of cancer-associated fibroblasts link the prognosis and metabolic features of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Ann Transl Med*, 10: 262.
- Huang, C. Y., C. L. Chung, T. H. Hu, J. J. Chen, P. F. Liu, and C. L. Chen. 2021. 'Recent progress in TGF-beta inhibitors for cancer therapy', *Biomed Pharmacother*, 134: 111046.
- Huang, S. H., and B. O'Sullivan. 2017. 'Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer', *Curr Treat Options Oncol*, 18: 40.
- Huang, Y., Y. Lan, Z. Zhang, X. Xiao, and T. Huang. 2022. 'An Update on the Immunotherapy for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma', *Front Oncol*, 12: 800315.
- Huber, W., V. J. Carey, R. Gentleman, S. Anders, M. Carlson, B. S. Carvalho, H. C. Bravo, S. Davis, L. Gatto, T. Girke, R. Gottardo, F. Hahne, K. D. Hansen, R. A. Irizarry, M. Lawrence, M. I. Love, J. MacDonald, V. Obenchain, A. K. Oles, H. Pages, A. Reyes, P. Shannon, G. K. Smyth, D. Tenenbaum, L. Waldron, and M. Morgan. 2015. 'Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor', *Nat Methods*, 12: 115-21.
- Hussain, F., J. Wang, R. Ahmed, S. K. Guest, E. W. Lam, G. Stamp, and M. El-Bahrawy. 2010. 'The expression of IL-8 and IL-8 receptors in pancreatic adenocarcinomas and pancreatic neuroendocrine tumours', *Cytokine*, 49: 134-40.
- Hutcheson, K. A., F. C. Holsinger, M. E. Kupferman, and J. S. Lewin. 2015. 'Functional outcomes after TORS for oropharyngeal cancer: a systematic review', *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 272: 463-71.
- Chao, T., E. E. Furth, and R. H. Vonderheide. 2016. 'CXCR2-Dependent Accumulation of Tumor-Associated Neutrophils Regulates T-cell Immunity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Immunol Res*, 4: 968-82.
- Charalambous, A., M. Oks, G. Nchinda, S. Yamazaki, and R. M. Steinman. 2006. 'Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4+ T cell immunity to mouse survivin', *J Immunol*, 177: 8410-21.
- Chaturvedi, A. K., E. A. Engels, W. F. Anderson, and M. L. Gillison. 2008. 'Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States', *J Clin Oncol*, 26: 612-9.
- Chatzistamou, I., N. Dioufa, G. Trimis, A. Sklavounou, C. Kittas, H. Kiaris, and A. G. Papavassiliou. 2011. 'p21/waf1 and smooth-muscle actin alpha expression in stromal fibroblasts of oral cancers', *Cell Oncol (Dordr)*, 34: 483-8.
- Chen, J., Y. Wei, W. Yang, Q. Huang, Y. Chen, K. Zeng, and J. Chen. 2022. 'IL-6: The Link Between Inflammation, Immunity and Breast Cancer', *Front Oncol*, 12: 903800.
- Chen, K., W. Qian, Z. Jiang, L. Cheng, J. Li, L. Sun, C. Zhou, L. Gao, M. Lei, B. Yan, J. Cao, W. Duan, and Q. Ma. 2017. 'Metformin suppresses cancer initiation and progression in genetic mouse models of pancreatic cancer', *Mol Cancer*, 16: 131.
- Chen, S., M. Wang, X. Chen, S. Chen, L. Liu, J. Zhu, J. Wang, X. Yang, and X. Cai. 2018. 'In Vitro Expression of Cytokeratin 19 in Adipose-Derived Stem Cells Is Induced by Epidermal Growth Factor', *Med Sci Monit*, 24: 4254-61.
- Chen, X., and E. Song. 2019. 'Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts', *Nat Rev Drug Discov*, 18: 99-115.

- Chen, Y., M. Shi, G. Z. Yu, X. R. Qin, G. Jin, P. Chen, and M. H. Zhu. 2012. 'Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer', *World J Gastroenterol*, 18: 1123-9.
- Chernock, R. D., X. Wang, G. Gao, J. S. Lewis, Jr., Q. Zhang, W. L. Thorstad, and S. K. El-Mofty. 2013. 'Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx', *Mod Pathol*, 26: 223-31.
- Chidharla, A., M. Parsi, and A. Kasi. 2022. 'Cetuximab.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Cho, Y. A., H. J. Yoon, J. I. Lee, S. P. Hong, and S. D. Hong. 2011. 'Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma', *Oral Oncol*, 47: 1148-53.
- Jablonska-Trypuc, A., M. Matejczyk, and S. Rosochacki. 2016. 'Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs', *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31: 177-83.
- Jacobetz, M. A., D. S. Chan, A. Neesse, T. E. Bapiro, N. Cook, K. K. Frese, C. Feig, T. Nakagawa, M. E. Caldwell, H. I. Zecchini, M. P. Lolkema, P. Jiang, A. Kultti, C. B. Thompson, D. C. Maneval, D. I. Jodrell, G. I. Frost, H. M. Shepard, J. N. Skepper, and D. A. Tuveson. 2013. 'Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer', *Gut*, 62: 112-20.
- Jacobs, C., G. Lyman, E. Velez-Garcia, K. S. Sridhar, W. Knight, H. Hochster, L. T. Goodnough, J. E. Mortimer, L. H. Einhorn, L. Schacter, and et al. 1992. 'A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck', *J Clin Oncol*, 10: 257-63.
- Jansson, S., K. Aaltonen, P. O. Bendahl, A. K. Falck, M. Karlsson, K. Pietras, and L. Ryden. 2018. 'The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence', *Breast Cancer Res Treat*, 169: 231-41.
- Jayatilaka, H., P. Tyle, J. J. Chen, M. Kwak, J. Ju, H. J. Kim, J. S. H. Lee, P. H. Wu, D. M. Gilkes, R. Fan, and D. Wirtz. 2017. 'Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration', *Nat Commun*, 8: 15584.
- Jiang, H., J. Yu, H. Guo, H. Song, and S. Chen. 2008. 'Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 368: 1-5.
- Jiang, L., Z. Li, and L. Rui. 2008. 'Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways', *J Biol Chem*, 283: 28066-73.
- Jobe, N. P., D. Rosel, B. Dvorankova, O. Kodet, L. Lacina, R. Mateu, K. Smetana, and J. Brabek. 2016. 'Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness', *Histochem Cell Biol*, 146: 205-17.
- Johnson, D. E., B. Burtness, C. R. Leemans, V. W. Y. Lui, J. E. Bauman, and J. R. Grandis. 2020. 'Head and neck squamous cell carcinoma', *Nat Rev Dis Primers*, 6: 92.
- Kanehisa, M., M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato, and K. Morishima. 2017. 'KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs', *Nucleic Acids Res*, 45: D353-D61.
- Kanno, A., K. Satoh, A. Masamune, M. Hirota, K. Kimura, J. Umino, S. Hamada, A. Satoh, S. Egawa, F. Motoi, M. Unno, and T. Shimosegawa. 2008. 'Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells', *Int J Cancer*, 122: 2707-18.
- Kareva, I. 2011. 'What can ecology teach us about cancer?', *Transl Oncol*, 4: 266-70.
- Katzenmaier, E. M., M. Kloor, H. J. Gabius, J. Gebert, and J. Kopitz. 2017. 'Analyzing epigenetic control of galectin expression indicates silencing of galectin-12 by promoter methylation in colorectal cancer', *IUBMB Life*, 69: 962-70.
- Kerbel, R. S. 1997. 'A cancer therapy resistant to resistance', *Nature*, 390: 335-6.
- Kilvaer, T. K., M. Rakaee, T. Hellevik, A. Ostman, C. Strell, R. M. Bremnes, L. T. Busund, T. Donnem, and I. Martinez-Zubiaurre. 2018. 'Tissue analyses reveal a potential immune-adjuvant function of FAP-1 positive fibroblasts in non-small cell lung cancer', *PLoS One*, 13: e0192157.

- Kim, H., S. H. Hong, J. Y. Kim, I. C. Kim, Y. W. Park, S. J. Lee, S. W. Song, J. J. Kim, G. Park, T. M. Kim, Y. H. Kim, J. B. Park, J. Chung, and I. H. Kim. 2017. 'Preclinical development of a humanized neutralizing antibody targeting HGF', *Exp Mol Med*, 49: e309.
- Kim, H. M., W. H. Jung, and J. S. Koo. 2015. 'Expression of cancer-associated fibroblast related proteins in metastatic breast cancer: an immunohistochemical analysis', *J Transl Med*, 13: 222.
- Kim, H. W., J. C. Lee, K. H. Paik, J. Kang, J. Kim, and J. H. Hwang. 2017. 'Serum interleukin-6 is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma progression pattern', *Medicine (Baltimore)*, 96: e5926.
- Kim, S. T., J. Y. Hong, S. H. Park, J. O. Park, Y. W. Park, N. Park, H. Lee, S. H. Hong, S. J. Lee, S. W. Song, K. Kim, Y. S. Park, H. Y. Lim, W. K. Kang, D. H. Nam, J. W. Lee, K. Park, K. M. Kim, and J. Lee. 2020. 'First-in-human phase I trial of anti-hepatocyte growth factor antibody (YYB101) in refractory solid tumor patients', *Ther Adv Med Oncol*, 12: 1758835920926796.
- Kodet, O., B. Dvorankova, B. Bendlova, V. Sykorova, I. Krajsova, J. Stork, J. Kucera, P. Szabo, H. Strnad, M. Kolar, C. Vlcek, K. Smetana, Jr., and L. Lacina. 2018. 'Microenvironmentdriven resistance to BRAf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts', *Int J Mol Med*, 41: 2687-703.
- Kolar, M., P. Szabo, B. Dvorankova, L. Lacina, H. J. Gabius, H. Strnad, J. Sachova, C. Vlcek, J. Plzak, M. Chovanec, Z. Cada, J. Betka, Z. Fik, J. Paces, H. Kovarova, J. Motlik, K. Jarkovska, and K. Smetana. 2012a. 'Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses', *Biol Cell*, 104: 738-51.
- Kolar, M., P. Szabo, B. Dvorankova, L. Lacina, H. J. Gabius, H. Strnad, J. Sachova, C. Vlcek, J. Plzak, M. Chovanec, Z. Cada, J. Betka, Z. Fik, J. Paces, H. Kovarova, J. Motlik, K. Jarkovska, and K. Smetana, Jr. 2012b. 'Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses', *Biol Cell*, 104: 738-51.
- Kong, X., L. Li, Z. Li, and K. Xie. 2012. 'Targeted destruction of the orchestration of the pancreatic stroma and tumor cells in pancreatic cancer cases: molecular basis for therapeutic implications', *Cytokine Growth Factor Rev*, 23: 343-56.
- Kubota, Y., K. Takubo, T. Shimizu, H. Ohno, K. Kishi, M. Shibuya, H. Saya, and T. Suda. 2009. 'M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis', *J Exp Med*, 206: 1089-102.
- Kuper, H., P. Boffetta, and H. O. Adami. 2002. 'Tobacco use and cancer causation: association by tumour type', *J Intern Med*, 252: 206-24.
- Kwa, M. Q., K. M. Herum, and C. Brakebusch. 2019. 'Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis?', *Clin Exp Metastasis*, 36: 71-86.
- Lacina, L., B. Dvorankova, K. Smetana, Jr., M. Chovanec, J. Plzak, R. Tachezy, L. Kideryova, L. Kucerova, Z. Cada, J. Boucek, R. Kodet, S. Andre, and H. J. Gabius. 2007. 'Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture', *Int J Radiat Biol*, 83: 837-48.
- Lambin, T., C. Lafon, R. A. Drainville, M. Pioche, and F. Prat. 2022. 'Locoregional therapies and their effects on the tumoral microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma', *World J Gastroenterol*, 28: 1288-303.
- Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck. 2014. 'Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 178-96.
- Le, D. T., and E. M. Jaffee. 2012. 'Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective', *Cancer Res*, 72: 3439-44.
- Lee, H. J., Y. A. Kim, C. K. Sim, S. H. Heo, I. H. Song, H. S. Park, S. Y. Park, W. S. Bang, I. A. Park, M. Lee, J. H. Lee, Y. S. Cho, S. Chang, J. Jung, J. Kim, S. B. Lee, S. Y. Kim, M. S. Lee, and G. Gong. 2017.

- 'Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes and their potential for application as adoptive cell transfer therapy in human breast cancer', *Oncotarget*, 8: 113345-59.
- Leone, R. D., L. Zhao, J. M. Englert, I. M. Sun, M. H. Oh, I. H. Sun, M. L. Arwood, I. A. Bettencourt, C. H. Patel, J. Wen, A. Tam, R. L. Blosser, E. Prchalova, J. Alt, R. Rais, B. S. Slusher, and J. D. Powell. 2019. 'Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion', *Science*, 366: 1013-21.
- Leong, K. G., K. Niessen, I. Kulic, A. Raouf, C. Eaves, I. Pollet, and A. Karsan. 2007. 'Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin', *J Exp Med*, 204: 2935-48.
- Lewis, J. S., Jr., W. L. Thorstad, R. D. Chernock, B. H. Haughey, J. H. Yip, Q. Zhang, and S. K. El-Mofty. 2010. 'p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status', *Am J Surg Pathol*, 34: 1088-96.
- Li, C., S. Shintani, N. Terakado, K. Nakashiro, and H. Hamakawa. 2002. 'Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma', *Oncol Rep*, 9: 1219-23.
- Li, H., X. Fan, and J. Houghton. 2007. 'Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer', *J Cell Biochem*, 101: 805-15.
- Lin, T. C., C. H. Yang, L. H. Cheng, W. T. Chang, Y. R. Lin, and H. C. Cheng. 2019. 'Fibronectin in Cancer: Friend or Foe', *Cells*, 9.
- Lindgaard, S. C., Z. Sztupinski, E. Maag, C. P. Hansen, I. M. Chen, A. Z. Johansen, J. P. Hasselby, S. E. Bojesen, D. Nielsen, and J. S. Johansen. 2022. 'Prognostic value of circulating proteins in patients undergoing surgery for pancreatic cancer', *Cancer Med*.
- Liou, G. Y., L. Bastea, A. Fleming, H. Doppler, B. H. Edenfield, D. W. Dawson, L. Zhang, N. Bardeesy, and P. Storz. 2017. 'The Presence of Interleukin-13 at Pancreatic ADM/PanIN Lesions Alters Macrophage Populations and Mediates Pancreatic Tumorigenesis', *Cell Rep*, 19: 1322-33.
- Lippi, G., and C. Mattiuzzi. 2020. 'The global burden of pancreatic cancer', *Arch Med Sci*, 16: 820-24.
- Liu, C. Y., H. H. Lin, M. J. Tang, and Y. K. Wang. 2015. 'Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation', *Oncotarget*, 6: 15966-83.
- Liu, S. Y., L. C. Chang, L. F. Pan, Y. J. Hung, C. H. Lee, and Y. S. Shieh. 2008. 'Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma', *Oral Oncol*, 44: 277-85.
- Liu, Y., X. Chen, W. Han, and Y. Zhang. 2017. 'Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia', *Drugs Today (Barc)*, 53: 597-608.
- Liu, Y., F. Li, F. Gao, L. Xing, P. Qin, X. Liang, J. Zhang, X. Qiao, L. Lin, Q. Zhao, and L. Du. 2016. 'Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling', *Oncotarget*, 7: 40148-59.
- Loehrer, P. J., Sr., Y. Feng, H. Cardenas, L. Wagner, J. M. Brell, D. Cella, P. Flynn, R. K. Ramanathan, C. H. Crane, S. R. Alberts, and A. B. Benson, 3rd. 2011. 'Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial', *J Clin Oncol*, 29: 4105-12.
- Lohr, M., M. Lensch, S. Andre, H. Kaltner, H. C. Siebert, K. Smetana, Jr., F. Sinowatz, and H. J. Gabius. 2007. 'Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: comparative profiling of gene/ promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry', *Folia Biol (Praha)*, 53: 109-28.
- Long, K. B., G. Tooker, E. Tooker, S. L. Luque, J. W. Lee, X. Pan, and G. L. Beatty. 2017. 'IL6 Receptor Blockade Enhances Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Mol Cancer Ther*, 16: 1898-908.
- Lorusso, G., and C. Ruegg. 2008. 'The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis', *Histochem Cell Biol*, 130: 1091-103.

- Ludwig, S., M. Distler, U. Schubert, J. Schmid, H. Thies, T. Welsch, S. Hempel, T. Tonn, J. Weitz, S. R. Bornstein, and B. Ludwig. 2022. 'Quality of life and metabolic outcomes after total pancreatectomy and simultaneous islet autotransplantation', *Commun Med (Lond)*, 2: 24.
- Luker, K. E., S. A. Lewin, L. A. Mihalko, B. T. Schmidt, J. S. Winkler, N. L. Coggins, D. G. Thomas, and G. D. Luker. 2012. 'Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells', *Oncogene*, 31: 4750-8.
- Mahadevan, K. K., K. S. Arora, A. Amzallag, E. Williams, A. S. Kulkarni, C. Fernandez-Del Castillo, K. D. Lillemoe, N. Bardeesy, T. S. Hong, C. R. Ferrone, D. T. Ting, and V. Deshpande. 2019. 'Quasimesenchymal phenotype predicts systemic metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Mod Pathol*, 32: 844-54.
- Mantovani, A. 2010. 'The growing diversity and spectrum of action of myeloid-derived suppressor cells', *Eur J Immunol*, 40: 3317-20.
- Mantovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, S. Sozzani, and L. Ruco. 1992. 'The origin and function of tumor-associated macrophages', *Immunol Today*, 13: 265-70.
- Marcus, B., D. Arenberg, J. Lee, C. Kleer, D. B. Chepeha, C. E. Schmalbach, M. Islam, S. Paul, Q. Pan, S. Hanash, R. Kuick, S. D. Merajver, and T. N. Teknos. 2004. 'Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma', *Cancer*, 101: 2779-87.
- Marsh, T., K. Pietras, and S. S. McAllister. 2013. 'Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis', *Biochim Biophys Acta*, 1832: 1070-8.
- Martin, F. T., R. M. Dwyer, J. Kelly, S. Khan, J. M. Murphy, C. Curran, N. Miller, E. Hennessy, P. Dockery, F. P. Barry, T. O'Brien, and M. J. Kerin. 2010. 'Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT)', *Breast Cancer Res Treat*, 124: 317-26.
- Matsuo, Y., N. Ochi, H. Sawai, A. Yasuda, H. Takahashi, H. Funahashi, H. Takeyama, Z. Tong, and S. Guha. 2009. 'CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer', *Int J Cancer*, 124: 853-61.
- Mechanick, J. I., S. Zhao, and W. T. Garvey. 2018. 'Leptin, An Adipokine With Central Importance in the Global Obesity Problem', *Glob Heart*, 13: 113-27.
- Melaku, Y. A., S. L. Appleton, T. K. Gill, F. A. Ogbo, E. Buckley, Z. Shi, T. Driscoll, R. Adams, B. C. Cowie, and C. Fitzmaurice. 2018. 'Incidence, prevalence, mortality, disability-adjusted life years and risk factors of cancer in Australia and comparison with OECD countries, 1990-2015: findings from the Global Burden of Disease Study 2015', *Cancer Epidemiol*, 52: 43-54.
- Mellin, H., S. Friesland, R. Lewensohn, T. Dalianis, and E. Munck-Wikland. 2000. 'Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival', *Int J Cancer*, 89: 300-4.
- Meng, H., Y. Zhao, J. Dong, M. Xue, Y. S. Lin, Z. Ji, W. X. Mai, H. Zhang, C. H. Chang, C. J. Brinker, J. I. Zink, and A. E. Nel. 2013. 'Two-wave nanotherapy to target the stroma and optimize gemcitabine delivery to a human pancreatic cancer model in mice', *ACS Nano*, 7: 10048-65.
- Mesker, W. E., J. M. Junggeburgt, K. Szuhai, P. de Heer, H. Morreau, H. J. Tanke, and R. A. Tollenaar. 2007. 'The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage', *Cell Oncol*, 29: 387-98.
- Metwaly, H., S. Maruyama, M. Yamazaki, M. Tsuneki, T. Abe, K. Y. Jen, J. Cheng, and T. Saku. 2012. 'Parenchymal-stromal switching for extracellular matrix production on invasion of oral squamous cell carcinoma', *Hum Pathol*, 43: 1973-81.
- Mhaweche, P., P. Dulguerov, M. Assaly, C. Ares, and A. S. Allal. 2005. 'EB-D fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck', *Oral Oncol*, 41: 82-8.
- Micke, P., K. Kappert, M. Ohshima, C. Sundquist, S. Scheidl, P. Lindahl, C. H. Heldin, J. Botling, F. Ponten, and A. Ostman. 2007. 'In situ identification of genes regulated specifically in fibroblasts of human basal cell carcinoma', *Journal of Investigative Dermatology*, 127: 1516-23.



- Mishra, P. J., P. J. Mishra, J. W. Glod, and D. Banerjee. 2009. 'Mesenchymal stem cells: flip side of the coin', *Cancer Res*, 69: 1255-8.
- Mitra, A. K., M. Zillhardt, Y. Hua, P. Tiwari, A. E. Murmann, M. E. Peter, and E. Lengyel. 2012. 'MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer', *Cancer Discov*, 2: 1100-8.
- Miyazono, K., S. Ehata, and D. Koinuma. 2012. 'Tumor-promoting functions of transforming growth factor-beta in progression of cancer', *Ups J Med Sci*, 117: 143-52.
- Moffitt, R. A., R. Marayati, E. L. Flate, K. E. Volmar, S. G. Loeza, K. A. Hoadley, N. U. Rashid, L. A. Williams, S. C. Eaton, A. H. Chung, J. K. Smyla, J. M. Anderson, H. J. Kim, D. J. Bentrem, M. S. Talamonti, C. A. Iacobuzio-Donahue, M. A. Hollingsworth, and J. J. Yeh. 2015. 'Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Nat Genet*, 47: 1168-78.
- Moisan, F., E. B. Francisco, A. Brozovic, G. E. Duran, Y. C. Wang, S. Chaturvedi, S. Seetharam, L. A. Snyder, P. Doshi, and B. I. Sikic. 2014. 'Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by CCL2 blockade in ovarian cancers', *Mol Oncol*, 8: 1231-9.
- Moro, J. D. S., M. C. Maroneze, T. M. Ardenghi, L. M. Barin, and C. C. Danesi. 2018. 'Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis', *Einstein (Sao Paulo)*, 16: eAO4248.
- Motlik, J., J. Klima, B. Dvorankova, and K. Smetana, Jr. 2007. 'Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation', *Theriogenology*, 67: 105-11.
- Murphy, K. J., J. Zhu, M. Trpceski, B. A. Pereira, P. Timpson, and D. Herrmann. 2022. 'Focal adhesion kinase priming in pancreatic cancer, altering biomechanics to improve chemotherapy', *Biochem Soc Trans*, 50: 1129-41.
- Nagasaki, T., M. Hara, H. Nakanishi, H. Takahashi, M. Sato, and H. Takeyama. 2014. 'Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction', *Br J Cancer*, 110: 469-78.
- Nasman, A., P. Attner, L. Hammarstedt, J. Du, M. Eriksson, G. Giraud, S. Ahrlund-Richter, L. Marklund, M. Romanitan, D. Lindquist, T. Ramqvist, J. Lindholm, P. Sparen, W. Ye, H. Dahlstrand, E. Munck-Wikland, and T. Dalianis. 2009. 'Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma?', *Int J Cancer*, 125: 362-6.
- Newburg, D. S., J. A. Peterson, G. M. Ruiz-Palacios, D. O. Matson, A. L. Morrow, J. Shults, M. L. Guerrero, P. Chaturvedi, S. O. Newburg, C. D. Scallan, M. R. Taylor, R. L. Ceriani, and L. K. Pickering. 1998. 'Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection', *Lancet*, 351: 1160-4.
- Nocini, R., G. Molteni, C. Mattiuzzi, and G. Lippi. 2020. 'Updates on larynx cancer epidemiology', *Chin J Cancer Res*, 32: 18-25.
- Noe, J. T., and R. A. Mitchell. 2020. 'MIF-Dependent Control of Tumor Immunity', *Front Immunol*, 11: 609948.
- Nutting, C. M., J. P. Morden, K. J. Harrington, T. G. Urbano, S. A. Bhide, C. Clark, E. A. Miles, A. B. Miah, K. Newbold, M. Tanay, F. Adab, S. J. Jefferies, C. Scrase, B. K. Yap, R. P. A'Hern, M. A. Sydenham, M. Emson, E. Hall, and Parsport trial management group. 2011. 'Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial', *Lancet Oncol*, 12: 127-36.
- Ogino, T., H. Shigyo, H. Ishii, A. Katayama, N. Miyokawa, Y. Harabuchi, and S. Ferrone. 2006. 'HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker', *Cancer Res*, 66: 9281-9.

- Okada, Y., G. Eibl, S. Guha, J. P. Duffy, H. A. Reber, and O. J. Hines. 2004. 'Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells', *Clin Exp Metastasis*, 21: 285-92.
- Omary, M. B., A. Lugea, A. W. Lowe, and S. J. Pandol. 2007. 'The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases', *J Clin Invest*, 117: 50-9.
- Opitz, F. V., L. Haeberle, A. Daum, and I. Esposito. 2021. 'Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia', *Cancers (Basel)*, 13.
- Orimo, A., P. B. Gupta, D. C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V. J. Carey, A. L. Richardson, and R. A. Weinberg. 2005. 'Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion', *Cell*, 121: 335-48.
- Ostermann, E., P. Garin-Chesa, K. H. Heider, M. Kalat, H. Lamche, C. Puri, D. Kerjaschki, W. J. Rettig, and G. R. Adolf. 2008. 'Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts', *Clin Cancer Res*, 14: 4584-92.
- Ozdemir, B. C., T. Pentcheva-Hoang, J. L. Carstens, X. Zheng, C. C. Wu, T. R. Simpson, H. Laklai, H. Sugimoto, C. Kahlert, S. V. Novitskiy, A. De Jesus-Acosta, P. Sharma, P. Heidari, U. Mahmood, L. Chin, H. L. Moses, V. M. Weaver, A. Maitra, J. P. Allison, V. S. LeBleu, and R. Kalluri. 2014. 'Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival', *Cancer Cell*, 25: 719-34.
- Padoan, A., M. Plebani, and D. Basso. 2019. 'Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity', *Int J Mol Sci*, 20.
- Pan, Y. C., T. Nishikawa, C. Y. Chang, J. A. Tai, and Y. Kaneda. 2021. 'CXCL2 combined with HVJ-E suppresses tumor growth and lung metastasis in breast cancer and enhances anti-PD-1 antibody therapy', *Mol Ther Oncolytics*, 20: 175-86.
- Papaccio, F., D. Kovacs, B. Bellei, S. Caputo, E. Migliano, C. Cota, and M. Picardo. 2021. 'Profiling Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma', *Int J Mol Sci*, 22.
- Papaspyridonos, M., E. McNeill, J. P. de Bono, A. Smith, K. G. Burnand, K. M. Channon, and D. R. Greaves. 2008. 'Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 433-40.
- Park, H. Y., H. M. Kwon, H. J. Lim, B. K. Hong, J. Y. Lee, B. E. Park, Y. Jang, S. Y. Cho, and H. S. Kim. 2001. 'Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro', *Exp Mol Med*, 33: 95-102.
- Parsons, J. T. 2003. 'Focal adhesion kinase: the first ten years', *J Cell Sci*, 116: 1409-16.
- Peltanova, B., M. Raudenska, and M. Masarik. 2019. 'Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review', *Mol Cancer*, 18: 63.
- Perez-Losada, J., and A. Balmain. 2003. 'Stem-cell hierarchy in skin cancer', *Nat Rev Cancer*, 3: 434-43.
- Perillo, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer, and L. G. Baum. 1995. 'Apoptosis of T cells mediated by galectin-1', *Nature*, 378: 736-9.
- Perkhofer, L., J. Gout, E. Roger, F. Kude de Almeida, C. Baptista Simoes, L. Wiesmuller, T. Seufferlein, and A. Kleger. 2021. 'DNA damage repair as a target in pancreatic cancer: state-of-the-art and future perspectives', *Gut*, 70: 606-17.
- Petkar, I., K. Rooney, J. W. Roe, J. M. Patterson, D. Bernstein, J. M. Tyler, M. A. Emson, J. P. Morden, K. Mertens, E. Miles, M. Beasley, T. Roques, S. A. Bhide, K. L. Newbold, K. J. Harrington, E. Hall, and C. M. Nutting. 2016. 'DARS: a phase III randomised multicentre study of dysphagia-optimised intensity- modulated radiotherapy (Do-IMRT) versus standard intensity- modulated radiotherapy (S-IMRT) in head and neck cancer', *BMC Cancer*, 16: 770.
- Petrelli, F., A. Coinu, K. Borgonovo, M. Cabiddu, M. Ghilardi, V. Lonati, E. Aitini, S. Barni, and Digerente Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell'Apparato. 2015. 'FOLFIRINOX-

- based neoadjuvant therapy in borderline resectable or unresectable pancreatic cancer: a meta-analytical review of published studies', *Pancreas*, 44: 515-21.
- Pignon, J. P., J. Bourhis, C. Domenge, and L. Designe. 2000. 'Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer', *Lancet*, 355: 949-55.
- Plzak, J., L. Lacina, M. Chovanec, B. Dvorankova, P. Szabo, Z. Cada, and K. Smetana, Jr. 2010. 'Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties', *Anticancer Res*, 30: 455-62.
- Plzak, J., K. Smetana, Jr., E. Hrdlickova, R. Kodet, Z. Holikova, F. T. Liu, B. Dvorankova, H. Kaltner, J. Betka, and H. J. Gabius. 2001. 'Expression of galectin-3-reactive ligands in squamous cancer and normal epithelial cells as a marker of differentiation', *Int J Oncol*, 19: 59-64.
- Polyak, K., I. Haviv, and I. G. Campbell. 2009. 'Co-evolution of tumor cells and their microenvironment', *Trends Genet*, 25: 30-8.
- Principe, D. R., J. A. Doll, J. Bauer, B. Jung, H. G. Munshi, L. Bartholin, B. Pasche, C. Lee, and P. J. Grippo. 2014. 'TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis', *J Natl Cancer Inst*, 106: djt369.
- Proietti, I., N. Skroza, S. Micholini, A. Mambrin, V. Balduzzi, N. Bernardini, A. Marchesiello, E. Tolino, S. Volpe, P. Maddalena, M. Di Fraia, G. Mangino, G. Romeo, and C. Potenza. 2020. 'BRAF Inhibitors: Molecular Targeting and Immunomodulatory Actions', *Cancers (Basel)*, 12.
- Provenzano, P. P., C. Cuevas, A. E. Chang, V. K. Goel, D. D. Von Hoff, and S. R. Hingorani. 2012. 'Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 21: 418-29.
- Pulte, D., and H. Brenner. 2010. 'Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis', *Oncologist*, 15: 994-1001.
- Pytynia, K. B., K. R. Dahlstrom, and E. M. Sturgis. 2014. 'Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer', *Oral Oncol*, 50: 380-6.
- Rakesh, K., and D. K. Agrawal. 2005. 'Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors', *Biochemical Pharmacology*, 70: 649-57.
- Rasanen, K., and A. Vaheri. 2010. 'Activation of fibroblasts in cancer stroma', *Exp Cell Res*, 316: 2713-22.
- Rasmi, R. R., K. M. Sakthivel, and C. Guruvayoorappan. 2020. 'NF-kappaB inhibitors in treatment and prevention of lung cancer', *Biomed Pharmacother*, 130: 110569.
- Rhim, A. D., E. T. Mirek, N. M. Aiello, A. Maitra, J. M. Bailey, F. McAllister, M. Reichert, G. L. Beatty, A. K. Rustgi, R. H. Vonderheide, S. D. Leach, and B. Z. Stanger. 2012. 'EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation', *Cell*, 148: 349-61.
- Rhim, A. D., P. E. Oberstein, D. H. Thomas, E. T. Mirek, C. F. Palermo, S. A. Sastra, E. N. Dekleva, T. Saunders, C. P. Becerra, I. W. Tattersall, C. B. Westphalen, J. Kitajewski, M. G. Fernandez-Barrena, M. E. Fernandez-Zapico, C. Iacobuzio-Donahue, K. P. Olive, and B. Z. Stanger. 2014. 'Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 25: 735-47.
- Ries, C. H., M. A. Cannarile, S. Hoves, J. Benz, K. Wartha, V. Runza, F. Rey-Giraud, L. P. Pradel, F. Feuerhake, I. Klamann, T. Jones, U. Jucknischke, S. Scheiblich, K. Kaluza, I. H. Gorr, A. Walz, K. Abiraj, P. A. Cassier, A. Sica, C. Gomez-Roca, K. E. de Visser, A. Italiano, C. Le Tourneau, J. P. Delord, H. Levitsky, J. Y. Blay, and D. Ruttinger. 2014. 'Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy', *Cancer Cell*, 25: 846-59.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi, and G. K. Smyth. 2015. 'limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies', *Nucleic Acids Res*, 43: e47.

- Ritzenthaler, J. D., S. Han, and J. Roman. 2008. 'Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling', *Mol Biosyst*, 4: 1160-9.
- Roa-Pena, L., C. V. Leiton, S. Babu, C. H. Pan, E. A. Vanner, A. Akalin, J. Bandovic, R. A. Moffitt, K. R. Shroyer, and L. F. Escobar-Hoyos. 2019. 'Keratin 17 identifies the most lethal molecular subtype of pancreatic cancer', *Sci Rep*, 9: 11239.
- Robatel, S., and M. Schenk. 2022. 'Current Limitations and Novel Perspectives in Pancreatic Cancer Treatment', *Cancers (Basel)*, 14.
- Rupp, C., M. Scherzer, A. Rudisch, C. Unger, C. Haslinger, N. Schweifer, M. Artaker, H. Nivarthi, R. Moriggl, M. Hengstschlager, D. Kerjaschki, W. Sommergruber, H. Dolznig, and P. Garin-Chesa. 2015. 'IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction', *Oncogene*, 34: 815-25.
- Ruvolo, P. P. 2016. 'Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment', *Biochim Biophys Acta*, 1863: 427-37.
- Ryan, D. P., T. S. Hong, and N. Bardeesy. 2014. 'Pancreatic adenocarcinoma', *N Engl J Med*, 371: 2140-1.
- Ryschich, E., T. Notzel, U. Hinz, F. Autschbach, J. Ferguson, I. Simon, J. Weitz, B. Frohlich, E. Klar, M. W. Buchler, and J. Schmidt. 2005. 'Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma', *Clin Cancer Res*, 11: 498-504.
- Sakurai, T., G. He, A. Matsuzawa, G. Y. Yu, S. Maeda, G. Hardiman, and M. Karin. 2008a. 'Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis', *Cancer Cell*, 14: 156-65.
- . 2008b. 'Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis', *Cancer Cell*, 14: 156-65.
- Shafer, P., L. M. Kelly, and V. Hoyos. 2022. 'Cancer Therapy With TCR-Engineered T Cells: Current Strategies, Challenges, and Prospects', *Front Immunol*, 13: 835762.
- Shelemey, P. T., C. P. Amaro, D. Ng, V. Falck, and V. C. Tam. 2021. 'Metastatic pancreatic cancer with complete response to FOLFIRINOX treatment', *BMJ Case Rep*, 14.
- Shen, M., P. Hu, F. Donskov, G. Wang, Q. Liu, and J. Du. 2014. 'Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis', *PLoS One*, 9: e98259.
- Shinn, J. R., S. J. Davis, K. A. Lang-Kuhs, S. Rohde, X. Wang, P. Liu, W. D. Dupont, D. Plummer, Jr., W. L. Thorstad, R. D. Chernock, M. Mehrad, and J. S. Lewis, Jr. 2021. 'Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma With Discordant p16 and HPV mRNA Results: Incidence and Characterization in a Large, Contemporary United States Cohort', *Am J Surg Pathol*, 45: 951-61.
- Shrestha, B., and L. Dunn. 2020. 'The Declaration of Helsinki on Medical Research involving Human Subjects: A Review of Seventh Revision', *J Nepal Health Res Counc*, 17: 548-52.
- Schneider, I. J., M. E. Flores, D. A. Nickel, L. G. Martins, and J. Traebert. 2014. 'Survival rates of patients with cancer of the lip, mouth and pharynx: a cohort study of 10 years', *Rev Bras Epidemiol*, 17: 680-91.
- Schon, M., C. E. Klein, V. Hogenkamp, R. Kaufmann, B. G. Wienrich, and M. P. Schon. 2000. 'Basal-cell adhesion molecule (B-CAM) is induced in epithelial skin tumors and inflammatory epidermis, and is expressed at cell-cell and cell-substrate contact sites', *J Invest Dermatol*, 115: 1047-53.
- Schott, A. F., L. J. Goldstein, M. Cristofanilli, P. A. Ruffini, S. McCanna, J. M. Reuben, R. P. Perez, G. Kato, and M. Wicha. 2017. 'Phase Ib Pilot Study to Evaluate Reparixin in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with HER-2-Negative Metastatic Breast Cancer', *Clin Cancer Res*, 23: 5358-65.
- Sica, A., T. Schioppa, A. Mantovani, and P. Allavena. 2006. 'Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy', *Eur J Cancer*, 42: 717-27.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal. 2016. 'Cancer statistics, 2016', *CA Cancer J Clin*, 66: 7-30.

- Sievert, M., M. Goncalves, A. Zbidat, M. Traxdorf, S. K. Mueller, H. Iro, and A. O. Gostian. 2021. 'Outcomes of transoral laser microsurgery and transoral robotic surgery in oropharyngeal squamous cell carcinoma', *Auris Nasus Larynx*, 48: 295-301.
- Slany, A., A. Bileck, B. Muqaku, and C. Gerner. 2015. 'Targeting breast cancer-associated fibroblasts to improve anti-cancer therapy', *Breast*, 24: 532-8.
- Smetana, K., Jr., S. Andre, H. Kaltner, J. Kopitz, and H. J. Gabius. 2013. 'Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target', *Expert Opin Ther Targets*, 17: 379-92.
- Smetana, K., Jr., L. Lacina, P. Szabo, B. Dvorankova, P. Broz, and A. Sedo. 2016. 'Ageing as an Important Risk Factor for Cancer', *Anticancer Res*, 36: 5009-17.
- Smith, E. M., J. M. Ritchie, K. F. Summersgill, J. P. Klusmann, J. H. Lee, D. Wang, T. H. Haugen, and L. P. Turek. 2004. 'Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers', *Int J Cancer*, 108: 766-72.
- Solis, D., N. V. Bovin, A. P. Davis, J. Jimenez-Barbero, A. Romero, R. Roy, K. Smetana, Jr., and H. J. Gabius. 2015. 'A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code', *Biochim Biophys Acta*, 1850: 186-235.
- Song, I. Y., and A. Balmain. 2015. 'Cellular reprogramming in skin cancer', *Semin Cancer Biol*, 32: 32-9.
- Sperry, S. M., C. H. Rassekh, O. Laccourreye, and G. S. Weinstein. 2013. 'Supracricoid partial laryngectomy for primary and recurrent laryngeal cancer', *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 139: 1226-35.
- Steele, C. W., S. A. Karim, J. D. G. Leach, P. Bailey, R. Upstill-Goddard, L. Rishi, M. Foth, S. Bryson, K. McDaid, Z. Wilson, C. Eberlein, J. B. Candido, M. Clarke, C. Nixon, J. Connelly, N. Jamieson, C. R. Carter, F. Balkwill, D. K. Chang, T. R. J. Evans, D. Strathdee, A. V. Biankin, R. J. B. Nibbs, S. T. Barry, O. J. Sansom, and J. P. Morton. 2016. 'CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 29: 832-45.
- Steuer, C. E., M. El-Deiry, J. R. Parks, K. A. Higgins, and N. F. Saba. 2017. 'An update on larynx cancer', *CA Cancer J Clin*, 67: 31-50.
- Stevens, T. M., and J. A. Bishop. 2017. 'HPV-related carcinomas of the head and neck: morphologic features, variants, and practical considerations for the surgical pathologist', *Virchows Arch*, 471: 295-307.
- Stone, W. L., L. Leavitt, and M. Varacallo. 2022. 'Physiology, Growth Factor.' in *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Storey, J. D., and R. Tibshirani. 2003. 'Statistical significance for genomewide studies', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 9440-5.
- Straussman, R., T. Morikawa, K. Shee, M. Barzily-Rokni, Z. R. Qian, J. Du, A. Davis, M. M. Mongare, J. Gould, D. T. Frederick, Z. A. Cooper, P. B. Chapman, D. B. Solit, A. Ribas, R. S. Lo, K. T. Flaherty, S. Ogino, J. A. Wargo, and T. R. Golub. 2012. 'Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion', *Nature*, 487: 500-4.
- Strnad, H., L. Lacina, M. Kolar, Z. Cada, C. Vlcek, B. Dvorankova, J. Betka, J. Plzak, M. Chovanec, J. Sachova, J. Valach, M. Urbanova, and K. Smetana. 2010a. 'Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes', *Histochem Cell Biol*, 133: 201-11.
- Strnad, H., L. Lacina, M. Kolar, Z. Cada, C. Vlcek, B. Dvorankova, J. Betka, J. Plzak, M. Chovanec, J. Sachova, J. Valach, M. Urbanova, and K. Smetana, Jr. 2010b. 'Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes', *Histochem Cell Biol*, 133: 201-11.
- Strome, S. E., H. Dong, H. Tamura, S. G. Voss, D. B. Flies, K. Tamada, D. Salomao, J. Cheville, F. Hirano, W. Lin, J. L. Kasperbauer, K. V. Ballman, and L. Chen. 2003. 'B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma', *Cancer Res*, 63: 6501-5.

- Sugano, G., I. Bernard-Pierrot, M. Lae, C. Battail, Y. Allory, N. Stransky, S. Krumeich, M. L. Lepage, P. Maille, M. H. Donnadieu, C. C. Abbou, S. Benhamou, T. Lebret, X. Sastre-Garau, S. Amigorena, F. Radvanyi, and C. Thery. 2011. 'Milk fat globule--epidermal growth factor--factor VIII (MFG-E8)/lactadherin promotes bladder tumor development', *Oncogene*, 30: 642-53.
- Sulic, S., L. Panic, I. Dikic, and S. Volarevic. 2005. 'Deregulation of cell growth and malignant transformation', *Croat Med J*, 46: 622-38.
- Sun, Q., Y. Zhang, M. Liu, Z. Ye, X. Yu, X. Xu, and Y. Qin. 2019. 'Prognostic and diagnostic significance of galectins in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis', *Cancer Cell Int*, 19: 309.
- Sun, X., Y. Mao, J. Wang, L. Zu, M. Hao, G. Cheng, Q. Qu, D. Cui, E. T. Keller, X. Chen, K. Shen, and J. Wang. 2014. 'IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer', *Oncogene*.
- Sun, Y. 2015. 'Translational horizons in the tumor microenvironment: harnessing breakthroughs and targeting cures', *Med Res Rev*, 35: 408-36.
- Sun, Y., J. Campisi, C. Higano, T. M. Beer, P. Porter, I. Coleman, L. True, and P. S. Nelson. 2012. 'Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B', *Nat Med*, 18: 1359-68.
- Sun, Y., L. Yue, P. Xu, and W. Hu. 2022. 'An overview of agents and treatments for PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors', *Front Oncol*, 12: 927587.
- Sundquist, E., J. H. Kauppila, J. Veijola, R. Mroueh, P. Lehenkari, S. Laitinen, J. Risteli, Y. Soini, V. M. Kosma, I. Sawazaki-Calone, C. C. Macedo, R. Bloigu, R. D. Coletta, and T. Salo. 2017. 'Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups', *Br J Cancer*, 116: 640-48.
- Szabo, P., M. Kolar, B. Dvorankova, L. Lacina, J. Stork, C. Vlcek, H. Strnad, M. Tvrdek, and K. Smetana, Jr. 2011. 'Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells', *Biol Cell*, 103: 233-48.
- Szabo, P., J. Valach, K. Smetana, Jr., and B. Dvorankova. 2013. 'Comparative analysis of IL-8 and CXCL-1 production by normal and cancer stromal fibroblasts', *Folia Biol (Praha)*, 59: 134-7.
- Talamini, R., C. Bosetti, C. La Vecchia, L. Dal Maso, F. Levi, E. Bidoli, E. Negri, C. Pasche, S. Vaccarella, L. Barzan, and S. Franceschi. 2002. 'Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study', *Cancer Causes Control*, 13: 957-64.
- Tang, Y., P. Kesavan, M. T. Nakada, and L. Yan. 2004. 'Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN', *Mol Cancer Res*, 2: 73-80.
- Tempero, M. A., M. P. Malafa, M. Al-Hawary, S. W. Behrman, A. B. Benson, D. B. Cardin, E. G. Chiorean, V. Chung, B. Cizto, M. Del Chiaro, M. Dillhoff, T. R. Donahue, E. Dotan, C. R. Ferrone, C. Fountzilas, J. Hardacre, W. G. Hawkins, K. Klute, A. H. Ko, J. W. Kunstman, N. LoConte, A. M. Lowy, C. Moravek, E. K. Nakakura, A. K. Narang, J. Obando, P. M. Polanco, S. Reddy, M. Reyngold, C. Scaife, J. Shen, C. Vollmer, R. A. Wolff, B. M. Wolpin, B. Lynn, and G. V. George. 2021. 'Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology', *J Natl Compr Canc Netw*, 19: 439-57.
- Tewari, K. S., M. W. Sill, R. T. Penson, H. Huang, L. M. Ramondetta, L. M. Landrum, A. Oaknin, T. J. Reid, M. M. Leitao, H. E. Michael, P. J. DiSaia, L. J. Copeland, W. T. Creasman, F. B. Stehman, M. F. Brady, R. A. Burger, J. T. Thigpen, M. J. Birrer, S. E. Waggoner, D. H. Moore, K. Y. Look, W. J. Koh, and B. J. Monk. 2017. 'Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240)', *Lancet*, 390: 1654-63.

- Theocharis, A. D., S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos. 2016. 'Extracellular matrix structure', *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 4-27.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto. 2009. 'Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease', *Cell*, 139: 871-90.
- Thiery, J. P., and C. T. Lim. 2013. 'Tumor dissemination: an EMT affair', *Cancer Cell*, 23: 272-3.
- Thyagarajan, A., M. S. A. Alshehri, K. L. R. Miller, C. M. Sherwin, J. B. Travers, and R. P. Sahu. 2019. 'Myeloid-Derived Suppressor Cells and Pancreatic Cancer: Implications in Novel Therapeutic Approaches', *Cancers (Basel)*, 11.
- Tilman, G., M. Mattiussi, F. Brasseur, N. van Baren, and A. Decottignies. 2007. 'Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells', *Mol Cancer*, 6: 80.
- Timoshenko, A. V., H. Kaltner, S. Andre, H. J. Gabius, and P. K. Lala. 2010. 'Differential stimulation of VEGF-C production by adhesion/growth-regulatory galectins and plant lectins in human breast cancer cells', *Anticancer Res*, 30: 4829-33.
- Tommelein, J., L. Verset, T. Boterberg, P. Demetter, M. Bracke, and O. De Wever. 2015. 'Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer', *Front Oncol*, 5: 63.
- Tong, J., S. Mou, L. Xiong, Z. Wang, R. Wang, A. Weigand, Q. Yuan, R. E. Horch, J. Sun, and J. Yang. 2018. 'Adipose-derived mesenchymal stem cells formed acinar-like structure when stimulated with breast epithelial cells in three-dimensional culture', *PLoS One*, 13: e0204077.
- Torphy, R. J., Z. Wang, A. True-Yasaki, K. E. Volmar, N. Rashid, B. Yeh, J. M. Anderson, J. S. Johansen, M. A. Hollingsworth, J. J. Yeh, and E. A. Collisson. 2018. 'Stromal Content Is Correlated With Tissue Site, Contrast Retention, and Survival in Pancreatic Adenocarcinoma', *JCO Precis Oncol*, 2018.
- Toscano, M. A., G. A. Bianco, J. M. Ilarregui, D. O. Croci, J. Correale, J. D. Hernandez, N. W. Zwirner, F. Poirier, E. M. Riley, L. G. Baum, and G. A. Rabinovich. 2007. 'Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death', *Nat Immunol*, 8: 825-34.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, and B. J. Van den Eynde. 2003. 'Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase', *Nat Med*, 9: 1269-74.
- Valach, J., Z. Fik, H. Strnad, M. Chovanec, J. Plzak, Z. Cada, P. Szabo, J. Sachova, M. Hroudova, M. Urbanova, M. Steffl, J. Paces, J. Mazanek, C. Vlcek, J. Betka, H. Kaltner, S. Andre, H. J. Gabius, R. Kodet, K. Smetana, Jr., P. Gal, and M. Kolar. 2012. 'Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors', *Int J Cancer*, 131: 2499-508.
- Van Abel, K. M., and E. J. Moore. 2012. 'Focus issue: neck dissection for oropharyngeal squamous cell carcinoma', *ISRN Surg*, 2012: 547017.
- Van Obberghen-Schilling, E., R. P. Tucker, F. Saupe, I. Gasser, B. Cseh, and G. Orend. 2011. 'Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth', *Int J Dev Biol*, 55: 511-25.
- Versteijne, E., J. A. Vogel, M. G. Besselink, O. R. C. Busch, J. W. Wilmink, J. G. Daams, C. H. J. van Eijck, B. Groot Koerkamp, C. R. N. Rasch, G. van Tienhoven, and Group Dutch Pancreatic Cancer. 2018. 'Meta-analysis comparing upfront surgery with neoadjuvant treatment in patients with resectable or borderline resectable pancreatic cancer', *Br J Surg*, 105: 946-58.
- Vietri, M. T., G. D'Elia, G. Caliendo, L. Albanese, G. Signoriello, C. Napoli, and A. M. Molinari. 2022. 'Pancreatic Cancer with Mutation in BRCA1/2, MLH1, and APC Genes: Phenotype Correlation and Detection of a Novel Germline BRCA2 Mutation', *Genes (Basel)*, 13.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Taberner, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, and M. F. Renschler.

2013. 'Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine', *N Engl J Med*, 369: 1691-703.
- Vonderheide, R. H. 2020. 'CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy', *Annu Rev Med*, 71: 47-58.
- Walker, M. R., K. K. Patel, and T. S. Stappenbeck. 2009. 'The stem cell niche', *J Pathol*, 217: 169-80.
- Wang, K., W. Ma, J. Wang, L. Yu, X. Zhang, Z. Wang, B. Tan, N. Wang, B. Bai, S. Yang, H. Liu, S. Zhu, and Y. Cheng. 2012. 'Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma', *J Thorac Oncol*, 7: 1457-61.
- Wang, Z., H. Liu, R. Zhao, H. Zhang, C. Liu, and Y. Song. 2013. '[Tumor-stroma ratio is an independent prognostic factor of non-small cell lung cancer]', *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 16: 191-6.
- Wang, Z., Q. Yang, Y. Tan, Y. Tang, J. Ye, B. Yuan, and W. Yu. 2021. 'Cancer-Associated Fibroblasts Suppress Cancer Development: The Other Side of the Coin', *Front Cell Dev Biol*, 9: 613534.
- Watt, D. M., and J. P. Morton. 2021. 'Heterogeneity in Pancreatic Cancer Fibroblasts-TGFbeta as a Master Regulator?', *Cancers (Basel)*, 13.
- Wedman, J., J. H. Heimdal, I. Elstad, and J. Olofsson. 2002. 'Voice results in patients with T1a glottic cancer treated by radiotherapy or endoscopic measures', *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 259: 547-50.
- Whatcott, C. J., C. H. Diep, P. Jiang, A. Watanabe, J. LoBello, C. Sima, G. Hostetter, H. M. Shepard, D. D. Von Hoff, and H. Han. 2015. 'Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer', *Clin Cancer Res*, 21: 3561-8.
- Whiteside, T. L. 2005. 'Immunobiology of head and neck cancer', *Cancer Metastasis Rev*, 24: 95-105.
- Wiest, I., C. Alexiou, C. Kuhn, S. Schulze, S. Kunze, D. Mayr, P. Betz, U. Jeschke, and D. Dian. 2012. 'Expression of different carbohydrate tumour markers and galectins 1 and 3 in normal squamous and malignant epithelia of the upper aerodigestive tract', *Anticancer Res*, 32: 2023-9.
- Wilson, T. R., J. Fridlyand, Y. Yan, E. Penuel, L. Burton, E. Chan, J. Peng, E. Lin, Y. Wang, J. Sosman, A. Ribas, J. Li, J. Moffat, D. P. Sutherlin, H. Koeppen, M. Merchant, R. Neve, and J. Settleman. 2012. 'Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors', *Nature*, 487: 505-9.
- Winer, A., S. Adams, and P. Mignatti. 2018. 'Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes', *Mol Cancer Ther*, 17: 1147-55.
- Witkiewicz, A., T. K. Williams, J. Cozzitorto, B. Durkan, S. L. Showalter, C. J. Yeo, and J. R. Brody. 2008. 'Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection', *J Am Coll Surg*, 206: 849-54; discussion 54-6.
- Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden. 2010. 'Roles for growth factors in cancer progression', *Physiology (Bethesda)*, 25: 85-101.
- Wolchok, J. D., L. Rollin, and J. Larkin. 2017. 'Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma', *N Engl J Med*, 377: 2503-04.
- Wolrab, D., R. Jirasko, E. Cifkova, M. Horing, D. Mei, M. Chocholouskova, O. Peterka, J. Idkowiak, T. Hrnčiarova, L. Kuchar, R. Ahrends, R. Brumarova, D. Friedecky, G. Vivo-Truyols, P. Skrha, J. Skrha, R. Kucera, B. Melichar, G. Liebisch, R. Burkhardt, M. R. Wenk, A. Cazenave-Gassiot, P. Karasek, I. Novotny, K. Greplova, R. Hrstka, and M. Holcapek. 2022. 'Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer', *Nat Commun*, 13: 124.
- Wu, M. H., H. C. Hong, T. M. Hong, W. F. Chiang, Y. T. Jin, and Y. L. Chen. 2011. 'Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression', *Clin Cancer Res*, 17: 1306-16.
- Wu, R., T. Wu, K. Wang, S. Luo, Z. Chen, M. Fan, D. Xue, H. Lu, Q. Zhuang, and X. Xu. 2018. 'Prognostic significance of galectin-1 expression in patients with cancer: a meta-analysis', *Cancer Cell Int*, 18: 108.



- Wu, X., L. Ruan, Y. Yang, and Q. Mei. 2017. 'Analysis of gene expression changes associated with human carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung carcinoma', *Biol Res*, 50: 6.
- Xiong, Y., J. Zhang, M. Liu, M. An, L. Lei, and W. Guo. 2014. 'Human leptin protein activates the growth of HepG2 cells by inhibiting PERKmediated ER stress and apoptosis', *Mol Med Rep*, 10: 1649-55.
- Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck. 2009. 'TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition', *Cell Res*, 19: 156-72.
- Yadav, D., and A. B. Lowenfels. 2013. 'The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer', *Gastroenterology*, 144: 1252-61.
- Yamamoto, H., F. Itoh, S. Iku, Y. Adachi, H. Fukushima, S. Sasaki, M. Mukaiya, K. Hirata, and K. Imai. 2001. 'Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression', *J Clin Oncol*, 19: 1118-27.
- Yang, J., L. Xiong, R. Wang, Q. Yuan, Y. Xia, J. Sun, and R. E. Horch. 2015. 'In vitro expression of cytokeratin 18, 19 and tube formation of adipose-derived stem cells induced by the breast epithelial cell line HBL-100', *J Cell Mol Med*, 19: 2827-31.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, L. Yu, J. Ni, and F. T. Liu. 2001. 'Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily', *J Biol Chem*, 276: 20252-60.
- Yang, Z. T., S. Y. Yeo, Y. X. Yin, Z. H. Lin, H. M. Lee, Y. H. Xuan, Y. Cui, and S. H. Kim. 2016. 'Tenascin-C, a Prognostic Determinant of Esophageal Squamous Cell Carcinoma', *PLoS One*, 11: e0145807.
- Yao, Z., S. Fenoglio, D. C. Gao, M. Camiolo, B. Stiles, T. Lindsted, M. Schleder, C. Johns, N. Altorki, V. Mittal, L. Kenner, and R. Sordella. 2010. 'TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 15535-40.
- Yeh, C. R., S. Slavin, J. Da, I. Hsu, J. Luo, G. Q. Xiao, J. Ding, F. J. Chou, and S. Yeh. 2016. 'Estrogen receptor alpha in cancer associated fibroblasts suppresses prostate cancer invasion via reducing CCL5, IL6 and macrophage infiltration in the tumor microenvironment', *Mol Cancer*, 15: 7.
- Yoshida, T., T. Akatsuka, and K. Imanaka-Yoshida. 2015. 'Tenascin-C and integrins in cancer', *Cell Adh Migr*, 9: 96-104.
- Young, M. R. 2006. 'Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault', *Head Neck*, 28: 462-70.
- Young, R. J., D. Urban, C. Angel, J. Corry, B. Lyons, N. Vallance, S. Kleid, T. A. Iseli, B. Solomon, and D. Rischin. 2015. 'Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma', *Br J Cancer*, 112: 1098-104.
- Yu, L., and W. Li. 2022. 'Abnormal activation of notch 1 signaling causes apoptosis resistance in cervical cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 15: 11-19.
- Yurkovetsky, Z. R., J. M. Kirkwood, H. D. Edington, A. M. Marrangoni, L. Velikokhatnaya, M. T. Winans, E. Gorelik, and A. E. Lokshin. 2007. 'Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b', *Clin Cancer Res*, 13: 2422-8.
- Zakrzewski, W., M. Dobrzynski, M. Szymonowicz, and Z. Rybak. 2019. 'Stem cells: past, present, and future', *Stem Cell Res Ther*, 10: 68.
- Zeng, Y., M. Zou, Y. Liu, K. Que, Y. Wang, C. Liu, J. Gong, and Y. You. 2020. 'Keratin 17 Suppresses Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer', *Front Med (Lausanne)*, 7: 572494.
- Zhang, X. H., X. Jin, S. Malladi, Y. Zou, Y. H. Wen, E. Brogi, M. Smid, J. A. Foekens, and J. Massague. 2013. 'Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma', *Cell*, 154: 1060-73.

- Zhou, W., S. Guo, M. Liu, M. E. Burow, and G. Wang. 2019. 'Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy', *Curr Med Chem*, 26: 3026-41.
- Zhu, Y., B. L. Knolhoff, M. A. Meyer, T. M. Nywening, B. L. West, J. Luo, A. Wang-Gillam, S. P. Goedegebuure, D. C. Linehan, and D. G. DeNardo. 2014. 'CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models', *Cancer Res*, 74: 5057-69.
- Zhuang, L., Y. Yao, L. Peng, F. Cui, C. Chen, Y. Zhang, L. Sun, Q. Yu, and K. Lin. 2022. 'Silencing GS Homeobox 2 Alleviates Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer Cells by Activating SHH/GLI1 Signaling Pathway', *Dig Dis Sci*, 67: 3773-82.

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

Desmoplastic crosstalk in pancreatic ductal adenocarcinoma is reflected by different responses of Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902, and CAPAN-2 cell lines to cancer-associated/normal fibroblasts.

Novak, S., Kolar, M., Szabo, A., Vernerova, Z., Lacina, L., Strnad, H., Sachova, J., Hradilova, M., Havranek, J., Spanko, M., Coma, M., Urban, L., Kanuchova, M., Melegova, N., Gurlich, R., Dvorak, J., Smetana jr., K., Gal, P., Szabo, P. *Cancer Genomics and Proteomic* 2021, 18(3), pp. 221–243  
IF 3.395

Detection of distinct changes in gene-expression profiles in specimens of tumors and transition zones of tenascin-positive/-negative head and neck squamous cell carcinoma.

Zivicova, V., Gal, P., Mifkova, A., Novak, S., Kaltner, H., Kolar, M., Strnad, H., Sachova, J., Hradilova, M., Chovanec, M., Gabius, H-J., Smetana jr., K., Zdenek, F.,  
*Anticancer Research*, 2018, 38(3), pp. 1279–1290  
IF 1,935

## 8.2 Publikace bez vztahu k disertaci

Molecular changes underlying hypertrophic scarring following burns involve specific deregulations at allwound healing stages (inflammation, proliferation and maturation).

Coma, M., Frohlichova, L., Urban, L., Zajicek, R., Urban, T., Szabo, P., Novak, S., Fetissov, V., Dvorankova, B., Smetana jr., K., Gal, P.  
International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2), pp. 1–20, 897  
IF 6,208

The role of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in the diagnostic management of parotid gland masses with emphasis on potential pitfalls.

Dostalova, L., Kalfert, D., Jechova, A., Koucky, V., Novak, S., Kuchar, M., Zabrodsky, M., Novakova Kodetova, D., Ludvikova, M., Kholova, I., Plzak, J.  
European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2020, 277(6), pp. 1763–1769  
IF 2,503

The role of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in Warthin tumour diagnosis and management.

Jechova, A., Kuchar, M., Novak, S., Koucky, V., Dostalova, L., Zabrodsky, M., Kalfert, D., Plzak, J.  
European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2019, 276(10), pp. 2941–2946  
IF 1.809

How Signaling Molecules Regulate Tumor Microenvironment: Parallels to Wound Repair.

Gal, P., Varinska, L., Faber, L., Novak, S., Szabo, P., Mitrengova, P., Mirossay, A., Mucaji, P., Smetana jr., K.  
Molecules, 2017, 22(11), 1818  
IF 3,098

Adenoid cystic carcinoma of the auricle.

Novak, S., Fik, Z., Kalfert, D., Lukes, P., Plzak, J.  
Otorinolaryngologie a Foniatrie, 2017, 66(3), pp. 148–151  
IF: 0