



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Medicina

Klinikinės medicinos institutas
Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinika

Sofija Saulė Kaubrytė, VI kursas, 7 gr.

VIENTISŲJŲ STUDIJŲ MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Chemoterapijos efektyvumo įvertinimas panaudojant individualius kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius: klinikinio pritaikomumo literatūros apžvalga

Clinical Application of Chemotherapy Efficacy Evaluation on Individual Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Organoid Models: a Literature Review

Darbo vadovas:

Dr. Benediktas Kurlinkus

Klinikos vadovas:

Prof. (HP) dr. Kęstutis Strupas

Vilnius, 2025

saule.kaubryte@mf.stud.vu.lt

TURINYS

1. SANTRAUKA
2. SUMMARY
3. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI
4. DARBO METODIKA
5. ĮVADAS
 - 5.1 Kasos duktalinė adenokarcinoma. Ligos aktualumas ir epidemiologija
 - 5.2 Genetiniai ir molekuliniai kasos duktalinės adenokarcinomos etiologijos ir patogenezės veiksniai
 - 5.3 Individualūs pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai
 - 5.4 Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimas
 - 5.5 Organoidų palyginimas su kitais kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamaisiais modeliais
 - 5.6 Kasos duktalinės adenokarcinomos terapiniai iššūkiai: atsparumo chemoterapijai problema ir individualizuotų gydymo strategijų perspektyvos
6. LITERATŪROS APŽVALGA
 - 6.1 Trimačių kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamųjų modelių kūrimo ir tobulinimo galimybės
 - 6.2 Cirkuliuojančių naviko ląstelių (CTC) panaudojimas kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimui
 - 6.3 Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų reikšmė ikivėžinių ir ankstyvų kasos vėžio pažeidimų modeliavimo, diagnostikos ir gydymo kontekste
 - 6.4 Organoidų modelių panaudojimas kasos navikų biologinių savybių tyrimuose: galimybės, pranašumai ir trūkumai
 - 6.5 Individualių pacientų organoidų pasitelkimas tiriant kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumo chemoterapijai veiksnius: naviko mikroaplinkos sąlygų ir sąveikų modeliavimo reikšmė
 - 6.6 Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių pritaikymas ligos diagnostinių ir terapinių (teranostinių) biožymenų aptikimui
 - 6.7 Individualių pacientų organoidų modelių pritaikymas, siekiant išspręsti kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumo chemoterapijai problemą
 - 6.8 Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių pritaikymas vaistų testavimo ir farmakotipavimo tyrimuose
7. IŠVADOS
8. REKOMENDACIJOS
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

SANTRAUKA

Kasos duktalinė adenokarcinoma yra dažniausiai pasitaikanti ir didžiausiu piktybiškumu pasižyminti kasos vėžio forma, sudaranti daugiau nei 90 % visų kasos vėžio atvejų. Liga siejama su prastomis sergančiųjų klinikinėmis išėtimis – remiantis literatūros duomenimis, pacientų, kuriems diagnozuota kasos duktalinė adenokarcinoma, penkerių metų išgyvenamumo rodiklis yra mažesnis nei 10 %. Pagrindiniais veiksniais, turinčiais įtakos neigiamai ligos dinamikai ir niūrioms pacientų išgyvenamumo prognozėms, yra laikomi tokie

aspektai, kaip vėlyva ligos diagnozė, naviko biologinės savybės ir sudėtingos mikroaplinkos sąlygos, nulemiančios kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumą standartinių gydymo metodų, kaip antai, chemoterapijos ir radioterapijos, poveikiui. Kasos duktalinės adenokarcinomos molekulinė patogenezė grindžiama genetiniais pokyčiais, tarp kurių paminėtinos KRAS mutacijos, nustatomos daugiau nei 90 % ligos atvejų, taip pat TP53, SMAD4 ir CDKN2A mutacijos, kurios skatina kasos vėžio progresavimą, navikų genominių nestabilumą ir atsparumą gydymui. Kasos navikai išsivysto iš pirmtakinių pažeidimų, tokių kaip kasos intraepitelinės neoplazijos (PanIN), intraduktalinės papiliarinės mucininės neoplazijos (IPMN) ir mucininės cistinės neoplazijos (MCN). Šiems ankstyviesiems kasos pažeidimams būdingas genetinių mutacijų kaupimasis, galiausiai paskatinantis neoplazijų progresavimą į invazinę kasos duktalinę karcinomą. Naujausioje mokslinėje literatūroje pateikiama įvairių kasos duktalinės adenokarcinomos klasifikavimo pagal klinikinius ir transkripcinius profilius schemų, pavyzdžiui, kai kurie tyrėjai išskiria klasikinio, plokščialąstelinio, imunogeninio ir aberantiškai diferencijuoto potipių kasos navikus, tačiau dažnai moksliniuose tyrimuose apsiribojama paprastesniu kasos duktalinės adenokarcinomos molekulinių savybių diferencijavimu, suskirstant navikus į du pagrindinius potipius – klasikinį ir bazinį. Pastebima, jog tradiciniai ikiklinikiniai modeliai, įskaitant dvimates ląstelių kultūras, genetiškai modifikuotų pelių modelius, pacientų kasos audinio kilmės ksenograftus, negebantys tiksliai atspindėti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų genetinio heterogeniškumo, stromos sąveikų ir terapinių atsakų. Pastaruoju metu perspektyvia tiriamąja platforma, padedančia mokslininkams geriau suprasti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų biologiją ir numatyti pacientų terapinius atsakus, tampa individualūs organoidų modeliai. Šios trimatės eksperimentinės platformos, sukurtos iš pacientų kasos navikų audinių, geba išsaugoti genetines, molekulinės ir fenotipines pirminių navikų savybes ir taip tiksliau atkartoti jų heterogeniškumą. Pagrindiniai kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų sukūrimui reikalingos žaliavos šaltiniai yra chirurginių rezekcijų medžiaga, plonos adatos aspiracinių biopsijų ėminiai ir mėginiai iš kasos vėžio metastazinių židinių. Individualūs organoidų modeliai geba užtikrinti gana aukštą naviko biologinių savybių perteikimo tikslumą ir gali būti naudojami individualizuotam vaistų testavimui bei pasitelkiami atliekant farmakotipavimo tyrimus. Pastaraisiais metais literatūroje pristatyti organoidų kultivavimo technologijų patobulinimai, pavyzdžiui, stromos komponentų, įskaitant su vėžiu susijusius fibroblastus (CAF) ir imunines ląsteles, integravimas į šių eksperimentinių modelių sudėtį, tyrimų metu sudaro sąlygas dar geriau imituoti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkos savybes. Taip pat tokios organoidų generavimo technologijos, kaip antai, 3D biospausdinimas ir mikroskysčių kultivavimo platformos, prisideda prie geresnio šių tiriamųjų modelių reprezentatyvumo ir tinkamumo išsamiai pacientų navikų analizei. Paminėti inovatyvūs organoidų kūrimo metodai sudaro sąlygas šių modelių pritaikymui didelio našumo vaistų testavimo tyrimuose. Šiuo metu mokslininkams jau pavyksta išauginti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidus iš mažų naviko žaliavos kiekių - kraujyje cirkuliuojančių naviko ląstelių, taip pat atsiranda galimybių organoidų modelių pagrindu nagrinėti su kasos duktalinės adenokarcinomos metastazavimą ir terapinį atsparumą sąlygojančius mechanizmus. Visgi dauguma tyrėjų sutinka, jog organoidų modelių, kaip eksperimentinės platformos, pritaikymo klinikinėje praktikoje perspektyvos ateityje turėtų būti vertinamos atliekant išsamesnius tyrimus. Nepaisant mokslinėje literatūroje įvardijamų iššūkių, susijusių su organoidų kultūrų standartizavimu, kasos duktalinės adenokarcinomos navikų heterogeniškumu ir mikroaplinkos sudėtingumu, individualūs pacientų audinių kilmės organoidų modeliai yra perspektyvus

tiriamasis įrankis, pasitelktinas naujų kasos vėžio biožymenų, terapinių taikinių paieškoms bei personalizuotų gydymo strategijų kūrimui ir standartiškai klinikinėje praktikoje taikomų terapinių priemonių tobulinimui, tuo siekiant pagerinti kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų gyvenimo kokybę ir išgyvenamumo prognozių tendencijas.

Raktažodžiai: kasos duktalinė adenokarcinoma, kasos vėžys, naviko mikroaplinka, pacientų organoidų modeliai, organoidai, chemoterapija, atsparumas, didelio našumo vaistų atranka, farmakotipavimas, personalizuota medicina.

SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma is the most prevalent and aggressive form of pancreatic cancer, accounting for over 90% of cases. It is associated with poor prognosis, with a five-year survival rate below 10%, largely due to late-stage diagnosis, a highly desmoplastic tumor microenvironment, and resistance to standard therapies such as chemotherapy and radiotherapy. The molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma is driven by genetic alterations, most notably KRAS mutations, which are present in over 90% of cases, along with TP53, SMAD4, and CDKN2A mutations that contribute to tumor progression, genomic instability, and resistance to therapy. The disease progresses from precursor lesions, such as pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs), intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs), and mucinous cystic neoplasms (MCNs), through the accumulation of sequential genetic mutations leading to invasive carcinoma. The latest scientific literature presents various classification schemes for pancreatic ductal adenocarcinoma subtypes. Some researchers distinguish between classical, squamous, immunogenic, and aberrantly differentiated subtypes, each characterized by distinct transcriptional profiles and clinical implications. However, many studies adopt a more simplified molecular classification approach, often categorizing pancreatic ductal adenocarcinoma into two primary subtypes—classical and basal—based on key molecular characteristics. Despite extensive research, conventional preclinical models, including two-dimensional (2D) cell cultures, genetically engineered mouse models, and patient-derived xenografts, exhibit significant limitations in recapitulating the genetic heterogeneity, stromal interactions, and therapeutic responses observed in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. In contrast, organoid models have emerged as a promising platform for studying pancreatic ductal adenocarcinoma biology and treatment response. These three-dimensional (3D) structures, derived from patient tumors, retain the genetic, molecular, and phenotypic characteristics of the original malignancy, allowing for a more accurate representation of tumor heterogeneity. Pancreatic ductal adenocarcinoma organoids can be generated from surgical resections, fine-needle aspiration biopsies (EUS-FNB), and metastatic lesions. These models have demonstrated high fidelity in preserving tumor-specific molecular subtypes and can be used for personalized drug screening and pharmacotyping. Recent advancements in organoid technology, including the incorporation of stromal components such as cancer-associated fibroblasts (CAFs) and immune cells, have improved their ability to replicate the tumor microenvironment. Additionally, innovative methodologies such as 3D bioprinting and microfluidic systems enhance the reproducibility and scalability of these models, facilitating their integration into high-throughput drug screening platforms. Circulating tumor cell (CTC)-derived organoids represent a novel avenue for studying pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis and therapeutic resistance, though further

validation is required for their clinical implementation. Despite challenges related to culture standardization, tumor heterogeneity, and microenvironmental complexity, patient-derived organoid models constitute a promising research platform for biomarker discovery, individualized treatment optimization, the development of novel targeted therapies, and the refinement of standard clinical therapeutic approaches, ultimately contributing to improved quality of life and enhanced survival prognosis for patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, pancreatic cancer, tumor microenvironment, patient-derived organoids, organoid models, chemotherapy, resistance, high-throughput drug screening, pharmacotyping, personalized medicine.

DARBO TIKSLAS

Remiantis naujausioje mokslinėje literatūroje pateikiama informacija, išryškinti individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių taikymo pagrįstumą ir potencialą tiriant kasos navikų biologines savybes, vertinant klinikinį chemoterapijos efektyvumą bei kuriant naujas kasos vėžio gydymo strategijas.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Išanalizuoti trimačių kasos duktalinės adenokarcinomos modelių kūrimo metodus bei įvertinti šių modelių pritaikymo moksliniuose tyrimuose ir klinikinėje praktikoje galimybes.
2. Aptarti cirkuliuojančių naviko ląstelių (CTC) panaudojimo perspektyvas kuriant individualius kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius.
3. Atkreipti dėmesį į individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų reikšmę priešvėžinių ir ankstyvųjų kasos vėžio pažeidimų modeliavimo, diagnostikos ir gydymo kontekste.
4. Išryškinti organoidų modelių taikymo svarbą kasos navikų biologinių savybių tyrimuose bei palyginti jų pranašumus ir trūkumus su kitų kasos vėžio modeliavimui naudojamų tiriamųjų sistemų ypatybėmis.
5. Pabrėžti individualių pacientų organoidų modelių reikšmę aiškinantis kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumo chemoterapijai veiksnius, ypatingą dėmesį skiriant naviko mikroaplinkos sąlygų ir sąveikų reprezentavimo aptarimui.
6. Pateikti mokslinės literatūros įrodymais grįstų pavyzdžių, patvirtinančių individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių vertę aptinkant teranostinius kasos vėžio biožymenis.
7. Įvertinti individualių pacientų organoidų modelių potencialą sprendžiant su kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumu chemoterapijai susijusias problemas.
8. Apibendrinti organoidų modelių pritaikymo pagrįstumą vaistų testavimo ir farmakotipavimo tyrimų kontekste, projektuojant individualizuotą požiūrį į kasos duktalinės adenokarcinomos gydymą.

DARBO METODIKA

Literatūros šaltinių atrankos strategija

Mokslinės literatūros paieška buvo atlikta naudojantis *PubMed* ir *Google Scholar* duomenų bazėmis, pritaikius pasirinktus straipsnių atrankos kriterijus. Literatūros paieškai pasitelkti nagrinėjama temą atitinkantys raktažodžiai ir jų deriniai: “pancreatic ductal adenocarcinoma“, “pancreatic cancer“, “chemotherapy“, “chemotherapy efficacy“, “organoid“, “patient-derived organoid” ir “organoid model“. Pirminės atrankos metu iš viso buvo rasta 318 straipsnių (ikiklinikinių, klinikinių, laboratorinių tyrimų aprašymai, sisteminės apžvalgos, metaanalizės ir metodologinės studijos), iš kurių literatūros analizei pasirinkta nagrinėti 70 mokslinių straipsnių, atitinkusių įtraukties kriterijus. Papildomai į literatūros apžvalgą įtraukti 127 straipsniai, suteikę vertingos informacijos nagrinėtos temos kontekstui bei paaiškinę aktualias problemas ir klausimus, iškilusius analizuojant mokslines publikacijas, atrinktas pagal paieškos metu pritaikytus raktinius žodžius.

Straipsnių įtraukimo ir atmetimo kriterijai

Atsižvelgus į temos naujumą ir aktualumą, literatūros apžalgai pasirinkta nagrinėti 2014–2024 m. laikotarpiu publikuotus straipsnius. Į apžvalgą įtraukti originalūs straipsniai, parašyti anglų kalba, susiję su nagrinėjamos temos problematika, pristatantys reikšmingus atradimus, susijusius su chemoterapijos efektyvumo vertinimu individualiuose kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose bei klinikinio organoidų modelių pritaikomumo aspektais. Atmesti straipsniai, neatitinkę įtraukties kriterijų: tiesiogiai nesusiję su tema (straipsniai apie kitų gastrointestinių navikų organoidus arba kitus kasos vėžio tipus), taip pat moksliniai straipsniai, publikuoti ne anglų kalba.

Literatūros paieškos proceso eiga

Literatūros paieška vykdyta įvedus pasirinktus raktažodžius į *PubMed* ir *Google Scholar* internetinės paieškos sistemų laukelius. Straipsnių paieškos rezultatai buvo patikslinti pagal publikavimo datą, straipsnio tipą ir papildomus įtraukties kriterijus (temos atitikimas pagal pavadinimą, santrauką; teksto kalba). Taip pat buvo peržiūrėti apžalgai atrinktų straipsnių literatūros sąrašai, siekiant identifikuoti tyrimus, galinčius suteikti papildomos reikšmingos informacijos literatūros analizei.

Duomenų analizė ir interpretacija

Visi literatūros paieškos metu identifikuoti straipsniai buvo atrinkti pagal pavadinimus ir santraukas. Pasirinktų straipsnių pilni tekstai buvo peržiūrėti ir patikrinti, siekiant patvirtinti jų tinkamumą planuojamai atlikti literatūros apžalgai. Duomenų analizei pasitelkti pagrindiniai temos aktualumą literatūroje atliepiantys faktai ir tendencijos. Išanalizavus literatūroje pateiktus duomenis ir siekiant visapusiškai atskleisti nagrinėjamos temos turinio aspektus, atitinkamuose rašto darbo skirsniuose pateikta išsami apžvalga, pagrįsta mokslinės literatūros įrodymais apie individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių klinikinio pritaikymo galimybes.

IVADAS

Kasos duktalinė adenokarcinoma. Ligos aktualumas ir epidemiologija

Kasos duktalinė adenokarcinoma (angl. pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) yra labiausiai paplitusi kasos vėžio forma, remiantis literatūros duomenimis, sudaranti daugiau nei 90 % visų kasos vėžio atvejų [1, 2]. Apie 90–95 % kasos piktybinių navikų, įskaitant ir kasos duktalinę adenokarcinomą, vystosi iš egzokrininio kasos audinio [3]. Kasos vėžys yra vienas iš agresyviausių onkologinių susirgimų, siejamas su prastomis pacientų klinikinėmis prognozėmis – daugelis autorių įvardija, kad kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų 5 metų išgyvenamumo rodiklis yra mažesnis nei 10%, o kai kuriuose tyrimuose nurodoma, kad 5 metus išgyvena tik 7–8% kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų [1-2, 4-6]. Nuogąstavimus dėl visame pasaulyje stebimų šia liga sergančiųjų prastų išgyvenamumo tendencijų įrodo pacientų mirtingumo bei sergamumo rodiklių santykis, kuris statistiškai siekia apie 94 % [7, 8]. Literatūros šaltiniuose nurodoma, jog kasos duktalinė adenokarcinoma pastaruoju metu užima ketvirtą vietą tarp pagrindinių su vėžiu susijusių mirčių priežasčių Europoje, tačiau dalis mokslininkų pateikia pesimistinių prognozių, teigdami, kad iki 2030 m. kasos vėžys gali tapti antra pagal dažnį mirties nuo vėžio priežastimi Senajame žemyne dėl didėjančio gyventojų sergamumo šia liga ir riboto pacientų gydymo rezultatų pagerėjimo [2, 9-12]. Kasos duktalinė adenokarcinoma pasaulyje yra 8-as dažniausias onkologinis susirgimas tarp moterų ir atitinkamai 9-as tarp vyrų [6, 9]. Statistiškai kasos lataukų piktybiniai navikai kasmet sukelia maždaug 350 000 mirčių visame pasaulyje, tuo tarpu Europoje per vienerių metų laikotarpį (2020 m.) užfiksuota apie 132 000 mirčių atvejų, siejamų su kasos duktaline adenokarcinoma [12, 13]. Tarp mokslinėje literatūroje įvardijamų didelio kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų mirštamumo priežasčių priskirtinos šios: vėlyva ligos diagnozė, sudėtingos naviko mikroaplinkos sąlygos, agresyvi vėžio ląstelių biologija, siejama su atsparumu standartiniams kliniškai taikomiems gydymo metodams, pavyzdžiui, chemoterapijai arba radioterapijai [1, 3, 9, 14]. Paprastai nustatoma, kad dauguma pacientų serga pažengusia arba metastazavusia kasos duktaline adenokarcinoma, o pastarosios atveju, pacientų išgyvenamumas tesiekia apie 6–12 mėnesių po ligos diagnozavimo, tuo tarpu pacientų, kuriems po atlikto naviko pašalinimo yra aptinkami teigiami navikui rezekcijos kraštai, išgyvenamumo trukmė yra mažesnė nei vieneri metai [9, 15, 16]. Nepaisant ilgą laiką vystomos imunoterapijos ir adjuvantinės chemoterapijos metodų pažangos, kasos duktalinės adenokarcinomos prognozė per pastaruosius 30 metų ženkliai nepakito. Pavyzdžiui, remiantis vieno pastarąją tendenciją atspindinčio tyrimo duomenimis, teigiamų pacientų terapinių atsakų dažnis, taikant gydymą chemoterapiniu agentu gemcitabinu arba skiriant terapiją FOLFIRINOX režimu, buvo žemas, iliustruojantis nepakankamą gydymo efektyvumą, ir atitinkamai siekė 9.4% (po paskirto gydymo gemcitabinu) ir 31.6% (pritaikius terapiją FOLFIRINOX režimu) [2, 13, 17]. Taigi, atsižvelgiant į aptartas kasos duktalinės adenokarcinomos biologines savybes ir epidemiologines tendencijas, akcentuotina ankstyvo ligos diagnozavimo, stratifikuoto su liga susijusių rizikos veiksnių vertinimo bei inovatyvių terapinių strategijų kūrimo svarba, siekiant įveikti šios onkologinės ligos visuomenės sveikatai keliamus iššūkius.

Genetiniai ir molekuliniai kasos duktalinės adenokarcinomos etiologijos ir patogenezės veiksniai

Kasos duktalinės adenokarcinomos etiologiją bei patogenezę sąlygoja sudėtinga genetinių mutacijų ir molekulinų kelių (angl. molecular pathways) sąveika, siejama su agresyviu ligos pobūdžiu ir reikšmingu naviko savybių nevienalytiškumu, dar vadinamu intratumoriniu heterogeniškumu (angl. intratumoral heterogeneity). Vienas pagrindinių literatūroje įvardijamų kasos duktalinės adenokarcinomos genetiniam profiliui būdingų požymių yra KRAS mutacijos, kurios nustatomos daugiau nei 90% šia liga sergančių pacientų. KRAS mutacijos paprastai atsiranda dar ankstyvoje kasos duktalinės adenokarcinomos vystymosi stadijoje ir yra aptinkamos specifinėje baltymo vietoje, vadinamoje G12 pozicijoje, t. y., ties 12-ąja aminorūgštimi KRAS baltymo sekoje, o tai, savo ruožtu, lemia sumažėjusį fermento GTPazės aktyvumą, paskatinantį mutuo to KRAS baltymo aktyvaciją. Prie dažniausiai pasitaikančių KRAS mutacijų priskiriamos G12D ir G12V mutacijos. Mokslininkai išsiaiškino, kad šios mutacijos gali sustiprinti molekulinų signalizavimo kelių, tokių kaip MAPK ir PI3K, aktyvumą kasos navikų ląstelėse, taip sukeldamos nekontroliuojamą jų proliferaciją ir skatindamos išlikimą [12, 18, 19]. Remiantis atliktų tyrimų duomenimis, nustatyta, jog, priešingai nei KRAS mutacijų aptikimo atveju, jų neaptikimas yra sietinas su geresnėmis kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų klinikinėmis prognozėmis, be to, mokslinėje literatūroje atskirai nurodomas terminas, kuriuo apibūdinami KRAS mutacijų neturintys, arba tiksliau, funkciškai normalų KRAS baltymą ekspresuojantys navikai, tai - laukinio tipo (angl. wild-type) kasos duktalinės adenokarcinomos navikai [12, 19, 20]. Tarp kitų svarbių dažnai nustatomų genetinių pokyčių, siejamų su kasos duktalinės adenokarcinomos išsivystymu, greta KRAS, paminėtinos TP53, SMAD4, p16/CDKN2A ir BRCA2 mutacijos, kurios tarpusavyje gali veikti sinergiškai, kartu skatindamos kasos vėžio progresavimą bei sąlygodamos navikinių ląstelių genominių nestabilumą [2, 6, 18, 21, 22].

Kaip žinoma, kasos duktalinės adenokarcinomos patogenezėje svarbų vaidmenį atlieka pirmtakiniai pažeidimai (angl. precursor lesions), tarp jų literatūroje dažniausiai nurodomos kasos intraepitelinės neoplazijos (angl. pancreatic intraepithelial neoplasias, PanINs), taip pat, kiek rečiau pasitaikantys, su naviko išsivystymu siejami ankstyvi pažeidimai – kasos intraduktalinės papiliarinės mucininės neoplazijos (angl. intraductal papillary mucinous neoplasms), mucininės cistinės neoplazijos (angl. mucinous cystic neoplasms), intraduktalinės onkocitinės papiliarinės neoplazijos (angl. intraductal oncocytic papillary neoplasms) ir intraduktalinės tubulopapiliarinės neoplazijos (angl. tubulopapillary neoplasms). Manoma, kad aukšto piktybiškumo kasos intraepitelinės neoplazijų išsivystymą lemia nuoseklus genetinių pokyčių kaupimasis kasos ląstelėse, pabrėžiant tokius veiksnius, kaip jau minėta kasos duktalinės adenokarcinomos patogenezei reikšminga KRAS aktyvacija, bei vėlesniuose naviko formavimosi etapuose atsirandančios mutacijos (TP53, SMAD4 ir CDKN2A), bendrai skatinančios laipsnišką pirmtakinių kasos ląstelių pažeidimų progresavimą į invazinę karcinomą [3, 8, 23].

Remiantis molekulinio profiliavimo analizių duomenimis, pagal transkriptomines ir genomines navikų savybes yra nustatomi skirtingi kasos duktalinės adenokarcinomos potipiai. Pavyzdžiui, Collisson ir kt. (2011 m.) išskyrė tris kasos duktalinės adenokarcinomos potipius – klasikinį (angl. classical), kvazimezenchiminį (angl. quasi-mesenchymal) ir panašų į egzokrininį (angl. exocrine-like), – kurie tarpusavyje skyrėsi pagal diferenciacijos lygius ir pacientų išgyvenamumo rezultatus [24]. Savo ruožtu, Bailey ir kt. pateikė kitokią kasos duktalinės adenokarcinomos klasifikaciją, apibrėždami keturis pagrindinius navikų potipius: plokščialąstelinį (angl. squamous), kasos pirmtakų (angl. pancreatic progenitor), imunogeninį

(angl. immunogenic) ir aberantiškai diferencijuotą endokrininį-egzokrininį (angl. aberrantly differentiated endocrine exocrine, ADEX) [25]. Pastebėta, kad klasikinis potipis pasižymi kasos ląstelių linijai būdingų transkripcijos faktorių, tokių kaip GATA6, HNF1A ir PDX1, ekspresija ir yra susijęs su labiau diferencijuotu naviko fenotipu bei geresne klinicine ligos prognoze. Tuo tarpu plokščialąstelinio kasos duktalinės adenokarcinomos potipio, kuriam būdingas epitelinės-mezenchiminės tranzicijos proceso (angl. epithelial mesenchymal transition, EMT) ir TGF- β molekulinio signalizavimo kelių suaktyvėjimas, fenotipas koreliuoja su prasta navikų diferenciacija, genominiu nestabilumu ir blogesnėmis pacientų terapinėmis išieitimis [6, 8, 26-29].

Dar tiksliau kasos duktalinės adenokarcinomos potipių specifines savybes atspindintį klasifikacijos modelį pasiūlė Chan-Seng-Yue su kolegomis (2020): pasitelkę genomines analizės duomenis ir lazerinės mikrodisekcijos technologiją (angl. laser capture microdissection), mokslininkai ištyrė pagrindines kasos duktalinės adenokarcinomos potipių savybes atitinkančius navikus bei suskirstė juos į smulkesnes kategorijas. Remiantis ankstesniuose tyrimuose įvardintam plokščialąsteliniam potipiui būdingų savybių išreikštumu ir naviko klinikiu stadijavimu, buvo išskirti atitinkami kasos duktalinės adenokarcinomos potipiai: panašus į klasikinį-A (angl. classical-like A), panašus į klasikinį-B (angl. classical-like B), panašus į bazinį-A (angl. basal-like A), panašus į bazinį-B (angl. basal-like B) ir mišrus (angl. hybrid) [30]. Anot Chan-Seng-Yue ir kt., panašiomis į bazinio potipio savybėmis pasižymintys kasos duktalinės adenokarcinomos navikai (ypač panašaus į bazinį potipį-A) sietini su pažengusia liga, plokščialąsteliniam kasos duktalinės adenokarcinomos potipiui būdingų požymių išsivystymu ir padidėjusiu KRAS geno disbalansu, kuris atspindi didesnę mutantinių KRAS alelių dalį gene. Pastarieji radiniai išryškina didelį kasos duktalinės adenokarcinomos intratumorinį heterogeniškumą, t. y., sąlygas, kuomet viename navike kartu egzistuoja kelių molekulinio vėžio potipių ląstelės [3, 26, 30-31].

Be dažnai pasitaikančių somatinių mutacijų, kasos duktalinės adenokarcinomos navikams būdingi didelės apimties chromosominiai pokyčiai, įskaitant amplifikacijas, delecijas ir genų sekos pertvarkymus, prisidedančius prie kasos vėžio genomo sudėtingumo [32]. Pavyzdžiui, Waddell ir kt. (2015 m.) apibūdino keturis genominius kasos duktalinės adenokarcinomos potipius, pagrįstus struktūrinėmis variacijomis, nustatytomis tirtuose pirminių navikų genomuose: stabilų (angl. stable), vietškai pertvarkytą (angl. locally rearranged), išsibarsčiusį (angl. scattered) ir nestabilų (angl. unstable) [33]. Stabiliam genomui kasos duktalinės adenokarcinomos potipiui buvo priskirta mažiau nei 50 struktūrinių variantų, taip pat šio potipio navikuose dažnai pasitaikė aneuploidinių ląstelių. Vietiškai pertvarkytą potipį tyrėjai susiejo su daugiau nei 50 skirtingų genetinių pokyčių, lokalizuotų vienoje ar dviejose chromosomose, įskaitant dažniausiai pastebėtas KRAS, SOX9 ir GATA6 genų amplifikacijas. Galiausiai likusieji du kasos duktalinės adenokarcinomos potipiai – išsibarstęs ir nestabilus – pasižymėjo dideliu chromosominiu nestabilumu, atitinkamai išsibarsčiusiam potipiui priskirta nuo 50 iki 200, o nestabiliui daugiau nei 200 struktūrinių variacijų [8, 33]. Be to, pažymėtina, kad kasos duktalinės adenokarcinomos patogenezė sietina ir su epigenetinėmis modifikacijomis, pavyzdžiui, DNR metiliniu ir histonų pokyčiais, o genų, tokių kaip ARID1A, KDM6A ir DNMT3A, mutacijos yra nustatomos apie 15 % kasos duktalinės adenokarcinomos atvejų [12, 32].

Remiantis literatūroje nurodoma informacija, galima teigti, jog sudėtinga kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių genomo kompozicija, kartu su specifiniais navikų potipiams

būdingais transkripcijos mechanizmais, nulemia šios agresyvia klinicine eiga pasižyminčios ligos etiologiją ir patogenezę, todėl ieškant potencialių terapinių sprendimų, svarbu tirti veiksnius, sudarančius kasos navikų molekulinį pagrindą.

Individualūs pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai

Terminas „organoidas“ (panašus į organą, angl. “organ-like”) literatūroje pirmą kartą buvo pavartotas 1946 m., pristatant cistinės organoidinės teratomos klinikinį atvejį, tačiau šiuolaikinė organoidų samprata pradėjo formotis tik apie 2009 m., kai Sato ir kt. iš pelės plonosios žarnos mėginių sukūrė pirmuosius žarnyno organoidus, kuriuos vėliau pritaikė pelių ir žmogaus virškinimo trakto epitelio audinių modeliavimui [2, 34, 35]. Organoidų modelių kūrimo pradininke laikoma Clevers laboratorija, išvysčiusi 3D ląstelių kultūros sistemą, sudarančią sąlygas epitelio organoidams formotis iš suaugusiojo organizmo audinių, išsaugant tapatumą su pirminiu audiniu. 2013 m. Huch ir kt. pritaikė šią sistemą kasos audinio organoidų kultivavimui, o 2015 m. Boj ir kt. panaudodami pelės ir žmogaus kasos adenokarcinomos navikų biologinę medžiagą, sukūrė pirmuosius 3D kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius [6, 36, 37].

Organoidai yra 3D ląstelių struktūros, suformuotos iš sveikų arba navikinių audinių, embrioninių kamieninių ląstelių (angl. embryonic stem (ES) cells) arba indukuotų pliuripotentinių kamieninių ląstelių (angl. induced pluripotent stem (iPS) cells), bei atitinkančios keturis pagrindinius kriterijus: (1) geba atkartoti organo, kurį modeliuoja, tapatybės požymius, (2) atspindi organo ląstelių tipų įvairovę, (3) reprezentuoja organui būdingas funkcijas ir (4) gali palaikyti pirminio audinio struktūrą atitinkančią saviorganizaciją (angl. self-organizing) [2, 38].

Kai kurių autorių teigimu, kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose pasitelkiami tradiciniai ikiklinikiniai modeliai, įskaitant ląstelių linijas, pelių ksenograftus ir genetiškai modifikuotas peles, negali atspindėti tam tikrų, specifinių kasos duktalinės adenokarcinomos navikų genetinės ir epigenetinės įvairovės ypatybių, todėl ne visuomet yra tinkami taikymui klinikinių, farmakologinių tyrimų kontekste [39-41]. Manoma, kad pacientų navikų kilmės organoidų modeliai gali įveikti tradicinių tiriamųjų modelių apribojimus, gebėdami tiksliai atkurti individualias navikų savybes ir imituodami naviko architektūrą in vivo sąlygomis. Mokslininkai, atlikdami tyrimus su individualiais pacientų organoidais, pastebi, jog šie eksperimentiniai modeliai pasižymi dideliu jautrumu ir specifiškumu numatant chemoterapijos atsakus, taip pat specifinėmis biologinėmis ypatybėmis, glaudžiai koreliuojančiomis su atitinkamų navikų genominių profilių savybėmis. Visa tai leidžia laikyti individualius pacientų organoidų modelius perspektyvia platforma individualizuotam pacientų jautrumo chemoterapijoms vaistams testavimui, tuo siekiant pritaikyti personalizuoto gydymo schemas taip, kad skiriant terapiją onkologinėmis ligomis sergantiems pacientams būtų didinamas vaistų veiksmingumas ir mažinamas sisteminis su gydymu siejamas toksiškumas [40, 41].

Dar visai neseniai ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose pradėti naudoti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai ilgainiui tapo vertinga modeline sistema, visų pirma, taikyta siekiant geriau suprasti kasos navikų biologiją ir galiausiai integruota į individualizuotų terapinių sprendimų kūrimo procesus. Organoidų modeliuose gana tiksliai atspindimos pirminių navikų genetinės ir transkriptominės savybės, nors dažnai pastebima ir tam tikrų

neatitikimų tarp pirminių navikų ir juos atitinkančių organoidų, pavyzdžiui, tarpusavyje gali skirtis mutacijų kiekiai ir variantų alelių dažniai, kaip manoma, dėl imuninių ląstelių ar stromos komponentų taršos navikų mėginiuose [8, 42]. Taip pat tyrimai rodo, kad organoidai geba išlaikyti kasos duktalinės adenokarcinomos molekulinį potipį, tokių kaip „klasikinis“ ir „bazinis“, požymius, todėl šie modeliai yra veiksminga priemonė, galinti padėti analizuoti specifinių kasos vėžio potipių savybes [8, 42-44]. Svarbu atkreipti dėmesį, jog kasos duktalinės adenokarcinomos potipiai siejami su skirtingais pacientų atsakais į taikomus terapinius režimus: pavyzdžiui, „klasikinis“ potipis pasižymi geresniu pacientų išgyvenamumo rodikliu gydant m-FOLFIRINOX režimu, palyginus su „baziniu“ potipiu, tuo tarpu „egzokrininis“ potipis koreliuoja su atsparumu tirozinkinazės inhibitoriams ir paklitakseliui. Be to, „nestabilaus“ kasos duktalinės adenokarcinomos potipio, kuriam būdingi DNR palaikymo defektai (angl. DNA maintenance defects), navikai gali būti jautresni DNR pažeidžiantiems agentams, tokiems kaip platina ar PARP inhibitoriai. Taigi, literatūroje gausu įrodymų, pagrindžiančių individualių pacientų organoidų modelių, kaip perspektyvios tiriamosios platformos, klinikinio panaudojimo vertę, atliekant pacientų stratifikaciją ir testuojant individualiai pritaikytų terapinių metodų efektyvumą, kartu siekiant pagerinti kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų gydymo rezultatus [8, 29, 33, 45].

Įvairūs eksperimentiniai modeliai, tiek in vitro, tiek in vivo tiriamosios sistemos, padeda mokslininkams geriau suprasti sudėtingas sąveikas kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkoje bei praverčia kaip patikima ir biologiškai reprezentatyvi platforma vaistų kūrimui ir terapinių metodų efektyvumo vertinimui. Iki šiol egzistuoja įvairių mokslininkų sukurtų tiriamųjų sistemų, galinčių eksperimentiškai imituoti panašias į in vivo sąlygas ir perteikti analizuojamas navikų savybes, - pradedant nuo paprastų ląstelių kultūrų platformų, skirtų analizuoti specifines ląstelines bei tarpląstelines sąveikas, ir baigiant sudėtingais pacientų audinių kilmės modeliais (organoidais, ksenograftais), kurie gali imituoti vėžio vystymąsi ir kompleksinę naviko mikroaplinkos koegzistavimą. Tačiau svarbu pabrėžti, kad sudėtingesnė eksperimentinio modelio sandara nebūtinai daro jį geresnį, todėl atliekant vaistų efektyvumo vertinimo tyrimus neatsisakydami ir paprastesni in vitro ar in vivo modeliai [2-3, 6, 9].

Pavyzdžiui, pacientų audinių kilmės organoidų modelių taikymas didelio masto vaistų testavimo tyrimuose (angl. large-scale drug screens) gali ne tik prisidėti prie naujų terapinių agentų sukūrimo, tačiau taip pat pasitarnauti ieškant naujų su vėžiu susijusių biologinių žymenų, padedančių numatyti geriausias individualaus gydymo galimybes konkrečiam onkologine liga sergančiam pacientui. Šiuo tikslu mokslininkai, pasitelkdami didelio našumo analitinius metodus tiria gausius kiekius biobankuose sukauptų pacientų mėginių ir su jais susijusių duomenų, kartu atlikdami farmakotipavimą – ikiklinikinių ir klinikinių terapinių atsakų vertinimą, atsižvelgiant į genominius ir transkriptominius pacientų organoidų profilius. Be to, literatūroje nurodoma, kad kasos duktalinės adenokarcinomos pacientų organoidų modeliai gali būti pritaikomi neoperabilus, metastazinio vėžio tyrimams: pavyzdžiui, Miyabayashi ir kt. žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidus persodino tiesiai į imunodeficitinių pelių bendruosius kasos latakus ir pastebėjo, kaip organoidai ėmė formuoti intraepitelinius neoplazinius pažeidimus, kurie vėliau progresavo indolentiškai arba invazyviai [46, 47]. Taigi, galima teigti, kad individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos modeliai taip pat gali suteikti vertingų įžvalgų apie specifines pacientų navikų progresavimo tendencijas, o

tai savo ruožtu prisideda prie personalizuotos medicinos tyrimų plėtros kasos vėžio gydymui taikomų klinikinių sprendimų kontekste [3, 46-48].

Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimas

Pirmųjų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimas prasidėjo nuo eksperimentų su pelėmis, o kiek vėliau imtasi modeliuoti žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidus, panaudojant šia liga sergančių pacientų mėginius, t. y. rezekcijos būdu pašalintus kasos navikus, plonos adatos aspiracines biopsijas (angl. fine-needle aspiration biopsies) ir biologinę medžiagą iš kepenų metastazių [2, 36, 49]. Kaip nurodoma Frappart ir Hoffman (2020 m.) straipsnyje, organoidų išauginimo iš kasos vėžiu sergančių pacientų mėginių sėkmės rodikliai siekia apie 62–100 % [2]. Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimo procesas pirmiausia pradedamas nuo mechaninio audinio skaidymo ir fermentinio virškinimo, pavyzdžiui, pasitelkiant kolagenazę/dispozę (angl. collagenase/dispase) bei TrypLE arba akutazę (angl. accutase), o siekiant atskirti ląsteles ankstyvose jų pasėjimo į terpę stadijose, svarbu naudoti izoliacijos procesą palengvinančius agentus, tokius kaip Rho kinazės inhibitorius Y27632 [2, 36]. Naujos biopsijų technologijos, tokios kaip mikroskysčių CTC lustai (angl. microfluidic CTC-chips), leidžia dar efektyviau izoliuoti naviko ląsteles ir sumažinti užteršimą bei užtikrinti ląstelių kultūrų gyvybingumą [47]. Bene plačiausiai šiuolaikinėje literatūroje pristatomuose moksliniuose tyrimuose naudojamos organoidų modelių kūrimo instrukcijos yra Tuveson ir Muthuswamy laboratorijų protokolai, kuriuose pateikiami detalūs organoidų generavimo metodai [2, 50, 51]. Tuo remiantis paminėtini du dažnai taikomi organoidų kultivavimo terpės būdai: modelių formavimas Tuveson laboratorijos terpėje, neturinčioje WNT, ir Muthuswamy laboratorijos chemiškai apibrėžtoje WNT neturinčioje terpėje (angl. chemically defined WNT-free tumor organoid medium) [2, 37, 50]. Taip pat organoidus galima suskirstyti į tipus pagal jų priklausomybę nuo WNT ir R-SPONDIN: (1) priklausomi nuo WNT ir R-SPONDIN, (2) nepriklausomi nuo WNT, bet priklausomi nuo R-SPONDIN, ir (3) nepriklausomi nuo WNT ir R-SPONDIN. Manoma, kad ypač pastarasis tipas, dažniausiai susiformuojantis WNT neturinčiose terpėse, atspindi agresyviausias naviko formas [2, 44]. Nors organoidų sukūrimo sėkmės rodikliai yra aukšti, šiose trimatėse tiriamosiose platformose modeliuojant kasos duktalinės adenokarcinomos navikus susiduriama su tokiais iššūkiais, kaip antai, kultivavimo terpės pritaikymo, optimizavimo sudėtingumas bei pastangos išvengti specifinių subklonų atrankos [44, 47, 52].

Kaip žinoma, kasos duktalinės adenokarcinomos navikai susideda iš dviejų kompozicinių elementų: pačių naviko ląstelių ir tankios desmoplastinės aplinkos, dar vadinamos stroma, sudarytos iš su vėžiu susijusių fibroblastų (angl. cancer-associated fibroblasts, CAFs), ekstraląstelinės matricos (angl. extra-cellular matrix), kasos žvaigždinių ląstelių (angl. pancreatic stellate cells, PSCs), endotelio ir imuninių ląstelių bei įvairių augimo faktorių [2, 3]. Anot Frappart ir Hofmann, stroma sudaro iki 90% naviko tūrio ir formuoja fizinį barjerą, kuris trukdo į naviką patekti terapiniams agentams bei taip prisideda prie naviko išvystomo terapinio atsparumo. Desmoplastinė stroma svarbi kasos duktalinės adenokarcinomos vystymuisi, kadangi užtikrina naviko aprūpinimą ekstraląstelinės matricos komponentais, citokinais ir augimo faktoriais. Taigi, siekiant kuo tiksliau atkartoti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų augimo sąlygas, į organoidų kultūras pravartu ir tikslinga įtraukti stromos komponentus [2, 3, 29].

Literatūroje pateikiama pavyzdžių iš tyrimų, kurių metu organoidai buvo kultivuojami bendrose 3D ląstelių kultūrose (angl. 3D-co-cultures) kartu su imuninėmis ląstelėmis ir su vėžiu susijusiais fibroblastais. Šias tiriamąsias platformas galima laikyti patobulintais kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliais, nuo paprastesnių organoidų besiskiriančiais sudėtingesne kompozicija ir gebėjimu tiksliau imituoti naviko mikroaplinkos sąlygas. Kurdami fibroblastais ir imuninėmis ląstelėmis praturtintus organoidų modelius, tyrėjai paprastai pašalina tam tikrus komponentus, trukdančius fibroblastų augimui, kaip antai, noginą (angl. Noggin), B27, TGFb inhibitorių, taip pat papildo terpę stromos ląstelių kultivavimui reikalingomis medžiagomis, pavyzdžiui, FBS (angl. fetal bovine serum) [2, 37]. Pastebėta, kad su vėžiu susijusių fibroblastų kultivavimas bendroje kultūroje su organoidais pagerina pastarųjų gyvybingumą, net ir esant ribotam augimo terpės kiekiui [2, 44]. Be to, imuninių ląstelių įtraukimas į bendrai kultivuojamas 3D ląstelių kultūras prisideda prie organoidų modelių kompozicijos sudėtingumo ir gali lemti sumažėjusį modeliujamo naviko jautrumą chemoterapijai [53]. Visgi bendrai auginamų ląstelių modelių sistemų klininis pritaikymas onkologijos srityje kol kas išlieka ribotas, kadangi vis dar susiduriama su iššūkiais sinchronizuojant pacientų organoidų, su vėžiu susijusių fibroblastų ir kitų naviko mikroaplinkos komponentų kultivavimo palaikymą [44, 47, 53].

Tikimasi, kad organoidų kūrimo procesų eigą ir pritaikymo tyrimuose galimybes galėtų palengvinti pasitelkiamos inovatyvios technologijos, tokios kaip 3D biospausdinimas (angl. 3D bioprinting) ir mikroskysčių sistemos (angl. microfluidic systems). Literatūroje nurodoma, jog biospausdinimo metodai užtikrina tikslų ląstelių erdvinį išsidėstymą ir nuoseklų pasiskirstymą modeliujamose eksperimentinėse platformose. Pavyzdžiui, Hou ir kt. neseniai sukūrė kasos vėžio sferoidus, panaudodami *NanoShuttle*® reagentą, sudarytą iš nanodalelių (aukso, geležies ir poli-L-lizino), bei pritaikė vieną iš biospausdinimo metodų - magnetinio formavimo technologiją. Reagentui prisijungus prie kasos vėžio ląstelių, buvo panaudota magnetinė jėga (angl. magnetic drive), kurios poveikis paskatino ląstelių susitelkimą į klasterius, t. y. lėmė sferoidų susiformavimą, be papildomo poreikio pasitelkti struktūrą palaikančias medžiagas, pavyzdžiui, ekstraląstelinės matricos komponentus [47, 54, 55]. Taip pat paminėtini ir kiti pažangūs organoidų kūrimo metodai, kaip antai, imersinis, arba ekstruzija paremtas biospausdinimas (angl. “immersion bioprinting”, a type of extrusion-based printing), kuomet organoido modeliavimui pasitelkiamas mechaninis arba pneumatinis slėgis, o kultivavimo terpėje išsaugomi ekstraląstelinės matricos komponentai. Lazerinė biospausdinimo technologija, savo ruožtu, užtikrina aukštesnę kuriamų tiriamųjų modelių raišką, todėl šis metodas taikomas modeliuojant eksperimentines platformas, skirtas didelio našumo tyrimams (angl. high-throughput assays) [47, 56, 57].

Siekdami patobulinti 3D kultūrų modeliavimo procesus, mokslininkai pasitelkia ir specialias mikroskysčių platformas, o jose kultivuojami 3D modeliai yra vadinami „organais ant lustų“ (angl. “organ-on-a-chip” platforms). Kaip pavyzdį galima paminėti *OrganoPlate* mikroskysčių sistemą, kurioje integruojama ląstelių srautų kontrolė, maistinių medžiagų tiekimas ir palaikomos naviko mikroaplinką imituojančios sąlygos, vėžinės ląstelės kultivuojant kartu su stromos ląstelėmis [47, 58].

Perpektyvia žaliava organoidų kūrimui taip pat laikytinos cirkuliuojančios naviko ląstelės (angl. circulating tumor cells, CTC). Nors šių ląstelių kraujyje aptinkami labai maži kiekiai (1 CTC iš 10^7 – 10^9 kraujo ląstelių), jos gali būti izoliuotos naudojant tokius metodus kaip *CellSearch*® ir jau minėtos mikroskysčių platformos [2, 47, 58-59]. Kasos duktalinės

adenokarcinomos atveju cirkuliuojančios naviko ląstelės pasižymi dideliu heterogeniškumu, o remiantis E-kadherino ir vimentino ekspresija, jų potipiai skirstomi į epitelinį, mezenchiminį arba mišrų [2, 60]. Literatūroje galima rasti tyrimų aprašymų, supažindinančių su CTC pagrįstų organoidų kultivavimo galimybėmis, tačiau norint tokiu būdu sukurtus modelius pasitelkti klinikinėje praktikoje, ateityje reikės atlikti papildomus tyrimus [2, 47, 61-62].

Nepaisant pažangos, pastebimos mokslininkams toliau tobulinant organoidų modeliavimo schemas, išlieka tam tikrų iššūkių, susijusių su šių modelių kūrimo metodikų standartizavimu ir organoidų sistemų reprezentatyvumu, atspindint konkrečias individualių pacientų savybes, užtikrinimu. Organoidų kultivavimui subalansuotos terpės, stromos komponentų integracija ir technologinės naujovės, tokios kaip biospausdinimas bei mikroskysčių sistemos, kaip viliamasi, ilgainiui padės atskleisti organoidų potencialą personalizuotos medicinos terapinių sprendimų kontekste [47, 52, 55, 58].

Vienu pagrindinių metodų, skirtų pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų generavimui, galima įvardinti endoskopiniu ultragarsu kontroliuojamą plonos adatos biopsiją (angl. endoscopic ultrasound-guided fine-needle biopsy, EUS-FNB). EUS-FNB metodo taikymo pagrįstumas ir panaudojimas organoidų modeliavimui buvo įrodyti įvairių tyrimų duomenimis. Pavyzdžiui, Tiriac ir kt. (2017) sėkmingai sukūrė organoidus iš kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mėginių, paimtų iš pacientų pasitelkus EUS-FNB su 22G adata: šio tyrimo metu pasiektas didelis (87%) organoidų sukūrimo sėkmės rodiklis, o 66% organoidinių kultūrų gyvybingumas buvo palaikomas mažiausiai penkių persėjimų metu per dviejų savaitių laikotarpį [43, 63].

Be to, pastebėta, jog iš EUS-FNB būdu gautų pacientų mėginių išauginti organoidai išlaiko pagrindinius pirminių kasos duktalinės adenokarcinomos navikų požymius – atkartoja svarbias morfologines ir genetines savybes (pvz., MYC geno ekspresiją, reikšmingą vertinant terapinius atsakus į bromodomeno inhibitorius), o tai įgalina jų panaudojimą transkriptomine analize, tiriant priešvėžinių vaistų poveikius bei atliekant genominių profiliavimą [43, 64-66]. Dantes ir kt. 2020 m. publikuoto tyrimo rezultatai parodė, kad terpėse, kuriose buvo kultivuojami pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai, pavyko nustatyti navikui specifines mutacijas iš laisvos DNR, praėjus vos 72 valandoms po atliktos EUS-FN biopsijos, todėl šis atradimas, kaip tikimasi, gali padėti paspartinti vaistų testavimo ir molekulinio profiliavimo tiriamuosius procesus, ypač tais atvejais, kai gaunami maži biopsinės medžiagos kiekiai, kurių nepakanka organoidų modelių sukūrimui [64, 67].

Organoidų išauginimo sėkmės rodikliai, šių modelių kūrimui panaudojant tiek EUS-FNA/FNB (angl. endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration/biopsy) metodais gautų biopsijų, tiek ir atliktų chirurginių rezekcijų medžiagą, yra panašūs, tačiau operacijos metu gauti pacientų mėginiai yra pranašesni tuo atžvilgiu, jog juose yra palaikomos geresnės ląstelių išgavimo sąlygos, t. y. užtikrinamas geresnis prieinamumas prie ląstelių, reikalingų organoido modeliavimui. Be to, chemoterapinio gydymo eigoje sekant individualius pacientų atsakus į terapiją, dažnu atveju pravartu kaupti turimus duomenis pacientų organoidų biobankuose, o EUS-FNA/FNB metodo taikymas leidžia paimti biopsinius mėginius kaip būsimų organoidų žaliavą, kurią vėliau galima tirti skirtingų chemoterapinio gydymo etapų metu [64, 68-69].

Organoidų palyginimas su kitais kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamaisiais modeliais

Kasos duktalinės adenokarcinomos ikiklinikiniai modeliai leidžia mokslininkams geriau suprasti genetinius ir molekulinius kasos vėžio vystymąsi skatinančius veiksnius, naviko mikroaplinkos kompoziciją, taip pat padeda kurti bei išbandyti naujus kasos duktalinės adenokarcinomos terapinius metodus. Anksčiau ikiklinikiniuose tyrimuose dažniausiai buvo naudojamos tradicinės eksperimentinės platformos, kaip, pavyzdžiui, genetiškai modifikuotų pelių modeliai (angl. genetically engineered mouse models, GEMM) arba imortalizuotos žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijos (angl. immortalized human PDAC cell lines), tačiau tobulėjant technologijoms, pradėta kurti naujus, pacientų audinių kilmės tiriamuosius 3D modelius, tarp kurių, be individualių pacientų organoidų, paminėtini iš ląstelių linijų išvesti sferoidai (angl. cell line-derived spheroids) bei pacientų kilmės ksenograftų modeliai (angl. patient-derived xenografts, PDXs), kurių suteikiami privalumai ypač aktualūs atliekant personalizuotos medicinos srities tyrimus [2-3, 6, 8-9, 39, 41].

Nors senesni tradiciniai ikiklinikiniai modeliai reikšmingai prisidėjo prie kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų pažangos, svarbu pažymėti, jog šioms tiriamosioms platformoms būdinga nemažai trūkumų. Literatūroje nurodoma, kad pirmosios žmogaus kasos ląstelių linijų pagrindu sukurtos vienasluoksnės (2D) ląstelių kultūros sistemos atsirado apie 1963 m. [6, 70], ir nuo to laiko vis dar yra plačiai pritaikomos moksliniuose tyrimuose dėl galimybių šias sistemas lengvai padauginti, užšaldyti ir jose atlikti norimas genetines manipuliacijas. Visgi ši tiriamoji platforma negeba tiksliai atkurti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų biologinių savybių. Atkreiptinas dėmesys, jog 2D kultūrų generavimo iš rezekcijų metu pašalintų kasos duktalinės adenokarcinomos navikų efektyvumas yra mažas, dažniausiai todėl, kad kultūrose kultivuojami fibroblastai perauga, t. y. savo augimu nustelbia neoplastines ląsteles [9, 71-72]. Be to, 2D ląstelių kultūrose stokojama svarbių naviko biologinės sandaros elementų, pavyzdžiui, ekstraląstelinės matricos karkasų (angl. extracellular matrix scaffolds) ir tarpląstelių gradientų (angl. gradients), o tai, savo ruožtu, lemia nepakankamą ląstelių (angl. cell-cell) bei ląstelių-matricos sąveikų (angl. cell-matrix interactions) modeliavimą. Taip pat jau sukurtos 2D ląstelių linijos dažnai patiria genetinę ir fenotipinę evoliuciją kultivavimo kultūroje metu, todėl iškyla su tuo susijusi heterogeniškumo problema, apsunkinanti atsaką į tiriamojame platformoje testuojamus vaistus vertinimą [9, 73].

Pranašesniais už 2D ląstelių linijas galima vadinti pacientų kilmės ksenograftų modelius, kurie geba geriau perteikti ir išlaikyti tam tikrus navikams būdingus požymius, kaip antai, architektūros ypatybes bei svarbiausius genetinius pokyčius (angl. driver gene alterations) [9, 74]. Pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos ksenograftų modeliai kuriami implantuojant kasos vėžio ląsteles ortotopiškai arba heterotopiškai (dažniausiai po oda) į imunodeficitinių pelių organizmus, taip suformuojant darinį, panašų į pirminį paciento naviką [6, 9, 74]. Tačiau svarbu akcentuoti, jog nepaisant įvardintų ksenograftų privalumų modeliuojant kasos duktalinės adenokarcinomos navikus, ši tiriamoji platforma taip pat pasižymi trūkumais, susijusiais su generavimo procesų laiko sąnaudomis, kultūrų persėjimo metu pastebimu ksenograftų genominiu nestabilumu ir negebėjimu imituoti imunines reakcijas imunodeficitiniuose šeimininkuose [9, 73-75].

Bendrai kultivuojamų ląstelių kultūrų sistemos (angl. co-culture systems), tokios kaip *Transwell* intarpų platforma (angl. *Transwell* inserts), yra priskiriamos prie 2D in vitro navikų

modeliavimo įrankių, tačiau jos pasižymi papildomais privalumais, palyginus su tradicinėmis 2D ląstelių linijomis. *Transwell* intarpų platformos panaudojimas tiriamaisiais tikslais buvo aprašytas dar 1986 metais, o ilgainiui tokio pobūdžio bendrai kultivuojamų ląstelių sistemas pradėta vis dažniau taikyti įvairiuose tyrimuose [3, 76]. *Transwell* intarpų platforma yra sudaryta iš porėtos polimerinės membranos, integruotos į tradicines šulinėlių plokšteles (angl. conventional well plates). Kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų kontekste ši sistema suteikia galimybę bendrai kultivuoti dviejų skirtingų tipų ląsteles, kartu analizuojant jų parakrines sąveikas (pavyzdžiui, tarp kasos žvaigždinių ir kasos vėžio ląstelių) bei stebint ląstelių migraciją [3, 76-77]. Paminėtinas Chen ir kt. tyrimas, kurio metu mokslininkai kultivavo *Transwell* intarpų platformą *Matrigel* terpėje, siekdami iširti mucininio baltymo Mucin-20 (MUC20) įtaką kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių invazinėms savybėms [78]. Yan ir kt. taip pat pasitelkė *Transwell* intarpų sistemą tam, kad galėtų bendrai kultivuoti kasos duktalinės adenokarcinomos ląsteles kartu su kasos žvaigždinėmis ląstelėmis, o šio metodo taikymas galiausiai padėjo mokslininkams įvertinti ERK1/2 inhibitorių veiksmingumą, slopinant kasos žvaigždinių ląstelių sąlygojamą kasos vėžio ląstelių migraciją [79].

Tradicinių dvimačių eksperimentinių modelių taikymas vėžio tyrimų kontekste nepraranda aktualumo, tačiau mokslininkai, nagrinėdami navikų biologiją bei tirdami pacientų terapinius atsakus, vis dažniau pasitelkia inovatyvesnes 3D in vitro vėžio modeliavimo sistemas. Greta anksčiau įvardintų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių privalumų, svarbu palyginti ir kitų šiuo metu kasos vėžio modeliavimui tyrėjų pasitelkiamų trimatės struktūros įrankių galimybes. Vieni tokių – kasos duktalinės adenokarcinomos sferoidai. Sferoidų kultūrose ląstelės susitelkia į agregatus, geba atkartoti tankios naviko stromos aplinkos savybes bei yra kultivuojamos į in vivo panašiomis sąlygomis, užtikrinant vėžio ląstelių augimui reikalingus maistinių medžiagų ir deguonies gradientus [3, 80-84]. Daugialąsteliniai sferoidai, dar vadinami heterosferoidais, yra sudaryti iš dviejų arba daugiau tipų ląstelių, pavyzdžiui Panc-1 kasos vėžio ląstelių linijos ir kasos žvaigždinių ląstelių [3, 85]. Pastarieji 3D modeliai geba atkartoti specifines naviko ir stromos sąveikas bei yra naudojami vaistų testavimui, pavyzdžiui, pasitelkiant silicio dioksido nanodaleles (angl. silica nanoparticles), mikroburbulus (angl. microbubbles), superparamagnetines geležies oksido nanodaleles (angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs), kuomet siekiama įvertinti stromos barjero įtaką vaistinių medžiagų patekimui į naviką [86-87]. Daugialąsteliniai sferoidų modeliai, pavyzdžiui, sukurti iš žmogaus bambos kraujagyslių endotelio ląstelių (angl. umbilical vascular endothelial cells, HUVECs), Panc-1 kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijos ir MRC-5 fibroblastų, pasižymi gebėjimu imituoti naviko kraujagyslinių komponentų savybes, nors jų sudėtyje ir nėra suformuotų funkciškai aktyvių kraujagyslių [88].

Nagrinėjant kasos duktalinės adenokarcinomos navikų progresavimo, metastazavimo tendencijas ir vertinant terapinius atsakus, vertingos informacijos mokslininkams suteikia eksperimentiniai gyvūnų modeliai. Svarstoma, jog net šiuolaikinės 3D in vitro tiriamosios platformos, nepaisant jų privalumų, ne visuomet geba tiksliai atkartoti sudėtingas in vivo navikų savybes, pvz., su imuninės sistemos poveikio išvengimu susijusius procesus, naviko ir stromos sąryšį bei terapinio atsparumo, kurį sukelia kraujo baltymų sąveikos ir desmoplazija, mechanizmus [3, 89].

Vienais pirmųjų karcinogenezei tirti pritaikytų gyvūnų eksperimentinių modelių laikomi chemiškai indukuoti žiurkių modeliai, sukurti panaudojus tam tikras spontaninį vėžio vystymąsi skatinančias medžiagas, kaip antai, azaseriną (DNR alkilinantį agentą) ir DMBA

(angl. crystalline 7,12-dimethylbenzanthracene, DMBA). Visgi kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose šie modeliai pasitelkiami retai dėl tokių trūkumų, kaip didelės generavimo laiko sąnaudos, rezultatų palyginimo tarp skirtingų modelių iššūkiai, menkos galimybės imituoti navikų metastazavimą ir svarbių kasos vėžio vystymuisi onkogeninių mutacijų (pvz., KRAS) stoka [3, 89-91]. Ortotopiniai ksenograftų modeliai, kuriami implantuojant kasos naviko medžiagą tiesiogiai į laboratorinio gyvūno (dažniausiai pelės) kasą, gali išsamiau perteikti natyvines kasos vėžio paveiktų paciento audinių ypatybes bei imituoti vėžio ląstelių metastazavimą. Heterotopinių ksenograftų modelių sukūrimas reikalauja mažiau pastangų, tačiau šios tiriamosios platformos stokoja tam tikrų svarbių kasos duktalinės adenokarcinomos navikams būdingų biologinių bruožų, susijusių su kraujagysline kompozicija ir metastazavimo galimybėmis [92-94]. Stengiantis atsižvelgti į imuninės sistemos įtaką vėžio patogenezėje, buvo pradėti kurti tiriamieji modeliai, naviko ląstelių kultivavimui pasirenkant imunokompetentinius šeimininkus. Literatūroje aprašomi singeniniai navikų modeliai, suformuojami kasos vėžio ląsteles perkeltant į genetiškai identiškus pelių organizmus [93, 95-96]. Ši eksperimentinė platforma mokslininkams suteikia galimybę tirti sąveikas tarp imunokompetentinio šeimininko imuninės sistemos ir tiriamame organizme kultivuojamų kasos vėžio ląstelių. Visgi svarbu pažymėti, kad singeninių pelių modelių klinikinis pritaikomumas išlieka ribotas, kadangi šios tiriamosios platformos neperteikia kasos navikams būdingų genetinių savybių, t. y. jose trūksta mutacijų, svarbių kasos duktalinės adenokarcinomos vystymuisi (pavyzdžiui, KRAS, TP53 ir SMAD4) [93, 97-98]. Tuo tarpu pacientų audinių kilmės ksenograftai, sukurti implantuojant paciento naviko fragmentus imunodeficitinėms pelėms, turi didesnę klinikinę reikšmę, kadangi šiuose tiriamuosiuose modeliuose išsaugomas pirminiam navikui būdingas heterogeniškumas, kurį atspindi naviko histopatologinės ir genetinio profilio savybės, taip pat naviko mikroaplinką imituojantys stromos komponentai. Nepaisant įvardintų ksenograftų privalumų, bene svarbiausi paminėtini su šių eksperimentinių modelių kūrimu siejami trūkumai yra finansinės ir laiko sąnaudos – navikų modeliavimas ksenograftuose užtrunka vidutiniškai apie 2-3 mėnesius [3, 99-100].

Kasos duktalinės adenokarcinomos terapiniai iššūkiai: atsparumo chemoterapijai problema ir individualizuotų gydymo strategijų perspektyvos

Kasos duktalinė adenokarcinoma išlieka vienu iš sunkiausiai gydymui pasiduodančių onkologinių susirgimų. Kadangi ligos pradžioje paprastai pasireiškia nespecifiniai simptomai, taip pat trūksta patikimų biologinių žymenų, kuriuos būtų galima pasitelkti rutinei pacientų atrankai, daugumai sergančiųjų liga diagnozuojama jau pažengusioje stadijoje, todėl tik apie 15-20 % pacientų yra tinkami kandidatai chirurginei kasos rezekcijai – vieninteliam gydymo metodui, po kurio galimas visiškas pasveikimas [15, 101]. Visgi net ir po atliktų rezekcinių kasos operacijų, kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų 5 metų išgyvenamumas, remiantis literatūros duomenimis, siekia maždaug 27–39%, be to, ligos pasikartojimai pasireiškia 80–85% atvejų, (ypač pacientams, kuriems po operacijos buvo aptikta cirkuliuojančios kraujyje naviko DNR) [16, 102]. Pastebėta, jog kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų išgyvenamumą nežymiai pagerina taikoma adjuvantinė chemoterapija, įskaitant gydymą modifikuotu FOLFIRINOX režimu (5-FU, leukovorinas, irinotekanas ir oksaliplatina) arba gemcitabino ir kapecitabino deriniu: pacientų bendro išgyvenamumo (angl. overall survival, OS) rodikliai pritaikius terapiją paminėtomis vaistų kombinacijomis pagerėjo, palyginus su monoterapija gemcitabinu (vidutinė bendro

išgyvenamumo trukmė pailgėjo atitinkamai 8,8 mėnesio ir 2,5 mėnesio) [8, 17, 103]. Be to, mokslinės literatūros šaltiniuose nurodoma, kad gemcitabino ir nab-paklitakselio terapinė kombinacija padidina kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų vidutinį bendrą išgyvenamumą iki 8,5 mėnesio, palyginus su išgyvenamumo trukmės pailgėjimu 6,7 mėnesio, kai gydymui skiriama tik gemcitabino monoterapija [104, 105]. Nors paprastai pasirenkant gydymą FOLFIRINOX režimu yra teikiama pirmenybė fiziškai pajėgesniems pacientams (taip pasiekiamas didesnis terapinis veiksmingumas), o gemcitabino pagrindu sukurtos gydymo schemos taikomos silpnesnės fizinės būklės ar vyresnio amžiaus pacientams (siekiant geresnio gydymo toleravimo), visgi abu chemoterapinio gydymo būdai dažniausiai yra siejami su sisteminiu toksiškumu organizmui ir greitai išsivystančiu terapiniu atsparumu [41]. Deja, taip pat tenka pripažinti, jog kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų išgyvenamumo rodikliai, nepaisant taikomo chemoterapinio gydymo, išlieka žemi dėl kasos navikams būdingo heterogeniškumo bei išvystomo atsparumo chemoterapiniams vaistams [26, 31].

Kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo kontekste bene didžiausiu iššūkiu yra įvardijama chemoterapinio atsparumo problema. Pirminėse kasos vėžio ląstelių linijose, įvertinę atsparumo standartiniams chemoterapiniams vaistams profilius, mokslininkai pastebėjo, kad naviko ląstelės išvysto unikalius atsparumo tokiems terapiniams agentams, kaip antai, gemcitabinas, 5-FU, oksaliplatina, docetakselis ir SN38, mechanizmus [106]. Be to, naviko ląstelių atsparumas vienam vaistui gali būti visiškai nesusijęs su atsparumu ar jautrumu kitam vaistui, todėl kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų gydymui svarbu taikyti individualizuotus terapinius sprendimus, atsižvelgiant į daugelį naviko chemoterapinį atsparumą lemiančių veiksnių. Svarbios informacijos, numatant kasos navikų atsakus į taikomus terapinius agentus, mokslininkams suteikia transkriptominės analizės, padedančios nustatyti įvairius genų ekspresijos modelius, susijusius su jautrumu ar atsparumu konkreitiems vaistams, ir atskleidžiančios individualias pacientų navikų fenotipines savybes [13, 106-107]. Svarbu atkreipti dėmesį, kad su kasos navikų chemoterapiniu atsparumu siejami genai paprastai neturi sąryšio su pacientų išgyvenimu, o tai rodo, kad jautrumas vaistams ir klinikiniai kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų rezultatai priklauso nuo skirtingų naviko funkcijas reguliuojančių genetinių veiksnių [13, 106].

Pastaraisiais dešimtmečiais mokslinėje literatūroje pateikiama svarstymų, jog kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo kontekste naujų vilčių gali suteikti imunoterapiniai vaistai, pavyzdžiui, imuninės kontrolės taškų inhibitoriai (angl. immune checkpoint inhibitors), kurių efektyvumas jau buvo įrodytas gydant kai kuriuos solidinius navikus [12, 108]. Deja, kol kas literatūroje aptinkama vis dar mažai duomenų apie imunoterapijos efektyvumą gydant kasos duktalinę adenokarcinomą. Nepaisant tyrėjų pastangų, kasos navikuose daugeliu atvejų nepastebima teigiamo atsako į imunoterapinį gydymą, tačiau su potencialia terapine nauda yra siejami imunoterapijos ir chemoterapinių vaistų deriniai, kurių efektyvumas vertinamas klinikiniuose tyrimuose [109-111]. Taip pat svarbu paminėti, jog kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui iki šiol išbandyta daugybė alternatyvių gydymo metodų, tokių kaip citokinų terapija (IL-2, IFN, IL-15), terapinės vakcinos, agonistiniai ir antagonistiniai antikūnai, mažų molekulių agonistai, adaptyvioji ląstelių terapija ir chimeriniai antigenų receptoriai [112-114].

Kaip pastebi mokslininkai, kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsparumą terapinių agentų poveikiui greičiausiai lemia sudėtingi naviko molekuliniai pakitimai ir kartu gerai išvystyti kompensaciniai mechanizmai, todėl siekiant efektyvesnių ligos gydymo išeičių, vis

daugiau dėmesio skiriama individualizuotų terapinių strategijų, pagrįstų naviko genetinio profilio analizių duomenimis, kūrimui. Šiuo metu pagrindiniu kasos navikų atsparumo chemoterapijai veiksnio yra laikoma KRAS mutacija, nustatoma didžiąjai daliai (daugiau nei 90%), kasos duktalinės adenokarcinomos sergančių pacientų. KRAS mutacija skatina naviko progresavimą ir palaiko onkogeninių signalų plitimą per RAS-RAF-MEK-ERK ir PI3K-AKT mTOR molekulinio signalizavimo kelius [18, 115]. Remiantis mokslinėje literatūroje pateikiamais duomenimis, taikinių terapija, poveikiu nukreipta į KRAS mutaciją kasos navikuose, nepasiteisino kaip strategija, pasitelktina kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui; tarp įvardijamų iššūkių – neefektyvus tiesioginis KRAS slopinimas ir KRAS inhibicijos fone pasireiškianti alternatyvių naviko molekulinio kelių (PI3K ir autofagijos) aktyvacija [116-117]. Kita vertus, kombinuotos taikinių terapijos, nukreiptos į tam tikrus onkogeninių signalizavimo kelių taškus, pvz., pasitelkus RAF-MEK arba ERK inhibitorius derinyje su autofagijos modulatoriais, parodė perspektyvių rezultatų ikiklinikiniuose modeliuose, slopindamos signalizavimo kelių reaktyvaciją ir sąlygodamos sinerginį naviką slopinantį poveikį [118-119]. Svarbų vaidmenį kasos duktalinės adenokarcinomos onkogenezeje atlieka PI3K signalizavimo kelias, turintis įtakos adaptyvaus chemoterapinio atsparumo išsivystymui kasos navikuose, todėl mokslininkai, atsižvelgdami į šio molekulinio kelio reikšmę, siekė pritaikyti tikslinį šio kelio izoformų slopinimą. Hobbs ir kt. neseniai atliktame tyrime (2020 m.) išsiaiškinta, jog selektyvi PI3K kelio katalitinių subvienetų (izoformų) inhibicija gali turėti teigiamą poveikį gydant kasos duktalinę adenokarcinomą. Tyrėjai akcentavo, kad tinkamai pritaikius vaistus PI3K inhibitorius, selektyviai slopinančius PI3K kelio kinazės izoformas, aktyvuotas kasos navikų kompensacinių mechanizmų kontekste (pvz., p110 γ izoforma KRASG12R-mutuotuose kasos navikuose arba p110 α ir p110 γ izoformos KRASG12D mutuotos kasos duktalinės adenokarcinomos atvejais), galima sutrikdyti navikui specifinių signalizavimo kelių funkcijas, kartu išvengiant neigiamo poveikio normaliam molekulinio signalų sklidimui kasos ląstelėse [120]. Taigi, minėti pavyzdžiai iš mokslinės literatūros, pagrindžiantys taikinių terapijos potencialą gydant kasos duktalinę adenokarcinomą, suteikia pagrindą ateityje numatomiems tyrimams ir naujų terapinių galimybių paieškom, siekiant sumažinti kasos vėžiu sergančių pacientų gydymo toksiškumą bei pagerinti klinikines išiteis [27, 120].

Nepaisant daug žadančių taikinių terapijos perspektyvų, šio gydymo metodo pritaikymo galimybės, gydant specifinėmis molekulinėmis savybėmis pasižyminčius kasos duktalinės adenokarcinomos navikus, kol kas yra ribotos. Pavyzdžiui, pritaikius terapiją erlotinibu laukinio tipo KRAS mutaciją turinčiuose kasos navikuose, pastebėtas nežymus pacientų išgyvenamumo pagerėjimas (OS trukmė pailgėjo 0,33 mėnesio), tuo tarpu PARP inhibitoriaus olaparibo poveikis, remiantis atliktų tyrimų stebėjimais, pagerino pacientų, kurių navikuose buvo nustatyta BRCA mutacija, išgyvenamumą be ligos progresavimo, tačiau reikšmingai nepailgino pacientų bendros išgyvenamumo trukmės [121-124]. Be šių neefektyvių tikslinių terapinių agentų, pasitelktų kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui, galima paminėti ir VEGF-A inhibitorių bevacizumabą bei daugybinį kinazių inhibitorių (angl. multi-kinase inhibitor) sorafenibą, kurie, kaip išsiaiškino tyrėjai, taip pat nepagerino pacientų klinikinių išiečių, todėl atsižvelgus į esamą kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui skirtų metodų spektrą, išlieka poreikis ieškoti naujų predikcinių ligos biožymenų bei alternatyvių terapinių sprendimų [8, 125-126].

Apibendrinant literatūroje aprašomas kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo tendencijas, svarbu atkreipti dėmesį, jog pastaruoju metu yra atliekama vis daugiau vėžio genominių tyrimų, o tai mokslininkams sudaro galimybes tiksliau vertinti su kasos duktaline adenokarcinoma susijusių mutacijų naštą, atsižvelgiant į kasos vėžio patogenezę svarbius molekulinio signalizavimo kelius bei ligos genominį heterogeniškumą. Savo ruožtu, gilesnis supratimas apie kasos duktalinės adenokarcinomos molekulines patogenezės aspektus gali praversti kuriant personalizuotas taikinių terapijos strategijas, kurių taikymas padėtų prailginti pacientų išgyvenamumą bei, geriausiu atveju, lemti pasveikimą nuo šios agresyvios ligos.

LITERATŪROS APŽVALGA

Trimačių kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamųjų modelių kūrimo ir tobulinimo galimybės

Šiuolaikiniai kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai yra trimatės (3D) struktūros modeliai, mokslininkų sukurti tam, kad kuo tiksliau atspindėtų naviko mikroaplinką, galėtų geriau atkartoti žmogaus audinių ir organų funkcijas dirbtinėmis sąlygomis, išvengiant tradicinių ankstesniuose tyrimuose naudotų 2D ląstelių kultūrų ir gyvūnų modelių apribojimų. Organoido sąvoka atsirado XX amžiaus viduryje: šis terminas iš pradžių buvo naudojamas onkologijoje, apibūdinant į teratomas panašias struktūras. Didelė pažanga organoidų modelių evoliucijoje buvo pastebėta 2009 m., kai olandų molekulinės genetikos specialistas, ląstelių biologas, Hans Clevers kartu su kolegomis iš Hubrechto instituto ir Utrechto universiteto Medicinos centro sukūrė pirmąją stabilią žarnyno organoido ląstelių kultūrą. Ši naujovė buvo susijusi su Lgr5+ kamieninių ląstelių išskyrimu iš žarnyno, jas panaudojant tam, kad būtų sukurtos trimatės struktūros, imituojančios žmogaus audinių architektūrą ir funkcijas. Mokslininkų sukurti organoidai parodė gebėjimą savarankiškai formuotis, telkti ląsteles ir išlaikyti stabilią ląstelių kultūros struktūrą, tad pastarasis atradimas atvėrė kelią tolesniam įvairių, konkrečius organus atitinkančių, specifinių organoidų vystymuisi, įskaitant organoidus, kurių gamyba būtų įgalinama panaudojant pluripotentes kamienines ląsteles (angl. pluripotent stem cells, PSCs) ir suaugusiųjų kamienines ląsteles (angl. adult stem cells, AdSCs). 2015 m. Clevers ir Tuveson laboratorijos pristatė pirmuosius kasos duktalinės adenokarcinomos 3D organoidų modelių, išaugintų iš pelių ir žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos audinių, kūrimo protokolus. Šiandieninės personalizuotos medicinos eroje organoidiniai modeliai įgyja didelę reikšmę gilinantį į onkologinių ligų mechanizmų supratimą, vykdant vaistų atrankinius tyrimus ir siekiant tikslesnio terapinių galimybių pritaikymo kiekvienam vėžiu sergančiam pacientui [37, 127].

Svarbu paminėti, kad organoidai nėra vieninteliai kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose pasitelkiami 3D modeliai. Prie paprastesnių, 3D struktūras sudarančių tiriamųjų sistemų taip pat priskiriami ląstelių agregatai bei sferoidai. Ląstelių agregatai susidaro dirbtinai priverčiant ląsteles augti kartu bendroje kultūroje. Labiausiai paplitę agregatų formavimo metodai apima silpno pritvirtinimo kultūrų plokštelių (angl. low attachment culture plates), agarozės mikrosulinių (angl. agarose micro-wells) arba kabančio lašo kultūrų (angl. hanging-drop cultures) kultivavimą. Šiose terpėse ląstelėms sudaromos sąlygos telktis į 3D struktūros agregatus. Tuo tarpu sferoidai formuoja sferinę struktūrą iš ląstelių, kurios paprastai auginamos kaip laisvai terpėje plaukiojantys agregatai be matricos komponento. Sferoidai gali būti generuojami iš imortalizuotų ląstelių linijų (angl. immortalized cell lines), pirminių ląstelių

(angl. primary cells) arba audinių fragmentų, todėl pabrėžtina, kad sferoidų funkcionalumas (angl. viability) yra ribotas, nes juose neatsispindi pirmtakų fenotipo savybės. Sferoidai augdami ir didėdami formuoja nekrozinę šerdį ir neturi arba turi labai neišreikštą audinių struktūrą ir mažiau reprezentatyvią audinių architektūrą. Sferinių struktūrų formavimo eksperimentai (angl. sphere-forming assays) plačiai pritaikomi kamieninių ląstelių biologijoje, vertinant konkretaus tipo ląstelių savaiminio atsinaujinimo ir diferenciacijos potencialą; taip pat in vitro modeliuose, pritaikytuose analizuoti solidinius navikus. Pirmieji sferoidai, panaudoti kamieninėms ląstelėms tirti, buvo sukurti siekiant ištirti suaugusiųjų neuronų kamienines ląsteles, jie pavadinti neurosferomis (Reynolds ir Weiss, 1992). Sferoidų 3D modeliai iki šiol taikomi kamieninėms, pirmtakų ląstelėms įvairiuose audiniuose (pvz., krūties, kasos, prostatos) ištirti. Paprastai, nurodant sferoido kilmės audinį, yra pridedama priesaga, tad iš kasos audinio išaugintas sferoidas būtų vadinamas pankreatosferu (angl. pancreas-derived pancreatosphere) [127].

Savo ruožtu, organoidai yra sudėtingesnės struktūros modeliai nei sferoidai: tai trimatės ląstelių kultūros, pasižyminčios pagrindinėmis kilmės organo savybėmis. Šiose in vitro 3D ląstelių kultūrų sistemose yra savaime atsinaujinanti kamieninių ląstelių populiacija, kuri diferencijuojasi į daugybę organui būdingų ląstelių tipų, gebančių formuoti erdvinę struktūrą, kaip ir atitinkamas kilmės organas, o kartu gali atkartoti kai kurias organo funkcijas, sudarydamos fiziologinius parametrus atitinkančią platformą. Organoidų modeliai išauginami iš vienos ar kelių suaugusio žmogaus audinių kamieninių ląstelių (angl. adult stem cells), iš embrioninių kamieninių ląstelių (angl. embryonic stem cells) arba iš indukuotų pluripotentinių kamieninių ląstelių (angl. induced pluripotent stem cells). Be to, organoidai skiriasi nuo kitų 3D tiriamųjų modelių (sferoidų ir ląstelių agregatų) tuo, jog jų auginimui paprastai reikia atramines savybes užtikrinančių medžiagų, pvz., pamatinės membranos ekstrakto (angl. basement membrane extract, BME), *Matrigel* arba ekstraląstelinės matricos komponentų. Tikimasi, kad patobulinus jau sukurtus 3D tiriamuosius modelius mokslininkams atsivers daugiau galimybių ištirti sudėtingas kasos navikų mikroaplinkos sąlygas, geriau suprasti ligos priežastis ir individualizuoti pacientų gydymo metodus [127].

Visų pirma, norint sukurti organoido modelį, reikalingi paciento audinių mėginiai, gauti operacijos ar biopsijos metu. Šie mėginiai paprastai paimami iš paciento organo naudojant endoskopiją su ultragarso kontrole ir plonos adatos aspiracinę biopsiją (angl. endoscopic ultrasound and fine-needle aspiration, EUS-FNA) [63, 64]. Lee ir kt. (2022) publikavo duomenis iš tyrimo, kurio metu iš kasos vėžiu sirgusių pacientų EUS-FNA būdu gautų mėginių organoidus pavyko sėkmingai sukurti 14 iš 20 atvejų (70%), o 12 organoidų modelių galėjo būti dauginami daugiau nei penkiais pasažais (atliekant kartotinius persėjimus), panaudojant organoido modelio medžiagą naujų organoidų ląstelių kultūrų auginimui. Organoidų audiniai buvo lyginami su atitinkamais šerdynių biopsijų audiniais (angl. core biopsy tissues), nudažytais hematoksilino ir eozino dažais. Histologiškai organoidai išlaikė panašias struktūrines savybes kaip ir pirminiai kasos navikai. Atlikus viso egzomo sekoskaitą (angl. whole exome sequencing, WES) paaiškėjo, jog 93% mutacijų, tokių kaip KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1 ir BRCA2, buvo homologiškos, lyginant organoidų modelius ir originalius iš paciento gautus biopsinius audinius. Vėliau, vadovaudamiesi tyrimo duomenimis, mokslininkai pritaikė sukurtus organoidų modelius klinikinio atsako į chemoterapiją FOLFIRINOX režimu vertinimui ir stebėjo vidutines reakcijų į gydymą

koreliacijas tarp organoidų atsakų ir pacientų, kuriems buvo taikyta chemoterapija FOLFIRINOX, klinikinių rezultatų [128].

Visgi vienu iš svarbių aspektų, ribojančių individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimo ir klinikinio pritaikymo galimybes, įvardijami nepakankami tiriamosios medžiagos kiekiai, gaunami iš pacientų biopsijų mėginių. Choi ir kt. tyrimo (2024 m.) metu buvo pristatyta eksperimentinė mikroskysčių platforma (angl. microfluidic platform), skirta kultivuoti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidus iš pacientų biopsijų, tuo siekiant išspręsti riboto audinių kiekio problemą, ypač tais atvejais, kai pacientų mėginiai yra gaunami iš adatinių biopsijų. Tyrimo metu buvo sukurtos dviejų tipų mikroskysčių platformos: viena skirta modelio išauginimui iš pasėtos pavienės ląstelės (angl. device type 1 for seeding single cells), o kita – pritaikyta vientisų organoidų ar jų fragmentų kultivavimui (angl. device type 2 for seeding intact organoids or organoid fragments). Mokslininkų sukurti mikroskysčių platformos organoidai fenotipiškai ir genotipiškai buvo panašūs į *Matrigel* kultūrose išaugintus tiriamuosius modelius, atitinkančius aukso standartu laikomą kultivavimo metodiką, dažniausiai taikomą kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų tyrimų kontekste. Be to, Choi ir kt. tyrime pristatyti mikroskysčių organoidai, palyginus su tradiciniais kasos duktalinės adenokarcinomos modeliais, pasižymėjo svarbiais privalumais, tokiais kaip tolygi sferinė modelio struktūra; minimalus ląstelių kiekis, reikalingas organoido išauginimui, ir nepriklausomybė nuo *Matrigel* ekstraląstelinės matricos pakaitalo. Tyrimo metu atlikta palyginamoji RNR sekoskaitos analizė parodė, kad mikroskysčių ir *Matrigel* organoidai turėjo 99,93% genų ekspresijos panašumą, tačiau mikroskysčių modeliuose buvo pastebėtas didesnis signalizavimo kelių, skatinančių imuninės sistemos ląstelių chemotaksį ir geresnę oksigenaciją, aktyvumas. Taip pat išanalizavus chemoterapinių vaistų testavimo rezultatus buvo pastebėtas didelis BRAF mutaciją turinčių mikrofluidinių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų jautrumas MEK inhibitoriams (Binimetinib) palyginus su RAF inhibitoriais (Encorafenib), o šių terapinių agentų derinys (MEKi ir RAFi) pasižymėjo sinerginiu poveikiu. Tyrime išbandytas naujas, kliniškai dar nenaudojamas terapinis agentas - GSK-3β inhibitorius (9-ING-41), kuris, kaip parodė rezultatai, padidino organoidų jautrumą gemcitabinui, tačiau atsakai į gydymą šiuo vaistu skyrėsi, priklausomai nuo specifinių mutacijų pacientų kasos navikuose. Atlikę imunoterapinių vaistų testavimą, mokslininkai išsiaiškino, kad panaudojus naują anti-B7-H3 TriKE biologinį preparatą padidėjo NK ląstelių citotoksiškumas, dėl to navikų organoidų dydis per 72 valandas sumažėjo iki 95%. Tyrimo metu naudoti mikroskysčių modeliai taip pat pasižymėjo imuninės sistemos ląstelių infiltracijos skatinimu bei sustiprino parakrininį signalų perdavimą tarp naviko ir imuninių ląstelių. Remiantis Choi ir kt. tyrimo išvadomis, galima teigti, kad mikroskysčių (mikrofluidinė) kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamoji platforma sudaro sąlygas tikslesnių diagnostinių ir gydymo metodų kūrimui personalizuotos onkologijos srityje, o kartu įgalina vaistų testavimą panaudojant minimalius biopsinių audinių kiekius [129].

Taip pat reikšmingas veiksnys, susijęs su kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamųjų platformų klinikiniu pritaikomumu, yra jų kultivavimo trukmė, todėl siektina, kad būtų sukurtas kultivavimo metodas, įgalinantis tiriamųjų modelių generavimą per kuo trumpesnį laiką. Neseniai Gao ir kt. (2022 m.) pristatė patobulintą, greitą organoidų kultivavimo technologiją, skirtą personalizuotam vaistų jautrumo nustatymui. Pacientų navikų organoidų modeliai buvo sukurti iš skrandžio vėžio ir kasos duktalinės adenokarcinomos audinių, panaudojus modifikuotą organoidų kultivavimui pritaikytą WRN terpę, praturtintą atitinkamais

augimo faktoriais – Wnt, R-spondin ir Noggin baltymais. Tyrimo metu atliktos histologinė ir imunohistocheminė (IHC) analizės patvirtino, kad pacientų navikų organoidų modeliai atspindėjo pirminio naviko audinio ypatybes, t. y. skrandžio vėžio ir kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai pasižymėjo didele CK7 ir maža CK20 citokeratinų ekspresija, tipiška pastebima viršutinių virškinimo trakto vėžinių susirgimų atvejais. Iš sukurtų organoidų modelių tyrėjai išskyrė pavienes ląsteles: šios ląstelės buvo izoliuotos TrypLE™ Express/DNase I fermentinės disociacijos būdu, optimizavus ląstelių atskyrimo proceso trukmę iki 7–10 minučių, kad būtų išvengta ląstelių pažeidimo. Kaip pastebėjo mokslininkai, daugiau nei 50 % vienos ląstelės sistemų per 2–3 dienas suformavo mažus (vienodo dydžio, ~50 µm) pacientų organoidų modelius. Taip pat tyrėjai atliko vaistų jautrumo testavimą, patikrindami penkių dažniausiai kasos duktalinės adenokarcinomos chemoterapijai vartojamų preparatų (5-fluorouracilo, docetakselio, epirubicino, irinotekano ir oksaliplatinos) efektyvumą organoidus paveikus skirtingomis šių vaistų koncentracijomis. Mokslininkai palygino terapinius atsakus vienos ląstelės modeliuose ir iš terpėje pasėtų pavienių ląstelių išaugintuose standartiniuose organoidų modeliuose: gauti rezultatai parodė panašias IC50 (angl. half-maximum inhibitory concentration) reikšmes ir dozės-reakcijos kreives tirtuose modeliuose, be to, nustatyta, kad kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijose efektyviausiu poveikiu pasižymėjo irinotekanas, o skrandžio vėžio ląstelių linijose – docetakselis ir epirubicinas. Ankstyvo pasėjimo (P2) pavienės ląstelės (t. y. ląstelės, kurioms taikytas ribotas (2) kultivavimo ciklo skaičius – 2 ciklai) užtikrino pakankamą organoidų išauginimui biologinės medžiagos kiekį ir nuoseklius tiriamosios platformos analizės rezultatus. Šis organoidų kultivavimo metodas įgalino vaistų testavimo atlikimą per maždaug dvi savaites – laikotarpį, apytiksliai atitinkantį naujos kartos sekoskaitos rezultatų gavimo terminą. Taigi, Gao ir kt. tyrime taikyta organoidų kultivavimo iš vienos ląstelės technologija suteikia galimybes standartizuoti vienodo dydžio organoidų modeliavimą, taip pat atlikti greitą vaistų poveikio testavimą turint mažai naviko biopsinės medžiagos bei tiksliai prognozuoti klinikinius atsakus, taikant personalizuotas gydymo schemas virškinimo trakto vėžio atvejais [130].

Kaip žinoma, organoidai įprastai yra kultivuojami naudojant specialią augimo faktoriais ir kitais augimui reikalingais komponentais (pvz., epidermio augimo faktoriumi, fibroblastų augimo faktoriumi, insulinu, transferinu, seleno ir kt., būtinais komponentais, patenkinančiais specifinius kasos ląstelių poreikius) praturtintą terpę ir matricą (dažniausiai šiuo tikslu pasitelkiama *Matrigel* matrica), siekiant palaikyti svarbias pirminio naviko charakteristikas, pavyzdžiui, genetinį heterogeniškumą ir naviko bei stromos ląstelių sąveikas. *Matrigel* užtikrina struktūrinę atramą organoido ląstelių kultūrai, - tai yra želatinos pavidalo baltymų mišinys, sukurtas naudojant pelių navikinių ląstelių ekstraląstelinės matricos komponentus, tokius, kaip antai: lamininas, IV tipo kolagenas, entaktinas, taip pat augimo faktoriai, pavyzdžiui, epidermio augimo faktorius. Taigi, bene svarbiausia *Matrigel* paskirtis - suteikti organoido modeliui 3D struktūrą, kuri galėtų būti panaši į in vivo organo architektūrą, suformuojant palankią aplinką ląstelių augimui ir diferenciacijai, taip imituojant ląstelių kultivavimo procesą natūraliomis gyvam organizmui būdingomis sąlygomis [127].

Neseniai Lumibao ir kt. atliko tyrimą (2024 m.), aiškindamiesi ekstraląstelinės matricos, kaip sudėtinio, atramą ir struktūrą palaikančio organoidų modelių komponento, įtaką organoidų funkcinėms savybėms, kaip antai, genų ekspresijai ir atsakui į taikomus terapinius agentus. Mokslininkai tyrė skirtingus bazinės membranos ekstraktus (angl., basement membrane extracts, BMEs), tokius kaip *Matrigel*, *Cultrex* ir *UltiMatrix*, kurie dažniausiai naudojami

organoidų augimui reikalingos 3D struktūros susiformavimui. Išsiaiškinta, kad tiek žmonių, tiek pelių organoidų modeliams buvo būdingi žymesni proliferacijos rodikliai *Matrigel* terpėje, palyginus su *Cultrex* ir *UltiMatrix*, taip pat *Matrigel* terpėje buvo užtikrinamas greitesnis ląstelių augimas ir galimybė sparčiau atlikti naujus ląstelių persėjimo ciklus (angl. passaging). Kaip pavyzdį tyrimo autoriai pateikė pelių organoidų liniją (mT69B), kurios proliferacija *UltiMatrix* terpėje sumažėjo iki 55 %, palyginus su ląstelių dauginimusi *Matrigel* terpėje. Vis dėlto atkreiptinas dėmesys, kad tirtuose organoidų modeliuose atsakai į vaistus reikšmingai nesiskyrė, nepriklausomai nuo bazinės membranos ekstraktų (BME) tipų. Vertinant įvairių vaistų, kaip antai, - gemcitabino, paklitakselio, SN-38, oksaliplatinos, 5-fluorouracilo (5-FU) ir trametinibo, - poveikius, nustatyta, kad dozės-atsako kreivės išliko stabilios, o IC50, Hill nuolydis (angl. Hill slope) ar AUC (angl. area under the curve) reikšmės pasižymėjo minimaliu kintamumu. Nors tam tikrais atvejais Lumibao ir kt. tyrimo eksperimentuose pastebėti statistiškai reikšmingi IC50 skirtumai, pavyzdžiui, pritaikius terapiją gemcitabinu ir paklitakseliu *Matrigel* bei *Cultrex/UltiMatrix* terpėse kultivuotiems organoidams, visgi nuoseklūs pokyčiai tarp skirtingose terpėse augintų organoidų terapinių atsakų nefiksuoti. Tyrimo metu atlikta genų ekspresijos analizė taip pat neparodė reikšmingų globalios genų raiškos (angl. global gene expression) pokyčių ar kasos duktalinės adenokarcinomos potipių klasifikacinių netolygumų tarp skirtingose terpėse kultivuočių organoidų. Fiksuoti tik minimalūs genų ekspresijos pakitimai (SMAD4 ir ERBB3 raiškos padidėjimas atitinkamai *Matrigel* ir *Cultrex/UltiMatrix* terpėse), tačiau dauguma svarbių genų, pavyzdžiui, KRAS, TP53 ir CDKN2A, tarp skirtingose terpėse augintų kultūrų išlaikė būdingas raiškos savybes. Remdamiesi duomenų atitikties analize (angl. goodness-of-fit, Sy.x values), tyrėjai nustatė, kad *Matrigel* užtikrina didesnę eksperimento nuoseklumą, palyginus su *Cultrex* ir *UltiMatrix* bazinės membranos ekstraktais praturtintomis organoidų kultivavimo terpėmis. Nors pradinis organoidų generavimo efektyvumas buvo užtikrintas visose skirtingais BME praturtintose kultivavimo terpėse, *Matrigel* terpėje pastebėtas greitesnis organoidų augimas ankstyvosios fazės metu (angl. early-phase expansion). Konstatuojant Lumibao ir kt. tyrimo išvadas galima teigti, kad nepaisant organoidų kultūrų proliferacijos greičio skirtumų, *Matrigel*, *Cultrex* ir *UltiMatrix* bazinės membranos ekstraktais praturtintos terpės sudaro palankias sąlygas kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų farmakotipavimui, todėl visas paminėtas eksperimentines platformas galima patikimai naudoti atliekant tolesnius tiksliosios medicinos tyrimus [131, 132].

Pažymėtina, jog organoidų gamybos technologijos įvairiose laboratorijose skiriasi, todėl svarbu įvertinti, kokią įtaką tai gali turėti organoidų modelių pritaikomumui ir su jų panaudojimu susijusių rezultatų interpretavimui. Lee su kolegomis (2017 m.) sukūrė organoidų modelius iš sveikų CD133+ kasos latakų ląstelių ir, pasinaudoję genų inžinerijos metodais, papildė šiuos tiriamuosius modelius KRASG12V mutacijomis bei CDKN2A, TP53 ir SMAD4 delecijomis. Kai šie mutantiniai organoidai buvo implantuoti į pelių organizmus ortotopiniu būdu, jie suformavo ankstyvus kasos pažeidimus (PanIN), tačiau neprogresavo į invazinį vėžį [133]. Kitaip nei Lee ir kt., Seino su kolegomis organoidų modeliavimui naudojo kasos latakų ląsteles iš „normalių“ regionų, esančių šalia navikų, ir sukūrė organoidus, kuriuose in vivo sąlygomis buvo stebima histologinė transformacija iš PanIN į invazinę kasos duktalinę adenokarcinomą. Pateiktas pavyzdys rodo, kad šių dviejų tyrimų metodologijos skirtumai, pvz., kasos latakų ląstelių kilmės šaltinis, KRASG12V mutacijos įvedimo būdai (padidinama ekspresija arba atliekamas įterpimas, angl. overexpression vs. knock-in) ir organoidų implantavimo metodai (ortotopinis ir poodinis, angl. orthotopic vs. subcutaneous), rodo, kad

šie veiksniai gali turėti įtakos mokslininkų taikomų eksperimentų rezultatams [44]. Atsižvelgiant į minėtus veiksnius, pabrėžtina, kad norint sukurti tikslesnius kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius, svarbu užtikrinti standartizuotas modelių kūrimo ir jų kultivavimo mikroadaptacijos sąlygas, pavyzdžiui, pasirinkti tinkamas auginimo terpes ir organoidų implantavimo vietas in vivo aplinkoje [44, 127, 133].

Pastebima, kad tam tikri su organoidų kultivavimo sąlygomis susiję veiksniai, pavyzdžiui, pacientų navikų ląstelingumas ar auginimo terpės sudėtis, gali turėti įtakos organoidų modeliavimo sėkmei. Hogenson ir kt. atliko tyrimą (2022 m.), kurio metu buvo vertinamos iš virškinimo trakto onkologinėmis ligomis sergančių pacientų mėginių išaugintų organoidų galimybės prognozuoti gydymo efektyvumą taikant terapiją atitinkamų vėžinių susirgimų, kaip antai, kasos duktalinės adenokarcinomos, storosios žarnos adenokarcinomos ir cholangiokarcinomos, atvejais. Organoidų modeliai buvo sukurti iš 163 pacientų mėginių, panaudojus chirurginių rezekcijų, biopsijų medžiagą ir pacientų kilmės ksenograftus (angl. patient-derived xenograft (PDX) models); bendras organoidų sugeneravimo sėkmės rodiklis siekė 52 % - tam įtakos turėjo navikų ląstelingumas (angl. tumor cellularity) ir kiti veiksniai (naviko tipas, į fibroblastus panašių ląstelių buvimas, kultivavimo terpės sudėtis). Tyrėjai pastebėjo, kad pacientų organoidų modeliai išlaikė donoriniams navikams būdingas savybes, t. y., pasižymėjo aukštu konkordantiškumu (angl. high concordance), išsaugodami svarbiausias morfologines, genomines ir transkriptomines donorinių navikų charakteristikas. Mutacijų atitikimas tarp pacientų organoidų ir donorinių navikų siekė 88 %, be to, organoidų ląstelės išlaikė stabilius genominius profilius vėlesnių organoidų auginimo etapų (ląstelių persėjimo ciklą) metu (angl. across passages). Svarbu pažymėti, kad Hogenson ir kt. tyrimo metu pasirinktos kultivavimo terpės turėjo reikšmingos įtakos kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų organoidų fenotipinių savybių perteikimui ir ląstelių terapiniam jautrumui. Pavyzdžiui, WNT terpėje buvo skatinama epitelio–mezenchimos perėjimo (EMT) žymenų raiška ir atsparumas 5-FU bei oksaliplatinai, tuo tarpu padidėjęs organoidų ląstelių jautrumas atitinkamai paskirtiems chemoterapiniams vaistams (oksaliplatinai ir 5-FU) buvo stebimas organoidų kultūras kultivuojant PaTOM terpės sąlygomis. Kaip išsiaiškino mokslininkai, pacientų navikų organoidų modeliuose stebėti tikslinių terapijų atsakai buvo suderinami su organoidų genominių profilių ypatybėmis, pavyzdžiui, FGFR aberacijos prognostiškai siejosi su jautrumu FGFR inhibitoriams. Tačiau tyrėjai atkreipė dėmesį ir į tam tikrus su organoidų prognozuojamu terapiniu jautrumu susijusius netikslumus, pavyzdžiui, galimybes numatyti HRD mutacijų ir jautrumo PARP inhibitoriams sąryšį. Kasos duktalinės adenokarcinomos organoido modelyje (HO162), kuriame nustatyta BRCA2 patogeninė mutacija, siejama su HRD, buvo stebimas padidėjęs jautrumas PARP inhibitoriui rucaparibui, kaip ir buvo prognozuota, remiantis organoido genominio profilio analizės duomenimis. Įdomu tai, jog kitame kasos duktalinės adenokarcinomos organoido modelyje (HO107), kuriame nebuvo aptikta žinomų su HRD susijusių mutacijų (angl. HRD-associated mutations), taip pat pastebėtas santykinis jautrumas rucaparibui, - priešingai, nei buvo galima numatyti, pasirėmus genominės organoido analizės prognoze. Tyrėjų atlikta transkriptominė organoidų analizė taip pat padėjo nustatyti su kasos duktalinės adenokarcinomos navikų terapiniu atsparumu susijusias mutacijas, kaip antai, KRAS mutacijas ir padidėjusią transkripcijos faktoriaus GLI2 raišką, – veiksnius, sąlygojusius ląstelių signalizavimo kelių pokyčius ir epitelio–mezenchimos perėjimą. Pažymėtina, kad Hogenson ir kt. sukurtų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų terapinis jautrumas atitiko stebėtus klinikinius pacientų gydymo rezultatus 82% atvejų (9 iš 11 organoidų atkartojo donorinių pacientų terapines reakcijas), tuo

tarpu rezultatų neatitikimus lėmė tokie veiksniai, kaip pacientų navikų specifinė mikroaplinka ar anksčiau taikytų gydymo režimų poveikis. Tyrėjai pabrėžia, kad siekiant plačiau panaudoti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius klinikinėje praktikoje, būtina standartizuoti jų auginimo sąlygas ir sukurti greitus, efektyvius vaistų testavimo metodus, taikytinus pasitelkiant organoidų tiriamąsias platformas. Galima teigti, jog Hogenson ir kt. tyrimo išvados įrodo pacientų organoidų modelių potencialą, galintį padėti mokslininkams kuriant personalizuoto gastrointestinių onkologinių susirgimų gydymo schemas, tačiau kartu reikalinga atlikti ir tolesnius didesnės apimties, standartizuotus klininius tyrimus, pagrindžiančius organoidų tiriamųjų sistemų klinikinio taikymo efektyvumą [134].

Neseniai Ehlen ir kt. (2020 m.) sukūrė ir pristatė naujus metodinius protokolus, taikytinus modeliuojant dvimačių (2D) ir trimačių (3D) pirminių ląstelių kultūrų sistemas iš pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos audinių. Tiriamoji medžiaga buvo surinkta iš 14 pacientų (vidutinis pacientų amžius – 74 metai; imtyje buvo 9 moterys ir 5 vyrai), kuriems atlikta pankreatikoduodenektomija (angl. pancreaticoduodenectomy). Iš gautų pacientų audinių mėginių mokslininkams pavyko sėkmingai sukurti 11 kasos duktalinės adenokarcinomos pirminių ląstelių kultūrų (79 %), tarp jų 6 ląstelių kultūros suformavo organoidinę struktūrą (43 %). Ehlen ir kt. tyrimo metu efektyviausiu protokolu pripažintas kultivavimo metodas, apėmęs dviejų etapų mechaninio ir fermentinio virškinimo procesą, panaudojus fermentų mišinį Enzyme Mix II (į kurio sudėtį įėjo kolagenazė XI, DNRazė I, dispazė II, elastazė ir hialuronidazė V). Šis kultivavimo protokolas pasižymėjo tokiais pranašumais, kaip pagerėjusi audinių disociacija ir išgautas pakankamai didelis gyvybingų ląstelių skaičius. Taip pat tyrimo autoriai pažymi, kad *Matrigel* terpė yra bene svarbiausias komponentas, užtikrinantis sėkmingą organoidų formavimąsi: optimalios augimo sąlygos buvo pasiektos, kai ląstelės buvo kultivuojamos *Matrigel* terpėje atitinkamu santykiu 1:3 (ląstelės:*Matrigel*), 37 °C temperatūroje. Ląstelių kultūrų gyvybingumas tyrimo metu buvo palaikomas vidutiniškai 96 dienas, ilgiausiai išsilaikiusi kultūra gyvavo 194 dienas, taip pat tyrėjams pavyko atlikti 7 kartotinius naujų ląstelių kultūrų kultivavimo ciklus. Be to, imunofluorescencinė analizė ir dažymas hematoksilinu-eozinu (HE) parodė kasos duktalinės adenokarcinomos navikams būdingų žymenų (CK19, E-kadherino ir CA 19-9) ekspresiją 87,5 % pirminių ląstelių kultūrų. Perteklinės fibroblastų proliferacijos problemą tyrėjai išsprendė panaudodami kultivavimo terpę be serumo, praturtintą organoidų suformavimui reikalingais diferenciacijos faktoriais, tokiais kaip FGF10, hEGF, retinoinė rūgštis ir ROCK inhibitoriai, reikalingais organoidų suformavimui. Nors tyrimo metu kultivuotos ląstelių kultūros atspindėjo pagrindines navikų savybes, buvo nustatyta ir stromos bei epitelio žymenų ekspresijos neatitikimų. Remiantis Ehlen ir kt. stebėjimų išvadomis, pabrėžtina *Matrigel* koncentracijos, ląstelių pasėjimo į terpę tankio ($\sim 1 \times 10^6$ ląstelių/cm²) ir tikslinio augimo faktorių papildymo svarba, siekiant sukurti platformą, pritaikomą kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose ir prisidedančią prie individualizuotos medicinos terapių metodų tobulinimo [135].

Įdomių įžvalgų pateikė Huang ir kt., atlikę tyrimą (2020 m.), kurio metu pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai buvo kultivuojami be WNT signalizavimo kelio komponentų (angl. under WNT-free culture conditions), tačiau nepaisant šio trūkumo, mokslininkams pavyko įrodyti šių eksperimentinių vėžio platformų tiriamąją naudą. Pažymėtina, jog WNT signalizavimo kelio komponentai, tokie kaip WNT ligandai arba augimo faktoriai, yra ypač svarbūs reguliuojant naviko ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir kamieninių ląstelių gyvybingumo palaikymą įvairiose biologinėse sistemose, tarp jų – ir

individualiuose pacientų navikų organoidų modeliuose. Huang ir kt. sukurti PXO organoidų modeliai (angl. PDX-derived organoid (PXO) models) gana tiksliai atkartojo genetines savo atitikmenų – ksenograftų modelių – savybes, išsaugodami 24 iš 25 pagrindinių kasos duktalinės adenokarcinomos atveju navikams būdingų mutacijų, įskaitant ir svarbias paminėtinas mutacijas, kaip antai, KRAS, TP53 ir SMAD4. Mokslininkų atlikti histologiniai ir molekuliniai tyrimai taip pat patvirtino, kad PXO organoidų modeliai glaudžiai atspindėjo PDX modeliuose pastebėtą architektūrą ir išlaikė epitelinius diferenciacijos žymenis, pavyzdžiui citokeratiną 19. Be to, vaistų poveikio tyrimai (angl. drug response studies) parodė, kad PXO modeliuose AUC reikšmės koreliuoja su in vivo PDX modelių AUC reikšmėmis, tiksliai prognozuojant jautrumą pavieniams vaistams ir jų deriniams, tarp jų - chemoterapiniams agentams, tokiems kaip gemcitabinas/paklitakselis (iš tyrėjų tikrintų 12 vaistų derinių, 10 pasižymėjo panašiais poveikiais abiejose eksperimentinėse platformose - PXO ir PDX modeliuose). Tyrimo metu atlikta glikominių profilių (angl. glycomic profiling) analizė atskleidė, kad PXO modeliai atkartoja ir PDX navikų glikanų savybes: ištyrus visus modelius, buvo identifikuoti 284 N-glikanai, tarp kurių 188 buvo aptikti abiejose eksperimentinėse platformose, taip pat iš viso nustatyti 57 pagrindiniai (angl. core), dominuojantys visuose modeliuose glikanai (sudarantys 50–94% glikominių profilių sudėties). Be to, pagrindinių glikanų sudėtyje buvo aptikta dominuojančių manoze turtingų glikanų (angl. high-mannose glycans) ir glikanų su Lewis epitopais, kurie siejami su kasos duktalinės adenokarcinomos navikų biologiniu profiliu. Tyrimo metu pasitelkus sekretuojamų biožymenų aptikimo metodą buvo nustatyti penki ekstraląstelių pūslelių baltymų žymenys, tarp kurių paminėti tokie kaip ANXA11, CD44v6 ir GPC4, kurie buvo aptinkami ekstraląstelinėse pūslelėse kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų organoiduose, taip pat nustatyti pacientų kraujo plazmos mėginiuose, taip diferencijuojant kasos duktalinei adenokarcinomai būdingus pokyčius nuo gerybinių gastrointestinių ligų arba lėtinio pankreatito. Galima teigti, jog Huang ir kt. tyrimo rezultatai įrodė PXO (angl. PDX-derived organoid (PXO) models) organoidų modelių kaip patikimos, kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimams tinkamos platformos, pritaikomumą, numatant ligos gydymui naudojamų vaistų atsakus in vivo, gilinant supratimą apie kasos navikams būdingus glikozilinimo mechanizmus ir pritaikant gautas žinias klinikiniam kontekste - kasos duktalinės adenokarcinomos biožymenų identifikavimui [136].

Nors tyrimai, kuriuose pasitelkiami iš kasos latakų ląstelių išauginti organoidai, mokslininkams suteikia svarbios informacijos gilinantį į kasos duktalinės adenokarcinomos patofiziologiją, tačiau diskusijos dėl to, kokios ląstelės lemia kasos duktalinės adenokarcinomos kilmę, lieka neišspręstos. Įrodyta, kad genetiniuose pelių modeliuose tiek kasos acinarinės, tiek latakų ląstelės gali lemti vėžio atsiradimą, o naujausi tyrimai atskleidžia transkriptominius ir fenotipinius navikų, kilusių iš kiekvieno ląstelių tipo, skirtumus [137, 138]. Manoma, kad šie skirtumai gali paaiškinti žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos atvejų heterogeniškumą. Deja, nepaisant siekio pritaikyti acinarines ląsteles kasos vėžio organoidų kūrimui, svarbu atsižvelgti į tai, jog šias ląsteles ypač sunku tirti in vitro – paprastai acinarinės ląstelės negeba suformuoti organoidų struktūrų, net jei į jas pavyksta įterpti pagrindines kasos duktalinei adenokarcinomai būdingas mutacijas. Be to, acinarinės ląstelės linkusios greitai transformuotis į duktalines primenančias ląsteles (angl. ductal-like cells), vykstant acinarinės metaplazijos procesui, taigi, ši acinarinių kasos ląstelių ypatybė dar labiau apsunkina jų panaudojimo galimybes kuriant stabilios trimatės struktūros kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamuosius modelius [127, 137, 138].

Siekdami įveikti acinarinių ląstelių kultūrų panaudojimo kasos vėžio tyrimuose apribojimus, mokslininkai sukūrė daug žadantį metodą, įgalinusi žmogaus pliuripotentinių kamieninių ląstelių (angl. human pluripotent stem cells, hPSC) diferencijavimą į kasos acinarinius ir į latakų struktūrą imituojančius egzokrininius organoidus (angl. acinar- and ductal-like exocrine organoids) [139, 140]. Ši organoidų generavimo metodika pagrįsta nuosekliu protokolu: embrioninės kamieninės ląstelės (ESC) pirmiausia buvo diferencijuojamos į kasos pirmtakes panašias ląsteles (angl. pancreatic progenitor-like cells), o vėliau į acinarines arba į duktalines panašias ląsteles (angl. acinar or ductal-like cells). Huang su kolegomis (2020 m.) įrodė, kad įvedus KRASG12D mutaciją šiuose organoidų modeliuose, atsirado skirtingi, ląstelių linijai būdingi fenotipai (angl. cell-lineage-specific phenotypes): į acinusus panašūs organoidai pirmiausia suformavo ankstyvus kasos duktalinės adenokarcinomos pažeidimus po ortotopinės transplantacijos, o į latakų struktūrą panašūs organoidai pasižymėjo mažiau efektyviu įsitvirtinimu po transplantacijos (angl. engraftment) ir daugiausia suformavo intraduktalines papilines mucinines neoplazmas (angl. intraductal papillary mucinous neoplasms, IPMNs) [136].

Iš sveikų organizmo audinių išaugintus organoidus taip pat galima laikyti svarbiu regeneracinės medicinos (angl. regenerative medicine) srityje vykdomų tyrimų įrankiu. Žinoma, kad gerai proliferuojančiuose organų, tokių kaip žarnynas ir oda, audiniuose, yra daug pirmtakų ląstelių (angl. progenitor cells), kurios atitinkamai sudaro maždaug 5–8% audinio, todėl po sužalojimo arba esant normalioms organizmo homeostazės sąlygoms yra reguliariai užtikrinamas audinių atsinaujinimas. Tam tikri organizmo audiniai pasižymi maža ląstelių apykaita, pavyzdžiui, kepenys, kurių tik specifinės ląstelės geba atsinaujinti po pažeidimo. Atkreiptinas dėmesys, jog kasa taip pat nepasižymi gera regeneracine geba, ypač kasos endokrininė dalis, ir nors mokslininkai atliko bandymus tirdami kasos pirmtakų galimybę pakeisti senas β ląsteles, kilmės atsekimo tyrimų (angl. lineage tracing) duomenys rodo, kad tokie specializuotai veikiantys ląstelių pirmtakai kasoje neišreiškia regeneracinio potencialo. Įdomu tai, kad acinarinės ląstelės pasižymi tam tikru plastiškumu ir išreiškia nežymų potencialą transdiferencijai į β ląsteles, nors šis procesas paprastai yra neefektyvus, jei nėra kontroliuojamas kartu vykstantis uždegimas. Kasos latakų ir acinarinės ląstelės gali inicijuoti organoidinių kultūrų susidarymą, tačiau tik latakų ląstelės gali suformuoti ilgalaikę struktūrą galinčius palaikyti organoidus, tad kartu tai įrodo kasos latakų ląstelių unikalų plastiškumą ir atspindi pritaikomumo regeneracinėje terapijoje potencialą, pavyzdžiui, gydant cukrinį diabetą [127].

Tiriamųjų kasos audinio platformų galimybes siekė išnagrinėti Huang su kolegomis (2015 m.), šių eksperimentinių sistemų modeliavimui pasitelkę regeneruojančių ląstelių populiacijas. Mokslininkai pristatė išsamią trijų dimensijų (3D) kultūros sistemą, įgalinančią žmogaus pliuripotentinių kamieninių ląstelių (angl. pluripotent stem cells, PSCs) diferenciaciją į kasos egzokrininius pirmtakinius organoidus, gebančius formuoti latakų ir acinarines struktūras tiek in vitro, tiek in vivo sąlygomis. Tyrėjai organoidų kultivavimui pasitelkė augimo faktorius, tokius kaip FGF2, insulinas, hidrokortizonas, askorbo rūgštis ir retinoinė rūgštis, bei pastebėjo, kad 10–20 % PSC kilmės ląstelių išsivystė į poliarizuotas struktūras, kurioms buvo būdinga kasos pirmtakinių ląstelių žymenų (NKX6.1, PDX1, SOX9) raiška. Tyrėjų sukurti organoidai išlaikė apikalinio-bazinio poliariškumo (angl. apical-basal polarity) savybes, struktūrinius matmenis ir galimybę panaudoti ląsteles tolesniems kultūrų persėjimams (angl. passaging). Taip pat atkreiptinas dėmesys, kad moduliavus TGFβ ir Notch signalinius kelius, buvo

paskatinta organoidų diferenciacija į kasos latakų (CA2+) ir acinarines (CPA1+) ląsteles. In vivo sąlygomis, transplantavus pirmtakinius organoidus į NOD/SCID peles (angl. NOD/SCID mice), buvo suformuoti dariniai, morfologiniu ir molekulinio lygmenimis tiksliai atkartojantys egzokrinines kasos struktūras. Huang ir kt. nustatė, kad organoidų modeliai gali būti pasitelkiami efektyviam kasos duktalinės adenokarcinomos modeliavimui, įvedant pasirinktas mutacijas, kaip antai, KRASG12V arba TP53R175H. Kaip parodė tyrimo rezultatai, KRASG12V mutacija organoiduose paskatino netvarkingų cistinių struktūrų, panašių į ankstyvus navikinius pažeidimus, formavimąsi, o tuo tarpu TP53R175H mutacija organoidų modeliuose lėmė nenormalią struktūrinę organizaciją ir citoplazminę SOX9 lokalizaciją (tipiškai SOX9, kaip transkripcijos faktorius, lokalizuojasi ląstelės branduolyje). Mokslininkai pastebėjo, kad citoplazminis SOX9, aptiktas TP53-mutuotuose kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų mėginiuose, buvo susijęs su prastesniais išgyvenimo be ligos (angl. disease-free survival) ir bendrojo išgyvenamumo (angl. overall survival) rodikliais. Iš šviežiai pašalintų kasos duktalinės adenokarcinomos navikų (angl. freshly resected PDAC) sukurti organoidų modeliai išlaikė diferenciacijos būklę, histoarchitektūrą bei pacientui specifinius požymius, tokius kaip deguonies suvartojimas ir atsakas į terapiją, todėl tyrimo autoriai siūlo organoidus pasitelkti individualizuotam vaistų testavimui. Remiantis atlikto tyrimo rezultatais, mokslininkams pavyko įrodyti, kad sukurti organoidai pasižymėjo skirtingu jautrumu vaistui EZH2 inhibitoriui, kuris sumažino H3K27me3 teigiamų organoidų (angl. positive for the H3K27me3 mark) proliferaciją ir kartu slopino deguonies suvartojimą. Verta atkreipti dėmesį, kad H3K27me3 epigenetinę modifikaciją (angl. histone H3 lysine 27 trimethylation, H3K27me3) straipsnio autoriai įvardijo kaip svarbų genų represijos žymenį (angl. repressive mark) ir kartu perspektyvų terapinį taikinį. Taigi, anot Huang ir kt., tiriamoji trijų dimensijų ląstelių kultivavimo sistema leidžia efektyviai (85%) sukurti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų organoidus iš pacientų chirurginių mėginių, patikimai išlaikant ląstelių histologinį heterogeniškumą (histostazę), diferenciacijos žymenis (tokius, kaip antai, KRT19, SOX9, GATA6) ir atspindint navikų epigenetinius profilius. Tyrimo metu organoiduose buvo atkartoti specifiniai pacientų navikams būdingi požymiai nuoseklių kultūrų persėjimų ir ląstelių šaldymo (angl. cryopreservation) metu, taip pat suformuoti navikų dariniai, kuriuos persodinus į pelių organizmus, gana tiksliai atkartotos pirminių navikų savybės. Funkciniai organoidų modelių tyrimai taip pat parodė, kad organoidai yra naudingi vertinant vaistų poveikį: nustatytas neefektyvus atsakas į gydymą gemcitabinu, tačiau kai kuriuose modeliuose pastebėtas teigiamas terapinis EZH2 inhibitorių poveikis. Galima teigti, kad Huang ir kt. tyrimo pastebėjimai rodo, kad kasos pirmtakiniai ir navikiniai organoidai yra universalūs įrankiai, pasitelktini kasos duktalinės adenokarcinomos modeliavimui, ankstyvos navikogenezės analizėms ir į pacientą orientuotų individualių terapinių metodų kūrimui [139].

Greta minėtų organoidų modelių pritaikymo regeneracinės medicinos srities tyrimuose galimybių, ši tiriamoji platforma vis dažniau pasitelkiama tiriant navikų patologiją. Pavyzdžiui, panaudodami individualius kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų navikų organoidų modelius, mokslininkai siekia identifikuoti pagrindines ligos patogenezę skatinančias mutacijas (angl. driver mutations), kartu taikydami inovatyvius genų inžinerijos metodus, kaip antai, CRISPR-Cas9 technologiją, arba šiuo tikslu pasitelkdami padidėjusios ekspresijos vektorius (angl. overexpression vectors) [127]. Organoidų modelių kūrimo technologijos yra nuolat tobulinamos, pasitelkiant naujus gamybos metodus. Pavyzdžiui, Kang ir kt. (2022) tyrime sutelkiamas dėmesys į organoidų modelių patobulinimo galimybes, įtraukiant pažangias vaizdinių tyrimo metodų technologijas ir skaičiavimo algoritmus. Tyrėjai

organoidų modeliams pritaikė dažymą specifiniais žymenimis (antikūnais), norėdami identifikuoti įvairius ląstelių komponentus: citokeratinu 19 (CK-19), skirtu naviko ir kasos lataų ląstelėms pažymėti; α lygiųjų raumenų aktinu (α -SMA), skirtu atpažinti aktyvuotus fibroblastus; aneksinu A5, padedančiu nustatyti ląstelių apoptozę, ir Ki-67, leidžiančiu atpažinti proliferuojančias ląsteles. Šie žymenys leido tyrėjams apibūdinti ir stebėti organoidų biologinius procesus, tokius kaip ląstelių proliferacija ir apoptozė, kurie yra labai svarbūs vertinant atsaką į vaistus. Tyrimą vykdę mokslininkai, siekdami patobulinti organoidų struktūras pasitelkė konfokalinę mikroskopiją, kad galėtų gauti didelės raiškos 3D organoidų nuotraukas. Šios nuotraukos buvo analizuojamos naudojant *Imaris* programinę įrangą, leidžiančią segmentuoti ląstelių komponentus ir kiekybiškai įvertinti fluorescencinius signalus. Segmentavimo procesas apėmė skirtingų ląstelių komponentų identifikavimą ir atskyrimą pagal fluorescencijos signalus iš atitinkamus žymenis ekspresuojančių organoido sričių. Tai buvo padaryta identifikuojant ląstelių branduolius, panaudojus fluorescuojantį dažymą DAPI žymeniu, skirtu ląstelių branduoliams atpažinti, bei nustatant ląstelių citoplazmos komponentus, remiantis CK-19, α -SMA ir aneksino A5 žymenų ekspresija. Tyrimo autoriai sukūrė algoritmus organoidų 3D vaizdams analizuoti, kurie suteikė išsamių įžvalgų apie organoidų ląstelių ir branduolinę sudėtį, taip pat skirtingų ląstelių tipų erdvinį pasiskirstymą. Kang ir kt. įvertino įvairius biologinius parametrus, tokius kaip, pavyzdžiui, skirtingas organoidų modelių augimo greitis, ir panaudojo šiuos duomenis augimo kreivėms sudaryti. Jie patvirtino organoidų atsaką į chemoterapiją, kiekybiškai įvertindami žymenis, tokius kaip Ki-67, kuris rodo ląstelių proliferaciją, ir aneksiną A5, kuriuo atpažįstamos apoptotinės ląstelės. Šie žymenys buvo kiekybiškai įvertinti naudojant 3D vaizdavimo technologiją, leidžiančią išsamiai išanalizuoti, kaip organoidai reaguoja taikytą į gydymą skirtingais terapiniais agentais. Viena iš pagrindinių tyrimo naujovių - ex vivo organoidinio jautrumo vaistams testavimo platformos (angl. organoid drug sensitivity assay, ODSA) pritaikymas. Šis įrankis buvo skirtas patikrinti, kaip chemoterapiniai vaistai veikia organoidus - 3D pacientų navikų modelius. Naudodami ODSA, mokslininkai galėjo palyginti, kaip organoidų modelius paveikė gydymas paskirtais vaistais, su tuo, kaip realūs pacientai reagavo į chemoterapiją. Tyrimas parodė, kad organoidų atsakas į gydymą buvo panašus į pacientų atsaką, taikant chemoterapiją klinikinėje praktikoje. Šis tyrimo radinys patvirtina prielaidą, jog organoidų modeliai gali būti efektyviu įrankiu, padedančiu individualizuoti gydymo planus kasos duktalinės adenokarcinoma sergantiems pacientams, pasirenkant efektyviausią chemoterapinį režimą konkrečiai kiekvienam pacientui [141].

Siekdami sukurti dar tiksliau kasos duktalinės adenokarcinomos biologiją atitinkantį tyrimų modelį, Osuna de la Peña ir kt. (2021 m.) pasitelkė bioinžineriniais metodais suprojektuotą bendros agregacijos, vientisą 3D platformą (angl. bioengineered 3D co-assembly platform), sudarytą iš peptidų amfifilų (angl. peptide amphiphiles, PAs) ir ekstraląstelinės matricos (angl. extracellular matrix, ECM) komponentų. Šiame ex vivo kasos duktalinės adenokarcinomos modelyje peptidų amfifilai buvo pritaikyti tam, kad galėtų savarankiškai susitelkti į nanopluoštinus hidrogelius, kurie imituotų naviko audiniuose esančios ekstraląstelinės matricos architektūrą ir sklindančių signalų ypatybes. Hidrogeliai buvo kombinuojami su pagrindiniais ekstraląstelinės matricos komponentais, tokiais kaip I tipo kolagenas, fibronektinas, lamininas ir hialuronanas, kurių gausiai aptinkama kasos duktalinės adenokarcinomos mikroaplinkoje. Šie komponentai suteikė struktūriškai ir biochemiškai palaikančią matricą, kuri leido auginti ir išlaikyti iš pacientų gautas kasos duktalinės adenokarcinomos ląsteles 3D kultūros sistemoje. Tyrimo autoriai į PA-ECM hidrogelius įterpė

iš kasos duktalinė adenokarcinoma sergančio paciento kasos išskirtas žvaigždines ląsteles (angl. pancreatic stellate cells, PSCs) ir pirminius makrofagus. Šios ląstelės pasirinktos kultivavimui kaip pagrindiniai kasos duktalinės adenokarcinomos stromos komponentai tam, kad būtų tiksliai atkartojama naviko mikroaplinka ir sudėtingos naviko ląstelių sąveikos.

Stengdamiesi, kad ląstelių kultūros biologškai tiksliai reprezentuotų tikruosius navikus, *ex vivo* kasos duktalinės adenokarcinomos modelio (PA-ECM, peptido amfifilinės ekstraląstelinės matricos platformos) kūrėjai ypatingą dėmesį skyrė PA-ECM modelyje naudojamų hidrogelių fizinių savybių pritaikymui, atsižvelgdami į tokius aspektus kaip standumas (angl. stiffness) ir pluošto tankis (angl. fiber density). Šios savybės buvo kruopščiai modifikuotos, kad atitiktų mechanines sąlygas, esančias realiuose kasos duktalinės adenokarcinomos audiniuose. Visų pirma, PA-ECM hidrogelių standumas buvo tiksliai sureguliuotas iki maždaug 1 kPa. Toks standumo lygis buvo pasirinktas, nes jis panašus į standumą, fiksuojamą kasos ksenograftų modelių audiniuose ir pirminiuose kasos duktalinės adenokarcinomos naviko mėginiuose. Šio kriterijaus nustatymas mokslininkams leido sukurti į natūralią panašią aplinką, skirtą kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių auginimui, o tai labai svarbu norint tiksliai perteikti modeliuojamą naviko elgesį. Svarbu atkreipti dėmesį, jog tyrimo metu hidrogeliai buvo papildyti specifiniais ekstraląstelinės matricos komponentais. Šie komponentai lėmė galimybę kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėms išvystyti tam tikras savybes, tokias kaip gebėjimas vykdyti epitelio-mezenchiminę tranziciją (angl. epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) ir palaikyti vėžio kamieninių ląstelių (angl. cancer stem cell, CSC) augimą. Epitelio-mezenchiminė tranzicija yra procesas, kurio metu ląstelės keičiasi iš struktūrinės epitelio būsenos į judresnę, mezenchiminę būseną, kuri yra svarbi vėžio plitimui [142].

Taigi, Osuna de la Peña ir kt. atlikto tyrimo duomenys parodė, kad bioinžinerijos būdu sukurtas 3D kasos duktalinės adenokarcinomos (PDAC) modelis, pagrįstas nauja tiriamąja platforma, suformuota iš peptidinės amfifilinės ekstraląstelinės matricos (PA-ECM) hidrogelių, yra pažangesnė ir dar geriau naviko mikroaplinką imituojanti sistema, palyginus su įprastais kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliais. Šio patobulinto *ex vivo* kasos duktalinės adenokarcinomos modelio patikimumas buvo patvirtintas atliekant proteominę analizę – metodą, naudojamą ląstelėse esantiems baltymams tirti. Analizė parodė, kad PA-ECM kultūros tiksliau nei tradiciniai organoidų modeliai atkūrė sudėtingą ECM sudėtį, kasos duktalinės adenokarcinomos navikuose atitinkančią matrisomą, arba ekstraląstelinės matricos, struktūrą. PA-ECM platforma buvo pritaikyta chemoterapinių preparatų veiksmingumui įvertinti. Tyrėjai į organoidus panašias PA-ECM kultūras paveikė standartiškai kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui pasitelkiamais terapiniais agentais, tokiais kaip gemcitabinas ir nab-paklitakselis, o tada palygino jų atsakus su pacientų ksenograftų modeliuose ir pirminiuose pacientų navikuose fiksuotais atsakais. Įvertinus rezultatus paaiškėjo, kad atsakas į vaistus kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių PA-ECM kultūrose buvo panašus į klinikinius rezultatus, kartu atsižvelgus ir į tokius veiksnius, kaip atsparumo mechanizmai, išsivystę dėl naviko stromos ir vėžio kamieninės ląstelių sąveikų. Galima teigti, jog greta tradicinių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių, PA-ECM platforma, kaip pademonstravo Osuna de la Peña ir kt. atliktas tyrimas, yra dar vienas perspektyvus įrankis tiriant kasos duktalinės adenokarcinomos biologiją ir kuriant individualizuotas gydymo strategijas, pagrįstas unikaliomis kiekvieno paciento naviko savybėmis [142].

Remiantis literatūroje pateikiamais duomenimis, darytina išvada, kad šiuo metu moksliniuose tyrimuose pasitelkiami organoidų modeliai yra galingas įrankis, padedantis gilinti supratimą apie kasos biologiją ir kurti perspektyvius gydymo būdus, taikytinus regeneracinės medicinos ir individualizuotos vėžio terapijos srityse. Tačiau nepaisant didelio potencialo, organoidai pasižymi formos ir dydžio įvairove bei generavimo netolygumais, taip pat juose dažnai nepakankamai išvystomas aprūpinimas krauju ir nepalaikomos sąveikos tarp skirtingų tipų ląstelių, o tai riboja šių modelių galimybes visiškai atkartoti in vivo aplinkos sąlygas. Siekiant įveikti šiuos apribojimus, būsimos mokslininkų pastangos turėtų būti nukreiptos į organoidinių kultūrų kultivavimo standartų kūrimą ir skirtingų tipų ląstelių (mezenchiminių, endotelio, neuronų, imuninių ląstelių) kultūrų kultivavimą bendroje terpėje, siekiant pagerinti ląstelių brandimą ir tiksliau modeliuoti kasos funkcines ir struktūrines savybes. Nors pastaruoju metu daroma pažanga kuriant sudėtingesnius trimačius tiriamuosius modelius, svarbu pripažinti ir esamų standartinių dvimačių bei gyvūnų modelių vertę, nes sprendžiant kasos tyrimų ir terapinių metodų kūrimo iššūkius, rezultatų patikimumo užtikrinimui gali prireikti kartu naudoti ir paprastesnius tradicinius tiriamuosius modelius.

Cirkuliuojančių naviko ląstelių panaudojimas kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių kūrimui

Pagrindinės organoidų kūrimo technologijos leidžia efektyviai ir patikimai izoliuoti kasos duktalinės adenokarcinomos ląsteles iš įvairių šaltinių, pvz., pašalintų navikų, plonos adatos aspiracinės biopsijos mėginių (angl. fine needle aspiration, FNA) ir metastazių. Literatūroje nurodoma, kad organoidų išauginimo iš pašalinto naviko ir plonos adatos aspiracinės biopsijos medžiagos sėkmės rodikliai svyruoja nuo 62% iki 100%, o kuriant organoidus kasos duktalinės adenokarcinomos metastazių kepenyse pagrindu – modelį pasiseka sukurti iki 70% atvejų. Dar vienas neseniai atrastas, kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų kūrimui tinkamas navikinės medžiagos šaltinis yra cirkuliuojančios naviko ląstelės (angl. circulating tumor cells, CTCs) ir jų „ne tumorigeniniai“ atitikmenys – cirkuliuojančios epitelinės ląstelės (angl. circulating epithelial cells, CECs), arba kitaip, normalios kraujotakoje cirkuliuojančios epitelinės ląstelės. Cirkuliuojančios naviko ląstelės yra perspektyvi ir beveik neribota tiriamo audinio šaltinio alternatyva invazinėms biopsijoms, netgi žinant, jog šių ląstelių kraujyje yra aptinkama itin mažai (1 CTC randama labai mažame kiekyje, t. y. maždaug 10^7 – 10^9 kraujo kūnelių) [2].

Įdomių įžvalgų apie cirkuliuojančių naviko ląstelių pritaikomumą kasos duktalinės adenokarcinomos klinikiniuose tyrimuose pateikiama Yeo ir kolegų straipsnyje (2022 m.). Tirdami cirkuliuojančių naviko ląstelių populiacijas, išskirtas iš pacientų kraujo mėginių, mokslininkai siekia gautus duomenis pritaikyti atliekant kasos duktalinės adenokarcinomos atrankinius, ankstyvus ir galutinius diagnostinius tyrimus, taip pat atliekant prognostinį ir predikcinį ligos klinikinės eigos vertinimą bei pasirenkant efektyvius terapinius sprendimus, gydant kasos duktalinę adenokarcinomą. Kasos duktalinei adenokarcinomai būdingas ankstyvas metastazavimas, o cirkuliuojančios naviko ląstelės gali būti aptinkamos dar ankstyvose ligos stadijose, tad laiku nustatčius ligos diagnozę, būtų galima pritaikyti efektyvius gydymo metodus. Visgi šiuo metu nėra sukurta standartizuotų metodų, pritaikomų cirkuliuojančių naviko ląstelių aptikimui, pagausinimui ir išskyrimui, todėl egzistuoja ribotos palyginamumo tarp tyrimų galimybės. Ištirti cirkuliuojančias naviko ląsteles padeda skystųjų

biopsijų (angl. liquid biopsies) mėginiai, iš paciento periferinio kraujo gaunami minimaliai invazyviu būdu, įgalinant kartotinius mėginių paėmimus ir multiomines cirkuliuojančių naviko ląstelių analizes (angl. multiomic analyses). Yeo ir kt. straipsnyje atkreipiamas dėmesys į ankstesnius sėkmingus bandymus išgauti cirkuliuojančias naviko ląsteles iš pacientų, sergančių prostatos, krūties ir plaučių vėžiu, periferinio kraujo, tačiau atsižvelgiama į tai, kad kasos duktalinės adenokarcinomos cirkuliuojančių ląstelių kultūras išgauti iš paciento mėginių yra sudėtinga dėl riboto cirkuliuojančių naviko ląstelių skaičiaus periferiniame kraujyje ir sudėtingų jų kultivavimo sąlygų. Taip pat Yeo ir kolegų straipsnyje pastebima, kad tokie tiriamieji modeliai, kaip tarpląstelinės matricos mikrogardelės (angl. extracellular matrix microarrays), bendrai kultivuojamos naviko ląstelių ir imuninių ląstelių ar fibroblastų kultūros, galėtų sudaryti tinkamas sąlygas cirkuliuojančių naviko ląstelių kultivavimui. Be to, apsvarstytina galimybė cirkuliuojančias naviko ląsteles panaudoti organoidų modelių kūrimui, tam pasitelkiant skystųjų biopsijų medžiagą, o ne įprastai tam naudojamus solidinių (audinių) biopsijų mėginius, kurių išgavimas iš paciento, sergančio kasos duktaline adenokarcinoma, yra sudėtingas procesas. Straipsnio autoriai išreiškia viltį, kad iš cirkuliuojančių naviko ląstelių sėkmingai išauginus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidus atsirastų alternatyva iki šiol atliekamoms audinių biopsijoms, o kartu būtų galima pritaikyti individualius terapinius sprendimus gydant kasos duktaline adenokarcinoma sergančius pacientus. Visgi šiuo metu mokslininkai dar susiduria su tam tikrais iššūkiais, susijusiais su cirkuliuojančių naviko ląstelių išgavimu iš pacientų periferinio kraujo mėginių, o patvirtintų standartizavimo kriterijų nebuvimas skatina šališkumo atsiradimą paskesniuose cirkuliuojančių naviko ląstelių tyrimuose, dėl to trūksta patikimų įrodymų apie nuspėjamąją cirkuliuojančių naviko ląstelių vertę klinikinio pritaikomumo kontekste. Taigi, siekiant patvirtinti cirkuliuojančių naviko ląstelių klinikinę naudą, reikalinga atlikti didelio masto perspektyvinius tyrimus, kuriuose cirkuliuojančios naviko ląstelės būtų pasitelkiamos, patikrinant jų praktinio pritaikomumo potencialą. Galiausiai, prie cirkuliuojančių naviko ląstelių, kaip tiriamosios platformos, panaudojimo tyrimuose efektyvumo galėtų prisidėti vienos ląstelės technologijų (angl. single-cell technologies) pažanga, kaip tikisi straipsnio autoriai, padėsianti išsamiai identifikuoti svarbias cirkuliuojančių naviko ląstelių subpopuliacijų savybes, atsakingas už vėžio metastazių susidarymą, kartu plečiant supratimą apie kasos duktalinės adenokarcinomos biologinius ypatumus, naviko heterogeniškumą ir naujomis žiniomis paremtus galimus terapinius sprendimus [143].

Neseniai publikuotame Frappart, Hofmann ir kt. (2020 m.) straipsnyje pateikiama įrodymų, kad kraujotakoje cirkuliuojančių naviko ląstelių skaičius (gausa) ir dinamika koreliuoja su naviko progresavimu ir atsaku į gydymą. Straipsnio autoriai atkreipia dėmesį, kad naujai atsirandantys cirkuliuojančių naviko ląstelių pokyčiai gali būti nustatomi gerokai anksčiau prieš ligos pasikartojimą, o tai rodo, kad cirkuliuojančios naviko ląstelės yra potencialus tiriamasis įrankis, panaudojamas kaip nuspėjamasis žymuo (angl. predictive marker), ir, savo ruožtu, padedantis numatyti tikėtiną atkrytį ir įtvirtinti naujas gydymo strategijas. Literatūroje pateikiama duomenų, kad cirkuliuojančios naviko ląstelės, nors ir retai pasitaikančios kraujotakoje, buvo sėkmingai išskirtos iš pacientų, sergančių kasos duktaline adenokarcinoma, kraujo prieš ir po pritaikyto gydymo. Šiam tikslui buvo naudojami įvairūs standartiniai metodai, įskaitant *CellSearch*® sistemą, *ScreenCell*® sistemą, anti-citokeratino/anti-EpCAM MACS sodrinimą (angl. anti-cytokeratin/anti-EpCAM MACS enrichment), epitelinio naviko ląstelių išskyrimo pagal dydį tyrimą (angl. isolation by size of epithelial tumor (ISET) cells assay) ir mikrofluidines platformas (angl. microfluidic platforms) [2, 59, 144, 145].

Įrodyta, kad kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų cirkuliuojančios naviko ląstelės yra heterogeniškos. Mokslininkams pirmiausia pavyko nustatyti du cirkuliuojančių naviko ląstelių potipius: „epitelines“ cirkuliuojančias naviko ląsteles (eCTC) ir „epitelines/mezenchimines“ cirkuliuojančias naviko ląsteles (mCTC). Naujesniuose tyrimuose kasos duktalinės adenokarcinomos cirkuliuojančios naviko ląstelės jau skirstomos į tris kategorijas – „epitelines“, „mezenchimines“ ir „hibridines“, ši klasifikacijos schema paremta E-kadherino ir vimentino ekspresija. Pastebėta, jog cirkuliuojančios naviko ląstelės kraujotakoje keliauja suformuodamos klasterius, kuriuose išlaiko tarpląstelinius ryšius (angl. cell–cell contacts), o tie klasteriai, kurie pasižymi mezenchiminėmis savybėmis (ypač jei ląstelės išskirtos iš metastazavusių vėžių sergančių pacientų), turi didesnę metastazavimo potencialą nei pavienės kraujyje migruojančios ląstelės, be to, cirkuliuojančios naviko ląstelės geba sudaryti klasterius su įvairių tipų imuninėmis ląstelėmis [2].

Cirkuliuojančias epitelines ląsteles (CEC), panašiai kaip ir cirkuliuojančias naviko ląsteles (CTC), mokslininkams pavyko išskirti iš pacientų, kuriems buvo nustatyta cistinių pažeidimų, tokių kaip kasos intraduktalinė papiliarinė mucininė neoplazija (angl. intraductal papillary mucinous neoplasia, IPMN), mucininė cistinė neoplazma (angl. mucinous cystic neoplasm, MCN), taip pat pasitaikius kitoms kasos ligoms, pvz., pankreatitui. Nors mokslinė literatūra apie organoidų gamybą iš cirkuliuojančių kasos naviko ląstelių vis dar pateikia nedaug duomenų, svarbu atkreipti dėmesį į sėkmingus bandymus sukurti organoidus panaudojus kitų vėžio tipų cirkuliuojančias epitelines ląsteles. Pavyzdžiui, Gao ir kt. pavyko sukurti organoidų modelius iš prostatos vėžio cirkuliuojančių naviko ląstelių, o Zhang ir kt. savo tyrime panaudojo 3D bendros kultūros sistemą (angl. 3D co-culture system) ir sėkmingai sukūrė plaučių vėžio organoidus [62, 146]. Literatūroje galima rasti įrodymų, kad kasos vėžio atveju, cirkuliuojančios naviko ląstelės, kultivuojamos kartu su imuninėmis ląstelėmis *Matrigel* matricoje, yra išlaikomos iki 7 dienų. Visgi reikalinga atlikti tolesnius tyrimus ir surinkti daugiau duomenų, siekiant patikimai sukurti organoidus iš cirkuliuojančių naviko ląstelių [2, 61].

Svarbių įrodymų apie cirkuliuojančių naviko ląstelių (angl. circulating tumor cell, CTC), gautų iš skystųjų biopsijų (angl. liquid biopsies), panaudojimo organoidų formavimui galimybes pateikia Wu ir kt. (2022 m.), kartu pagrįsdami tokiu būdu sukurtų tiriamųjų modelių gebėjimą prognozuoti terapinį atsaką gydant pacientus, sergančius kasos duktaline adenokarcinoma. Iš 31 kasos duktaline adenokarcinoma sergančio paciento buvo surinktas 41 skystosios biopsijos mėginys, 87,8 % mėginių gauta iš pacientų, kuriems nustatyta IV ligos stadija. Tyrimo autoriai, panaudodami laboratorijoje sukurtą biomimetinę ląstelių kultūros sistemą (angl. biomimetic cell culture system), pasiekė sėkmingą cirkuliuojančių naviko ląstelių ekspansiją į organoidus per trijų savaičių laikotarpį (CTC kultūros sėkmingai išplėstos į organoidus 87,8 % efektyvumu). Organoidų kilmės validumą pagrindžiančios ypatybės, atitinkančios kasos duktalinės adenokarcinomos navikų savybes, tyrimo metu buvo patvirtintos tiriamuosiuose kasos vėžio modeliuose nustatčius teigiamumą EpCAM žymeniui, neigiamumą CD45 ir citokeratino-7 žymenims. Mokslininkai taip pat atliko devynių kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui skirtų vaistų jautrumo analizę organoidų modeliuose, o tyrimo rezultatus išreiškė svertiniu citotoksiškumo balu (angl. weighted cytotoxicity scores, CTS). Remdamiesi gautais duomenimis, tyrėjai pastebėjo reikšmingą CTS ir pacientų klinikinio atsako į gydymą koreliaciją ($P=0,0406$; šansų santykis=16,06), tad šis tyrimo radinys suteikė prielaidą prognozuoti kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų gydymo rezultatus

ir taip išvengti neveiksmingų terapinių sprendimų. Wu ir kt. atlikta organoidų atsako jautrumo analizė parodė potencialią šios tiriamosios sistemos klinikinę naudą, atsižvelgiant į individualias (atipines) genetines navikų ypatybes. Pavyzdžiui, vienam kasos duktalinės adenokarcinoma sergančiam pacientui, kurio navike aptikta EGFR mutacija, buvo nustatytas teigiamas atsakas į erlotinibą (tirozinkinazės inhibitorių), tuo tarpu kitam pacientui, kurio navikui buvo būdingos retos ATM ir BRIP1 mutacijos, teigiamą poveikį suteikė taikytas gydymas olaparibu (PARP inhibitoriumi). Visgi tyrimo autoriai atkreipė dėmesį ir į tam tikrus su organoidų klinikinio pritaikymu susijusius iššūkius – ištyrus šiuos modelius pastebėta, kad jų tikslumas atkuriant kasos navikų mikroaplinkos savybes (kraujagyslinius ir imuninius komponentus) yra ribotas, o cirkuliuojančių naviko ląstelių heterogeniškumo palaikymas yra sudėtingas. Nepaisant minėtų trūkumų, tyrimo išvados suteikia įrodymų, kad CTC pagrindu sukurti organoidų modeliai yra mažiau invazyvus, efektyvus ir greitas būdas atlikti vaistų jautrumo tyrimus, palyginus su tradicinėmis eksperimentinėmis platformomis, pavyzdžiui, su iš pacientų biopsijų sukurtais organoidų modeliais [147].

Taigi, šiuo metu tikimasi, jog cirkuliuojančių naviko ląstelių (CTC) pagrindu sukurtų organoidų modelių potencialas ateityje bus tinkamai išnaudotas personalizuotos medicinos srities tyrimų kontekste, ypač tobulinant individualių kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų gydymui taikytinų strategijų kūrimą, tačiau kol kas svarbu atsižvelgti ir į poreikį atlikti didesnės apimties atsitiktinių imčių tyrimus, siekiant patvirtinti šių modelių sistemų klinikinio pritaikymo pagrįstumą.

Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų reikšmė ikivėžinių ir ankstyvų kasos vėžio pažeidimų modeliavimo, diagnostikos ir gydymo kontekste

Ankstyvų kasos duktalinės adenokarcinomos molekulinį pokyčių nustatymas yra itin svarbus siekiant pagerinti ligos diagnostiką ir gydymo galimybes. Individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai suteikia mokslininkams naujų galimybių modeliuoti priešvėžinius ir ankstyvus neoplazinius pažeidimus, įskaitant kasos intraepitelines neoplazijas, kartu padeda identifikuoti kasos vėžio onkogenezės metu vykstančius patologinius procesus bei kurti inovatyvias ligos gydymo strategijas, nukreiptas į tikslingai pasirinktus terapinius taikinius.

Kaip svarbūs kasos duktalinės adenokarcinomos išsivystymą galintys nulemti ankstyvi neoplaziniai pažeidimai literatūroje nurodomi intraduktaliniai papiliariniai mucininiai navikai (IPMN), kurių molekulinį pokyčių tyrimas yra itin reikšmingas siekiant geriau suprasti ligos progresiją ir ankstyvos diagnostikos galimybes. Intraduktaliniai papiliariniai mucininiai navikai (IPMN) yra apibūdinami kaip piktybinį potencialą turinčios kasos cistos, susiformuojančios iš pagrindinių arba kolateralinių kasos latakų šakų (angl. main or collateral branch ducts) epitelio. Kasos latakų neoplaziniai pažeidimai gali progresuoti nuo žemo laipsnio IPMN iki aukšto laipsnio IPMN ir galiausiai išsivystyti iki kasos duktalinės adenokarcinomos, kuriai būdingi saviti molekuliniai ir histologiniai pokyčiai. Neseniai Bernard ir kt. atliktame tyrime (2019 m.), pasitelkus vienos ląstelės RNR sekoskaitą (angl. single-cell RNA sequencing) buvo išsiaiškinta, kad žemo laipsnio IPMN būdinga prouždegiminė stroma (angl. pro-inflammatory stroma), kurios kiekis mažėja, kuomet neoplazija progresuoja ir vystosi kasos duktalinės adenokarcinomos linkme. Mokslininkai pastebi, jog vis labiau didėjantis IPMN paplitimas skatina susimąstyti apie tai, kad reikalinga skirti dėmesio ankstyvų

molekulinių kasos duktalinės adenokarcinomos priežasčių išaiškinimui, siekiant pagerinti ligos prevencijos ir ankstyvos diagnostikos galimybes [148].

Agostini su kolegomis (2023 m.) nagrinėjo specifinių molekulinių mechanizmų, skatinančių IPMN progresavimą, poveikį. Šiame tyrime, pasitelkus erdvinę transkriptomiką (angl. spatial transcriptomics), buvo išanalizuoti 43 intraduktaliniai papiliariniai mucininiai navikai (angl. intraductal papillary mucinous neoplasms, IPMN) ir pastebėta, kad ligai progresuojant nuo žemo iki aukšto laipsnio IPMN, yra suaktyvinamas mucino O-glikozilinimo kelias (angl. mucin O-glycosylation pathway). GCNT3, pagrindinis mucino ekspresijos reguliatorius, Agostini ir kt. tyrime identifikuotas kaip galimas terapinis taikiny, galintis pasitarnauti projektuojant kasos duktalinės adenokarcinomos gydymą [149].

Atkreiptinas dėmesys, kad nenormali mucinų ekspresija pastebima sergant daugeliu ligų, įskaitant solidinius navikus, kuriuose mucinai geba moduluoti imuninį atsaką. Taip pat yra manoma, kad per didelė GCNT3 ekspresija yra susijusi su padidėjusia mucino gamyba, prastesniais onkologinių pacientų išgyvenimo rezultatais ir atsparumu chemoterapijai, ypač sergant storosios žarnos ir kiaušidžių vėžiu [150]. Sergant vėžiu, nenormalus mucino glikozilinimas (angl. abnormal mucin glycosylation) skatina proliferacinius signalus (angl. proliferative signaling) ir taip padeda naviko ląstelėms išvengti imuninės sistemos poveikio, o tai lemia T ląstelių, kurios nukreiptos veikti vėžiui specifinius glikozilinimo procesus (angl. cancer-specific glycosylation patterns), apoptozę. Mokslininkai nustatė, kad talniflumas, maža terapinė molekulė ir kartu padidėjusios mucino produkcijos inhibitorius (angl. small-molecule inhibitor of mucin overproduction), gali užblokuoti GCNT3 aktyvumą, sumažinti mucino ekspresiją ir slopinti kasos intraepitelinės neoplazijos (PanIN) bei kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių dauginimąsi. Agostini ir kolegų tyrime talniflumato poveikis imuninės sistemos slopinimui buvo patikrintas pasitelkus organoidinius kasos duktalinės adenokarcinomos modelius. Pelės ir žmogaus 3D kasos duktalinės adenokarcinomos modelių analizės rezultatai parodė, kad talniflumas sumažino mucino sekreciją, taip pagerindamas T ląstelių funkciją ir stimuliuodamas imuninį atsaką. Ištyrus ortotopinį singeninį pelės modelį (angl. orthotopic syngeneic mouse model), kuriam buvo būdingas mažas imunogeniškumas, pastebėta, jog talniflumas padidino gemcitabino/nab-paklitakselio chemoterapijos derinio veiksmingumą, žymiai sumažindamas naviko augimą ir pagerindamas bendro išgyvenamumo rodiklį (angl. overall survival). Tyrėjų atlikta imunofluorescencinė analizė taip pat parodė padidėjusią T ląstelių infiltraciją į navikinius audinius po taikyto gydymo talniflumatu. Taigi, galima daryti prielaidą, jog nukreipus gydymą talniflumatu į specifinį mucinui O-glikozilinimą, ypač slopinant GCNT3, pavyktų sustiprinti imuninį atsaką ir pagerinti chemoterapijos veiksmingumą kasos duktalinės adenokarcinomos atveju. Visgi norint patvirtinti talniflumato poveikį ir įvertinti šio terapinio agento klinikinį pritaikomumą, būtina atlikti tolesnius atsitiktinių imčių klinikinius tyrimus [149].

Ankstyvųjų su kancerogeneze siejamų pažeidimų įtaka kasos duktalinės adenokarcinomos navikų išsivystymui taip pat akcentuojama Boj ir kt. tyrimo (2015 m.) aprašyme. Siekdami kuo tiksliau atspindėti kasos intraepitelinės neoplazijos (PanIN) ir kasos duktalinės adenokarcinomos (PDA) progresavimo mechanizmus, kaip eksperimentinius modelius mokslininkai pasitelkė pelės ir žmogaus kasos duktalinių ląstelių organoidus. Pastebėta, jog organoiduose, išaugintuose iš pelių kasos duktalinių ląstelių, kurioms buvo būdinga $Kras^{+/LSL-G12D}$; Pdx1-Cre ("KC") aktyvacija, fiksuoti padidėję $Kras$ -GTP kiekiai ir kasos intraepitelinei neoplazijai būdingų žymenų (Muc5ac, Muc6, Tff1) ekspresija. Atlikus ortotopinę pelių

intraepitelinės kasos neoplazijos organoidų transplantaciją genetiškai panašioms pelėms (angl. syngeneic mice), buvo išsiaiškinta, kad persodinti organoidai pelių organizmuose sukėlė nekintamus displastinius pažeidimus, susijusius su padidėjusia ląstelių proliferacija ir stromos atsaku, t. y. pokyčius, būdingus pelių kasos intraepitelinėms neoplazijoms (mPanIN). Be to, pažymėtina, kad kasos navikų organoidų, išaugintų pasitelkus $Kras^{+/LSL-G12D}$; $Trp53^{+/LSL-R172H}$; $Pdx1-Cre$ ("KPC") peles, persodinimas į genetiškai panašių pelių organizmus juose paskatino invazinių ir metastazinių kasos duktalinės adenokarcinomos pažeidimų išsivystymą, išlaikant būdingus $Kras^{G12D}$ mutacijos nulemtus vėžinių kasos ląstelių genų ir baltymų raiškos pokyčius. Boj ir kt. tyrimo metu atliktų RNR sekoskaitos ir proteomikos analizių duomenys parodė padidėjusią genų ir baltymų, susijusių su glutationo metabolizmo suaktyvėjimu, ekspresiją, taip pat nukleoporinų (pvz., NUP153, NUP88) ir anabolinių signalizavimo kelių raiškos padidėjimą progresuojančios kasos duktalinės adenokarcinomos fone. Svarbu paminėti, jog ištyrę žmogaus navikų organoidus, sukurtus pagal gautą medžiagą iš pacientų kasos audinių ir plonos adatos biopsijų mėginių, mokslininkai pastebėjo, kad šiuose organoidų modeliuose pasireiškė intraepitelinių neoplazinių pažeidimų progresija į kasos duktalinės adenokarcinomos navikus (angl. PanIN to PDA progression), be to, identifikuotos bene svarbiausios su kasos duktalinės adenokarcinomos išsivystymu siejamos mutacijos - KRAS, TP53, SMAD4 ir CDKN2A. Pažymėtina, kad žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai in vivo sąlygomis taip pat sukėlė į kasos intraepitelinę neoplaziją panašius pažeidimus, kurie išvystė gebėjimą progresuoti į kasos duktalinę adenokarcinomą, formuoti kolageno turtingą naviko aplinką, skatinti stromos atsakus, o kartu pasižymėjo ir tokiomis kasos duktalinės adenokarcinomos navikams būdingomis savybėmis, kaip ląstelių aneuploidija ir padidėjusi kasos vėžio žymens CA19-9 koncentracija. Taigi, Boj ir kt. tyrimo duomenys leidžia daryti išvadą, kad organoidų modeliai mokslininkams padeda geriau suprasti kasos navikų biologines savybes bei tiksliai imituoti kasos duktalinės adenokarcinomos vystymosi etapus, todėl visa tai įrodo šių eksperimentinių modelių svarbą personalizuotos onkologijos srityje, vykdant naujų, ankstyvų kasos vėžio terapinių taikinių paieškas [37].

Kaip žinoma, ankstyvi kasos ląstelių pažeidimai ir jose vykstantys ikinavikiniai pokyčiai skatina kasos duktalinės adenokarcinomos navikų vystymąsi, tačiau mokslininkai ieško terapinių išeičių, galinčių slopinti su šiais veiksniais siejamą kasos vėžio progresavimą. Neseniai buvo identifikuotas svarbus kasos duktalinės adenokarcinomos navikų slopiklis – SIRT5 (sirtuinų šeimos baltymas), kurio ekspresija, kaip parodė Hu ir kt. atlikto tyrimo (2021 m.) rezultatai, kasos navikuose yra reikšmingai sumažėjusi, o tai koreliuoja su ligos progresavimu, naviko recidyvu bei prastomis pacientų išgyvenamumo prognozėmis. Pasitelkę genetiškai modifikuotus pelių modelius su kasos audiniui specifine SIRT5 geno delecija (angl. pancreas-specific SIRT5) ir onkogeninėmis KRAS mutacijomis, tyrėjai nustatė, kad SIRT5 ekspresijos praradimas skatina acinarinio kasos audinio metaplazavimą į duktalinį fenotipą (angl. acinar-to-ductal metaplasia), taip pat kasos intraepitelinių neoplazijų (angl. pancreatic intraepithelial neoplasias, PanINs) susiformavimą (angl. pancreatic intraepithelial neoplasias, PanINs) ir kasos duktalinės adenokarcinomos progresavimą. Taip pat pastebėta, kad SIRT5 sutrikdo nekanoninį glutamino metabolizmo kelią (angl. noncanonical glutamine metabolic pathway), deacilindamas GOT1 ties aminorūgštimi lizinu 369, todėl sumažėja GOT1 fermento aktyvumas, slopinamas glutamino/glutationo metabolizmas ir kartu naviko ląstelių proliferacija. Taigi, priešingu atveju, SIRT5 raiškos praradimas kasos duktalinės adenokarcinomos navikų ląstelėse skatina padidėjusį glutamino pasisavinimą ir glutationo metabolizmą, stiprina redokso pusiausvyrą (angl. redox balance) ir suaktyvina navikinių

ląstelių proliferaciją net esant ribotiems energiją teikiančių medžiagų ištekliais (angl. under nutrient-limited conditions) ląstelėse. Tirdami SIRT5 baltymo funkcinę reikšmę kasos duktalinės adenokarcinomos navikų patofiziologijos kontekste, Hu ir kt. taip pat pasitelkė pacientų navikų organoidų modelius: paaiškėjo, kad sumažinus SIRT5 raišką, suaktyvėjo kasos navikų organoidų augimas. Be to, įdomu tai, kad tyrėjų sukurtas naujas mažos molekulės SIRT5 aktyvatorius (angl. small-molecule SIRT5 activator) – MC3138 – imitavo SIRT5 poveikį, slopindamas GOT1 aktyvumą, naviko ląstelių proliferaciją, mažindamas prieinamas nukleotidų atsargas (angl. nucleotide pools), kartu padidindamas kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijų, pacientų organoidų ir ksenograftų modelių jautrumą gemcitabino poveikiui. Taip pat pastebėta, kad MC3138 ir gemcitabino kombinacija sinergiškai slopino navikų augimą organoidų ir ksenograftų modeliuose, todėl Hu ir kt. tyrimo išvadose chemoterapijos ir SIRT5 aktyvacijos derinys įvardijamas kaip perspektyvi terapinė strategija, taikytina kasos duktalinės adenokarcinomos navikų, pasižyminčių sumažėjusia SIRT5 raiška, gydymui [151].

Siekiant sukurti veiksmingas kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostikos ir gydymo strategijas, svarbu išsiaiškinti, kokie veiksniai prisideda prie ankstyvų kasos vėžio pažeidimų vystymosi. Pavyzdžiui, Skrypek ir kt. tyrimo (2021 m.) metu buvo nagrinėjama stearyl-KoA desaturazės (SCD) – fermento, veikiančio ląstelės endoplazminiame tinkle ir atsakingo už sočiųjų riebalų rūgščių pavertimą nesočiosiomis, – reikšmė kasos duktalinės adenokarcinomos kancerogenezės kontekste. Fermento savybes mokslininkai tyrė pasitelkę $Pdx1^{Cre}; LSL-Kras^{G12D}$ pelių modelius, navikų organoidus ir žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių liniją PANC-1. Tyrimo metu iš EPCAM+ (epitelinų ląstelių adhezijos molekulės ekspresuojančių) naviko ląstelių išauginti organoidai išlaikė apikalinį-bazinį poliarumą, juose nustatyta tokių žymenų, kaip EPCAM, KRT19 ir PROM1, raiška – taip perteiktos ankstyvai PanIN (kasos intraepitelinės neoplazijos) stadijai būdingos savybės, pastebėtos in vivo. Šiuos organoidus paveikus SCD fermento inhibitoriumi (A939572), buvo stebima jų degeneracija, slopinamas augimas ir aktyvuojamas UPR (angl. unfolded protein response) atsakas, identifiкуotas nustačius padidėjusią su UPR atsaku susijusių žymenų – PERK, ATF4, CHOP ir sXBP1 – raišką. Taigi, Skrypek ir kt. pastebėjo, jog kasos navikų organoidų augimas buvo slopinamas dėl sumažėjusios nesočiųjų riebalų rūgščių sintezės ir sočiųjų riebalų rūgščių kaupimosi – visa tai paskatino UPR atsako aktyvaciją. Taip pat svarbu paminėti, kad terapinis agentas A939572 in vivo sąlygomis sukėlė selektyvią PanIN ląstelių apoptozę $Pdx1^{Cre}; LSL-Kras^{G12D}$ pelių kasos navikų modeliuose, tačiau acinarinės ir kasos salėlių ląstelės liko nepaveiktos. Žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos PANC-1 ląstelių linijose A939572 slopino ląstelių proliferaciją ir skatino UPR atsako aktyvaciją, tačiau nepakankamai, todėl nesukėlė ląstelių žūties. Skrypek ir kt. tyrimo rezultatai išryškina SCD įtaką ankstyvojo kasos duktalinės adenokarcinomos navikų augimui ir išlikimui, pabrėžiant šio fermento, kaip terapinio taikinio, potencialą kuriant strategijas, skirtas ankstyvų stadijų kasos duktalinės adenokarcinomos navikų gydymui [152].

Apibendrinus įžvalgas iš naujausių mokslinės literatūros straipsnių, galima įsitikinti, kad tokie veiksniai kaip nenormalus mucinų glikozilinimas, SIRT5 ekspresijos praradimas ir stearyl-KoA desaturazės aktyvumas prisideda prie ankstyvų ikivėžinių pažeidimų vystymosi bei turi įtakos kasos duktalinės adenokarcinomos progresavimui. Individualūs kasos navikų organoidų modeliai suteikia naujų galimybių modeliuoti priešvėžinius ir ankstyvus neoplazinius

pažeidimus, padedančius geriau suprasti ligos progresiją bei ieškoti inovatyvių ligos diagnostikos bei gydymo sprendimų.

Organoidų modelių panaudojimas kasos navikų biologinių savybių tyrimuose: galimybės, pranašumai ir trūkumai

Individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai, kaip efektyvus eksperimentinis įrankis, įgalina kasos navikų biologinių mechanizmų ir patologinių procesų tyrinėjimą.

Kaip pastebima Malinova ir kt. straipsnyje (2021 m.), kasos duktalinei adenokarcinomai būdingi tam tikri ląstelių kilmės integralumo sutrikimai (angl. cell lineage infidelity) ir fenotipo pakitimai, kaip manoma, sąlygojantys naviko progresiją ir atsparumą chemoterapijai. Literatūroje aprašomi du pagrindiniai kasos duktalinės adenokarcinomos molekuliniai potipiai: klasikinis/kasos pirmtakų potipis (angl. classic or pancreatic progenitor subtype), kuriam būdinga endoderminės kilmės specifinių transkripcijos faktorių raiška, ir agresyvesnis bazinis/skvamozinis potipis (angl. basal-like/squamous subtype), pasižymintis endoderminių genų epigenetiniu slopinimu bei chromatino modifikacijomis (angl. epigenetic downregulation of endodermal genes and chromatin modifications) [153]. Taigi, atsižvelgiant į kasos duktalinės adenokarcinomos histologinių ir genetinių savybių klinikinę reikšmę, bazinio potipio kasos navikai sietini su prasta ligos prognoze ir bazinių žymenų, tokių kaip citokeratinai, ekspresija, tuo tarpu klasikiniame kasos duktalinės adenokarcinomos potipiui labiau būdinga diferencijuotų kasos latakų ląstelių žymenų ekspresija bei sąsaja su geresne ligos prognoze. Mokslininkai pastebi, kad kasos duktalinės adenokarcinomos klasikinio potipio ląstelės yra nepakankamai reprezentuojamos tradiciniuose kasos navikų ląstelių kultūrų modeliuose, todėl tai tampa iššikiu, norint tiksliai tirti ir gydyti ligą [43]. Siekiant identifikuoti svarbius kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipinius požymius, greta įprastų ląstelių kultūrų modelių, tyrimams vis dažniau pasitelkiami dar tiksliau nei tradiciniai dvimačių kultūrų modeliai kasos navikų savybes atkartojantys pacientų navikų organoidai – trimatės tiriamosios platformos, sukurtos iš pirminių ląstelių, indukuotų pliuripotentinių kamieninių ląstelių (iPSL) arba navikų rezektatų [153, 43]. Šios 3D tiriamosios sistemos leidžia mokslininkams detaliai nagrinėti onkogeninių mutacijų (pvz., KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4) įtaką kasos duktalinės adenokarcinomos patofiziologiniams procesams. Svarbu priminti, jog ypač aktualios kasos duktalinės adenokarcinomos kontekste yra KRAS mutacijos, kurios, kaip įrodė atlikti stebėjimai acinarinių organoidų modeliuose, slopina acinarinius genus (angl. acinar-specific genes), tokius kaip PTF1A, ir skatina kasos latakų žymenų, pvz., SOX9, raišką. Be to, priklausomai nuo ląstelių tipo, skirtingos mutacijos atitinkamai veikia naviko vystymąsi: pavyzdžiui, KRAS mutacijos acinarinėse ląstelėse skatina vėžinių pažeidimų atsiradimą, o GNAS mutacijos latakinėse ląstelėse sukelia cistinių struktūrų formavimąsi [153].

Vienas pagrindinių literatūroje įvardijamų organoidų modelių pranašumų yra sąlyginai greitas jų sukūrimo procesas, kuriam reikalingas minimalus žaliavinio audinio kiekis, todėl šie modeliai pasitarnauja kaip patogi platforma vaistų testavimui ir atitinkamų biomarkerių, susijusių su ligos diagnoze, identifikavimui. Be to, organoidų modeliai yra įgalinti atkartoti skirtingas ligos stadijas ir prognozuoti klinikinius ligos scenarijus, o tai mokslininkams leidžia geriau įsigilinti į ligos, šiuo atveju, kasos duktalinės adenokarcinomos, patofiziologiją. Tradiciškai didžioji dauguma kasos vėžio genotranskriptominių (angl. genotranscriptomic)

tyrimų buvo sutelkti į chirurginių mėginių analizes. Visgi, svarbu prisiminti, jog įprastai tik maždaug 20% kasos vėžiu sergančių pacientų yra galima atlikti chirurginę rezekciją, o likusieji 80 % serga pažengusia liga ir turi prastą ligos prognozę. Taigi, pacientams, kuriems dėl tam tikrų priežasčių negalima atlikti chirurginės kasos rezekcijos, į pagalbą pasitelktini organoidai, galintys padėti įvertinti kasos naviko biologiją individualiu konkreto paciento, sergančio kasos duktaline adenokarcinoma, atveju [154].

Malinova ir kt. (2021 m.) straipsnyje paminimas dar vienas svarbus organoidų privalumas – tai galimybė modeliuoti naviko mikroaplinką (TME), atspindint stromos ir imuninių ląstelių sąveiką. Pavyzdžiui, bendroje kultūroje kultivuojant kasos duktalinės adenokarcinomos organoidus ir kasos žvaigždines ląsteles, yra skatinamas naviko stromos susiformavimas, o aktyvuotos kasos žvaigždinės ląstelės geba diferencijuotis į skirtingus su vėžiu susijusių fibroblastų (CAFs) potipius. Su vėžiu susiję fibroblastai toliau skatina naviko vystymąsi ir perėjimą į labiau agresyvią, mezenchiminę, būseną. Straipsnio autoriai taip pat pristato pavyzdį, įrodantį organoidų modeliuose pastebėtą kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių priklausomybę nuo nišinių veiksnių, tokių kaip Wnt ligandai, o kartu ir galimybes modifikuoti šiuos ryšius genetiškai (pvz., slopinant GATA6 transkripcijos faktorių). Be to, organoidų modeliai tinka individualiems pacientų terapiniams atsakams tirti: žinodami apie tai, kad padidėjusi MYC geno raiška, ypač kartu su chromatiną modifikuojančių genų, pvz., ARID1A, mutacijomis skatina plokščialąsteliniam kasos vėžiui būdingas savybes, lemiančias kasos duktalinės adenokarcinomos progresavimą, mokslininkai gali numatyti su šiomis ypatybėmis susijusį atsparumą tam tikriems vaistams. Malinova ir kt. straipsnyje taip pat atkreipiamas dėmesys, kad nepaisant pažangos kuriant naujus kasos duktalinės adenokarcinomos trimačius tiriamuosius modelius, praktikoje išlieka tam tikrų apribojimų, tarp kurių paminėtinas kintamas organoidinių kultūrų išvedimo sėkmės rodiklis (angl. culture derivation success rate), molekulinis nuokrypis link klasikinių fenotipų (angl. molecular drift towards classical phenotypes) ir nepilnas pirminio naviko sudėtingumo atkūrimas, pavyzdžiui, neįtraukiant autologinių stromos komponentų. Visgi straipsnio autoriai pastebi, kad naujausi patobulinimai kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų srityje, eksperimentinių platformų kūrimui pasitelkiant sintetinius hidrogelius ir optimizuotas kultūrų terpes (angl. optimized culture media), gali padėti įveikti dalį esamų iššūkių, taip padidinant organoidų modelių klinikinį pritaikomumą [153].

Deja, kai kurie naujausi tyrimai rodo, kad organoidai gali įgyti kultivuojamai kultūrai būdingus transkriptominius profilius, kurie savo bruožais skiriasi nuo pradinio naviko, ir šie skirtumai gali turėti įtakos organoidų platformoje testuojamų vaistų atsakams [155]. Mokslininkai svarsto, kad net organoidų auginimo sąlygų standartizavimo gali nepakakti tiksliai atsakų į laboratorijose testuojamus vaistus vertinimui, todėl atliekant tyrimus su organoidų modeliais, didelę reikšmę įgyja individualizuotas požiūris, taikomas kiekvienu konkreto paciento atveju. Be to, atkreiptinas dėmesys, jog kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelės pasižymi plastiškumu, pavyzdžiui, reaguojant į chemoterapijos poveikį šiose ląstelėse gali įvykti transkripcijos potipių pasikeitimų (angl. transcriptional subtype switches), tad visa tai apsunkina gydymo veiksmingumo prognozes [30, 127].

Visgi nepaisant tam tikrų su 3D tiriamosiomis platformomis siejamų trūkumų, pavyzdžiui, sudėtingesnių jų kūrimo sąlygų, akcentuotina šių trimačių eksperimentinių sistemų, tarp jų ir kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų, pritaikymo reikšmė pastaruoju metu vykdomų onkologinių tyrimų kontekste. Tikimasi, kad individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos

organoidai ilgainiui taps patikimos kasos vėžio vystymosi modeliavimo in vitro platformos pavyzdžiu ir tuo remdamiesi mokslininkai galės tiksliau vertinti terapinių agentų poveikius, išryškindami trimačių modelių pranašumus prieš anksčiau tyrimuose standartiškai naudotus 2D ląstelių kultūrų modelius.

3D modelių privalumai, vertinant pasirinktų vaistų terapinius efektus, atspindi Kumarasamy ir kolegų atlikto tyrimo (2024 m.) rezultatuose. Mokslininkai testavo MRTX1133, KRASG12D inhibitoriaus, terapinį potencialą sukurtuose kasos duktalinės adenokarcinomos modeliuose. Kaip pastebėjo tyrėjai, MRTX1133 efektas slopinant ląstelių proliferaciją ir tolimesnę genų ekspresiją (angl. downstream gene expression) buvo nepastovus 2D kultūrose, tačiau šis terapinis agentas buvo žymiai efektyvesnis 3D kultūrose ir in vivo. Taip pat CRISPR-Cas9 atrankos (angl. CRISPR-Cas9 screening) metodu buvo nustatyta, kad ITGB1 (angl. integrin subunit beta 1) baltymas galėtų būti laikomas terapiniu taikiniu, sustiprinančiu atsaką į MRTX1133. ITGB1 yra svarbus baltymas, dalyvaujantis mechanotransdukcijos ir YAP/TAZ signalizavimo procesuose, todėl jo slopinimas galėtų sukelti ryšių tarp vėžinių ląstelių ir ekstraląstelinės matricos sutrikdymą, taip pat pabloginti vėžio ląstelių augimą, išlikimą ir atsparumo vaistams vystymąsi, o kartu pagerinti jautrumą MRTX1133 preparatui. Tyrimo metu buvo išsiaiškinta, kad ITGB1 geno raiškos slopinimas pagerino MRTX1133 vaisto veiksmingumą, ypač 3D sferoidų modeliuose. In vivo sąlygomis MRTX1133 sukėlė naviko regresiją imunokompetentiškuose modeliuose (turinčiuose funkcionuojančią imuninę sistemą), tačiau nesumažino naviko masės imunodeficitiniuose šeimininkuose, todėl galima daryti prielaidą, kad imuninė sistema yra susijusi su MRTX1133 poveikio mechanizmu ir gali sustiprinti vaisto efektą. Kumarasamy ir kolegų tirtas terapinis agentas (MRTX1133) taip pat suaktyvino interferono- γ signalizavimą (susijusį su imuninės sistemos aktyvinimu), sustiprino antigenų pateikimą imuninėms ląstelėms ir skatino efektorinių CD8⁺ T ląstelių infiltraciją į naviką, be to, sumažino neutrofilų populiacijas ir remodeliavo naviko mikroaplinką. Mokslininkai nustatė ir atsparumo veiksnius, tokius kaip MTOR ir EGFR signalizavimo keliai, kuriuos nuslopinus būtų galima padidinti MRTX1133 veiksmingumą. Nors ikiklinikiniuose modeliuose šis terapinis agentas pasiteisino veiksmingumu, kasos duktalinės adenokarcinomos pasikartojimas nutraukus gydymą išryškina kombinacinių strategijų, įskaitant imunoterapiją, poreikį. Kumarasamy ir kt. tyrimo atradimai rodo, kad MRTX1133 yra perspektyvus KRASG12D mutotos kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui skirtas vaistas, o 3D kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamieji modeliai suteikia pranašumų tiriant terapinių agentų poveikio efektyvumą, tiksliau nei 2D modeliai atspindėdami tam tikras naviko atsako į gydymą ypatybes, kaip antai, vėžinių ir naviko mikroaplinkos ląstelių sąveikas [156].

Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių galimybes prognozuoti terapinius atsakus į kliniškai taikomus kasos vėžio gydymo metodus siekė ištirti Frappart ir kt. (2020 m.). Tyrimo metu išsiaiškinta, kad pacientų organoidų modeliai geba tiksliai atkartoti pagrindines pacientų kilmės ksenograftų savybes, įskaitant morfologiją, baltymų raiškos profilius ir genomines ypatybes. Mokslininkams atlikus imunohistochemines ir molekulinės kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų analizes taip pat buvo patvirtintas organoidų gebėjimas atkartoti ksenograftinių modelių ypatybes: palyginus abi tiriamąsias platformas, nustatytas didesnis nei 99,5 % proteominis panašumas bei panašios chromosomų pertvarkos, nors buvo pastebėta ir nedidelių, konkrečių pacientų navikams būdingų variacijų.

Svarbu paminėti, jog Frappart ir kt. tyrimo metu pacientų organoidų modeliuose išryškėjo pastebimi skirtumai tarp epitelinio ir mezenchiminio tipo kasos duktalinės adenokarcinomos

navikų, kuriuos tyrėjai atpažino pasiremami organoiduose nustatytais CDH1 teigiamu ir VIM neigiamu žymenimis. Be to, kasos duktalinės adenokarcinomos organoidams buvo būdingi specifiniai augimo modeliai, palyginus su pacientų ksenograftų modeliais, skyrėsi organoidų transkripcijos reguliacija, pavyzdžiui, susieta su didesne CDX2 baltymo ekspresija, t. y. nustatyta daugiau CDX2 teigiamų ląstelių organoiduose nei ksenograftuose. Mokslininkų sukurta nauja farmakotipavimo platforma pademonstravo kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių tinkamumą vaistų testavimui. Per 21 dieną tyrėjams pavyko sukurti pakankamą tyrimui kiekį pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ląstelių kultūrų, kurios buvo pasitelktos nedidelės apimties vaistų testavimo bandymams (angl. small-scale drug testing screen), pritaikant dviejų metrikų sistemą: ląstelių mirtingumo santykio ($CDR > 1,30$) ir ploto po kreive analizę ($AUC < 1,64$), siekiant prognozuoti gydymo veiksmingumą. Pavyzdžiui, PDO163 rodė jautrumą gemcitabinui (GEM) ir irinotekanui (IRI), tačiau buvo atsparus paklitakseliui (PAC), tuo tarpu PDO185 pasižymėjo platesniu jautrumu visiems testuotiems vaistams, ypač stipriu atsaku į PAC ($CDR 3,0-11,0$). Šios prognozės, suformuluotos remiantis in vitro sąlygomis, pacientų organoiduose stebėtais terapiniais atsakais, buvo patvirtintos in vivo ksenograftų modeliuose, o tai savo ruožtu įrodė organoidų, kaip tiriamosios platformos, tikslumą bei potencialą individualizuoto kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo kontekste. Ksenograftų modelių kultivavimas užtruko apie 40 dienų iki kol jie buvo tinkami terapinių atsakų vertinimui, todėl tyrėjai atkreipė dėmesį į su šių modelių kūrimu susijusias laiko sąnaudas, taip išryškindami organoidų pranašumą – galimybę greičiau (per 14-21 d.) panaudoti pacientų organoidų modelius vaistų testavimo tyrimams. Mokslininkai taip pat atsižvelgė ir į galimus su organoidų modelių praktiniu pritaikymu susijusius iššūkius, tokius, kaip antai, subklonų atranka organoidų ląstelių kultūrose ir kultūrų kultivavimo sąlygų kintamumas, bei konstatavo, kad ląstelių augimo terpės sudėtis ir kartotiniai bandymai suteikia galimybę užtikrinti rezultatų nuoseklumą. Tyrėjai įrodė organoidų modelių patikimumą, patvirtindami šios tiriamosios platformos prognostinę vertę klinikinėje situacijoje: pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai, kurie tyrimo metu buvo išauginti iš kasos duktalinės adenokarcinoma sirgusio paciento kepenų metastazės biopsijos, tiksliai prognozavo atsparumą FOLFIRINOX gydymo režimui ir jautrumą chemoterapijai gemcitabino/nab-paklitakselio deriniu, tad vėliau pacientui pritaikius kombinuotą gydymą gemcitabinu/nab-paklitakseliu buvo pastebėtas naviko sumažėjimas. Apibendrinant Frappart ir kt. tyrimo metu atliktų stebėjimų išvadas, kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius galima apibūdinti kaip greitą, ekonomišką ir tikslų rezultatų užtikrinančią tradicinių pacientų kilmės ksenograftų modelių alternatyvą, pasitelktiną kaip perspektyvų tiriamąjį įrankį, padėsiantį kurti individualizuotas kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo strategijas [157].

Be to, pažymėtina, jog pačius organoidų modelius galima veiksmingai pritaikyti kaip ksenograftus. Persodinus organoidus į imunodeficitinių pelių organizmus, jie generuoja kasos intraepitelines neoplazijas, galinčias progresuoti iki kasos invazinės adenokarcinomos ir ksenografto modelyje formuoti metastazes. Todėl paraleliškai tyrimuose taikomi naviko organoidų ir ksenograftų modeliai yra vertingos tiriamosios priemonės, pavyzdžiui, sekant vėžio progresavimą bei stengiantis atrasti naujus biologinius žymenis ankstyvosiose kasos duktalinės adenokarcinomos stadijose [154].

Pacientų kilmės ksenograftų ir iš ksenograftų sukurtų organoidų modelių pritaikymo klinikinėje praktikoje galimybės buvo nagrinėjamos Pham ir kt. (2021 m.) tyrime:

mokslininkai siekė įrodyti, kad šios eksperimentinės platformos yra svarbūs įrankiai, kuriuos pasitelkus galima atkurti genetines ir fenotipines kasos, dvylikapirštės žarnos ir tulžies lataų navikų savybes. Iš 276 Whipple operacijos metu paaimtų pacientų mėginių pradinis ląstelių įskiepijimo (P0) rodiklis (angl. initial engraftment (P0) rate) imunodeficitinėse pelėse siekė 59 % (118/199), kai buvo persodintos kasos vėžio ląstelės, atitinkamai 86 % (25/29), kuomet įskiepytos dvylikapirštės žarnos navikų ląstelės ir 35 % (17/48) tulžies lataų vėžio ląstelės. Verta atkreipti dėmesį, jog didžiausias sėkmingai sukurtų pacientų kilmės ksenograftų modelių rodiklis buvo pasiektas šių modelių kūrimui pasitelkus kasos duktalinės adenokarcinomos ląsteles: ksenograftuose prigijo 62 % (105/169) kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių. Be to, iš 71 % (10/14) kasos duktalinės adenokarcinomos ksenograftų sėkmingai buvo sukurti ksenograftų kilmės organoidų modeliai, kurie išsaugojo histologinį tapatumą su pirminiais navikais. Tyrėjų atlikta pacientų kilmės ksenograftų modelių molekulinė analizė atskleidė, kad 95 % (73/77) kasos duktalinės adenokarcinomos ksenograftų modelių turėjo KRAS mutacijas, o likę 5 % (4/77) buvo laukinio tipo (angl. wild-type), susieti su nustatytais alternatyviais onkogeniniais pokyčiais, įskaitant BRAF delecijas (N486_P490del, V600E) ir EGFR mutacijas (L747-P753del). Pham ir kt. pateikė pavyzdį, iliustruojantį, jog pacientų ksenograftų kilmės organoidų modeliai gali padėti priimti tikslingus klinikinius sprendimus: organoido modelyje (OCIP256), kuriame nustatyta BRAF *in-frame* delecija, buvo užfiksuotas padidėjęs MAPK signalizavimo kelio aktyvumas, todėl atsižvelgdami į šiuos veiksnys, mokslininkai pritaikė gydymą trametinibu (MEK inhibitoriumi) ir LY3009120 (pan-RAF inhibitoriumi). Paciento kilmės ksenografto ir pagal šį ksenograftą sukurtame organoido modelyje (OCIP256) taikytas kombinuotas gydymas trametinibu (MEK inhibitoriumi) ir LY3009120 (pan-RAF inhibitoriumi) lėmė visišką fosfo-ERK (biocheminio MAPK signalizavimo kelio žymens) aktyvumo ir naviko augimo slopinimą. Taigi, MAPK signalizavimo kelią mokslininkai įvardijo kaip kartinį naviko proliferaciją skatinantį veiksnį ir svarbų terapinį taikinį, nepriklausomą nuo naviko KRAS-mutacinio statuso, nes trametinibo jautrumas buvo pastebėtas tiek KRAS mutuojuose, tiek laukinio tipo kasos duktalinės adenokarcinomos eksperimentiniuose modeliuose. Mokslininkai taip pat išsiaiškino, kad kasos navikų ląstelių prigijimo imunodeficitinių pelių organizmuose sėkmė, lemianti pacientų kilmės ksenograftų modelių suformavimą, koreliavo su prastesne pacientų išgyvenamumo trukme, tačiau nebuvo susijusi su ligos recidyvų dažniu, o navikų augimo latentiskumas mažėjo su kiekvienu ksenotransplantato ląstelių persėjimo ciklu (angl. serial passaging). Paminėtina, jog pacientų kilmės kasos duktalinės adenokarcinomos ksenograftų modeliai išlaikė aukštą genetinį tapatumą, palyginus su pirminiais pacientų navikais: 76 % atvejų, paciento naviko mutacijų buvo rasta atitinkamame paciento kasos duktalinės adenokarcinomos ksenografto modelyje. Vis dėlto tyrimo metu fiksuota ir tam tikrų genetinių profilių neatitikimų tarp pirminių pacientų navikų ir atitinkamų pacientų kilmės ksenograftų modelių: tikėtina, kad šie netikslumai atsirado dėl tyrimo procedūrų šališkumo, sietino su techniniais ksenograftų kūrimo proceso veiksniais (sukurtų tiriamųjų modelių vėžio ląstelių ir nenavikinių komponentų proporcijomis, neatitinkančiomis pacientų pirminių navikų ląstelių santykinio pasiskirstymo; skirtingais metodais, pasitelktais pacientų navikų ir ksenograftų modelių DNR sekoskaitai).

Apibendrinant Pham ir kt. pastebėjimus, svarbu akcentuoti, kad tyrimo metu atliktos vaistų jautrumo analizės ksenograftų kilmės organoidų modeliuose parodė, jog gemcitabino ir trametinibo poveikiai buvo panašūs tiek KRAS mutantiniuose, tiek laukinio tipo kasos duktalinės adenokarcinomos modeliuose, tačiau kaip pagrindinis naviko proliferaciją skatinantis veiksnys, o kartu ir potencialus terapinis taikiny, nepaisant naviko KRAS-

mutacinio statuso, buvo įvardintas MAPK signalizavimo kelias. Remiantis tyrimo duomenimis, galima teigti, kad pacientų kilmės ksenograftų ir pagal šiuos ksenograftus sukurtų organoidų modelių pritaikymas ikiklinikiniuose eksperimentuose suteikia progą gilinti supratimą apie navikų genetinę įvairovę, pasitelkti šiuos tiriamuosius įrankius terapinių taikinių nustatymui ir naujų vaistų bei jų derinių testavimui [158].

Tam tikrais atvejais kitos kasos vėžio tyrimuose pasitelkiamos platformos yra pranašesnės už organoidų modelius, pavyzdžiui, metastazių susiformavimui tirti labiau tinka ksenograftų modeliai, tačiau organoidai yra svarbūs patvirtinant ksenograftuose stebimus eksperimentų rezultatus, pavyzdžiui, navikinių ląstelių atsakus į taikomą gydymą. Ksenograftų modeliuose pacientų navikų ląstelės yra implantuojamos į in vivo tiriamąsias sistemas (įprastai į imunodeficitinių pelių organizmus), todėl šiose eksperimentinėse platformose yra atkartojamos sąveikos tarp vėžinių ląstelių, šeimininko kraujagyslių, imuninės sistemos ir naviko ekstraląstelinės matricos komponentų – esminių veiksnių, reikalingų vėžio metastazavimui. Dimitrov-Markov ir kt. atliko tyrimą (2020 m.), kurio metu buvo sukurtos septynios didelių polinkiu metastazuoti pasižyminčios žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos eksperimentinės sistemos - pacientų navikų kilmės ksenograftiniai pelių modeliai. Tyrėjai ksenograftų modelių kūrimui pasitelkė NOD/SCID/IL2g peles, kuriose unikaliu būdu buvo palaikomas kasos duktalinės adenokarcinomos metastazių formavimasis plaučiuose, kepenyse ir smegenyse. Išanalizavę tiriamuosius modelius, mokslininkai nustatė, kad stebėtas vidutinis pelių išgyvenamumas siekė 57,6 dienos, metastazės buvo aptiktos praėjus dviem savaitėms po navikinių audinių implantacijos (iš kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų į NOD/SCID/IL2g peles) bei progresavo eksponentiškai. Taip pat atkreiptinas dėmesys, kad cirkuliuojančios naviko ląstelės (CTC), kurias tyrėjai išskyrė iš pelių kraujo, atpažindami jas pagal žmogaus HLA žymenis, buvo itin navikogeninės ir išlaikė gebėjimą formuoti metastazinius navikinius pažeidimus antriniuose šeimininkuose, t. y. pelėse. Remdamiesi vienos ląstelės RNR sekoskaitos (angl. single-cell RNA sequencing) analizės duomenimis, mokslininkai išskyrė pirminių navikų, CTC ir kepenų metastazių ląstelių klasterius: CTC ląstelių grupę, kurioje pastebėta sumažėjusi ląstelės ciklo, ekstraląstelinės matricos ir su adhezija susijusių genų raiška, tačiau suaktyvėję oksidacinio fosforilinimo keliai. Tyrėjai nustatė, kad survivinas, mitozės ir apoptozės reguliatorius, buvo dažniausiai pasitaikęs padidėjusia raiška pasižymintis genas CTC ląstelėse ir kasos duktalinės adenokarcinomos navikų metastazėse. Pastebėta, kad survivino slopinimas YM155 preparatu arba geno nutildymas (angl. knockdown) skatino anoikio – programuotos ląstelių žūties, sąlygotos prarasto gebėjimo prisijungti prie ekstraląstelinės matricos, – aktyvavimą ir sumažino navikinių ląstelių gyvybingumą. Taip pat paveikus pacientų ksenograftų modelius atskirai YM155 arba šį preparatą derinant su chemoterapija, buvo fiksuojamas metastazių vystymosi sutrikdymas, sietinas su pacientų išgyvenamumo rodiklio pagerėjimu. Svarbu pažymėti, kad YM155, tiek paskirtas atskirai, tiek derinyje su nab-paklitakseliu, pagerino išgyvenamumą ir visiškai sustabdė metastazių plitimą Panc265 modelyje, kuris reprezentavo smegenų mikrometastazių formavimąsi. Be to, tyrėjų atlikta genų rinkinių analizė patvirtino survivino svarbą, reguliuojant anoikį, o padidėjusi šio baltymo ekspresija buvo susijusi su ląstelių atsparumu atsiskyrimui nuo ekstraląstelinės matricos (angl. ECM detachment) ir jų gebėjimu išgyventi kraujotakoje bei metastazavimu. Dimitrov-Markov ir kt. tyrimo rezultatai, patvirtinti tokiose tiriamosiose platformose, kaip antai, dideliu polinkiu metastazuoti pasižyminčiuose pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos ksenograftiniuose pelių modeliuose (angl. highly metastatic PDAC patient-derived xenograft (PDX) mouse models), cirkuliuojančiose naviko

ląstelėse ir kasos vėžio organoiduose, įrodo survivino, kaip terapinio taikinio, pasitelkto kuriant kasos duktalinės adenokarcinomos metastazių gydymo strategijas, potencialią klinikinę vertę [159].

Nors tradiciškai kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose naudojamos eksperimentinės platformos, kaip antai, ląstelių kultūros, pelių ksenograftų modeliai ar individualūs pacientų organoidų modeliai, mokslininkams suteikia galimybę analizuoti tam tikrus dominančius procesus ir tiriamų objektų savybes, dažnai dalis šių eksperimentinių modelių taip pat pasižymi atitinkamais trūkumais, t. y. - ribotu gebėjimu atkartoti naviko mikroapliną, didelėmis laiko ar finansinėmis sąnaudomis. Atsižvelgdami į tai, jog šiuo metu tyrimuose dažniausiai pasitelkiami eksperimentiniai modeliai yra sąlyginai nepraktiški, mokslininkai toliau ieško patikimų alternatyvų esamoms tiriamosioms platformoms. Kaip pavyzdį galima paminėti Solanki ir kt. straipsnyje (2020 m.) pristatytą tiriamąją platformą – naviko eksplantų kultūras. Tyrimo rezultatai parodė, kad naviko eksplantai geba užtikrinti ilgalaikį audinių gyvybingumą kelias savaites: tuo mokslininkai pagrindė šių tiriamųjų platformų klinikinę svarbą kasos duktalinės adenokarcinomos terapiniame kontekste, vertinant individualias pacientų atsako į paskirtą gydymą prognozes. Iš pradžių tyrėjai lygino kasos navikų atsakus į paskirtus terapinius agentus in vivo ir ex vivo sąlygomis: buvo naudojami gemcitabinui jautrūs (PANC-1) ir atsparūs (AsPC-1, Capan-1) ksenograftų modeliai, siekiant išryškinti vaistų įsisavinimo ir atsako skirtumus, susijusius su gemcitabino transportavimui į ląsteles būtino receptoriaus hENT1 (angl. human equilibrative nucleoside transporter 1, hENT1) ekspresijos lygio kintamumu. Tyrimo metu naviko eksplantai iš trijų ksenograftų ląstelių linijų (AsPC-1, PANC-1 ir Capan-1) buvo paveikti vienkartinę gemcitabino dozę. Įvertinus gemcitabino poveikį po 48 val., eksplantų kultūrose užfiksuoti atsakai, panašūs į stebėtus in vivo – tą įrodė sumažėjusi ląstelių proliferacija ir padidėjusi apoptozė, remiantis aptiktų atitinkamų žymenų (Ki67 ir CC-3) ekspresijos dažniais. konkrečiau – AsPC-1 eksplante fiksuotas minimalus atsakas į gemcitabiną, PANC-1 eksplante - stiprus atsakas ir nepastovus (kintamas) atsakas į paskirtą vienkartinę gemcitabino dozę Capan-1 eksplante. Taip pat pastebėta, kad proliferacijos (Ki67), autofagijos (Beclin 1) ir apoptozės (CC-3) žymenys eksplantuose buvo aptinkami panašiu dažniu kaip ir in vivo tirtuose profiliuose. Be to, tyrimo autoriai pažymi, kad kasos naviko eksplantai išlaikė gyvybingumą iki penkių dienų. Šio Solanki ir kolegų tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad alternatyvūs eksplantų kultūrų modeliai gali padėti greitai įvertinti terapinį veiksmingumą pacientų mėginiuose per savaitę nuo biopsijos paėmimo. Paminėtinas dar vienas svarbus tyrimo aspektas - Atto680 fluoroforo pasirinkimas žymėti gemcitabinui; šis fluoroforas sumažino fono fluorescenciją ir leido konkrečiai vizualizuoti vaisto pasiskirstymą eksplantų ląstelių kultūrose. Kai kasos naviko eksplantų kultūrose buvo naudojamas fluorescenciniu būdu pažymėtas gemcitabinas (Gem-Atto), vaistų pasiskirstymo modeliai atitiko tuos, kurie buvo stebimi in vivo, ypač nekroziniuose navikų regionuose. Solanki ir kt. tyrimo išvados suteikia svarbių įžvalgų apie kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamųjų modelių alternatyvą – naviko eksplantų ląstelių kultūras: šis tiriamasis modelis įgalina greitą, fluorescenciniu būdu pažymėtų terapinių agentų patikrą ir padeda išaiškinti galimas kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumo chemoterapijai priežastis konkrečių pacientų atvejais, todėl tikimasi, kad naviko eksplantų modeliai artimiausiu metu bus plačiau pritaikomi klinikiniuose vėžio tyrimuose [160].

Siekiant išsiaiškinti, ar organoidų modeliai iš tiesų galėtų būti pranašesni už kitas kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose pasitelkiamas eksperimentines platformas, svarbu

palyginti atitinkamų modelių efektyvumą tarpusavyje. Vertingų įžvalgų apie kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių pritaikomumą pateikiama Hoare ir kolegų (2021 m.) straipsnyje, kuriame aptariamos trijų ikiklinikinių kasos duktalinės adenokarcinomos modelių – individualių pacientų ksenograftų (angl. patient-derived xenografts, PDX), iš ksenograftų išaugintų kasos organoidų (angl. xenograft-derived pancreatic organoids, XDPO) bei iš ksenograftų išgautų pirminių ląstelių kultūrų (angl. xenograft-derived primary cell cultures, XDPCC) – savybės. Tyrimo autoriai vertino pasirinktų tiriamųjų modelių transkriptominius profilius, jautrumo vaistams ir molekulinį signalizavimo kelių ypatybes, siekdami geriau išryškinti atitinkamos eksperimentinės platformos unikalius pranašumus bei atkreipti dėmesį į kartu taikomų tiriamųjų modelių papildomą efektyvumą. Kaip parodė Hoare ir kt. atlikto tyrimo rezultatai, individualūs pacientų ksenograftai (PDX) pasižymėjo didžiausiu heterogeniškumu (įvairialypumu), kadangi juose nustatyta tiek baziniam, tiek klasikiniam kasos duktalinės adenokarcinomos transkriptominiams fenotipams būdingų savybių, tuo tarpu iš ksenograftų išaugintuose kasos organoiduose (XDPO) stebėtas klasikinis kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipas, o iš ksenograftų išgautose pirminėse ląstelių kultūrose (XDPCC) fiksuotas daugiausia bazinis kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipas. Pagrindinių komponentų analizė (angl. principal component assay, PCA), atlikta panaudojus 634 pagrindinius bazinio ir klasikinio kasos duktalinės adenokarcinomos potipių transkriptominius žymenis (remiantis Nicolle ir kt. nustatytais žymenų standartais), patvirtino šių potipių pasiskirstymą tirtuose modeliuose. Taip pat atlikę transkriptominę analizę, pasinaudodami kasos duktalinės adenokarcinomos molekulinio gradientu (angl. PDAC molecular gradient, PAMG) mokslininkai atskleidė, kad individualūs pacientų ksenograftai (PDX) pasižymėjo didžiausia molekulinį žymenų variacija, o iš ksenograftų išauginti organoidai (XDPO) – didžiausiu molekulinio homogeniškumu (mažiausia molekulinį žymenų variacija). Tiriant pasirinktų modelių chemoterapinį jautrumą išsiaiškinta, kad visuose eksperimentiniuose modeliuose didžiausias atsakas fiksuotas pritaikius gydymą gemcitabinu, mažesnis terapinis efektas nustatytas atitinkamai gydant irinotekanu, 5-fluorouracilu ir oksaliplatina. Be to, nepriklausomos komponentų analizės (angl. independent component analysis, ICA) metu buvo nustatyti transkriptominiai komponentai, unikaliai susiję su atsaku į vaistą kiekviename modelyje. Analizės rezultatai parodė, kad iš ksenograftų išaugintų kasos organoidų (XDPO) molekuliniai keliai buvo susiję su jautrumu visiems tirtiems terapiniams agentams (gemcitabinui, irinotekanui, 5-fluorouracilui ir oksaliplatina), o iš ksenograftų išgautų pirminių ląstelių kultūrų (XDPCC) molekuliniai keliai - su atsparumu taikytai chemoterapijai. Stebėtos molekulinį kelių savybės koreliavo su bazine/klasikine modelių fenotipų poliarizacija: klasikinio kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipo savybėmis pasižymėjusiems tiriamiesiems modeliams (individualiems pacientų ksenograftams (PDX) ir iš pacientų ksenograftų išaugintiems kasos organoidams (XDPO)) buvo būdingas didesnis chemoterapinis jautrumas, o bazinio fenotipo savybėmis pasižymėjusiose iš ksenograftų išgautose pirminėse ląstelių kultūrose (XDPCC) fiksuotas mažesnis chemoterapinis jautrumas. Remiantis Hoare ir kt. tyrimo duomenimis, reprezentatyviausiu klinikinėje praktikoje pritaikomu tiriamuoju modeliu galima laikyti individualius kasos duktalinės adenokarcinomos pacientų ksenograftus (PDX), kadangi jie tyrimo metu išlaikė didžiausią transkripcinį navikų heterogeniškumą (angl. transcriptomic inter-tumor heterogeneity). Tačiau iš ksenograftų išauginti kasos organoidai (XDPO) bei iš ksenograftų išgautos pirminės ląstelių kultūros (XDPCC) taip pat pasižymi tam tikrais pranašumais – greitomis rezultatų analizės galimybėmis ir stabiliais transkriptominiiais profiliais, susijusiais su konkrečiais fenotipais. Hoare ir kolegų

tyrimo išvados atskleidė, jog nustatytas transkriptominis kasos duktalinės adenokarcinomos modelių nuoseklumas (angl. transcriptomic consistency) patvirtino nuo fenotipo priklausomo chemoterapinio jautrumo stebėjimų rezultatus, nepriklausomai nuo ląstelių proliferacijos greičio ar kitų faktorių atitinkamose eksperimentinėse platformose. Be to, tyrimo autoriai pabrėžia, jog siekiant visapusiškai atskleisti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų biologines savybes, svarbu tarpusavyje derinti duomenis, gautus tiriant kelis palyginamus modelius. Pavyzdžiui, tyrimuose kartu pasitelkiant individualius pacientų ksenograftų modelius (PDX) ir iš ksenograftų išaugintus kasos organoidus (XDPO) ar iš ksenograftų išgautas pirmines ląstelių kultūras (XDPCC), atitinkamai būtų derinami šių modelių privalumai: ksenograftų modeliai padėtų geriau atskleisti naviko heterogeniškumą, tuo tarpu organoidai arba iš ksenograftų išgautos pirminės ląstelių kultūros galėtų geriau atspindėti su fenotipo specifiškumu susijusias naviko savybes, tad visa tai, kaip tikimasi, prisidėtų prie tikslesnės ligos prognozės, šiuos metodus paraleliai pritaikant ir klinikinėje praktikoje [161].

Individualių pacientų organoidų modelių, kaip tiriamosios platformos, suteikiančios galimybes nustatyti konkrečias, specifines navikų ypatybes ir stebėti klinikinius terapinius atsakus, potencialu neseniai įsitikino Le Compte ir kt., atlikę tyrimą (2023 m.), kurio metu, pasitelkus šiuos modelius, buvo nagrinėjamos kasos duktalinei adenokarcinomai būdingos savybės – agresyvus naviko pobūdis ir atsako į gydymą heterogeniškumas. Atlikus 8 pacientų navikų organoidų linijų analizę pastebėta, kad organoidai pasižymėjo skirtingomis morfologinėmis ypatybėmis (pvz., vertinant modelių struktūras, išskirti cistinis ir kietas tipai, angl. cystic-like vs. solid-like structures), taip pat skyrėsi organoidų augimo greičiai, molekulinės savybės, o RNR sekos analizė parodė transkripcinius skirtumus, dar labiau išryškinusius pacientų navikų heterogeniškumą. Atkreiptinas dėmesys, kad kieto tipo organoidai augo lėčiau ir pasižymėjo sumažėjusia proliferacijos genų rinkinių (angl. proliferation-related gene sets), tokių kaip G2M kontrolės taškas (angl. G2M checkpoint) ir E2F taikiniai (angl. E2F targets), ekspresija. Le Compte ir kt. vertindami organoidų augimo greitį ir ląstelių užsėjimo tankį pasitelkė normalizuoto vaistų atsako rodiklį (angl. Normalized Drug Response, NDR), kuris reikšmingai pagerino pacientų stratifikaciją, palyginus su tradiciniais ląstelių gyvybingumo matavimais. NDR rodiklio vertinimu pagrįstos analizės rezultatai parodė pacientų jautrumą standartinėms terapijoms (gemcitabino-paklitakselio ir FOLFIRINOX režimams), identifikuojant citostatinius ir citotoksinius atsakus. Pavienių organoidų analizė (angl. single-organoid analysis) papildomai atskleidė navikų vidinį (intratumorinį) heterogeniškumą: tyrimo metu buvo aptikta atsparių ir invazinių subklonų net ir chemoterapiškai jautriose organoidų linijose. Remdamiesi vaizdų fiksavimo skirtingais laiko intervalais technologija (angl. time-lapse imaging) tyrėjai pastebėjo, kad chemoterapija, ypač paklitakseliu, paradoksaliai skatino kai kurių subklonų invazines savybes. Tyrimo metu transkripcinės analizės duomenys buvo suderinti su NDR rodiklio vertėmis, identifikuojant su jautrumu ir atsparumu chemoterapijai susijusius biomarkerius, įskaitant šešis genus, susijusius su geresne išgyvenamumo prognoze. Be to, funkciniai genų klasteriai parodė, kad jautriems chemoterapijai organoidams buvo būdingi PI3K-AKT-mTOR signalizavimo keliai ir epitelio-mezenchimos tranzicijos reakcija, o atsparūs gydymui organoidų modeliai buvo susiję su riebalų rūgščių sinteze ir IL-6/STAT3 signalų sklidimu. Kaip parodė Le Compte ir kt. tyrimo rezultatai, klinikinio požiūriu reikšmingos chemoterapinių vaistų koncentracijos pasižymėjo specifiniu terapiniu poveikiu, pavyzdžiui, gydymui paskyrus oksaliplatiną kartu su FOLFIRINOX režimu, tam tikriems pacientams stebėtas teigiamas vaistų sinergistinis poveikis. Taip pat šiame tyrime kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių invaziniai bruožai buvo susieti su priklausomybe nuo

terapinio agento rūšies ir koncentracijos, o tSNE klasterizacijos algoritmas (angl. non-linear dimensionality reduction algorithm, tSNE) padėjo identifikuoti subpopuliacijas su skirtingu chemoterapiniu jautrumu ir invazijos savybėmis. Le Compte ir kt. tyrimo išvados parodė, kad normalizuoto vaistų atsako rodiklio (NDR) interpretacija, derinama kartu su pavienių organoidų analizės (angl. single-organoid analysis) duomenimis, padidina tiriamosios organoidų platformos klinikinį pritaikomumą, padeda įvertinti ląstelių subklonų populiacijų dinamiką ir jos prognostinę vertę, stebint atsakus į gydymą bei nustatant ligos atkryčio riziką [162].

Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai padeda modeliuoti tokias kasos navikų savybes kaip heterogeniškumas ir sudėtinga ląstelių diferenciacijos hierarchija, o tai prisideda prie geresnio šios agresyvios ligos biologijos supratimo bei leidžia tyrėjams tiksliau numatyti pacientų terapinius atsakus į gydymą. Krieger ir kt. (2021 m.) straipsnyje pristatomi radiniai iš tyrimo, kurio metu mokslininkai išvedė 24 organoidų ląstelių linijas, panaudodami 18 pirminių navikų ir 2 pirminius navikus atitinkančių kepenų metastazių mėginius, gautus iš kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų. Kaip parodė mokslininkų atliktos vienos ląstelės RNR sekoskaitos analizės (angl. single-cell RNA sequencing) rezultatai, iš viso ištyrus 93 096 ląstelių RNR sekas, organoidų modeliuose atsispindėjo pacientų navikų transkripcijos heterogeniškumas, be to, organoidų ląstelių linijos atitiko piktybinių kasos lataukų ląstelių savybes, jas identifikavus pagal abipusio pagrindinių komponentų nustatymo kriterijus (angl. reciprocal principal component analysis) bei ištyrus kasos navikams charakteringų genų ekspresiją (angl. expression of characteristic genes). Krieger ir kt. tyrimo metu analizuotuose pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos modeliuose pastebėta diferenciacijos hierarchija – ląstelių perėjimas iš ciklinių pirmtakų (angl. cycling progenitor state) būsenos, t. y. ankstyvos, aktyvaus dalijimosi stadijos, į diferencijuotą sekrecijos būseną (angl. differentiated secretory state), atspindinčią kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių funkcinę specializaciją. Tyrėjai išsiaiškino, kad klasikinio kasos duktalinės adenokarcinomos potipio ląstelės buvo sutelktos specialiu metodu (angl. Markov chain tracing) identifikuotuose diferenciacijos trajektorijų pabaigos taškuose (angl. endpoints of differentiation trajectories), kitaip tariant, šios ląstelės pasižymėjo geresne diferenciacija ir būsenos stabilumu, palyginus su bazinio tipo kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėmis. Savo ruožtu, bazinio tipo ląsteles mokslininkai susiejo su blogesnėmis kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų prognozėmis ir atsparumu standartiniams ligos gydymo režimams. Taigi, Krieger ir kt. identifikuota kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ląstelių hierarchija padėjo tyrėjams atrasti sąsajas tarp ląstelių potipių savybių, funkcinų būsenų ir atitinkamai prognozuojamų pacientų gydymo išiečių. Pažymėtina, kad kasos duktalinės adenokarcinomos organoiduose pastebėta pacientui specifinė genų raiška išryškino šia liga sergančiųjų navikuose pasitaikantį heterogeniškumą, grindžiamą nustatyta skirtingų genų, koduojančių ląstelės paviršiaus ir sekretuojamus baltymus, ekspresija. Tyrėjai pastebėjo, kad tam tikri genai, aptinkami skirtingų pacientų navikuose, priklauso toms pačioms genų šeimoms, pavyzdžiui, mucinams ar kladinams, o tai skatina pasvarstyti apie galimybę šiuos genus pasitelkti kaip potencialius kasos duktalinės adenokarcinomos biožymenis. Svarbu akcentuoti, jog Krieger ir kt. tirtuose kasos duktalinės adenokarcinomos kepenų metastazių organoiduose buvo išlaikytos pirminių pacientų navikų savybės, tačiau taip pat nustatyta, kad šiems organoidų modeliams buvo būdingas sumažėjęs diferencijuotų ląstelių kiekis ir padidėjusi bazinio potipio ląstelių raiška, siejama su epigenetinės reguliacijos procesu. Be to, tyrėjų atlikta vaistų testavimo analizė parodė, kad klasikinio potipio kasos duktalinės adenokarcinomos organoiduose fiksuoti geresni terapiniai

atsakai į gydymą tokiais vaistais, kaip 5-FU ir gemcitabinas, tuo tarpu bazinio potipio organoiduose stebėti prastesni kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsakai į taikytą chemoterapinį gydymą. Krieger ir kt. tyrimo išvados leidžia patvirtinti indikacijas individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų klinikiniam pritaikymui, - analizuojant su kasos navikų heterogeniškumu susijusius veiksnius, naviko potipių diferenciacijos hierarchiją ir numatant kasos duktalinę adenokarcinomą sergančių pacientų terapinius atsakus [163].

Individualių pacientų organoidų modelių, kaip patikimos tiriamosios platformos, klinikinio pritaikymo potencialą taip pat įrodo Raimondi ir kt. tyrimo (2020 m.) radiniai. Iš sveikų kasos audinių ir kasos duktalinės adenokarcinomos navikų tyrimo metu išauginti organoidų modeliai tiksliai atspindėjo šiems navikams būdingas savybes, t. y. histologinę morfologiją ir KRAS mutacijas, kurios buvo aptiktos visuose (7 iš 7) organoiduose, gautuose iš pacientų navikų biologinės medžiagos. Tyrėjai, pasitelkę kasos vėžio organoidų modelius, kaip tiriamąją platformą, siekė išsiaiškinti onkolitinių adenovirusų terapinį poveikį. Tyrimo metu pastebėta, kad onkolitiniai adenovirusai pasižymėjo specifiskumu navikui (angl. oncoselectivity), užkrėsdami ir daugindamiesi tik kasos duktalinės adenokarcinomos organoiduose, tačiau nepaveikdami sveikų audinių. Onkolitinių adenovirusų specifiskumas navikui buvo patvirtintas remiantis šių virusų ekspresuojamo GFP baltymo (angl. green fluorescent protein) raiškos nustatymu ir įvertinus virusų replikacijos tyrimų rezultatus. Organoidų modeliuose pastebėti individualūs pacientui specifiniai jautrumo tirtiems onkolitiniams adenovirusams (AdNuPARmE1A ir ICOVIR15) skirtumai: šių virusų citotoksiškumas priklausė nuo dozės, o ID50 (pusinės inhibicijos dozė, angl. half maximal inhibitory dose) reikšmės svyravo nuo 10^3 iki 10^5 plokšteles formuojančių vienetų šulinėlyje (angl. pfu/well). Tyrimo metu nustatytas naviko ląstelių jautrumas onkolitinių adenovirusų poveikiui koreliavo su genų ekspresija – didesnis jautrumas AdNuPARmE1A buvo susijęs su padidėjusia uPAR (angl. urokinase plasminogen activator receptor) ir Notch signalinių kelių aktyvacija, kuo pasižymėjo IDIT1 kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ląstelių linija. Ksenograftinių modelių analizė taip pat patvirtino pacientų organoidų modeliuose stebėtas priešnavikines reakcijas: AdNuPARmE1A efektyviau veikė IDIT1 kilmės navikus (angl. IDIT1-derived tumors), o ICOVIR15 – IDIT6 kilmės navikus (angl. IDIT6-derived tumors), kas atitiko in vitro rezultatus. Derinant viroterapiją onkolitiniiais adenovirusais kartu su standartiniais chemoterapiniais vaistais (nab-paklitakseliu ir gemcitabinu), pacientų organoidų modeliuose stebėtas reikšmingas citotoksiškumo sustiprėjimas, todėl tyrimo autoriai akcentuoja, kad ši terapinė kombinacija pasižymi sinerginio efektyvumo potencialu. Be to, organoidai, išauginti iš ortotopinių kasos duktalinės adenokarcinomos navikų ir kasos vėžio metastazių, atspindėjo pirminių pacientų navikų pagrindu sukurtuose organoidų modeliuose stebėtas reakcijas, taigi, šie pastebėjimai įrodo organoidų modelių prognostinę reikšmę tiriant tiek pirminius, tiek ir metastazinius kasos navikus. Apibendrinus Raimondi ir kt. tyrimo išvadas, organoidus galima įvardinti kaip praktišką ir reprezentatyvią platformą onkolitinių adenovirusų poveikiu pagrįstų bei kombinuotų terapijų pritaikymui, gydant kasos duktalinę adenokarcinomą [164].

Galiausiai, atsižvelgiant į šiuolaikinę technologijų pažangą, aktualu paminėti, kad pastaraisiais metais inovatyvių dirbtinio intelekto metodų taikymas onkologinių tyrimų srityje leido sukurti naujus įrankius, skirtus navikinių ląstelių elgsenai ir terapiniam atsakui stebėti realiuoju laiku. Ferreira ir kt. (2024 m.) pristatė naują platformą, pritaikytą realiu laiku stebėti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų atsakus į gydymą, pasitelkiant gilaus mokymosi algoritmą (angl. deep-learning algorithm) *OrganoIDNet*, gebantį analizuoti šviesiniu mikroskopu matomus

vaizdus (angl. bright-field images). Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai buvo išvesti iš pelės ir žmogaus navikų ląstelių, o gauti modeliai validuoti remiantis imunofluorescencijos tyrimu - patvirtinti kasos duktalinei adenokarcinomai būdingi biologiniai žymenys SOX9, CK19 ir nustatytos tipinės mutacijos (KRAS, TP53, SMAD4). Gilaus mokymosi algoritmas *OrganoIDNet* tiksliai įvertino organoidų modelių atsaką į gemcitabiną priklausomybę nuo organoido dydžio: nustatyta, kad didesni organoidai yra jautresni gydymui. Pelės ląstelių organoidų modeliuose pastebėtas reikšmingas augimo (~75 %) ir paviršiaus ploto (~80 %) sumažėjimas, gemcitabino koncentracijai pasiekus 380 nM, o žmogaus organoidai į gydymą gemcitabinu reagavo panašiai, tačiau reikšmingas poveikis pastebėtas pritaikius didesnes vaisto dozes (840–1000 nM). Be to, mokslininkai atkreipė dėmesį ir į tyrimo metu pastebėtus morfologinius pokyčius, tokius kaip organoidų modelių struktūrinis ekscentriškumas (angl. eccentricity) ir formos pakitimai, kurie, kaip manoma, buvo susiję su kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų reakcijomis į chemoterapiją. Tyrėjai suformulavo prielaidą, jog labiau apvalią (panašią į pirminę) formą išlaikantys organoidai yra jautresni chemoterapijai nei pailgą formą *Matrigel* terpėje įgyjantys organoidai. Taip pat tyrėjai analizavo terapinį atsaką į atezolizumabą bendrai kultivuojamose organoidų ir imuninių ląstelių kultūrose (angl. organoid/immune cell co-cultures) su HLA suderintais periferinio kraujo mononukleais (angl. PBMCs). Organoidų ir imuninės sistemos ląstelių (PBMC) bendrų kultūrų su HLA suderintais PBMC analizei mokslininkai pritaikė giliojo mokymosi algoritmą *OrganoIDNet* bei išsiaiškino, kad atezolizumabas paskatino PBMC medijuojamą naviko ląstelių žūtį (angl. PBMC-mediated tumor killing), ypač žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose, kuriuose nustatyta aukštesnė bazinė PD-L1 ekspresija. Periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių (PBMC) aktyvacija per CD3/CD28 receptorius ir jų kultivavimas bendroje *Matrigel* terpės ląstelių kultūroje užtikrina tiesioginius ląstelių tarpusavio ryšius bei tikslų vaizdų, tinkamų analizei, perteikimą. Visgi kai kuriuose organoidų modeliuose (konkrečiai – HO2 žmogaus organoidiniame modelyje), paveiktuose atezolizumabu, pastebėtas reikšmingas nesveikų ląstelių skaičiaus padidėjimas ir organoidų struktūros dezintegracija, o tai atspindi individualias organoidų terapinių atsakų variacijas. Taigi, Ferreira ir kt. tyrimo metu pritaikyta *OrganoIDNet* platforma leidžia tiksliai stebėti tam tikrą skaičių organoidų modelių, įvertinti organoidų paviršiaus plotą, pacientų sveikatos būklę ir sekti individualiuose pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose vykstančias terapines reakcijas laiko atžvilgiu. Ši tiriamoji sistema pranoksta tradicinius kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose naudojamus metodus, kadangi geba fiksuoti dinamiškus procesus, tokius kaip organoidų susijungimas (angl. organoid merging), ir stratifikuoti terapinius atsakus, atsižvelgiant į organoido dydį bei genetinio profilio savybes. Be to, svarbu akcentuoti, kad Ferreira ir kt. tyrime panaudota *OrganoIDNet* platforma įgalino dirbtinio intelekto integravimą kartu su gyvų ląstelių vaizdavimu (angl. live imaging), todėl tai galima laikyti žingsniu į priekį personalizuotos medicinos srityje, tikintis sukurti patikimą ir fiziologiškai aktualią eksperimentinę sistemą, skirtą chemoterapijos ir imunoterapijos efektyvumo vertinimui individualiuose kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose [165].

Žvelgiant į šiuo metu mokslinėje literatūroje aktualizuojamus individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių privalumus, galima įsitikinti, jog ši 3D eksperimentinė platforma leidžia mokslininkams tyrinėti kasos duktalinei adenokarcinomai būdingų onkogeninių mutacijų (pvz., KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4) įtaką vėžinių procesų progresavimui bei išvystomam chemoterapiniam atsparumui. Tyrimų duomenys rodo, kad kasos vėžio organoidų modeliai gana tiksliai atkartoja su navikų heterogeniškumu siejamas

savybes, taip pat padeda tyrėjams geriau suprasti kasos navikams būdingus epigenetinius mechanizmus (pvz., endoderminių genų epigenetinį slopinimą) ir specifines fenotipines ypatybes, pavyzdžiui, bazinio potipio kasos vėžio ląstelių plastiškumą bei jų gebėjimą keisti transkripcinius profilius reaguojant į gydymą. Nors organoidų modelių pritaikymas klinikinėje praktikoje vis dar kelia tam tikrų iššūkių, susijusių su kultivavimo metu vykstančiais tiriamosios medžiagos fenotipiniais pokyčiais, taip pat su stromos ir naviko ląstelių auginimui palankių standartizuotų sąlygų užtikrinimu, šių trimačių tiriamųjų sistemų prognostinė vertė, įskaitant atsaką į taikinių terapijos agentus, kaip antai, MRTX1133, trametinibą, YM155, bei standartinius chemoterapinius vaistus (gemcitabiną, irinotekaną, 5-fluorouracilą ir oksaliplatiną), modeliavimą, patvirtina organoidų reikšmę personalizuotos onkologijos tyrimų kontekste. Be to, dirbtinio intelekto algoritmai, integruojami į eksperimentines sistemas, tarp kurių paminėtina inovatyvi *OrganoIDNet* tiriamoji platforma, suteikia galimybę optimizuoti kasos duktalinės adenokarcinomos terapinius sprendimus, pagal atitinkamą organoido modelį konkrečiam pacientui individualiai pritaikant atitinkamą gydymo schemą.

Organoidų pasitelkimas tiriant kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumo chemoterapijai veiksnius: naviko mikroaplinkos sąlygų ir sąveikų modeliavimo reikšmė

Kasos navikų mikroaplinka susideda iš trijų elementų: matricos komponentų (ekstraląstelinė matrica ir stromos ląstelės); ląstelių komponentų (navikinių, endotelinų ir imuninių ląstelių) ir tirpių faktorių (citokinių, imuninių reguliacinių molekulių). Mikroaplinkos sąlygos kasos duktalinės adenokarcinomos navikuose palaikomos per nuolatinį ląstelių-matricos ir ląstelių-ląstelių ryšius (angl. cell-matrix and cell-cell interactions), taip užtikrinant kasos vėžio ląstelių, epitelio ląstelių bei stromos ląstelių tarpusavio sąveikų tęstinumą, lemiantį ligos progresavimą. Ši naviko mikroaplinkos veiksnų visuma kasos duktalinės adenokarcinomos terapiniame kontekste yra laikoma dideliu iššūkiu, siejamu su ligos atsparumu gydymui chemoterapiniais ir imunoterapiniais vaistais. Be to, tanki kasos navikų stroma veikia ir kaip fizinis, ir kaip biocheminis barjeras, ribojantis chemoterapijos veiksmingumą ir kartu trukdantis imuninių ląstelių infiltracijai [14, 166].

Atsižveldami į tai, jog nuo imuninės sistemos gynybinio atsako kasos vėžio ląsteles apsaugo naviko stromoje dominuojančios aktyvuotos kasos žvaigždinės ląstelės (angl. activated pancreatic stellate cells, PSCs), Geyer su kolegomis atliko tyrimą (2023 m.), kurio metu siekė sukurti eksperimentines sąlygas, galinčias imituoti imuninę sistemą moduliuojančias kasos navikų stromos savybes. Mokslininkai sukūrė 3D kasos duktalinės adenokarcinomos eksperimentinį modelį, susidedantį iš endotelio vamzdelio (angl. endothelial tube), perfuzuojamo periferinio kraujo mononuklearinėmis ląstelėmis (angl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), kasos žvaigždinių ląstelių ir kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų, kultivuotų srautinio judėjimo sąlygomis (angl. flow conditions). Taip pat tyrimo metu imuninių ląstelių migracijai ir infiltracijai ištirti buvo pasitelktas specialus mikroskysčių lustas (angl. microfluidic chip). Sukūrus tėkmės sąlygas buvo tikimasi, kad tai padės perteikti dinamišką naviko aplinkos būseną, kuomet ląstelės nepertraukiamai, lyg kraujotakoje, susiduria su maistinių medžiagų, deguonies įsisavinimo ir apykaitos produktų šalinimo procesais. Toks mokslininkų sukurtas 3D modelis buvo naudojamas siekiant ištirti, kaip naviko stroma veikia imuninių ląstelių patekimą ir pasiskirstymą naviko aplinkoje. Kaip pabrėžiama

Geyer ir kt. straipsnyje, naviko stromos komponentas be to, kad suformuoja fizinį barjerą, taip pat sukuria biochemines sąlygas, keičiančias įprastą imuninių ląstelių migraciją ir prisidedančias prie to, kad būtų užkirstas kelias imuninių ląstelių sąveikai su vėžinėmis ląstelėmis. Darytina prielaida, kad naviko stroma turi įtakos imuninių ląstelių pasiskirstymui, kadangi tyrimo metu pastebėta, jog kasos žvaigždinių ląstelių segmente (angl. PSC compartment) iš dalies susilaikė ir pasiliko periferinio kraujo mononuklearinės ląstelės, ypač B ląstelės. Nepaisant to, kad kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių išskirti chemokina, kaip antai, CCL2, CXCL13 ir IL-8, pritraukė imunines ląsteles, šių ląstelių imuninį poveikį sumažino stromos sąveika. Tuo remdamiesi tyrėjai atkreipė dėmesį, kad siekiant padidinti imuninių ląstelių patekimą į naviką, svarbu tinkamai nukreipti gydymą, taikantis į naviko stromos barjerą.

Siekiant įveikti stromos barjerą ir padidinti imuninių ląstelių infiltraciją, tyrimo metu buvo išbandyti į stromą nukreipti junginiai (angl. stromal targeting compounds) - losartanas, vismodegibas, galunisertibas, pirfenidonas ir halofuginonas, - pasižymintys skirtingais veikimo mechanizmais. Visi tirti junginiai parodė transepitelinio elektrinio atsparumo (angl. transepithelial electrical resistance, TEER) sumažėjimą ir stromos barjerinės funkcijos slopinimą, tačiau halofuginono efektas buvo ryškiausias, o vismodegibo – menkiausias. Tyrėjai nustatė, kad kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose halofuginonas padidino imuninių ląstelių infiltraciją atitinkamai po 24 ir 48 valandų po paskyrimo, o tai reiškia, kad šio terapinio junginio poveikis buvo susijęs su stromos barjerinės funkcijos susilpninimu. Visgi stebėtas halofuginono poveikis po 48 valandų sumažėjo dėl, kaip manoma, stromos barjero regeneracijos ir kasos žvaigždinių ląstelių proliferacijos.

Nors Geyer ir kolegų sukurtas 3D kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamasis modelis veiksmingai imitavo imuninę sistemą moduluojantį kasos navikų stromos poveikį, svarbu paminėti ir šios eksperimentinės platformos trūkumus, susijusius su ribotomis naviko struktūrinio sudėtingumo atkūrimo galimybėmis ir rezultatų interpretacijų perkėlimu į in vivo kontekstą. Todėl siekiant geriau perteikti naviko mikroaplinkos savybes tiriamuosiuose modeliuose turėtų būti įtraukiama daugiau kasos duktalinės adenokarcinomos stromos komponentų, tokių kaip, pavyzdžiui, su vėžiu susiję fibroblastai (CAF). Nepaisant šiuo metu pastebimų 3D kasos vėžio eksperimentinių modelių apribojimų, šios tiriamosios platformos mokslininkams suteikia vertingų įžvalgų apie naviko mikroaplinką, sąveiką su imuninėmis ląstelėmis ir kasos vėžio gydymo galimybes [166].

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad kasos duktalinei adenokarcinomai būdingas gausus stromos komponentas skatina naviko progresavimą per mikroaplinkos arba „nišos“ veiksnius (angl. niche factors). Visgi tyrimai su pelių modeliais parodė, kad kasos duktalinės adenokarcinomos navikuose sumažinus stromos kiekį, padidėja prastai diferencijuotų naviko ląstelių proporcija, o tai siejama su žymiai blogesne pacientų prognoze [167].

Shinkawa ir kt. (2022 m.) atliko tyrimą, siekdami išsiaiškinti, kaip stromos mikroaplinka ir vienas pagrindinių jos komponentų - vėžiu susiję fibroblastai (angl. cancer-associated fibroblasts, CAFs), veikia kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių diferenciaciją ir kokią įtaką visa tai gali turėti įtakos klinikiams pacientų atsakams į gydymą. Atlikę kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių genominę ir transkriptominę analizes, mokslininkai nustatė molekulinės savybes, kurios skyrėsi priklausomai nuo naviko diferenciacijos laipsnio. Shinkawa ir kolegų tyrimo išvados atskleidė, kad gerai diferencijuotų kasos duktalinės

adenokarcinomos ląstelių organoidų modeliai labai priklausė nuo nišinių veiksnių, kuriuos nulėmė su vėžiu susiję fibroblastai (CAF), o prastai diferencijuotų naviko ląstelių organoidų modeliai buvo mažiau priklausomi nuo paminėtų veiksnių.

Mokslininkai sukūrė trimatį bendros kultūros modelį, kuriame kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai buvo auginami kartu su CAF (su vėžiu susijusiais fibroblastais), imituojant kasos duktalinės adenokarcinomos naviko mikroaplinkos sąlygas. Šiame modelyje gerai diferencijuotų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų augimas ir išgyvenimas labai priklausė nuo CAF, o tai pabrėžia kritinį stromos vaidmenį palaikant naviko diferenciaciją. Priešingai, vidutiniškai diferencijuotų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ląstelės pasižymėjo didesniu adaptyvumu ir plastiškumu, o jų morfologija keitėsi, priklausomai nuo su vėžiu susijusių fibroblastų (CAF) buvimo ar nebuvimo, atspindėdama dinamišką naviko ląstelių ir jų mikroaplinkos nišų sąveiką.

Be to, Shinkawa ir kt. nustatė, kad gerai diferencijuoti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai atspindėjo genų, dalyvaujančių mevalonato kelyje, reguliavimą (mevalonato kelias žinomas kaip pagrindinis metabolizmo kelias, kuris tiesiogiai siejamas su naviko priklausomybe nuo nišinių mikroaplinkos veiksnių). Dėl padidėjusio mevalonato kelio reguliavimo gerai diferencijuoti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai buvo jautresni gydymui simvastatinu - vaistu, kurio poveikis nukreiptas į mevalonato kelią, o prastai diferencijuoti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai parodė sumažėjusį jautrumą paskirtam gydymui simvastatinu. Šie Shinkawa ir kt. tyrimo radiniai rodo, kad su vėžiu susiję fibroblastai (CAF) ne tik prisideda prie diferencijuoto kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipo palaikymo, išskirdami nišinius veiksnius, bet ir sąlygoja atitinkamą naviko atsaką į specifinius gydymo būdus, pagrįstus jo diferenciacijos būseną (angl. differentiation state). Taigi, galima tikėtis, kad šios mokslininkų įžvalgos padės kuriant naujus, specifinius kasos duktalinės adenokarcinomos potipiams terapinius metodus (angl. subtype-specific therapeutic approaches), nukreiptus į CAF ir mevalonato kelio sąveiką, ypač gydant gerai diferencijuotus kasos duktalinės adenokarcinomos navikus [167].

Siekiant geriau suprasti, kaip naviko mikroaplinka skatina vėžio progresavimą, svarbu atsižvelgti į intratumorinį stromos savybių heterogeniškumą. Įdomių įžvalgų apie žmogaus kasos navikų mikroaplinkos ypatybes pateikiama Grünwald ir kt. (2021 m.) straipsnyje. Tyrime buvo analizuojama žmogaus kasos navikų mikroaplinka, integruojant regioninius daugiafunkcinius duomenis, taip pat remiantis histologija, klinicine informacija ir pacientų tiriamaisiais modeliais. Tyrėjai nustatė skirtingas naviko mikroaplinkos nišas (angl. “subTMEs”), kurios apibrėžia specifines audinių sąlygas ir pasižymi tam tikromis histologinėmis savybėmis, susijusiomis su fibroblastų plastiškumu. Šios „subTME“ atspindėjo sąryšį su naviko imunitetu, potipiu, diferenciacijos laipsniu ir gydymo atsakais. „Reaktyvios“ naviko mikroaplinkos nišos (angl. “reactive” subTMEs), kuriose yra sudėtingos sandaros, bet funkciškai integruotų fibroblastų populiacijų, yra susijusios su imunologiškai aktyvia aplinka ir yra apgyvendintos agresyvių naviko ląstelių. Tuo tarpu „apleistos“ naviko aplinkos nišos (angl. “deserted” subTMEs), kuriose gausu matricos ir yra mažiau aktyvių fibroblastų, pasižymi naviką slopinančiomis savybėmis, tačiau geba suformuoti barjerą, apsaugantį nuo chemoterapijos, ir tampa labiau pastebimos po gydymo. Apskritai, naviko aplinkos nišų (subTME) ištakos slypi fibroblastų diferenciacijos keliuose, o fibroblastų perėjimai iš vienos nišos į kitą stebimi tiek atliekant vienos ląstelės transkriptomiką, tiek in situ analizę. Skirtingų naviko mikroaplinkos nišų buvimas prisideda prie pacientui specifinio vėžio heterogeniškumo

(angl. patient-specific heterogeneity), kuris yra glaudžiai susijęs su piktybiniu elgesiu ir gali būti nuspėjamas kompiuteriniais skaičiavimais (angl. computationally predictable). Todėl mokslininkai sutinka, kad kasos navikų mikroaplinkos kintamumas nėra atsitiktinis reiškinys; tai atspindi esmines organizacines struktūras naviko audiniuose.

Šiuo metu žinoma, kad naviko mikroaplinkos nišos neveikia savarankiškai, bet bendradarbiauja tarpusavyje, kad aktyviai skatintų vėžio progresavimą ir išvystytų atsparumą gydymui. Taigi, svarbu akcentuoti, jog ištyrinėjus kasos navikų mikroaplinkos ypatybes, mokslininkams pavyko išsiaiškinti, kad egzistuoja dvi pagrindinės mikroaplinkos nišos, t. y. „reaktyvios“ subTME, kurioms būdinga didelė vaskuliarizacija, imuninių ląstelių infiltracija ir naviką skatinantis poveikis (angl. tumor-promoting role), tačiau kartu ir didesnis jautrumas chemoterapijai; ir „apleistos“ subTME, kurios pasižymi reikšmingais vaskuliarizacijos ir imuninės sistemos trūkumais, palaiko naviko diferenciaciją bei dėl savo chemoprotekcinio savybių yra susijusios su prastu gydymo atsaku. Intratumorinė šių subTME (naviko mikroaplinkos nišų) sąveika sukuria sudėtingą ekosistemą, kuri aprūpina naviką augimą skatinančiais veiksniais ir gali sąlygoti atsparumo chemoterapijai išsivystymą, taip nulemiant prastesnius kasos vėžiu sergančių pacientų gydymo rezultatus.

Apie su vėžiu susijusių fibroblastų (angl. cancer-associated fibroblasts, CAF), kaip svarbaus kasos navikų heterogeniškumui veiksnio, reikšmę taip pat diskutuojama Grünwald ir kt. straipsnyje (2021 m.). Verta prisiminti, jog šios ląstelės yra laikomos pagrindiniais subTME susiformavimą ir palaikymą užtikrinančiais elementais. Grünwald su kolegomis nustatė iki 11 CAF subpopuliacijų subTME kultūrose, kurių kiekviena turėjo unikalios diferenciacijos būsenas, susijusias su joms būdingu specifiniu mikroaplinkos kontekstu. Mokslininkų identifikuoti CAF iliustravo diferenciacijos spektrą nuo tarpinių iki labai reaktyvių (angl. highly reactive) ar apleistų būsenų (angl. deserted states), lemiančių įvairius fenotipus, aptinkamus skirtinguose naviko regionuose. Nustatyta, kad šių CAF diferenciacijos potencialas yra nulemtas RNR įvairovės ir pliuripotencijos (angl. RNA diversity and pluripotency), panašiai kaip kamieninių ląstelių elgesys, o tai pabrėžia jų gebėjimą specifiškai paveikti naviko elgesį. Tokia CAF subpopuliacijų įvairovė ir sąveika su imuninėmis ląstelėmis sukuria skirtingas subTME organizacijas, kurios turi įtakos naviko progresavimui, imuniniam atsakui ir terapiniam atsparumui.

Grünwald ir kt. tyrimas atskleidžia, kad su naviko mikroaplinka siejamas imuninis heterogeniškumas atlieka svarbų vaidmenį formuojant naviko elgesį: reaktyvios subTME veikia kaip imuniniai „karštieji taškai“, skatinantys uždegiminį atsaką, o apleistos subTME pasižymi atsparumu gydymui ir prasta vaskuliarizacija. Taip pat tyrimo autoriai pastebėjo, kad kasos vėžio ląstelių epitelio potipiai, kaip antai, bazinis/plokščiasis potipis (angl. the basal-like/squamous subtype), dažnai yra susiję ir egzistuoja kartu su šiomis subTME, o tai dar labiau pabrėžia ryšį tarp epitelinio ir imuninio heterogeniškumo kasos duktalinės adenokarcinomos kontekste. Tokia heterogeniškumo sąsaja tarp naviko mikroaplinkos ir epitelinių ląstelių lygmens yra svarbus aspektas, kuriant naujas kasos duktalinės adenokarcinomos imunoterapijos strategijas bei užtikrinant kuo tikslesnę kasos vėžiu sergančių pacientų stratifikaciją.

Taip pat Grünwald ir kt. straipsnyje pabrėžiama, jog chemoterapija sukelia naviko mikroaplinkos pokyčius, sąlygodama perėjimą prie labiau apleisto, ekstraląstelinės matrica turtingo subTME fenotipo, todėl neabejojama, kad naviko mikroaplinka prisideda prie įgyto

chemorezistentiškumo. Todėl atkreiptinas dėmesys, kad šiuo metu iškyla poreikis kurti naujus gydymo metodus, kurie galėtų būti konkrečiai nukreipti veikti apleistą subTME, siekiant padidinti terapinį veiksmingumą įvairiuose kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo etapuose – pradedant neoadjuvantine ir adjuvantine terapijomis ir baigiant paliatyvia priežiūra. Norint sukurti tikslus, heterogeniškumu pagrįstus terapinius taikinius, labai svarbu nustatyti CAF pogrupius, kurie šiuose procesuose veikia kaip „vykdytojai“ (angl. executors) arba „stebėtojai“ (angl. bystanders), kartu su jų specifinėmis efektorinėmis molekulėmis.

Apibendrinant Grünwald ir kolegų pateiktas išvalgas galima pasakyti, kad šiame tyrime apibrėžiami du esminiai kasos navikų mikroaplinkos nišų (subTME) tipai, pagrįsti fibroblastų plastiškumu ir nulemiantys funkcinį intratumorinį kasos duktalinės adenokarcinomos heterogeniškumą. Tyrėjai taip pat įsitikino, jog galimybė regioniniu mastu tiksliai nustatyti naviko mikroaplinkos nišas naudojant histopatologinius ir kompiuterinius skaičiavimo įrankius suteikia progą gauti reikšmingų išvalgų iš molekulinio profiliavimo, imuninio fenotipavimo ir pacientų klinikinių duomenų. Grünwald ir kt. straipsnyje pastebima, kad kasos navikų mikroaplinkos proteomo (angl. TME proteome) raiškos skirtumai, palyginus reaktyvius ir apleistus mikroaplinkos regionus, sudaro apie 50% mikroaplinkoje identifikuojamų baltymų ekspresijos pokyčių, todėl galima daryti prielaidą, jog kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų stratifikavimas atsižvelgiant į specifiskai nustatomas subTME charakteristikas gali praversti apsisprendžiant dėl tikslingesnio, labiau personalizuoto kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų gydymo. Be to, kasos duktalinės adenokarcinomos atveju, gilesnis naviko mikroaplinkos savybių supratimas galėtų palengvinti gydymui aktualių stromos taikinių ir biožymenų paieškas [168].

Verta paminėti, kad kasos navikų mikroaplinkoje aptinkami su vėžiu susiję fibroblastai (angl. cancer-associated fibroblasts, CAFs) ne tik užtikrina glaudžius ryšius tarp naviko ir stromos ląstelių, tačiau, kaip jau minėta, kartu atlieka svarbų vaidmenį vystantis kasos duktalinės adenokarcinomos chemoterapiniam atsparumui. Schuth ir kolegų atliktame tyrime (2022 m.) pasitelkus tiesiogines trimates (3D) pirminių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų bendrai kultivuojamas kultūras (angl. direct three-dimensional (3D) co-cultures) kartu su atitinkamais pacientų CAF (su vėžiu susijusiais fibroblastais), buvo analizuojama fibroblastų įtaka chemoterapinio atsparumo pasireiškimui kasos navikuose. Tyrėjai pastebėjo, kad kartu su CAF kultivuotos ląstelių kultūros skatino organoidų proliferaciją ir sumažino chemoterapijos sukeltą ląstelių mirtį, kai buvo taikytas gydymas gemcitabinu, 5-fluorouracilu ir paklitakseliu. Be to, vienos ląstelės RNR sekoskaitos (angl. single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) rezultatai parodė transkripcijos pokyčius bendrai kultivuotose su vėžiu susijusių fibroblastų kultūrose (angl. co-cultured CAFs); šie pakitimai atspindėjo priešūždegiminį ląstelių fenotipą, o tirtuose organoidų modeliuose nustatyta genų ekspresija, susijusi su epitelio-mezenchimos tranzicijos procesu, kuris, kaip žinoma, yra vienas iš padidėjusio atsparumo chemoterapijai veiksnio kasos duktalinės adenokarcinomos kontekste. Taip pat tyrimo metu buvo pastebėtos specifinės receptorių ir ligandų sąveikos naviko ir stromos aplinkoje (angl. the tumor-stroma interface), pvz., CD44 jungimasis su CAF išskiriamais ligandais, tokiais kaip HGF, HBEGF, FGF2 ir LGALS9. Verta atkreipti dėmesį, jog CD44 receptorių, aptinkamas kasos vėžio ląstelių paviršiuje, taip pat yra susijęs su kasos duktalinės adenokarcinomos išsivystymu ir prasta ligos prognoze, o didelė šio receptoriaus ekspresija siejama su vėžio pasikartojimu po chemoterapijos, todėl svarstoma, kad CD44 paminėtinas kaip potencialus kasos duktalinės adenokarcinomos terapinis taikiny. Svarbu pastebėti, jog bendros ląstelių kultūros modelis

išlaikė specifines su paciento naviko heterogeniškumu susijusias ypatybes, tad Schuth ir kt. tyrimo išvados pabrėžia tokio pobūdžio eksperimentinių platformų (trimačių bendrai kultivuojamų organoidų ir fibroblastų kultūrų sistemų) reikšmę individualizuotos medicinos srityje, kadangi šie tiriamieji modeliai gali padėti tiksliai prognozuoti atsaką į chemoterapinius vaistus ir suteikia galimybę patikrinti į stromą nukreiptų gydymo būdų veiksmingumą. Galima daryti išvadą, kad, nepaisant techninių iššūkių, susijusių su CAF ląstelių (su vėžiu susijusių fibroblastų) atkūrimo galimybėmis ir bendrai kultivuojamų ląstelių kultūrų stabilumu, trimatis bendrai kultivuojamų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ląstelių ir su vėžiu susijusių fibroblastų eksperimentinis modelis gali būti pritaikomas didelio našumo vaistų testavimo tyrimuose, taip pat vykdant naujų terapinių agentų paiešką bei kuriant naujas terapines galimybes, pasitelktinas individualizuotam kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui [169].

Nepaisant kasos navikų mikroaplinkos sudėtingumo, kurį sunku modifikuoti, pasitelkus standartinius kasos duktalinės gydymo metodus, pastaruoju metu ieškoma terapinių sprendimų, galinčių įveikti šią problemą. Feldmann ir kt. atliko tyrimą (2021 m.), akcentuodami transkripcijos faktoriaus Prrx1 svarbą reguliuojant su vėžiu susijusių fibroblastų (angl. cancer-associated fibroblasts, CAFs) plastiškumą ir jo įtaką kasos duktalinės adenokarcinomos progresavimui bei terapinio atsparumo išsivystymui. Nustatyta, kad Prrx1 ekspresija yra ženkliai padidėjusi su vėžiu susijusiuose fibroblastuose (CAF) ir stromos ląstelėse, palyginus su naviko ląstelėmis. Panaudodami genetiškai modifikuotus pelių modelius, mokslininkai išsiaiškino, jog Prrx1 trūkumas lemia nuolatinę CAF ląstelių aktyvumo būseną (angl. constitutively activated state), nustatoma pagal tokius kriterijus, kaip padidėjusi α -SMA ekspresija, kolageno depozicija, ekstraląstelinės matricos remodeliavimas (angl. ECM remodeling) ir sustiprėjusi ląstelių migracija (angl. cellular migration). Šios aktyvuoto CAF fenotipo ląstelės skatina naviko diferenciaciją (G3 diferenciacijos laipsnio pasikeitimą į G2), mažina sisteminį naviko išplitimą, metastazavimą ir didina imuninių ląstelių (įskaitant CD3+, CD8+, CD4+ T ląsteles ir makrofagus) infiltraciją. Pastebėtina, kad priešingai, nei CAF ląstelėse, stromoje aukšta Prrx1 ekspresija koreliuoja su agresyviu kasos duktalinės adenokarcinomos plokščiakūlinio potipio navikų išsivystymu ir blogesnėmis pacientų prognozėmis. Feldmann ir kt. atlikti in vitro bendroje terpėje kultivuojamų ląstelių eksperimentai, kartu pasitelkus trimačius kasos navikų organoidų modelius, suteikė informacijos apie tai, kad Prrx1 neekspresuojantys CAF (angl. Prrx1-deficient CAFs) slopina naviko ląstelių epitelio-mezenchimos tranzicijos procesą (angl. epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) ir kartu padidina kasos vėžio ląstelių jautrumą gemcitabino poveikiui. Mokslininkai šiuos įrodymus grindžia pastebėjimu, jog Prrx1 turintys CAF skatina epitelio-mezenchimos tranziciją ir atsparumą chemoterapijai per hepatocitų augimo faktoriaus (HGF) sekreciją (angl. HGF secretion) ir MET signalizavimo kelio (angl. MET pathway) aktyvaciją, taigi, minėtus poveikius galima neutralizuoti eliminavus (inaktyvavus) Prrx1 (angl. Prrx1 deletion). Tyrėjai taip pat akcentuoja Prrx1-HGF ašies svarbą, grindžiamą rekombinantinio HGF skatinamu mezenchiminio fenotipo atkūrimu ir bendrai kultivuojamų ląstelių modeliuose (angl. co-culture models) pastebėtu atsparumu chemoterapijai, siejama su šios ašies funkciniu aktyvumu. Be to, Feldmann ir kt. tyrimo metu pastebėta, kad Prrx1 trūkumas 3D kasos navikų ląstelių kultūrose sutrikdo CAF plastiškumą, neleidžiant ląstelėms sugrįžti į ramybės būseną (angl. quiescent state). Išanalizavę su vėžiu susijusių fibroblastų (CAF) genų raiškos profilius, tyrimo autoriai atskleidė, kad Prrx1 neekspresuojantiems CAF (angl. Prrx1-deficient CAF) buvo būdinga padidėjusi su ekstraląsteline matrica susijusių molekulinio signalizavimo kelių

raiška (angl. ECM-related pathways), o tuo tarpu Prrx1 ekspresuojantys CAF (angl. Prrx1-proficient CAFs) pasižymėjo padidėjusiu metaboliniu aktyvumu, be to, jiems buvo būdingi su RNR brendimu siejami žymenys (angl. RNA processing signatures). Tyrimo rezultatus pavyko patvirtinti in vivo sąlygomis, pasitelkus ortotopinius ir genetinius modelius, kuriuose buvo nustatytas padidėjęs ekstraląstelinės matricos baltymų (kolageno I, SPARC) kiekis, taip pat navikuose, kuriuose aptikta Prrx1 neekspresuojančių CAF, buvo atspindėta labiau diferencijuota naviko struktūra. Feldmann ir kt. tyrimo išvados įrodo, kad transkripcijos faktorius Prrx1 reguliuoja CAF tarpininkaujamą kasos naviko ląstelių ir stromos sąveiką (angl. CAF-driven tumor-stroma crosstalk), skatinančią vėžio invaziją, epitelio-mezenchimos tranziciją ir metastazavimą. Galimybė nukreipti gydymą, paveikiant su Prrx1 reguliacija susijusį CAF plastiškumą, teikia vilčių kasos vėžio gydymo kontekste: paverčiant naviko vystymąsi skatinančius CAF į naviką slopinančius CAF, būtų galima pagerinti terapines ligos išėtis [170].

Neseniai atliktame Broekgaarden ir kt. tyrime (2020 m.) buvo analizuojamas su vėžiu susijusių fibroblastų (angl. cancer-associated fibroblasts, CAFs) poveikis, skatinant gydymui atsparios kasos duktalinės adenokarcinomos vystymąsi ir kartu ieškota būdų, kaip įveikti šį terapinį iššūkį. Panaudodami naują 3D bendros ląstelių kultūros modelį (angl. 3D co-culture model), į kurio sudėtį buvo integruotos kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelės ir iš pacientų gauti su vėžiu susiję fibroblastai (CAFs), tyrėjai nustatė, kad CAFs reikšmingai padidina atsparumą chemoterapijai oksaliplatinos preparatu, taip pat fotodinaminei terapijai (angl. photodynamic therapy, PDT). Su vėžiu susijusių fibroblastų poveikis tirtuose modeliuose lėmė sustiprėjusį oksidacinį metabolizmą ir padidėjusią oksidacinio streso indukuojamą išlikimo baltymų ekspresiją (angl. stress-induced survival protein expression). Tyrimo rezultatai buvo patvirtinti ortotopiniame ksenografiniame modelyje: įrodyta, kad CAFs keičia kasos duktalinės adenokarcinomos navikų metabolizmą, lemia padidėjusią redokso būseną (angl. redox state) ir atsparumą gydymui oksaliplatinos chemoterapija. Kaip buvo nustatyta tyrimo metu, kombinuotas gydymas oksaliplatina ir antidiabetiniu vaistu metforminu (mitochondrijų komplekso I inhibitoriumi) arba taikant fotodinaminę terapiją kartu su metforminu veiksmingai sumažino su vėžiu susijusių fibroblastų sukeltą atsparumą, mažindamas oksidacinį stresą ir metabolinį plastiškumą. Be to, 3D heterotipinis kultūros modelis pranoko tradicinius 2D modelius, tiksliai atkurdamas svarbias naviko-stromos sąveikas ir įgalindamas detaliai tirti naviko elgesio mechanizmus.

Broekgaarden ir kt. taip pat pabrėžia su vėžiu susijusiems fibroblastams būdingų veiksmų, tokių kaip GLI2 ekspresija, svarbą naviko atsparumo mechanizmų išsivystymui ir susieja CAFs sukeliamus metabolizmo pokyčius su naviko ląstelių prisitaikymu išvengti gydymo. Šiuo aspektu tyrėjai atkreipia dėmesį, kad antidiabetinis vaistas metforminas galėtų tapti perspektyviu adjuvantiniu terapiniu agentu ir išryškina modulinės 3D mikronaviko platformos (angl. modular 3D heterotypic microtumor culture model) potencialą kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų kontekste, leidžiantį individualiai pritaikyti naviko metabolizmą veikiančius gydymo metodus konkrečiais ligos atvejais. Broekgaarden ir kt. straipsnyje pateikiama svarstymų ir apie galimą organoidų modelių pritaikymą testuojamų terapinių režimų efektyvumo stebėsenai. Mokslininkai siūlo perspektyvią idėją – detalioms ir atkartojamoms analizėms pasitelkti 3D ląstelių linijų pagrindu sukurtus modelius, tokius kaip šiame tyrime pritaikytas heterotipinis kasos mikronaviko modelis, o individualius pacientų organoidų modelius panaudoti gautų rezultatų patvirtinimui. Galiausiai tikimasi, kad šių

metodų derinimas tarpusavyje padėtų gauti svarbių įžvalgų apie naviko stromos veiksmų skatinamą kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumą chemoterapiniams vaistams, be to, tai suteiktų galimybę individualizuotai tirti vaistų poveikį su naviko savybėmis susijusiems metabolizmo pokyčiams [171].

Siekdami praktiškai pritaikyti šiuo metu sukauptas žinias apie kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkos savybes, Haque su kolegomis (2022 m.) atliko tyrimą, pagrindinį dėmesį skirdami kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkos sąlygų atkūrimui: įgyvendindami šį tikslą mokslininkai pasitelkė naviko ant lusto modelį (angl. tumor-on-a-chip device), jo kūrimui panaudodami pacientų kasos organoidus ir stromos ląsteles. Šis novatoriškas modelis įvardytas kaip perspektyvi tiriamoji ex vivo platforma, kurios privalumus būtų galima pritaikyti individualizuotos medicinos srityje, vaistų testavimui prieš paskiriant gydymą konkrečiam pacientui (angl. personalized medicine (PM)-based drug testing). Kaip tiriamąjį objektą tyrėjai pasirinko kasos duktalinės adenokarcinomos navikus - dėl šios onkologinės ligos ypač prastos prognozės ir pacientų išgyvenamumo rodiklių.

Kadangi organoidai suteikia galimybę imituoti numanomą pacientų atsaką į tikslinę terapiją, juos galima laikyti esminėmis tyrimo priemonėmis, padedančiomis identifikuoti pacientus, kuriems gali būti naudingas gydymas personalizuotos medicinos strategijomis pagrįstais metodais. Kaip žinoma, tradicinės organoidinės kultūros daugiausia sudaro duktalinio epitelio ląstelės, kurių savybės neatspindi kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkos sudėtingumo. Todėl pagrindinių stromos ir kartu naviko mikroaplinkos ląstelių, tokių kaip kasos žvaigždinės ląstelės (PSC), įtraukimas yra ypač svarbus kuriant kasos duktalinės adenokarcinomos navikų lustų modelius (angl. PDAC-on-a-chip model). Haque ir kt. tyrimo rezultatai patvirtino abipusę PSC ir kasos vėžio ląstelių sąveiką: PSC auginimas kartu su organoidų ląstelėmis padidino organoidų dydį ir paskatino kasos žvaigždinės ląsteles aktyviau sekretuoti kolageną. Suaktyvintos PSC buvo identifikuotos pagal žymenis, kaip antai, alfa lygiųjų raumenų aktiną (angl. alpha-smooth muscle actin, α -SMA) ir fibroblastų aktyvinimo baltymą-alfa (angl. fibroblast activation protein-alpha, FAP). Pastebėta, kad kasos žvaigždinės ląstelės prisidėjo prie vėžio ląstelių dauginimosi išskirdamos augimo faktorius, uždegiminius citokinus ir chemokinus.

Haque su kolegomis taip pat pabrėžė su naviku susijusių makrofagų (angl. of tumor-associated macrophages, TAMs) svarbą kasos duktalinės adenokarcinomos progresavimui, atsparumui chemoterapijai ir epitelio-mezenchimos perėjimui (angl. epithelial-to-mesenchymal transition EMT). Pastebėta, kad su naviku susiję makrofagai, gausiausias imuninių ląstelių tipas kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkoje, įgyja fenotipinių pokyčių ir gali skatinti naviko invaziją. Tyrėjai nustatė, kad vėžio epitelinių ląstelių kultivavimas kartu su monocitais padidino vėžio ląstelių proliferaciją ir invaziškumą, palaikomą ekstraląstelinės matricos (angl. ECM remodeling) remodeliavimo.

Vienas iš navikų lustų modelių privalumų, darančių juos pranašesnius už tradicinės šulinėlių plokšteles (angl. traditional well plates), yra jų suteikiama galimybė nenutrūkstamai aprūpinti ląsteles maistinėmis medžiagomis ir deguonimi: kasos vėžio organoidai, kultivuojami bendroje kultūroje su stromos ląstelėmis, tam pritaikytoje naviko lusto platformoje, Haque ir kt. tyrimo metu pademonstravo reikšmingą augimo spartą. Iš pacientų išskirtų pirminių kasos vėžio ląstelių, taip pat fibroblastų ir makrofagų įtraukimas į naviko lusto modelio sudėtį sėkmingai atkūrė auglio augimą skatinančią aplinką, pastebimą kasos duktalinės adenokarcinomos atveju.

Naviko lusto modelio potencialą, pritaikant šią tiriamąją sistemą vaistų atrankai, įrodė sėkmingi bandymai paveikti stromą tyrėjų pasirinktomis priešstrominėmis medžiagomis (angl. anti-stroma agents), tokiomis kaip ATRA (angl. all-trans retinoic acid) ir liposominis klodronatas (angl. liposomal clodronate). Tyrimo metu išsiaiškinta, kad ATRA sukėlė kasos žvaigždinių ląstelių ramybės būseną, sumažindamas aplinkinių vėžio ląstelių proliferaciją, o klodronatas, kurio poveikis buvo nukreiptas į su naviku susijusius makrofagus (angl. tumor-associated macrophages, TAMs), veiksmingai sumažino naviko augimą in vivo.

Nors mikroskysčių lustai, pagaminti iš polidimetilsiloksano (PDMS), plačiai naudojami ląstelių kultūrų tyrimuose, kuomet ląstelės inkubuojamos su hidrofobinėmis vaistų molekulėmis, poringas ir hidrofobinis lustų medžiagos pobūdis lemia greitą vaistų molekulių absorbciją. Taigi, galima tikėtis, kad mikroskysčių lusto perfuzuotoje terpėje (angl. perfused medium) bus pasiekama mažesnė vaisto, kurį galėtų įsisavinti ląstelės, koncentracija. Nepaisant galimų PDMS lustų naudojimo apribojimų, Haque ir kt. tyrimas atskleidė, kad chemoterapijos derinys su stromą ardančiomis medžiagomis turėjo reikšmingos įtakos vėžio ląstelių žūčiai. Be to, tyrimo rezultatai taip pat parodė, kad PDMS lustų absorbcija turėjo minimalų poveikį vaistų testavimo rezultatams: konkrečiu atveju - dėl mažo gemcitabino pasiskirstymo koeficiento (angl. low partition coefficient), atspindinčio terapinio agento hidrofilinį pobūdį, ir naviko lusto platformoje užtikrinamos nuolatinės vaisto perfuzijos. Galiausiai tyrėjai pabrėžė būtinybę atlikti būsimus tyrimus, kad būtų sprendžiami tokie iššūkiai kaip HLA fenotipų nustatymas ir imuninių ląstelių įtraukimas į individualius kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų navikų lustų modelius [172].

Apibendrinus mokslinėje literatūroje pateikiamų tyrimų duomenis, galima teigti, jog tokie kasos duktalinės adenokarcinomos navikų mikroaplinkos komponentai, kaip antai, su vėžiu susiję fibroblastai, tanki naviko stroma bei joje dominuojančios aktyvuotos kasos žvaigždinės ląstelės, turi reikšmingos įtakos kasos navikų išvystomam terapiniam atsparumui. Viliamasi, kad kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai artimiausiu metu suteiks daugiau galimybių išsamiau tirti naviko-stromos sąveikas ir imuninio atsako mechanizmus. Be to, inovatyvių ląstelių kultivavimo metodų taikymas, navikų organoidų kultūras integruojant į mikroskysčių platformas (suformuojant „naviko ant lusto“ modelius), kaip tikimasi, gali padėti dar tiksliau imituoti dinamiškas kasos navikų mikroaplinkos sąlygas bei vertinti šiose tiriamosiose sistemose testuojamų kasos duktalinės adenokarcinomos vaistų terapinių poveikių pokyčius.

Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių pritaikymas ligos diagnostinių ir terapinių (teranostinių) biožymenų aptikimui

Nepaisant vis tobulėjančių kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo galimybių, šia liga sergančių pacientų išgyvenamumo rodikliai išlieka žemi, kadangi dažniausiai kasos vėžys diagnozuojamas išsivysčius jau pažengusioms ligos stadijoms. Svarstant apie tai, kaip būtų galima užkirsti kelią kasos duktalinės adenokarcinomos pasireiškimui, aktualių aspektų pirmiausia laikytinas pacientų atrankos, pasitelkiant specifinius vėžio biožymenis, tikslumas.

Šiuo metu bene plačiausiai klinikinėje praktikoje kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostikai pasitelkiamas biožymuo yra angliavandenių antigenas CA19-9 (sialyl-Lewis^a) [173]. Kraujo serume CA19-9 yra aptinkamas nuo 10% iki 30% pankreatito ir net apie 75%

kasos vėžio atvejų, be to, nustatomas ir kitomis gastrointestininėmis ligomis sergančiųjų pacientų kraujo mėginiuose [174]. CA19-9 žymens kiekio padidėjimas kraujo serume nustatomas ir kasos intraepitelinė neoplazijų atvejais (angl. pancreatic intraepithelial neoplasms, PanINs), o šie intraepiteliniai pokyčiai yra įvardijami kaip kasos duktalinės adenokarcinomos prekursoriai [174]. Visgi apie 5-10 % kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų kraujo serume Lewis glikoproteinas neaptinkamas (šių pacientų organizme CA19-9 negaminamas), todėl remiantis CA19-9 biožymens aptikimu ir siekiant nustatyti kasos duktalinės adenokarcinomos diagnozę, gali būti gaunami klaidingai neigiami rezultatai. Be to, pastebėta, kad Lewis-neigiamų pacientų paplitimas priklauso nuo etninės grupės (pvz., iki 22 % afroamerikiečių neekspresuoja CA19-9) [173].

Mokslininkai svarsto, jog CA19-9 būtų galima pasitelkti ir kaip terapinį taikinį, galintį pasitarnauti ieškant efektyvesnio kasos ligų gydymo galimybių. Kaip parodė Engle ir kt. atlikto tyrimo (2019 m.) rezultatai, indukuota CA19-9 ekspresija pelės organizme sukėlė sunkų pankreatitą, susijusį su epiderminio augimo faktoriaus receptoriaus (EGFR) signalų hiperaktyvacija. Tyrimo metu taip pat nustatyta, kad CA19-9 geba modifikuoti fibuliną-3 – matriceliulinį baltymą (angl. matricellular protein), sustiprindamas šio baltymo sąveiką su EGFR ir paskatindamas EGFR aktyvumą. Be to, pastebėta, kad fibulino-3, CA19-9 arba EGFR ligandų blokavimas sugrąžina EGFR būdingą normalų aktyvumą, tuo pabrėžiant CA19-9 svarbą pankreatito patogenezėje. Be to, Engle ir kt. atkreipė dėmesį, kad CA19-9 sąveika su onkogenine KrasG12D mutacija turi reikšmės skatinant agresyvaus kasos vėžio vystymąsi. Tyrimo metu įsitikinta, kad CA19-9 antikūnai padeda slopinti pankreatito progresavimą, kadangi in vivo sąlygomis jų poveikis lėmė sumažėjusią imuninių ląstelių infiltraciją, kasos latakų metaplaziją ir fibrozę. Kartu Engle ir kt. tyrimo rezultatai suteikė vertingų įžvalgų apie glikozilinimo mechanizmus, svarbius pankreatito ir kasos vėžio patogenezėje, bei įrodymų apie CA19-9, kaip perspektyvaus terapinio taikinio, potencialą [174].

Greta CA19-9, kaip terapinio taikinio, privalumų, atkreiptinas dėmesys į šio angliavandenių antigeno, kaip diagnostinio biožymens, trūkumus, siejamus su nepakankamu specifiskumu numatant kasos ligų prognozes ir apsisprendžiant dėl tinkamų gydymo metodų pasirinkimo. Kaip pastebima Kinny-Köster ir kt. straipsnyje (2021 m.), šiuo metu vilčių kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostikos srityje teikia nauji biomarkeriai, tokie kaip cirkuliuojanti naviko DNR (ctDNA), aptinkama naudojant modernias naujos kartos sekoskaitos technologijas, ir cirkuliuojančios naviko ląstelės (CTC), kuriuos galima laikyti perspektyviomis alternatyvomis CA19-9 biožymeniui, kadangi minėti biomarkeriai gali suteikti daugiau informacijos apie kasos navikų mutacinius profilius (pvz., KRAS mutacijas), sisteminę išplitimą (diseminaciją) ir atsaką į chemoterapinius vaistus efektyvumą. Kinny-Köster ir kt. pastebi, kad ctDNR pasiteisino prognozuojant kasos vėžio histologinę regresiją ir ligos atsinaujinimą, o šio biožymens prognostinis jautrumas didėja vėlesnėse ligos stadijose. Be to, cirkuliuojančios naviko ląstelės (CTC), aptinkamos kraujyje net po taikytos chemoterapijos, atspindi epitelio-mezenchimos tranziciją – procesą, svarbų metastazių susiformavimui, o šių ląstelių buvimas periferiniame kraujyje yra susijęs su ligos atsinaujinimu ir prastesne išgyvenimo prognoze. Iš pacientų navikų biopsinės medžiagos sukurti organoidų modeliai (PDO), galintys imituoti in vivo naviko biologiją, Kinny-Köster straipsnyje taip pat įvardijami kaip papildoma tiriamoji platforma, įgalinanti individualizuotą chemoterapijos planavimą, remiantis farmakotipavimo analizės rezultatais, o kartu ir padedanti geriau suprasti naviko kloninės evoliucijos mechanizmus gydymo metu. Straipsnyje minimų biomarkerių

(ctDNR ir CTC), gaunamų iš skystųjų biopsinių ėminių, taip pat alternatyvių tiriamųjų platformų, kaip antai, pacientų organoidų modelių, pasitelkimas kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose gydytojams galėtų leisti stratifikuoti pacientus pagal naviko biologinę dinamiką, optimizuoti chirurginės intervencijos laiką ir koreguoti gydymo strategijas, atsižvelgiant į individualias paciento naviko savybes. Kaip pažymi tyrimo autoriai, ateityje turėtų būti skiriama dėmesio aprašytų naujų biomarkerių (ctDNR ir CTC), taip pat individualių pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių diagnostinių galimybių derinimui su CA19-9 biomarkerio nustatymu, siekiant sukurti išsamų, neinvazinį diagnostinį kasos vėžio įrankį, kuris padėtų pagerinti gydymo tikslumą ir rezultatus, ypač lokalizuotu pažengusiu kasos vėžiu sergantiems pacientams [173].

Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai gali būti pasitelkiami kaip tiriamasis įrankis, taikytinas kuriant transkriptominius chemoterapinio jautrumo biožymenis. Chemoterapinio atsako prognozavimui sukurtas biožymens pavyzdį neseniai pateikė Nicolle ir kt., atlikę tyrimą (2022 m.), kurio metu buvo siekiama patobulinti RNR pagrįstą transkriptominį žymenį (angl. RNA-based signature), vadinamą GemPred, kuris padeda numatyti gemcitabino, kaip adjuvantinio terapinio agento, veiksmingumą gydant kasos duktalinę adenokarcinomą sergančius pacientus. Iš pradžių GemPred žymuo, tyrėjų sukurtas panaudojus 2D pirminių ląstelių kultūras (angl. 2D primary cell cultures), parodė reikšmingą sąsają su jautrumu gemcitabinui, tačiau jo platesnį pritaikomumą apribojo tai, jog šis žymuo buvo šališkas vertinant gemcitabino efektyvumą baziniu molekulinio fenotipu pasižyminčiuose navikuose. Siekdami pagerinti eksperimentines sąlygas, tinkamas GemPred biožymens prognostinio potencialo vertinimui, mokslininkai iš kasos duktalinę adenokarcinomą sergančių pacientų biopsijų mėginių sukūrė 3D organoidų modelius, kurie atkartojo platų spektrą molekulinį kasos vėžio fenotipų, tarp jų ir klasikinio kasos duktalinės adenokarcinomos potipio navikų savybes. In vitro sąlygomis gemcitabino jautrumas buvo vertinamas pagal tokius kriterijus, kaip stiprumas (angl. potency, IC50), veiksmingumas (angl. efficacy, Einf) ir plotas po dozės-atsako kreive (angl. area under the dose-response curve, AUC). Iš biopsijų sukurtuose pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos modeliuose aptikti 77 transkriptomų variantai, kurie tiksliai atspindėjo biologines navikų ypatybes, atliekant chemograminę analizę (angl. chemogram measurements). Atkreiptinas dėmesys, jog dviejų genų – CDA ir hENT1 – raiškos lygmenys nuosekliai koreliavo su gemcitabino jautrumu tiek tirtuose 2D, tiek 3D modeliuose. GemPred žymens patobulinimai apėmė duomenų iš 2D ir 3D modelių sutelkimą: tyrimo metu atlikta nepriklausoma komponentinė analizė (angl. independent component analysis) ir pritaikyta išsami paieškos strategija (angl. multi-objective exhaustive search) pagerino žymens koreliaciją su gemcitabino jautrumą atspindinčiais kriterijais. Žymens patikimumo patvirtinimui tyrėjai suformavo patvirtinimo kohortą (angl. validation cohort), į kurią buvo įtraukti 385 operuoti kasos duktalinę adenokarcinomą sergantys pacientai (iš jų 130 buvo taikytas adjuvantinis gydymas gemcitabinu), bei nustatyta, kad GemPred žymuo pasižymėjo reikšminga prognostine verte. GemPred+ pacientų, kurie buvo gydyti gemcitabinu, išgyvenamumo rodikliai buvo geresni nei gemcitabinu negydytų pacientų: GemPred+ pacientų bendras 5 metų išgyvenamumas buvo 55,4 %, o 5 metų išgyvenamumas be ligos progresavimo siekė 46,4 %. Tuo tarpu GemPred- pacientų išgyvenamumo rodikliai buvo panašūs nepriklausomai nuo gydymo gemcitabinu. Taip pat svarbu paminėti, kad, remiantis daugiamačių analizių duomenimis, patobulintas GemPred žymuo tapo nepriklausomas nuo klasikinio/bazinio kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipo spektro ir išlaikė prognostinę reikšmę esant skirtingoms vėžio stadijoms, naviko diferenciacijos procesams bei dydžio

variacijoms. Atsižvelgiant į kasos duktalinės adenokarcinomos agresyvumą ir vėlyvą diagnozę, tyrimo metu buvo siūloma įprastu būdu atlikti transkriptomines diagnostinių biopsijų analizės, siekiant optimizuoti pacientų gydymo strategijas. Mokslininkai pabrėžia potencialią GemPred naudą, kasos duktaline adenokarcinoma sergantiems pacientams parenkant tinkamus gemcitabinu pagrįstus gydymo režimus (monoterapiją ir terapijų kombinacijas), kurių veiksmingumas būtų panašus į intensyvios polichemoterapijos (pavyzdžiui mFOLFIRINOX) efektą, tačiau pasižymėtų mažesniu toksiškumu. Nicolle ir kt. tyrimo išvados leidžia tikėtis, kad integruojant skirtingų modelių (2D ir 3D) stebėjimų duomenis galima įveikti atskirai naudojamų tiriamųjų sistemų apribojimus ir sukurti patikimus prognostinius įrankius, taikytinus personalizuotos onkologijos srityje [175].

Vėliau atliktame Nicolle ir kt. tyrime (2024 m.) buvo vertinama transkriptominio žymens “GemPred” predikcinė vertė, numatant kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų, kuriems buvo atlikta naviko rezekcija ir kurie buvo įtraukti į PRODIGE-24/CCTG PA6 tyrimą, jautrumą gemcitabino (GEM) chemoterapijai. Tyrėjai sukūrė GemPred transkriptominį žymenį, panaudodami ląstelių linijų ir organoidų tiriamuosius modelius, taip pat atliko 350 pacientų chirurginių mėginių RNR sekoskaitą ir 25,5 % mėginių identifikavo kaip GemPred teigiamus (angl. GemPred-positive), GemPred1. Remdamiesi RNR sekoskaitos duomenimis, Nicolle ir kt. suskirstė pacientus į grupes – GemPred1 ir GemPred-. Gydymo gemcitabinu grupėje GemPred1 pacientams (n=50, 30 %) buvo būdingas reikšmingai ilgesnis išgyvenimo be ligos laikotarpis (angl. disease-free survival, DFS) ir geresnis specifinio su vėžiu susijusio išgyvenamumo rodiklis (angl. cancer-specific survival, CSS), palyginus su GemPred neigiamais pacientais (GemPred-; n=117, 70 %). Vidutinis GemPred1 pacientų išgyvenimo be ligos laikotarpis (DFS) buvo 27,3 mėnesio, GemPred- pacientų - 10,2 mėnesio, o vidutinis specifinis su vėžiu susijęs GemPred1 pacientų išgyvenamumo laikotarpis (CSS) GemPred1 pacientams buvo 68,4 mėnesio, palyginus su 28,6 mėnesio GemPred- pacientų grupėje. Kaip parodė tyrimo rezultatai, GemPred neturėjo prognostinės vertės modifikuoto FOLFIRINOX (mFFX) gydymo grupėje, kur DFS ir CSS buvo panašūs tarp GemPred1 ir GemPred- pacientų. Be to, Nicolle ir kt. tyrimo metu pastebėta, jog GemPred1 pacientų gydymo rezultatai buvo panašūs GEM ir mFFX gydymo režimų grupėse (atitinkamai DFS: 27,3 ir 24 mėnesiai; CSS: 68,4 ir 51,4 mėnesio), taip pat GEM sukėlė reikšmingai mažiau sunkių (≥ 3 laipsnio) šalutinių reiškinių nei mFFX chemoterapija (pacientų grupėse pagal taikytą gydymą GEM ir mFFX, šalutinių reakcijų dažniai atitinkamai siekė 40 % ir 76 %). Visgi svarbu atkreipti dėmesį į vieną tam tikrus šio tyrimo apribojimus, kaip antai, BRCA1/2 mutacijų ir homologinių reparacijos trūkumų (angl. homologous repair deficiencies) nevertinimą, – neturint šių duomenų sudėtinga vertinti, ar GemPred1 ir HRD navikų gydymui turėjo būti indikuotina terapija gemcitabinu, ar FOLFIRINOX režimu. Nepaisant paminėtų trūkumų, Nicolle ir kt. tyrimo išvados įrodo GemPred1 prognostinę vertę, nustatant kasos duktalinės adenokarcinomos navikų jautrumą gydymui gemcitabinu, ir kartu leidžia tikėti, kad šis biožymuo galėtų būti pritaikomas adjuvantinės terapijos parinkimui, ypač pacientams, kurie netoleruoja mFFX dėl toksinių šalutinių poveikių. Kaip pažymi mokslininkai, GemPred1 prognostinės reikšmės įtvirtinimui dar reikalinga atlikti tolimesnius šio biožymens pritaikymo skirtinguose klinikiniuose kontekstuose tyrimus (pvz., pasirenkant neoadjuvantinę chemoterapiją arba gydant lokaliai pažengusius, metastazavusius kasos duktalinės adenokarcinomos navikus) [176].

Pasitelkiant pažangias duomenų analizavimo technologijas, pastaraisiais metais identifikuojama vis daugiau naujų su kasos vėžio atsparumu chemoterapijai siejamų

molekulinių žymenų. Neseniai Zheng ir kt. atlikto tyrimo (2023 m.) rezultatai parodė, kad vienas pagrindinių kasos duktalinės adenokarcinomos navikų rezistentiškumą oksaliplatinos chemoterapijai lemiančių veiksnių yra žiedinė RNR molekulė circBIRC6, dalyvaujanti DNR taisymo mechanizmų veikloje ir sąveikaujanti su naviko mikroaplinka. Pasitelkus aukštos skiriamosios gebos sekos analizės duomenis, atskleista, jog circBIRC6 raiška yra reikšmingai padidėjusi ekstraląstelinėse pūslelėse (angl. extracellular vesicles, EV), išskirtose iš su vėžiu asocijuotų fibroblastų (CAF), palyginus su jų raiška normaliuose fibroblastuose; be to, ir circBIRC6 raiška sietina su trumpesniu išgyvenimo be ligos rodikliu (angl. progression-free survival, PFS) tarp pacientų, kurie buvo gydyti oksaliplatina pagrįsta chemoterapija. Išsiaiškinta, kad circBIRC6 yra gausiai ekspresuojamas CAF ląstelėse, supakuojamas į ekstraląstelines pūsleles ir perduodamas į vėžines ląsteles, taip paskatinant naviko atsparumą oksaliplatinai tiek in vitro, tiek in vivo sąlygomis. Funkciniu požiūriu circBIRC6 stiprina DNR taisymo procesus tiesiogiai prisijungdamas prie XRCC4 baltymo ir skatindamas jo potransliacinę modifikaciją – SUMOilizaciją (angl. SUMOylation), t. y. SUMO baltymo prisijungimą prie XRCC4 ties 115-ąja lizino pozicija, taip palengvinant XRCC4 nukreipimą ir prisijungimą prie specifinių DNR pažeidimo vietų. Visa tai paskatina XRCC4 lokalizuotis atitinkamose chromatinio vietose, kur reikalinga DNR reparacija, o kartu padidėja ir XRCC4 efektyvumas taisant dvigrandžius DNR lūžius (angl. double-strand breaks, DSBs) per mechanizmus, priklausomus nuo nehomologinio galų sujungimo (angl. non-homologous end joining (NHEJ)-dependent repair). Zheng ir kt. taip pat atkreipė dėmesį, kad circBIRC6 slopinimas (angl. silencing) sumažino XRCC4 baltymo SUMOilizaciją ir panaikino jo poveikį, susijusį su atsparumu chemoterapijai, o XRCC4 baltymo K115R mutacija neutralizavo circBIRC6 sukeltą naviko rezistentiškumą gydymui oksaliplatina. Funkciniai eksperimentai parodė, kad CAF kilmės ekstraląstelinės pūslelės, savo sudėtyje turinčios circBIRC6, padidino kasos vėžio ląstelių ir organoidų išgyvenamumą gydymo oksaliplatina metu: pastebėta, jog žiedinė RNR - circBIRC6 - skatino efektyvų DNR pažaidų taisymą ir padėjo naviko ląstelėms išvengti apoptozės. Be to, išsiaiškinta, kad in vivo sąlygomis circBIRC6 slopinimas pagerino chemoterapijos efektyvumą ksenograftų modeliuose, o circBIRC6 slopinimą derinant su olaparibu dar labiau padidėjo kasos duktalinės adenokarcinomos navikų jautrumas gydymui oksaliplatina. Zheng ir kt. atliktos klinikinės analizės rezultatai atskleidė, kad dideli kraujo plazmoje (ekstraląstelinėse pūslelėse) aptinkami circBIRC6 kiekiai plazmoje koreliavo su prastu atsaku į oksaliplatiną, tačiau ne į kitus taikytus chemoterapinius vaistus. Šie tyrimo radiniai leido mokslininkams patvirtinti circBIRC6, kaip biožymens, prognozinę reikšmę, taip pat susiejant padidėjusią šios žiedinės RNR molekulės raišką su sumažėjusiu fosforilintos formos histono H2AX (γ H2AX) – ankstyvo DNR pažaidos rodiklio - ekspresijos lygiu. Taigi, galima teigti, jog Zheng ir kt. tyrimo rezultatai atspindi žiedinės RNR - circBIRC6 - svarbą, pastebimą nagrinėjant kasos duktalinės adenokarcinomos navikų chemoterapinio atsparumo mechanizmus, siejamus su padidėjusia šios žiedinės RNR molekulės raiška CAF kilmės ekstraląstelinėse pūslelėse ir dalyvavimu NHEJ taisymo procesuose, todėl viliamasi, kad circBIRC6 galėtų tapti nauju terapiniu taikiniu, gydant kasos vėžiu sergančius pacientus [177].

Vertingų įžvalgų apie chemoterapijai atsparių kasos duktalinės adenokarcinomos navikų identifikavimo ir su tuo susijusio pacientų stratifikavimo galimybes pateikiama Gao ir kt. straipsnyje (2021 m.). Mokslininkai iškėlė hipotezę, kad glikano biožymuo, sialilintas su naviku susietas antigenas (angl. sialylated tumor-related antigen, sTRA), gali būti atsparumo chemoterapijai indikatoriumi kasos duktalinės adenokarcinomos navikuose. Pasitelkę įvairias tiriamąsias sistemas, įskaitant ląstelių linijas, organoidus ir izogenines ląstelių linijas, taip pat

pirminius navikus ir žmonių kraujo plazmą, tyrėjai nustatė, kad kasos duktalinės adenokarcinomos modeliuose, ekspresuojančiuose sTRA, stebima kamieninių ląstelių genų ekspresija (angl. stem-like gene expression) ir mezenchiminė diferenciacija (angl. mesenchymal differentiation). Mokslininkai pastebėjo, kad sTRA ekspresuojantys modeliai taip pat buvo žymiai atsparesni septyniems dažniausiai naudojamiems chemoterapiniams preparatams. Pacientai, kurių navikuose buvo nustatyta sTRA ekspresija, nepatyrė teigiamo poveikio po adjuvantinės chemoterapijos, kaip patvirtino dviejų tirtų grupių rezultatai, vertinti atsižvelgiant į genų ekspresijos klasifikatorius (gene expression classifiers) ir audinių mikromatrices (angl. tissue microarrays). Be to, kraujo plazmos tyrimas, skirtas sTRA aptikimui, padėjo tiksliai identifikuoti kasos duktalinės adenokarcinomos navikus, linkusius patirti greitą atkrytį po neoadjuvantinės chemoterapijos.

Mokslininkai atkreipia dėmesį, kad reikšmingas sTRA biožymens naudojimo klinikinėje praktikoje pranašumas būtent ir yra siejamas su galimybe šį žymenį aptikti atliekant kraujo tyrimą, todėl tikimasi, kad šio biožymens pagrindu sukurti diagnostiniai algoritmai leistų gydytojams paprasčiau stratifikuoti pacientus prieš gydymą, be specialaus reikalavimo atlikti kasos biopsiją. Šiuo metu egzistuoja įvairių kraujo tyrimų, kuriuos atliekant galima aptikti mutavusią DNR, naviko egzosomas ir metabolitus. Tokie tyrimai gali praversti kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostikai, tačiau jie paprastai nenumato pacientų terapinių atsakų. Pavyzdžiui, nors padidėjęs CA19-9 žymens kiekis ir šio rodiklio nesugrįžimas į normos intervalą po neoadjuvantinio gydymo ar operacijos klinikinėje praktikoje yra laikomi nepalankiais kasos vėžio prognostiniais veiksniais, visgi CA19-9 pirmiausia yra naviko tūrio rodiklis, o ne atsparumo chemoterapijai prediktorius. Gao ir kt. straipsnyje atkreipiamas dėmesys, jog kitaip nei CA19-9, sTRA biožymuo padeda aptikti skirtingus biologinius kasos duktalinės adenokarcinomos potipius ir koreliuoja su nustatytu atsparumu chemoterapijai.

Be to, tyrėjai akcentuoja, kad kartu atliekamas sTRA ir CA19-9 biožymenų nustatymas gali būti naudingas diagnozuojant kasos duktalinę adenokarcinomą ir ligos monitoravimo tikslais (angl. in surveillance settings). Pastebėtina, jog sTRA biožymeniu gali būti identifikuojami gydymui atsparūs klasikinio ir bazinio potipių kasos duktalinės adenokarcinomos navikai, visgi kartu atkreiptinas dėmesys, kad sTRA biožymuo nenustato blogos ligos prognozės. Pavyzdžiui, jei pacientas turi aukštą sTRA arba CA19-9 (arba abiejų) biožymenų kiekį, tai turėtų tapti indikacija atlikti tolesnius tyrimus, siekiant patvirtinti arba paneigti vėžio diagnozę. Tais atvejais, kai pacientui diagnozuojamas kasos vėžys, tikėtina, kad navikas, kurį tiriant aptinkamas padidėjęs sTRA biožymens kiekis, bus atsparesnis chemoterapijai, palyginus su naviku, neišskiriančiu sTRA. Tačiau pagrindinis sTRA panaudojimo gydymo atsakui prognozuoti trūkumas yra tai, kad kai kurie chemoterapijai atsparūs kasos duktalinės adenokarcinomos navikai gali būti neatpažįstami, kadangi negamina sTRA antigeno. Gao ir kolegų atliktame tyrime, kuriame dalyvavę pacientai buvo gydomi neoadjuvantine terapija, 47 % pacientų stebėtas trumpas laikotarpis iki ligos progresavimo (angl. time to progression, TTP), tačiau tik 25 % šių pacientų plazmoje buvo nustatytas didelis sTRA kiekis. Tai rodo, kad nors tyrime buvo identifikuota didelė dalis atsparių vėžio formų, kai kurie navikai neišskyrė pakankamai sTRA antigeno, kad jį būtų galima aptikti kraujyje. Pavyzdžiui, AsPC-1 ląstelių linija, kuri pasižymi dideliu atsparumu chemoterapijai, yra sudaryta iš ląstelių, kurios išreiškia sTRA antigeną savo paviršiuje, bet nepakankamai jį sekretuoja. Taip pat pabrėžtina, kad sTRA kiekio nustatymo riba gali skirtis priklausomai nuo laboratorijose nustatytų standartų. Ankstesniuose ligos monitoravimo tyrimuose buvo naudojamos ribinės sTRA nustatymo

vertės, pagal kurias buvo identifikuoti apie 65% pacientų, o ribiniai rodikliai, kurie buvo optimizuoti gydymo atsakui numatyti, užfiksavo mažesnę procentinę pacientų dalį.

Gao ir kt. atlikto tyrimo išvados rodo, kad sTRA glikanas gali būti naudojamas kaip biožymuo, padedantis identifikuoti kasos duktalinės adenokarcinomos navikus, kurie pasižymi dideliu atsparumu chemoterapijai. Viliamasi, jog šio biožymens pasitelkimas klinikinėje praktikoje galėtų praversti kuriant individualizuotas gydymo strategijas ir biomarkerių identifikavimu pagrįstus kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostinius metodus. Kaip pažymi straipsnio autoriai, tiksliai sTRA biožymens prognostinė reikšmė numatant kasos vėžiu sergančių pacientų terapinius rezultatus dar turėtų būti patvirtinta atliekant didesnės apimties, išsamesnius perspektyvinius tyrimus [178].

Literatūroje pateikiami duomenys iš biožymenų nustatymu pagrįstų kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų suteikia vertingos informacijos apie kasos duktalinės adenokarcinomos potipius, siejamus su didesniu piktybiškumo potencialu ir blogesnėmis pacientų klinikinėmis prognozėmis. Ruta ir kt. (2024 m.) tyrimo metu buvo nustatytas kasos duktalinės adenokarcinomos potipiui specifinis splaisingo biožymuo (angl. subtype-specific splicing signature) bei paminėta splaisingo faktoriaus Quaking (angl. splicing factor Quaking, QKI) reikšmė agresyvaus, bazalinio kasos vėžio fenotipo (angl. basal-like phenotype) išsivystymui. Tyrėjai, atlikę kasos duktalinės adenokarcinomos mėginių transkriptominę analizę (pasiremdami TCGA ir nepriklausomų kohortų duomenimis), užfiksavo 35 skirtingų variacijų splaisingo įvykius (angl. differentially regulated splicing events), tarp kurių dažniausiai pasitaikė egzono kasetės (angl. exon cassette) splaisingo variacija. Pagal transkriptominės analizės identifikuotus molekulinis skirtumus, kasos navikų mėginiai buvo suskirstyti į atitinkamus potipius – klasikinį ir bazinį. Bazinio potipio navikuose, paprastai pasižyminčiuose blogesne prognoze, buvo stebimas QKI reguliuojamų splaisingo įvykių padidėjimas molekulinuose keliuose, susijusiuose su WNT signalizavimu (angl. WNT signaling), ekstraląstelinės matricos struktūriniu persitvarkymu (angl. extracellular matrix organization) ir vėžinių ląstelių migracija. Tyrimo autoriai atkreipia dėmesį, jog QKI ekspresija koreliavo su bazinio kasos duktalinės adenokarcinomos potipio žymenimis, slopino klasikiniam potipiui būdingus splaisingo įvykius ir skatino baziniam potipiui būdingus splaisingo įvykius, pvz., 33 egzono įtraukimą į subrendusį SEC16A mRNR transkriptą, kuris siejamas su prasta kasos vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumo prognoze. Mokslininkai išsiaiškino, kad QKI faktorius skatina mezenchiminio kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipo vystymąsi, taip padidinant vėžinių ląstelių migraciją ir atsparumą chemoterapijai tirtose kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijose ir organoiduose. Svarbu paminėti, kad QKI faktorius tiesiogiai reguliuoja splaisingo procesus per savo prisijungimo motyvą (angl. binding motif, ACTAAC), esantį šalia taikinių egzonų, ir turi įtakos maždaug 32 % splaisingo įvykių, būdingų baziniam naviko potipiui. Taigi, QKI slopinimas reikšmingai sumažina baziniam potipiui būdingas savybes, atkuria klasikinio splaisingo mechanizmus ir padidina jautrumą chemoterapijai, taikant gydymą irinotekanu ir mFOL režimu. Imunohistocheminių tyrimų rezultatai taip pat parodė, kad QKI ekspresija yra aukštesnė aukštos diferenciacijos ir metastaziniuose navikuose, palyginus su šio faktoriaus raiška gerai diferencijuotuose vėžiniuose pažeidimuose. Ruta ir kt. tyrimo radinius patvirtino ir vienos ląstelės analizė (angl. single-cell analyses) duomenys – įrodyta, kad QKI yra susijęs su intranavikiniu heterogeniškumu, yra dažniau aptinkamas bazalinėse ląstelėse ir atvirkščiai koreliuoja su klasikinių žymenų (angl. classical markers), tokių kaip GATA6, ekspresija. Be to,

tyrimo autoriai pažymi, jog kartu derinant QKI ir GATA6 žymenų ekspresijos lygių įvertinimus pagerėja kasos duktalinės adenokarcinomos potipių klasifikavimo tikslumas. Tyrimas parodė, kad QKI vaidina svarbų vaidmenį epitelio-mezenchimos perėjimo (EMT) procese, taip pat turi įtakos ląstelių plastiškumo vystymuisi, naviko metastazavimui ir atsparumui chemoterapijai. Remiantis Ruta ir kt. tyrimo išvadomis, galima teigti, kad QKI yra vienas pagrindinių kasos duktalinės adenokarcinomos piktybiškumo molekulinį variklių, turintis įtakos epitelio-mezenchimos perėjimo (EMT) procesui bei vėžio ląstelių plastiškumui. Tyrimo autoriai pabrėžia splaisingo faktoriaus QKI reikšmę kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių metastazavimui ir atsparumo chemoterapijai išsivystymui, todėl pritaikius gydymą, nukreiptą į šį faktorių, kaip potencialų terapinį taikinį, būtų tikimasi sumažinti kasos vėžio progresavimą ir pagerinti šia liga sergančių pacientų klinikines išėitis [179].

Vertinant pastaraisiais metais mokslinėje literatūroje aprašomų kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų tendencijas, svarbu paminėti, jog kasos vėžio diagnostikos ir gydymo pažangai tvirtą pagrindą suteikia identifikuojami nauji kasos navikų biožymenys. Nors angliavandenių antigenas CA19-9 šiuo metu yra bene plačiausiai klinikinėje praktikoje taikomas kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostinis žymuo, jo specifiskumas nėra aukštas, todėl mokslininkai tiria alternatyvių biožymenų, tokių kaip cirkuliuojanti naviko DNR (ctDNR) ir cirkuliuojančios naviko ląstelės (CTC), prognostinį potencialą, galintį suteikti tikslesnės informacijos apie naviko biologiją ir ligos progresavimą. Pasitelkus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius tyrėjams pavyksta nustatyti naujus transkriptominius biožymenis (pavyzdžiui, jautrumo gemcitabinui žymenį GemPred), kurie, kaip tikimasi, turėtų praversti numatant naviko atsaką į chemoterapiją veiksmingumą ir padėti optimizuoti kasos vėžiu sergančių pacientų gydymą. Be to, perspektyviais kasos vėžio teranostiniais žymenimis literatūroje įvardijami ir navikų chemoterapinio atsparumo išsivystymui svarbūs molekuliniai veiksniai, kaip antai, KRAS mutacijos arba circBIRC6 sąveika su DNR taisymo mechanizmais. Viliamasi, kad ateities perspektyvoje teranostinių žymenų aptikimas suteiks privalumų klinikinėje praktikoje, vykdant pacientų stratifikaciją pagal biožymenų pagrindu nustatytus kasos navikų atrankos kriterijus bei siekiant tikslingai pritaikyti individualizuotas terapines schemas kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų gydymui.

Individualių pacientų organoidų modelių pritaikymas, siekiant išspręsti kasos duktalinės adenokarcinomos atsparumo chemoterapijai problemą

Kasos duktalinės adenokarcinomos gydymas klinikinėje praktikoje iki šiol kelia didelių iššūkių, visų pirma, dėl agresyvaus naviko pobūdžio, taip pat dėl vėlyvos diagnostikos ir nepakankamų pacientų atsakų, reaguojant į chemoterapijos poveikį. Individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai chemoterapinio atsparumo akivaizdoje iškyla kaip perspektyvi eksperimentinė platforma, leidžianti tyrėjams tiksliau prognozuoti kasos vėžiu sergančių pacientų navikų jautrumą gydymui skiriamiems vaistams. Modeliuodami kasos navikų terapinius atsakus tiriamosiose organoidų platformose, mokslininkai stengiasi išaiškinti veiksnius, galinčius padidinti chemoterapijos veiksmingumą, bei sukurti naujas kasos duktalinės adenokarcinomos kombinuoto gydymo strategijas, kurias pritaikius būtų galima įveikti išsivysčiusius kasos vėžio atsparumo terapiniams agentams mechanizmus.

Tyrėjai išreiškia viltį, kad efektyvių kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo metodų atsiradimą gali paskatinti tikslus esminių kasos navikų chemoterapinį atsparumą lemiančių

veiksnių identifikavimas: vertingų įžvalgų apie organoidų modelių pritaikymą šiuo tikslu pateikia Farshadi ir kt., atlikę tyrimą (2021 m.), kurio metu buvo sukurta 10 individualių pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų linijų (angl. pancreatic ductal adenocarcinoma organoid lines) – 5 iš negydytų pacientų mėginių ir tiek pat iš pacientų, gydytų aštuoniais neoadjuvantinės FOLFIRINOX chemoterapijos ciklais, naviko audinių. Tyrėjai, analizuodami organoidų modelius, siekė įvertinti vėžinių ląstelių atsparumą ir jautrumą chemoterapijai. Ištyrus gautus stebėjimų duomenis, paaiškėjo, kad Farshadi ir kt. sukurti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai išlaikė histologines, genetines ir transkripcines savybes, atspindinčias atitinkamus pirminių navikų audinių ypatumus, Pearson koreliacijos koeficiento reikšmei esant lygiai 0,85. FOLFIRINOX chemoterapijos režimu anksčiau gydytų pacientų organoidų modeliuose buvo stebimas ryškus atsparumas oksaliplatinai (4 iš 5 organoidų), irinotekanui (5 iš 5) ir FOLFIRINOX kombinacinei terapijai (5 iš 5), palyginus su gydymo nepaveiktais organoidais (angl. treatment-naïve organoids), tuo tarpu jautrumas 5-fluorouracilui (5-FU) abiejose grupėse buvo panašus. Tyrėjų atlikta diferencinės genų raiškos analizė (angl. differential gene expression analysis) padėjo nustatyti 58 skirtingai ekspresuojamus genus (angl. differentially expressed genes, DEGs), bendrai pasitaikančius tiek tuose organoiduose, kuriems buvo taikoma chemoterapija, tiek ir tuose, kuriems netaikytas joks gydymas, o kartu ir skirtingus organoidų modelius atitinkančiuose pirminių navikų audiniuose. Buvo nustatyta, kad genai, pasižymintys raiškos padidėjimu, yra susiję su genominiu nestabilumo procesais (pvz., genai TOP2A, KIF18A), pakitusiu naviko ląstelių metabolizmu (pvz., genai SLC2A1, PKM) ir transmembraninės pernašos pokyčiais, o genai, kuriems būdinga sumažėjusi raiška, - su imuninio atsako slopinimu (pvz., genai CXCL8, C3) ir ląstelių senėjimo išvengimu. Tyrėjai atkreipia dėmesį, kad FOLFIRINOX gydytų navikų organoidai toleravo augimo faktorių pašalinimą, o tai atspindi chemoterapinio atsparumo mechanizmus. Be to, viena kasos duktalinės adenokarcinomos paciento organoido ląstelių linija (Farshadi ir kt. tyrime pažymėta O9) pasižymėjo jautrumu oksaliplatinai, su tuo buvo siejamas ir dalinis klinikinis atsakas (angl. partial clinical response, PR), pastebėtas atitinkamam pacientui. Taigi, Farshadi ir kt. tyrimo rezultatai įrodo, kad adjuvantinio FOLFIRINOX terapijos režimo taikymas pacientams po atliktų kasos navikų operacijų gali būti neefektyvus dėl liekamųjų naviko ląstelių išvystomo atsparumo chemoterapijai, todėl svarbu atsižvelgti į organoidų modeliuose numatomą atsparumą tam tikriems chemoterapiniams vaistams ir priimti personalizuotus gydymo sprendimus konkrečių kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų atvejais [180].

Neoadjuvantinė chemoterapija išlieka svarbiu kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų gydymo metodu, įprastai taikomu siekiant sumažinti naviko masę, eliminuoti mikrometastazes ar įvertinti naviko atsaką į chemoterapijos poveikį. Neseniai Zhou su kolegomis pristatė tyrimą (2023 m.), kurį atlikdami siekė išsiaiškinti kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų atsaką į chemoterapiją heterogeniškumą, didžiausią dėmesį skirdami atkakliųjų, arba gerai toleruojančių chemoterapiją, ląstelių fenotipų (angl. persister cell phenotypes), prisidedančių prie atsparumo gydymui ir prastų klinikinių išiečių, analizei. Tyrėjai atliko RNR sekoskaitą (n=97) ir multipleksinę imuno fluorescenciją (n=122) chemoterapiškai „naiviuose“ (angl. chemo-naïve) ir po taikytos chemoterapijos (angl. post-chemotherapy, CTX) rezektuotose pacientų mėginiuose, taip stengdamiesi patikrinti neoadjuvantinės chemoterapijos poveikį (pacientai, kuriems taikyta chemoradioterapija, nebuvo įtraukti į tyrimą).

Tyrimo metu, pasitelkus transkriptominę analizę, suderintą su aukštos raiškos profiliavimu (angl. transcriptome analysis combined with high-resolution mapping) viso audinio sluoksnių mėginiuose (angl. whole-tissue sections) buvo aptiktos skirtingos ląstelių populiacijos, pažymėtos atitinkamai: GATA6 (susijusi su klasikiniu kasos duktalinės adenokarcinomos potipiu), KRT17 (susijusi su baziniu kasos duktalinės adenokarcinomos potipiu) ir citochromą P450 3A ekspresuojančių ląstelių populiacija (susijusi su CYP3A fermentų šeima). Išsiaiškinta, jog po taikytos chemoterapijos rezektuotuose audiniuose visos minėtos ląstelių populiacijos buvo pagausėjusios, todėl galima manyti, kad šių specifinių tipų ląstelės, greičiausiai, yra susijusios su naviko išlikimo ir atsako į gydymą palaikymu. Padidėjusios ekspresijos GATA6 ir KRT17 ląstelių (tyrime pažymėtų kaip GATA6^{hi} ir KRT17^{hi}) išlikimas po chemoterapijos buvo susijęs su žymiai blogesniais išgyvenamumo rezultatais, ypač tarp pacientų, gydytų mFOLFIRINOX (mFFX) režimu, į kurį įtrauktas provaistas irinotekanas. Be to, mokslininkai sukūrė organoidų modelius iš chemoterapiškai naivių (angl. chemo-naïve) ir po pritaikytos chemoterapijos paimtų pacientų mėginių (angl. post-CTX samples).

Tyrėjai išsiaiškino, kad chemorezistentiškuose pacientų organoidų modeliuose pasitaikė didesnis kiekis CYP3A+ ląstelių, taip pat buvo nuslopinta irinotekano konversija į aktyvų metabolitą SN-38. CYP3A svarbą kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumo chemoterapijai išsivystymui mokslininkai įrodė pasitelkę ketokonazolą – šis vaistas slopino CYP3A aktyvumą ir padidino chemorezistentiškų organoidų terapinį jautrumą irinotekanui. Taigi, Zhou ir kt. tyrimo metu atlikta organoidų analizė atskleidė, kad CYP3A ekspresija ląstelėse laikytina chemoterapinio atsako predikciniu veiksniu ir kad CYP3A ekspresuojančiais vaistų detoksikavimo keliais yra įgalinamas provaisto irinotekano (mFFX režimo komponento) metabolizmas. Visa tai įrodo, kad didelė CYP3A ekspresija koreliuoja su sumažėjusiu chemoterapijos veiksmingumu.

Apibendrinant Zhou ir kt. tyrimo išvadas, pabrėžtinai vaistams tolerantiškų ląstelių fenotipų vaidmuo kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui taikomos adjuvantinės chemoterapijos kontekste. Šie ląstelių fenotipai, pasižymintys padidėjusia GATA6, KRT17 ir CYP3A ekspresija, yra svarbūs veiksniai, į kuriuos verta atsižvelgti, kuriant veiksmingesnius adjuvantinius kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo būdus, pritaikytus individualiems molekuliniais profilams. Galiausiai, panaudojant inovatyvias tiriamąsias platformas, pavyzdžiui, organoidų modelius, siektina geriau suprasti su navikų heterogeniškumu ir terapijos sukeltu ląstelių plastiškumu susijusias kliniškes problemas bei ieškoti personalizuotų, į pacientą orientuotų sprendimų, gydant kasos duktalinę adenokarcinomą sergančius pacientus [181].

Esminiu kasos duktalinės adenokarcinomos progresavimo bei atsparumo chemoterapijai veiksniu mokslininkai šiuo metu įvardija naviko ir stromos sąveiką, priklausomą nuo specifinių baltymų ekspresijos, skatinančios naviko ląstelių išlikimą bei agresyvumą. Neseniai atlikto Qin ir kt. tyrimo (2023 m.) metu buvo nustatyti svarbūs kasos duktalinės adenokarcinomos navikų ir stromos sąveikos mediatoriai – su melanoma susijusių antigenų A (MAGEA) izoformos (angl. melanoma-associated antigen A (MAGEA) isoforms), pabrėžiant MAGEA2, MAGEA3 ir MAGEA10 izoformų reikšmę. Tyrimo autoriai rėmėsi klinikiniais duomenimis, rodančiais, kad didelė MAGEA ekspresija yra glaudžiai susijusi su blogesne pacientų išgyvenamumo prognoze, didesniu naviko dydžiu, greitesniu ligos progresavimu, dažniau pasitaikančiomis limfmazgių metastazėmis ir atkryčiais įvairių onkologinių susirgimų - kasos duktalinės adenokarcinomos, skrandžio vėžio, nesmulkiąląstelinio plaučių vėžio ir krūties vėžio –

atvejais, kaip įrodė ankstesni mokslininkų stebėjimai. Qin ir kt. nustatė, kad MAGEA2 inhibuoja gemcitabino sukeltą apoptozę, slopindamas JNK-c-Jun-p53 molekulinio signalizavimo kelią (angl. JNK-c-Jun-p53 signaling axis). Tuo pat metu, paskatintos gemcitabino poveikio, kasos žvaigždinės ląstelės pradeda sekretuoti augimo/diferenciacijos faktorių-15 (angl. growth/differentiation factor-15, GDF15), kuris aktyvina GFRAL-RET-Akt/ERK1/2 signalizavimo kelią MAGEA2 ekspresuojančiose ląstelėse, todėl dar labiau padidėja kasos vėžio ląstelių atsparumas gemcitabinui. Tyrėjai pastebėjo, kad organoidai, išauginti iš gemcitabinui atsparių (GemR) pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių, pasižymėjo reikšmingai didesne MAGEA2, MAGEA3 ir MAGEA10 raiška, palyginus su gemcitabinui jautrių (GemS) pacientų. Be to, padidinus MAGEA izoformų ekspresiją GemS organoidų modeliuose, išaugo ir atsparumas gemcitabinui, tuo tarpu MAGEA izoformų raiškos slopinimas GemR organoiduose atkūrė jų ląstelių jautrumą vaistui. Taigi, kaip išsiaiškinta tyrimo metu, slopinant MAGEA izoformų arba GDF15 raišką, yra atkuriamas naviko ląstelių jautrumas chemoterapijai.

Tyrimo metu įrodyta, kad in vivo sąlygomis pelių modeliuose fiksuota padidėjusi MAGEA2 raiška skatino kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsparumą gemcitabinui ir metastazavimą, o gemcitabinu gydytuose navikuose pastebėta padidėjusi GDF15 ir GFRAL (angl. glial-derived neurotrophic factor receptor alpha-like) ekspresija. Atsižvelgdami į nustatytus kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsparumo gydymui gemcitabinu veiksnius, Qin ir kt. sukūrė naują daugiakomponentinę MAGEA antigenų DNR vakciną (angl. multi-MAGEA antigen DNA vaccine), kurią pasitelkus buvo siekiama nukreipti imuninės sistemos ląstelių poveikį prieš chemorezistentiškas naviko ląsteles, ekspresuojančias MAGEA2, MAGEA3 ir MAGEA10 izoformas. Kaip pastebėjo tyrėjai, ši vakcina sukėlė specifinius, stiprius CD8⁺ bei CD4⁺ T ląstelių atsakus, slopino naviko augimą ir atsparumą gemcitabinui chemorezistentiškuose kasos duktalinės adenokarcinomos pelių modeliuose. Įrodyta, kad vakcina yra specifiška, imunogeniška ir saugi, jos poveikis nesukelia normalių audinių pažeidimo. Taigi, apibendrinus Qin ir kt. tyrimo išvadas, pabrėžtina, kad MAGEA (su melanoma susijusių antigenų A) izoformos yra svarbūs kasos navikų atsparumo gemcitabinui ir metastazavimo procesų reguliatoriai. Daugiakomponentinė MAGEA antigenų DNR vakcina galėtų tapti perspektyviu kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo metodu, kurį pasitelkus būtų siekiama įveikti kasos vėžio ir kitų onkologinių susirgimų atvejais pasireiškiantį atsparumą chemoterapijai poveikiui [182].

Aiškinantis, kokios konkrečios priežastys lemia prastus kasos navikų gydymo rezultatus, taip pat aktualu atkreipti dėmesį į dar vieną literatūroje minimą su kasos duktalinės adenokarcinomos onkogeneze ir chemoterapinio atsparumo išsivystymu susijusį veiksnių – chemokinių ašį (angl. chemokine axis). Raufi ir kt. straipsnyje (2023 m.) nurodoma, jog CXCL12-CXCR4 chemokinių ašis (angl. CXCL12-CXCR4 chemokine axis) yra reikšminga reguliuojant T ląstelių infiltraciją kasos navikų mikroaplinkoje. Svarbu paminėti, kad CXCR4 yra chemokinių receptorius, ekspresuojamas imuninėse ląstelėse, priklausančiose kasos duktalinės adenokarcinomos naviko mikroaplinkai, o šio receptoriaus ligandą CXCL12 gausiai išskiria naviko stromos fibroblastai (angl. stromal carcinoma-associated fibroblasts), inkapsuliuojantys vėžio ląsteles. Savo ruožtu, chemokinas CXCL12, dalyvaujant transglutaminazei-2 (angl. transglutaminase-2), naviko ląstelėse formuoja kovalentinius heterodimerus su keratinu-19 (angl. keratin-19). Be to, CXCL12 prisijungimas prie CXCR4 sukelia ir T-ląstelių pašalinimą iš naviko, taip sumažinant šių imuninių ląstelių aktyvaciją.

Raufi ir kt. atkreipia dėmesį, kad aukštas intratumorinis CXCL12 lygis yra susijęs su prastomis kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų prognozėmis. Taigi, kaip pagrindinę terapinę kliūtį tyrimo autoriai įvardija kasos navikams būdingas imunosupresines mikroaplinkos sąlygas: manoma, jog tai lemia ribotą gydymo sėkmę kasos vėžio gydymui taikant tam tikrus terapinius metodus, pvz., imuninės kontrolės taško blokadą (angl. immune checkpoint blockade, ICB), kurios efektyvumas, beje, yra kur kas didesnis gydant kitas vėžio rūšis.

Reaguodami į šią problemą, Raufi ir kt. siekė išsiaiškinti, ar chemoterapijos taikymas derinyje su imunoterapiniais vaistais, galėtų būti efektyviai pasitelkiamas kaip kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo metodas. Pasirinkdami chemoterapinį agentą numatytai tiriamo gydymo schemai, tyrėjai rėmėsi prielaida, jog gemcitabinas, skirtingai nei 5-FU, žymiai sumažina cirkuliuojančių periferinių T reguliacinių ląstelių skaičių ir slopina jų ekspansiją, todėl jis galėtų būti tinkamesnis chemoterapijos papildinys greta taikomo gydymo CXCR4 inhibitoriais ir imuninės kontrolės taškų blokada. Raufi ir kt. tyrime gemcitabino, AMD3100 ir anti-PD1 poveikiui tirti (taikant monoterapiją arba kombinuotą gydymą) buvo panaudota ex vivo autologinė bendra paciento imuninės/organoidinės kultūros sistema (angl. autologous patient-derived immune/organoid (PDIO) co-culture system), kartu su autochtoniniu KPC kasos vėžio pelės modeliu (angl. autochthonous KPC pancreatic cancer mouse model). Šie tyrimo modeliai buvo sukurti tam, kad galėtų imituoti sudėtingus autokrininius ir parakrininius signalizacijos kelius tarp žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos imuninių ląstelių.

Taigi, pritaikę paciento naviko organoidinę sistemą laboratoriniam migracijos šulinėliuose tyrimui (angl. transwell migration assay), mokslininkai siekė ištirti CXCL12-CXCR4 ašies signalų poveikį imuninių ląstelių migracijai ir invazijai. Tyrėjai pastebėjo, kad CXCR4 slopinimas suaktyvino periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių migraciją, o paciento naviko organoido sistema gebėjo sėkmingai išskirti chemoatraktantus, paskatinusius imuninių ląstelių migraciją. Įdomu tai, kad CXCL12 taip pat padidino paciento periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių migraciją ir slopino CXCR4⁺ limfocitų migraciją, tačiau CXCR4⁺ limfocitų supresija buvo panaikinta pritaikius terapinio agento AMD3100.

Raufi ir kt. tyrimo rezultatus patikrino in vivo sąlygomis, panaudodami KPC pelės modelį: gauti duomenys parodė, kad CXCR4 slopinimo, gemcitabino ir anti-PD1 terapijos derinys prailgino pelių išgyvenamumą. Pelėse, gydytose šia triguba terapija, padidėjo naviko ląstelių mirštamumas, sumažėjo ląstelių dauginimasis ir buvo stebimas gydymo poveikiui palankus naviko mikroaplinkos vaizdas, kuriam buvo būdingas didesnis CD8⁺ T-ląstelių ir T reguliacinių ląstelių (Treg) santykis bei padidėjusi natūralių žudikų (NK) ląstelių infiltracija. Be to, tyrimo metu pastebėta, jog vien tik CXCR4 slopinimo ir anti-PD1 derinys nepailgino pelių išgyvenamumo, nepaisant laikino naviką stabilizavusio efekto, o tad šis radinys skatina daryti prielaidą, jog papildomas gemcitabino pridėjimas yra būtinas norint visiškai slopinti naviko augimą ir sustiprinti imuninės sistemos skatinamą naviko ląstelių mirtį.

Apibendrinant išvadas iš Raufi ir kt. tyrimo, svarbu akcentuoti, kad CXCL12/CXCR4 ašis yra vienas pagrindinių veiksnių, skatinančių imunosupresines naviko mikroaplinkos sąlygas kasos duktalinės adenokarcinomos atveju, todėl šios ašies poveikio moduliavimas glaudžiai siejasi su paciento priešnavikinio imuninio atsako veiksmingumu. Raufi su kolegomis atliktame tyrime, pasitelkus šiuolaikines ex vivo paciento imunines organoidines sistemas ir KPC kasos vėžio pelės modelius, buvo išsiaiškinta, kad CXCR4 inhibicijos, anti-PD1 ir gemcitabino

terapijos derinys suteikia perspektyvią naviko kontrolės strategiją. Šis kombinuoto gydymo metodas sumažina naviko mikroaplinkos sukeltą imunosupresiją, taip pat skatina imuninių efektorinių ląstelių funkcinį aktyvumą, o tai ypač aktualu siekiant įveikti naviko atsparumo gydymui mechanizmus bei pagerinti kasos duktalinės adenokarcinomos terapinius rezultatus [183].

Mokslininkai atkreipia dėmesį, kad tam tikros kasos navikų genetinės ypatybės, nulemiančios geresnį kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių prisitaikymą organizme, yra sietinos su atsparumo chemoterapijai išsivystymu. Pavyzdžiui, Hasselluhn ir kt. tyrimo (2024 m.) metu buvo identifikuotas specifinis, agresyvaus pobūdžio kasos duktalinės adenokarcinomos potipis (SMAD4^{-/-}/NFATc1^{High}), pasižymintis SMAD4 geno trūkumu (angl. SMAD4 deficiency) ir padidėjusia NFATc1 ekspresija bei siejamas su atsparumu standartiniam chemoterapiniam gydymui. Tyrėjai nustatė, kad SMAD4 geno trūkumas yra būtina sąlyga onkogeninio NFATc1/SMAD3/cJUN transkripcijos faktorių komplekso susidarymui. Šis kompleksas didina RRM1 ir RRM2 genų, atsakingų už nukleozidų atsargų (angl. nucleoside pools) atstatymą, raišką. Išsiaiškinta, kad nukleozidai (deoksiribonukleotidai, kurių gamybą skatina RRM1 ir RRM2 genai) konkuruoja su gemcitabinu (chemoterapiniu agentu, nukleozidų analogu) dėl įsiterpimo į naviko ląstelių DNR, taip skatindami atsparumo šiam vaistui išsivystymą kasos duktalinės adenokarcinomos navikuose. Atsižvelgdami į šią problemą, mokslininkai pritaikė terapinę strategiją, nukreiptą į onkogeninį NFATc1/SMAD3/cJUN transkripcijos faktorių kompleksą: panaudojus vaistą trametinibą, pavyko slopinti MAPK signalizavimo kelio aktyvumą, o tai skatino minėto onkogeninio komplekso suardymą, RRM1/2 ekspresijos sumažėjimą bei didino SMAD4 geno trūkumu pasižyminčių kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių jautrumą gemcitabino chemoterapiniam poveikiui. Svarbu paminėti, jog MAPK signalizavimo kelias buvo pasirinktas kaip terapinis taikiny, kadangi tai yra svarbus veiksnys transkripcijos faktoriaus cJUN aktyvumo palaikymui ir kartu NFATc1/SMAD3/cJUN transkripcijos faktorių komplekso stabilumo užtikrinimui. Hasselluhn ir kt. tyrimo rezultatai buvo patvirtinti įvairiose eksperimentinėse platformose, įskaitant individualius pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius, pirmines ląstelių linijas ir genetiškai modifikuotus pelių modelius, įrodant, kad trametinibo ir gemcitabino terapinio derinio efektas mažina kasos vėžio ląstelių proliferaciją, metastazavimo potencialą ir pagerina gydymo efektyvumą SMAD4 geno trūkumu pasižyminčiuose kasos navikuose. Be to, remiantis tyrėjų atliktos transkriptominės analizės duomenimis, nustatyta NFATc1/SMAD3/cJUN transkripcijos faktorių komplekso sąsaja su genais, kurie skatina agresyvaus naviko fenotipo susiformavimą ir blogą ligos klinikinę prognozę. Hasselluhn ir kt. tyrimo radiniai atspindi molekulinės stratifikacijos svarbą kasos duktalinės adenokarcinomos pacientų gydymo kontekste ir suteikia pagrindą laikyti SMAD4 ir su šiuo genu susijusį onkogeninį transkripcijos faktorių kompleksą NFATc1/SMAD3/cJUN prognostiniais terapinio atsako į gydymą trametinibo ir gemcitabino deriniu, biožymenimis. Viliamasi, jog pritaikius šį kombinuotą terapinį metodą kasos duktalinė adenokarcinoma sergančių pacientų gydymui, gali pavykti įveikti SMAD4 geno trūkumu pasižyminčių kasos navikų atsparumą chemoterapijai [184].

Su kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumu gydymui bei nepalankiomis šia liga sergančių pacientų išgyvenamumo prognozėmis taip pat gali būti susijęs unikalios proline izomerazės Pin1 (angl. unique proline isomerase, Pin1) ekspresijos padidėjimas, kaip parodė Koikawa ir kt. atlikto tyrimo (2021 m.) išvados. Tyrėjai nustatė, jog padidėjusi Pin1 raiška

buvo būdinga tiek kasos vėžio ląstelėse, tiek su vėžiu susijusiuose fibroblastuose (angl. cancer-associated fibroblasts, CAFs), įeinančiuose į desmoplastinės kasos duktalinės adenokarcinomos navikų stromos sudėtį. Funkciniu požiūriu Pin1 skatina kasos navikų progresavimą, aktyvuodamas keletą onkogeninių molekulinio signalizavimo kelių, skatindamas CAF aktyvaciją ir sukeldamas lizosominį PD-L1 (angl. programmed death-ligand 1) bei ENT1 (angl. equilibrative nucleoside transporter 1) degradaciją (skaidymą) kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėse. Siekdami nuslopinti Pin1 poveikį, tyrėjai pasitelkė kliniškai prieinamus inhibitorius (ATRA+ATO ir Sulfopin), kurie sumažino CAF proliferaciją, citokinų (pavyzdžiui, IL-6, TGF- β) sekreciją ir kolageno kaupimąsi (angl. collagen deposition) naviko mikroaplinkoje, tačiau atkūrė ENT1 ir PD-L1 ekspresiją kasos navikų ląstelių paviršiuje. Mokslininkų tirtuose kasos duktalinės adenokarcinomos pelių modeliuose Pin1 inhibitoriai, paskirti derinyje su mažomis gemcitabino dozėmis ir anti-PD-1 terapija, reikšmingai sumažino navikų augimą, metastazavimą ir imunosupresinių ląstelių (pvz., reguliacinių T limfocitų, su naviku asocijuotų makrofagų) kiekį bei aktyvumą. Taip pat išsiaiškinta, kad šis trigubas terapinis derinys padidino CD8⁺ citotoksinių T limfocitų infiltraciją ir aktyvumą, skatindamas visišką naviko regresavimą iki 87,5% tirtuose genetiškai modifikuotuose kasos duktalinės adenokarcinomos pelių modeliuose, kai kuriais atvejais užtikrindamas pasiektų rezultatų palaikymą (būklę be ligos atkryčio) ilgiau nei metus. Tyrėjai atkreipė dėmesį, kad Pin1 inhibicija paruošia navikus imunochemoterapijai, padidinant PD-L1 ir ENT1 kiekius ląstelių paviršiuje, sumažinant imuninę išsekimą (angl. exhaustion) ir sustiprinant anti-PD-1 terapinį poveikį. Be to, mokslininkai išanalizavo iš pacientų chirurginių rezekcijų būdu gautus navikų mėginius bei išsiaiškino, kad padidėjusi Pin1 ekspresija atitinkamai 71.5% kasos navikinėse ląstelėse ir 51.9% su vėžiu susijusiuose fibroblastuose (CAF) koreliavo su sumažėjusiu pacientų išgyvenamumu (mediana: 16 mėnesių, palyginus su 60 mėnesių išgyvenamumu tarp pacientų, kuriems nustatyta maža Pin1 raiška). Svarbu paminėti, jog mokslininkų tirtuose žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose, pritaikius Pin1 inhibiciją, pastebėtas gemcitabino sukeltos apoptozės suaktyvėjimas, kartu padidėjus ir ENT1 – pagrindinio gemcitabino įsisavinimui reikalingo pernašos baltymo – raiškai. Taip pat Pin1 slopinimas skatino PD-L1 raiškos padidėjimą ląstelių paviršiuje, todėl jos tapo labiau atpažįstamos imuninei sistemai ir efektyviau reagavo į anti-PD-1 terapijos poveikį. Tyrimo metu atlikti bendrai terpėje kultivuojamų ląstelių (angl. co-culture culture) eksperimentai su CD8⁺ T ląstelėmis ir kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliais parodė, kad Pin1 inhibicija veikia sinergiškai su aPD1 terapija, kartu sustiprinant T ląstelių sąlygojamą vėžio ląstelių naikinimą. Koikawa ir kt. atkreipė dėmesį, jog minėti poveikiai priklausė nuo ENT1 ir PD-L1, nes sumažinus jų ekspresiją, anksčiau stebėta terapinė sinergija buvo panaikinta. Pasitelkę pagreitinotos laiko tėkmės vaizdinimo metodą (angl. time-lapse imaging) mokslininkai patvirtino, kad Pin1 inhibitorių derinys su gemcitabinu ir/arba anti-PD-1 sukėlė stiprų, nuo dozės priklausomą apoptozės efektą kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose, o tai suteikia įrodymų pagrindą šios kombinuotos terapijos klinikiniam pritaikomumui. Taigi, Koikawa ir kt. tyrimo išvados leidžia laikyti Pin1 kertiniu kasos duktalinės adenokarcinomos piktybiškumą ir atsparumą vaistams reguliuojančių veiksmu, bei išryškina Pin1 inhibitorių ir imunochemoterapinių agentų kombinacijos klinikinį potencialą, gydant agresyvaus pobūdžio kasos duktalinės adenokarcinomos navikus [185].

Atsižvelgdami į tai, jog šiuo metu kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų gydymui taikomi standartiniai chemoterapiniai preparatai pasižymi ribotu klinikiniu efektyvumu, mokslininkai ieško galimybių sustiprinti šių vaistų terapinį poveikį, kurdami

alternatyvias kombinuoto gydymo schemas. Pavyzdžiui, Kang ir kt. atliko tyrimą (2023 m.), siekdami išsiaiškinti, ar antihelminčio vaisto niklosamido ir chemoterapinio agento gemcitabino derinys gali sustiprinti priešnavikinį poveikį, gydant kasos duktalinę adenokarcinomą. Tyrimo autoriai rėmėsi prielaida, jog niklosamidas, anksčiau tirtas dėl potencialių terapinių efektų, taikant šį preparatą krūties, plaučių ir storosios žarnos navikų gydymui, gali būti pasitelktas ir kasos vėžio terapijai, derinant vaisto poveikį su standartiniais chemoterapiniais agentais, kaip antai, gemcitabinu. Kaip žinoma, gemcitabinas, įprastai kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui vartojamas vaistas, pasižymi ribotu veiksmingumu dėl kasos navikų išvystomo chemoterapinio atsparumo šiam preparatui. Kang ir kt. įvertino gydymo niklosamido ir gemcitabino deriniu poveikį atitinkamose tiriamosiose platformose: kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijose (įskaitant PANC-1 ir MIA PaCa-2 ląstelių linijas), organoidų modeliuose ir in vivo pelių (angl. BALB/c nude mice) ksenograftų modeliuose. Tyrimo rezultatai mokslininkams leido įsitikinti, kad niklosamidas, veikdamas derinyje su gemcitabinu, geba sinergiškai slopinti kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių dauginimąsi, skatinti apoptozę ir inicijuoti ląstelės ciklo G1 fazės sustabdymą. Tyrėjai pastebėjo, kad niklosamido ir gemcitabino terapinis derinys sumažino nuo ciklino priklausomų kinazių (angl. cyclin-dependent kinases), CDK4, CDK6 ir ciklino D1 ekspresiją, todėl buvo slopinamas retinoblastomos baltymo (Rb) fosforilinimas (angl. Rb phosphorylation) ir didinama ląstelės ciklo reguliacinio baltymo p21 raiška, o tai, savo ruožtu, stabdė ląstelės ciklo progresavimą, užkertant kelią naviko ląstelių DNR replikacijai ir dalijimuisi. Pažymėtina, kad niklosamidas taip pat sustiprino gemcitabino poveikį, susijusį su Wnt/ β -katenino signalų perdavimo kelio inhibicija, paskatinant β -katenino fosforilinimą, ubiquitinavimą (angl. ubiquitination) ir vėlesnę proteasominę degradaciją. Taigi, niklosamido ir gemcitabino terapinė kombinacija lėmė Wnt signalizavimo kelio genų ekspresijos slopinimą ir baltymo β -katenino kiekio sumažėjimą tirtose in vitro sąlygomis kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijose ir in vivo kasos vėžio pelių ksenograftų modeliuose. Be to, niklosamidas slopino transkripcijos faktoriaus STAT3, siejamo su ląstelių išlikimu, proliferacija, angiogenezės bei imuninės sistemos poveikio išvengimu, fosforilinimą ties šio baltymo aminorūgšties Tyr705 pozicija (angl. STAT3 phosphorylation at Tyr705) ir sumažino onkogeninių taikinių, pavyzdžiui, transkripcijos faktoriaus c-Myc, ekspresiją. Svarbu paminėti, jog kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose niklosamidas reikšmingai slopino ląstelių dauginimąsi, o in vivo sąlygomis, pelių ksenograftų modeliuose, niklosamido poveikis sąlygojo reikšmingą kasos navikų dydžio ir svorio sumažėjimą, palyginus šio vaisto poveikį su minėtuose tiriamuosiuose modeliuose taikytos gemcitabino monoterapijos efektu. Kang ir kt. tyrimo išvados patvirtina niklosamido ir gemcitabino, kaip perspektyvios kombinacinės terapijos, veiksmingumą gydant kasos duktalinės adenokarcinomos navikus: mokslininkams pavyko įrodyti, kad niklosamidas sustiprina gemcitabino antiproliferacinį efektą ir apoptozę skatinantį poveikį, kartu nukreipiant terapinį efektą į molekulinis Wnt/ β -katenino ir JAK/STAT signalų perdavimo kelius kasos vėžio ląstelėse [186].

Kombinuotų gydymo metodų poreikis kasos duktalinės adenokarcinomos chemoterapinio atsparumo kontekste taip pat akcentuojamas Kumarasamy ir kt. publikuotame straipsnyje (2020 m.). Pirmiausia, kaip terapinį taikinį mokslininkai įvardijo CDK4/6 kompleksą, aktyvųjį KRAS geno mutacijų ir CDKN2A naviko supresoriaus (angl. CDKN2A tumor suppressor) praradimo. Pažymėtina, kad kasos duktalinei adenokarcinomai būdingos įvairios genetinės aberacijos, kurios lemia nuo ciklino priklausomų kinazių CDK4 ir CDK6 reguliavimo sutrikimus. Nuo ciklino priklausomos kinazės CDK4 ir CDK6 yra labai svarbios

skatinant G1-S fazių pasikeitimą (angl. G1-S phase transition) ląstelės ciklo metu, kuomet yra inaktyvuojamas RB kelias (angl. RB pathway). Be to, pažymėtina, jog KRAS mutacijos prisideda prie D tipo ciklinų indukcijos, sustiprindamos CDK4/6 kinazių aktyvumą. Naviką slopinančio geno CDKN2A (angl. tumor suppressor gene, CDKN2A), endogeninio CDK4/6 inhibitoriaus, praradimas dar labiau sustiprina šių kinazių reguliavimo sutrikimus.

Nors CDK4/6 mokslininkams pasirodė kaip daug žadantis terapinis taikiny, į kurį nukreipus gydymą, galėtų būti palaikomas naviko ląstelės ciklo slopinimas, atlikus tyrimus, buvo išsiaiškinta, kad kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelės dažnai išvysto atsparumą CDK4/6 inhibitoriams. Remiantis ankstesnių tyrimų duomenimis, manoma, kad kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelės geba palaikyti ląstelės ciklo plastiškumą, o tai joms leidžia išvengti CDK4/6 inhibicijos, tačiau šią naviko ląstelių savybę galima pakeisti derinant CDK4/6 inhibitorius su terapiniais agentais, nukreiptais į KRAS efektorinius kelius (angl. KRAS effector pathways). Atsižvelgus į šiuos pastebėjimus, Kumarasamy ir kt. tyrimo metu buvo nagrinėjamos CDK4/6 inhibitorių ir tradiciškai kasos vėžio gydymui skiriamų chemoterapinių preparatų - gemcitabino ir taksanų - sąveikos. Šių terapinių agentų kombinacinį poveikį mokslininkai tyrė pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ir ksenograftų (angl. patient-derived xenograft, PDX) modeliuose.

Tyrimo rezultatai parodė, kad gydymas trijų terapinių agentų (CDK4/6 inhibitoriais, gemcitabinu ir docetakseliu) slopino organoidų augimą veiksmingiau nei gydymas kiekvienu preparatu atskirai, o CDK4/6 inhibitorių pridėjimas tik dar labiau sustiprino minėtų chemoterapinių agentų poveikį. In vivo bandymai, pasitelkus ksenograftų modelius, patvirtino organoidų modeliuose stebėtas tendencijas, įrodant, kad triguba terapija, pritaikius CDK4/6 inhibitorių, gemcitabino ir docetakselio derinį, reikšmingai slopino naviko augimą, be to, ši terapinė kombinacija tirtoms pelėms nesukėlė reikšmingo svorio netekimo. Apskritai, CDK4/6 inhibitorių ir chemoterapinių vaistų derinio poveikis lėmė ilgalaikę naviko augimo kontrolę ir bendrai padidino tradicinės chemoterapijos veiksmingumą kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamuosiuose modeliuose.

Kumarasamy ir kt. tyrimas pateikia vertingų ikiklinikinių įrodymų, patvirtinančių CDK4/6 inhibitorių ir chemoterapinių agentų kombinacijos potencialą, šį terapinį derinį pasitelkiant kasos duktalinės adenokarcinomos navikų gydymui. Derinant skirtingų chemoterapinių medžiagų, tokių kaip gemcitabinas ir taksanai, poveikį kartu su CDK4/6 inhibitorių citostatiniu efektu, ateityje būtų galima pagerinti sergančiųjų kasos duktaline adenokarcinoma klinikines išėitis, ypač palaikomojo gydymo stadijoje, kai chemoterapinių agentų skyrimą tenka pristabdyti dėl kumuliacinio chemoterapinių vaistų toksiškumo. CDK4/6 inhibitorių gebėjimas užkirsti kelią likutinių vėžio ląstelių augimui po chemoterapijos yra vilčių teikianti galimybė pasiekti ilgalaikę ligos kontrolę gydant kasos duktaline adenokarcinoma sergančius pacientus [187].

Naujausioje mokslinėje literatūroje pateikiama įrodymų apie chemoterapinių vaistų efektyvumo didinimui pasitelkiamas genų terapijos galimybes, siekiant sukurti naujus kombinuotos sudėties terapinius agentus. Pavyzdžiui, Yuen ir kt. (2024 m.) pristatė naują kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo strategiją, modifikuodami naviką slopinančias mikroRNR (angl. tumor-suppressor microRNAs, miRNAs), - miR-15a ir miR-194, kartu su gemcitabinu (Gem), ir pristatė naujus terapinius agentus: Gem-miR-15a ir Gem-miR-194. Šių gemcitabinu modifikuotų miRNR analogų poveikis kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėms

linijose (Hs766T, AsPC-1 ir PANC-1) atitiko IC50 reikšmės, kurios buvo keliais šimtais kartų mažesnės nei nemodifikuotų miRNR ar paties gemcitabino. Tiksliau, Gem-miR-15a terapinio agento IC50 reikšmės buvo 534–1 048 kartus mažesnės, o Gem-miR-194 – net 2 027–2 437 kartus mažesnės nei gemcitabino. Šie analogai efektyviai pateko į ląsteles be papildomų pernešėjų (angl. delivery vehicles) poreikio ir išlaikė savo funkciją, slopindami pagrindinius onkogeninius taikinius, tokius kaip WEE1, CHK1, BMI1 ir YAP1 (Gem-miR-15a) bei FOXA1 (Gem-miR-194). Gem-miR-15a poveikis sukėlė ląstelės ciklo sustabdymą G1 fazėje ir naviko ląstelių apoptozę, o Gem-miR-194 – ląstelės ciklo sustabdymą G2 fazėje, priklausomai nuo ląstelių linijos. Pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose Gem-miR-15a ir Gem-miR-194 terapinių agentų poveikių efektyvumą įrodė IC50 reikšmės, kurios buvo iki 170 kartų mažesnės nei gemcitabino. In vivo Gem-miR-15a reikšmingai sumažino navikų augimą ir kasos duktalinės adenokarcinomos pelių modeliuose – navikų dydis sumažėjo 5,5 karto, o toksinio poveikio nepastebėta, tuo tarpu Gem-miR-194 nepasižymėjo naviko dydį mažinančiu poveikiu. Remiantis Yuen ir kt. tyrimo radiniais, galima daryti išvadą, kad Gem-miR-15a yra perspektyvus terapinis agentas, derinantis miRNR navikus slopinančias savybes su gemcitabino chemoterapiniu efektyvumu [188].

Vienas iš pažengusios kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui įprastai skiriamų terapinių agentų yra 5-fluorouracilas (5FU), dažniausiai įtraukiamas kaip komponentas taikant kombinuoto gydymo režimus, pvz., FOLFIRINOX. Visgi pastebima, jog dėl nespecifinio vaisto pristatymo į poveikio vietą (angl. non-specific delivery) 5FU veiksmingumas išlieka nepakankamas kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo kontekste. Mokslininkai tikisi, kad perspektyvia kasos vėžio gydymo strategija galėtų tapti gydymo nukreipimas į epidermio augimo faktoriaus receptorių (angl. epidermal growth factor receptor, EGFR), kurio padidėjusi ekspresija yra nustatoma iki 70 % kasos duktalinės adenokarcinomos atvejų. Mahajan ir kt. (2021 m.) pristatė metodą, padedantį taikyti gydymą konkrečiai paveikiant EGFR ekspresuojančias kasos naviko ląsteles. Tyrimo autoriai sukūrė 5FU inkorporuotus aptamerus (angl. 5FU-incorporated aptamers) - viengrandžius oligonukleotidus (angl. single-stranded oligonucleotides), kurie, kaip buvo įrodyta tyrimo metu, mažina naviko proliferaciją, skatindami specifinį EGFR įsisavinimą (angl. EGFR-specific uptake) per nuo klatrino priklausomą endocitozės procesą (angl. clathrin-dependent endocytosis), ir taip geba įveikti atsparumą 5FU. Iki klinikiniai tyrimai pagrindė 5FU-EGFR aptamerų potencialą – buvo stebimas reikšmingas naviko tūrio sumažėjimas įvairiose tiriamosiose platformose (genetiškai modifikuotuose kasos duktalinės adenokarcinomos pelių modeliuose, žmogaus kasos vėžio ksenograftuose ir individualiuose kasos duktalinės adenokarcinomos pacientų organoidų modeliuose). Pastebėta, kad gydymui pasitelkus 5FU-EGFR aptamerus, buvo ne tik slopinamas naviko augimas, bet ir įveikiamas dažnas iššūkis, su kuriuo susiduriama taikant chemoterapiją kasos duktalinės adenokarcinomos atveju, - naviko atsparumas 5FU. Tyrėjai taip pat pabrėžė RNR aptamerų privalumą užtikrinant tikslinį chemoterapinių agentų tiekimo mechanizmą, kadangi aptamerai į vėžio ląsteles geba patekti per nuo EGFR sukeltą klatrino priklausomą endocitozę, o tai padidina 5FU kaupimąsi vėžio ląstelėse, kartu tausojant sveikus audinius. Taigi, šis vaistų tiekimo į poveikio vietą metodas, pasitelkiant aptamerus, suteikia didelį specifiškumo laipsnį, sumažindamas netikslinį toksiškumą ir sustiprindamas terapinį poveikį pacientui. Tačiau Mahajan su kolegomis pažymi, jog ši daug žadanti terapinė strategija tam tikrais kasos duktalinės adenokarcinomos atvejais gali būti neveiksminga, kadangi iki 30 % kasos duktalinės adenokarcinomos navikų nepasižymi padidėjusia EGFR raiška, todėl tokiose situacijose EGFR nėra parankus terapinis taikiny s RNR aptamerams. Nepaisant tyrėjų

pastebėtų trūkumų, 5FU-EGFR aptamerai galėtų tapti svarbiu vėžio taikinių terapijos komponentu, pritaikant šį gydymo metodą ne tik kasos, bet ir kitiems EGFR ekspresuojantiems virškinimo trakto vėžiams, taigi, viliamasi, kad ateityje tai taps dar viena perspektyvia terapine priemone, pasitelktina tiksliosios medicinos srityje [189].

Stengdamiesi spręsti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumo chemoterapijai problemą, tyrėjai kuria naujus terapinius metodus, galinčius paveikti tam tikras kasos vėžio patogenezės grandis, pavyzdžiui, sutrikdyti mitochondrijų funkciją ir nuslopinti ląstelių proliferaciją. Šiuo atveju, organoidų modeliai mokslininkams pasitarnauja kaip eksperimentinė platforma, įgalinanti kasos navikuose pastebimų biologinių procesų analizavimą, pasirinktų terapinių priemonių efektyvumo vertinimą realiu laiku bei padeda tyrėjams projektuoti tikėtinus pacientų klinikinius atsakus [190].

Rana ir kt. atliktame tyrime (2023 m.) buvo nustatyta, kad vaistas BMS-986158, BET inhibitorius (angl. bromo- and extra-terminal domain inhibitors, BETi), veiksmingai slopina kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių augimą, jo poveikis sukelia mitochondrijų disfunkciją ir padidina jautrumą chemoterapijai. Tiksliau, BMS-986158 sutrikdo mitochondrijų funkciją kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėse, pablogindamas bioenergetines sąlygas (angl. bioenergetics), svarbias vėžinių ląstelių proliferacijai ir epitelio-mezenchimos tranzicijai (angl. epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), taip padidindamas chemoterapijos veiksmingumą, taikant net mažas vaistų dozes. Dėl vaisto BMS-986158 poveikio pakinta tam tikri vėžinių ląstelių mitochondrijų bioenergetiniai parametrai: slopinamas bazinis kvėpavimas (angl. basal respiration), su ATP susijęs kvėpavimas (angl. ATP-linked respiration), mažėja protonų nutekėjimas (angl. proton leak) ir maksimalus kvėpavimo pajėgumas (angl. maximal respiration capacity). Šios BET inhibitoriaus savybės, sutrikdančios mitochondrijų funkcijos aktyvumą, suteikia galimybę nukreipti gydymą tiesiogiai veikiant kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių priklausomybę nuo ATP susidarymo mitochondrijose.

Be to, kaip buvo pastebėta Rana ir kolegų straipsnyje, BMS-986158 geba sustiprinti E-kadherino, pagrindinio reguliatoriaus ir epitelinių ląstelių molekulinio programavimo žymens, siejamo su naviko slopinimu, ekspresiją kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliuose, taip paskatindamas priešnavikinį kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių perprogramavimą (angl. antitumor reprogramming), nukreipiant ląsteles išvystyti mažiau agresyvių epitelinį fenotipą. Pasitelkę IncuCyte gyvų ląstelių vaizdavimo technologiją (angl. IncuCyte live-cell imaging), mokslininkai užfiksavo kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijų ir organoidų augimo dinamiką realiuoju laiku, kontroliuojamomis sąlygomis, kiekybiškai įvertinę proliferaciją, morfologinius ir dydžio parametrus kelių dienų laikotarpiu. Remiantis gautais duomenimis buvo nustatyta, kad vaistas BMS-986158 veikdamas atskirai ir derinyje su chemoterapija reikšmingai slopino tiek pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų, tiek pelės kasos organoidų augimą. Be to, pastebėta, kad BMS-986158 paskirtas kartu su gemcitabinu ir paklitakseliu (GemPTX) labiau slopino kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų ląstelių augimą, palyginus su BMS-986158 vartotu atskirai arba tik chemoterapija, o minėtas vaistų derinys sumažino ląstelių proliferaciją ($P < 0,0001$) per 5 dienas. Unikalus BMS-986158 vaisto poveikio mechanizmas, nepriklausomas nuo c-Myc molekulinio signalizavimo kelių ir susijęs su pakitusia genų ekspresija (per chromatino remodeliavimą), mažina epitelio-mezenchimos tranziciją (EMT), ląstelių proliferaciją ir ląstelės ciklo progresavimą, specifiskai sustabdydamas ląstelių vystymąsi G1 fazėje. Svarbu

atkreipti dėmesį, kad Rana ir kolegų tyrimas taip pat pabrėžia organoidų, kaip eksperimentinės platformos, vaidmenį kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų srityje, analizuojant BET inhibitorių poveikį kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių augimui (įrodyta, kad BMS-986158 ženkliai slopino ląstelių augimą, pabrėždamas organoidų vertę ikiklinikiniuose BET inhibitorių vertinimuose). Remiantis mokslininkų pastebėjimais, galima teigti, kad į mitochondrijų funkcijų slopinimą nukreiptos terapijos, tokios kaip BETi, pasitelkiamos atskirai arba kartu su chemoterapija, teikia vilties, jog bus įveiktas kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsparumas chemoterapijai, tačiau šių prielaidų patvirtinimui būtina atlikti papildomus klinikinius tyrimus [190].

Nors kasos duktalinės adenokarcinomos gydymas chemoterapiniais vaistais yra siejamas su nežymiai pagerėjusiu šia liga sergančių pacientų išgyvenamumu, svarbu atkreipti dėmesį į šio terapinio metodo trūkumus, kaip antai, didelį sisteminių toksiškumą ir finansinius kaštus. Taigi, saugesnių ir ekonomiškesnių gydymo būdų kūrimas šiuo metu išlieka esminiu kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose akcentuojamu prioritetu. Atsižvelgdami į minėtas problemas tyrėjai neatmeta galimybės kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui pasitelkti natūraliai gamtoje randamus junginius, kurių pagrindu sukurtos terapinės priemonės, kaip tikimasi, galėtų padidinti priešvėžinio gydymo veiksmingumą ir padėti išvengti su toksiškumu siejamų nepageidaujamų poveikių. Naujausioje mokslinėje literatūroje pateikiama duomenų apie tai, kad augalinės kilmės junginių derinimas su standartine chemoterapija yra perspektyvi kasos vėžio gydymo strategija, taikytina, siekiant pagerinti šia liga sergančių pacientų klinikines išėitis bei sumažinti terapinių agentų poveikio sąlygojamą toksiškumą.

Okuno ir kt. (2022 m.) straipsnyje nurodoma, kad tokie natūralūs junginiai kaip *Escin*, *Boswellic* rūgštys, *Andrographis* ir *Curcumin* gali padidinti kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių jautrumą chemoterapiniam agentui gemcitabinui. Berberinas (BBR), natūralus augaluose aptinkamas alkaloidas, neseniai taip pat sulaukė tyrėjų dėmesio dėl potencialaus chemoterapinį jautrumą didinančio poveikio, gydant įvairius vėžinius susirgimus, įskaitant krūties vėžį, glioblastomą, virškinimo trakto piktybinius navikus, taip pat kasos duktalinę adenokarcinomą. Įrodyta, kad sergant krūties vėžiu BBR modifikavo naviko chemoterapinio atsparumo mechanizmus, inhibuodamas vėžinių ląstelių membranų ABC pernešėjus (angl. ABC transporters) ir slopindamas autofagiją per PTEN/Akt/mTOR signalizacijos kelią (angl. PTEN/Akt/mTOR signaling pathway), o glioblastomos atveju BBR sumažino atsparumą temozolomidui, moduliudamas ERK1/2 signalizavimo kelią. Taip pat pastebėta, jog pritaikius gydymą gaubtinės žarnos navikui ir skrandžio vėžiui, BBR sustiprino irinotekano ir cisplatinos poveikį, atitinkamai inhibuodamas NF-κB transkripcijos faktorių ir slopindamas PI3K/Akt/mTOR kelią.

Okuno ir kolegų atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad BBR žymiai pagerino kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių jautrumą gemcitabinui, slopindamas pagrindinius onkogeninius kelius, pavyzdžiui, Rap1/PI3K/Akt, kuris, kaip žinoma, yra susijęs su atsparumu vaistams ir prisideda prie naviko augimo bei metastazavimo. Šis signalizavimo kelias yra labai svarbus reguliuojant ląstelės ciklą, apoptozę ir naviko ląstelių proliferaciją, o jo disreguliacija glaudžiai siejasi su kasos duktalinės adenokarcinomos chemorezistentiškumo (atsparumo chemoterapijai) vystymusi. Tyrimas parodė, kad BBR sukėlė ląstelės ciklo sustabdymą ir sustiprino apoptozę gemcitabinui atspariose kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijose, taip panaikindamas atsparumą gemcitabinui. Be to, BBR ir gemcitabino derinys sukėlė sinergistinį poveikį, ne tik slopindamas Rap1/PI3K/Akt kelią, bet ir žymiai sumažindamas

kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių gyvybingumą, migraciją ir tolimesnę invaziją. Tyrimo metu kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijose pastebėti poveikiai buvo patvirtinti eksperimentais, panaudojus pacientų navikų organoidų modelius, kurie taip pat patvirtino BBR veiksmingumą, sprendžiant su kasos duktalinės adenokarcinomos chemorezistentiškumu susijusius terapinius iššūkius. Taigi, Okuno ir kt. atlikto tyrimo įžvalgos leidžia daryti prielaidą, kad berberinas ateityje galėtų papildyti kasos duktalinės adenokarcinomos chemoterapijos režimus: tai būtų ypač aktualu pacientams, kurie susiduria su neigiamomis gydymo toksiškumo ar atsparumo vaistams sukeltomis pasekmėmis. BBR gebėjimas paveikti svarbius kasos duktalinės adenokarcinomos molekulinis kelius, įskaitant Rap1/PI3K/Akt signalizavimo ašį (angl. Rap1/PI3K/Akt signaling axis), teikia vilčių, kad bus įveikta atsparumo gemcitabinui problema ir pagerinti kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų išgyvenamumo rezultatai. Nors Okuno ir kolegų tyrimas suteikia daug žadančių įžvalgų apie BBR vaidmenį didinant gemcitabino veiksmingumą, svarbu paminėti ir tam tikrus tyrimo apribojimus. Pavyzdžiui, eksperimentų su organoidų modeliais rezultatai buvo pagrįsti tik dviejų pacientų organoiduose stebėtais rezultatais. Todėl tam, kad būtų nuodugniai išanalizuoti su berberino poveikiu susiję molekuliniai naviko atsako mechanizmai, reikalinga atlikti tolimesnius tyrimus ir patvirtinti šias išvadas didesnėse, įvairesnėse pacientų populiacijose, taip pat įvertinti gautų duomenų tikslumą patikimuose eksperimentiniuose modeliuose [191].

Kitame Okuno ir kolegų (2023 m.) straipsnyje pristatomos išvados iš tyrimo, kurio metu buvo siekiama išsiaiškinti, ar natūralus augalinis junginys *Andrographis* (*Andro*) taip pat galėtų padėti įveikti kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsparumą gydymui gemcitabinu. Andrografolidas (angl. andrographolide), labdano diterpenoidas (angl. labdane diterpenoid), išskirtas iš žolės *Andrographis paniculata*, yra priskiriamas prie stiprių kalcio kanalų blokatorių. Remiantis atliktų tyrimų duomenimis, yra žinoma, kad *Andrographis*, turi chemosensibilizuojančių savybių, t. y., jo poveikis gali padidinti vėžio ląstelių jautrumą vaistams, tokiems kaip doksorubicinas, 5-FU ir cisplatina. Pastebėta, kad kiaušidžių vėžio atveju, *Andrographis* panaikino atsparumą cisplatinai, paskatindamas naviko ląstelių apoptozę, taip pat pastaruoju metu mokslinėje literatūroje atsiranda įrodymų apie šio natūralaus junginio potencialą įveikti kasos navikų atsparumą 5-FU, gydant storosios žarnos vėžį.

Pažymėtina, kad *Andrographis* neseniai sulaukė mokslininkų dėmesio dėl gebėjimo reguliuoti keletą svarbių onkogeninių signalizavimo kelių, identifikuojamų įvairių onkologinių susirgimų atvejais. Tarp svarbiausių molekulinio signalizavimo kelių, prisidedančių prie kasos duktalinės adenokarcinomos navikų išvystomo atsparumo gemcitabinui, paminėtini su tirozino kinaze susiję keliai, kaip antai, MAPK ir PI3K-Akt, kuriuos aktyvuoja KRAS mutacijos, nustatomos apie 90% kasos vėžiu sergančių pacientų. Okuno ir kt. straipsnyje atkreipiamas dėmesys į dar vieną, ne mažiau svarbų veiksnį, turintį įtakos kasos navikų atsakui į gydymą jautrumui: tyrėjai, remdamiesi transkriptomino profiliavimo duomenimis ir išanalizavę kasos duktalinės adenokarcinomos audinių mėginius, kaip pagrindinį atsparumo gemcitabinui reguliatorių įvardijo kalcio signalizavimo kelią (angl. calcium signaling pathway) ir taip pat nustatė, kad padidėjusi ERBB3 (kalcio signalizavimo kelio geno, atliekančio lemiamą vaidmenį nuo ligandų priklausomoje kalcio pernašoje) ekspresija buvo susijusi su prastomis onkologinių pacientų prognozėmis. Kalcio signalizavimo kelias yra įvairių ląstelių funkcijų reguliatorius ir susijęs su daugelio vėžio formų, įskaitant kasos duktalinę adenokarcinomą, patogenezę. Naujausi tyrimai parodė, kad kalcio signalizavimo kelias reikšmingai prisideda prie vėžio

ląstelių atsparumo chemoterapijai vystymosi, todėl tai gali tapti perspektyviu terapiniu taikiniu, gydant įvairių tipų piktybinius navikus. Įdomu tai, kad kalcio kanalų blokatoriai, pavyzdžiui, amlodipinas, turi įtakos kalcio signalizavimo kelio veiklai, todėl pastaruoju metu mokslininkai aiškinasi, ar šie vaistai ateityje galėtų įveikti kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių atsparumą gemcitabinui.

Tirdami molekulinis mechanizmus, kuriais grindžiamas andrografolido sukeltas atsparumo gemcitabinui panaikinimas, mokslininkai atliko eksperimentų seriją, panaudodami kelias gemcitabinui atsparias kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijas. Gautos išvados toliau buvo patikrintos ir patvirtintos pasitelkus 3D pacientų organoidų modelius. Galiausiai Okuno ir kt. atliktas tyrimas parodė, kad gydymas *Andrographis* preparatu sumažino ERBB3 ekspresiją ir tarpląstelinį kalcio kiekį gemcitabinui atspariose kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėse. Toks kalcio kiekio sumažėjimas padidino ląstelių apoptozę ir panaikino atsparumą gemcitabinui. Išsiaiškinus, jog *Andrographis* gebėjimas slopinti ERBB3 medijuojamą kalcio signalizavimą padidina jautrumą gemcitabinui, ateityje svarstyta galimybė įtraukti šį augalinį junginį į kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo režimus.

Okuno ir kt. straipsnyje pateikiama daug žadančių išvadų apie *Andrographis* naudą, tačiau taip pat atkreiptinas dėmesys į šio tyrimo trūkumus. Visų pirma, eksperimentai buvo atlikti naudojant tik dvi gemcitabinui atsparias kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijas ir 3D organoidų modelius, sukurtus iš trijų pacientų navikų mėginių. Be to, į tyrimą nebuvo įtraukti in vivo modeliai, o tai reiškia, kad nebuvo įvertintas galimas *Andrographis* toksiškumas ir nustatyta optimali dozė. Ankstesniuose mokslininkų eksperimentuose, vykdytuose panaudojus *Andrographis* panašiomis dozėmis kaip Okuno ir kolegų atliktame tyrime, buvo pastebėtas stiprus priešvėžinis šio natūralaus junginio aktyvumas, tačiau be neigiamo poveikio pelėms, todėl tikėtina, kad Okuno ir kt. tyrimo metu pritaikyta *Andrographis* dozė gali būti priimtina, tačiau norint patvirtinti šias išvagas ir pasitelkti *Andrographis* klinikiniam naudojimui, yra būtina atlikti tolesnius tyrimus. Anot straipsnio autorių, būsimuose tyrimuose taip pat galėtų būti skiriama dėmesio *Andrographis* ir kitų kalcio kanalų blokatorių (pvz., verapamilio, augalinių preparatų) veiksmingumo palyginimui, siekiant geriau suprasti kalcio signalizavimo kelio reikšmę mažinant atsparumą gemcitabinui kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėse. Taigi, tikimasi, kad surinkus pakankamą kiekį įrodymų apie *Andrographis* efektyvumą, šis natūralus augalinis junginys ateityje galėtų būti pasitelkiamas kaip papildomas terapinis komponentas kasos vėžiu sergančių pacientų gydymui [192].

Remiantis įrodymais iš analizuotų mokslinės literatūros straipsnių, svarbu pabrėžti, kad individualių organoidų modelių taikymas kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimuose suteikia mokslininkams galimybes identifikuoti kasos navikų atsparumo chemoterapijai mechanizmus ir kurti efektyvesnes kasos vėžio gydymo schemas. Apibendrinant naujausių tyrimų duomenis, galima teigti, jog kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumas chemoterapijai gali būti susijęs su daugeliu molekulinį veiksmų: genų raiškos pokyčiais (pvz., CYP3A, MAGEA izoformų, SMAD4 ir NFATc1 ekspresija), naviko mikroaplinkos poveikiu (pabrėžtina CXCL12/CXCR4 chemokinių ašies įtaka) ir onkogeniniais signalizacijos keliais (pvz. Wnt/ β -katenino, Rap1/PI3K/Akt). Pastaruoju metu ieškodami alternatyvių kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo sprendimų, mokslininkai nemažai dėmesio skiria terapinio specifiškumo ir efektyvumo užtikrinimui, šiuo tikslu pasitelkdami inovatyvius įrankius, pavyzdžiui RNR aptamerus, pagerinančius vaistų pasisavinimą kasos navikų mikroaplinkoje. Vilčių kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo kontekste taip pat teikia

mokslinėje literatūroje pateikiami įrodymai apie tai, kad specifinių inhibitorių, tokių kaip Pin1 ar BETi, poveikiai gali padidinti chemoterapijos efektyvumą, o natūralūs junginiai (pvz., berberinas, andrografolidas) gali sustiprinti gemcitabino poveikį, mažindami kasos vėžio ląstelių atsparumą gydymui.

Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių pritaikymas vaistų testavimo ir farmakotipavimo tyrimuose

Kasos duktalinės adenokarcinomos diagnozė dažniausiai nustatoma jau išsivysčius pažengusiai ligos stadijai, todėl kasos vėžiu sergančių pacientų gydymo galimybės paprastai būna ribotos. Tokiais atvejais sisteminis gydymas, pavyzdžiui, neoadjuvantinė ar adjuvantinė chemoterapija, derinamas kartu su chirurgine intervencija, tik nežymiai pagerina bendrą pacientų išgyvenamumą (angl. overall survival, OS) ir išgyvenimo be ligos progresavimo rodiklį (angl. progression-free survival, PFS). Be to, gydant kasos duktalinę adenokarcinomą vienu pagrindinių iššūkių išlieka ligos atsparumas įprastiems chemoterapiniams režimams: tik mažesnioji dalis pacientų, kuriems taikoma chemoterapija, efektyviai reaguoja į taikomą gydymą, kadangi liga pasižymi dideliu heterogeniškumu. Taigi, siekiant geresnių kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo rezultatų, atsiranda individualizuotų terapinių strategijų kūrimo poreikis [43].

Lokaluoto ir metastazavusio kasos vėžio gydymo režimų parinkimas labai priklauso nuo paciento fizinės būklės ir gretutinių ligų. Tik tam tikrose retai pasitaikančiose situacijose, kai kasos duktalinės adenokarcinomos išsivystymas siejamas su reikšmingomis mutacijomis, tokiomis, kaip antai, BRCA2 geno mutacijos, mikrosatelitų nestabilumas ir gana retai nustatoma KRASG12C mutacija, yra galimas specifinis gydymas, nukreiptas į šių genetinių pokyčių poveikio moduliavimą. Visgi nemaža dalis kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų neturi paminėtų mutacijų, todėl tokiais atvejais tenka ieškoti alternatyvių gydymo būdų, pasitelkiant inovatyvias tiriamąsias platformas navikų genotipinių ir fenotipinių savybių modeliavimui bei atliekant individualizuotą vaistų testavimą. Kasos duktalinės adenokarcinomos fenotipo tyrimus anksčiau riboja pacientų sukurtų modelių, galinčių tiksliai atspindėti ligos savybių spektrą, stoka, o tai kartu lėmė iššūkius, susijusius su gydymo atsako prognozavimo patikimumu. Organoidų ląstelių kultūros kūrimo technologija iš esmės pakeitė šią tyrimų sritį. Šiuo metu organoidų modeliai, sukurti iš kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų chirurginės rezekcijos mėginių ir plonos adatos biopsijos medžiagos, laboratorijose gali būti sėkmingai išauginami, išsaugant pirminių navikų genetines ir fenotipines savybes [43].

Kaip pavyzdį galima pristatyti Tiriac ir kolegų (2018) publikuotame straipsnyje pateikiamą sėkmingai sukurtų organoidų kultūrų bibliotekos analizę, į kurią iš viso buvo įtraukti 66 kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų organoidų modeliai. Medžiaga, skirta organoidų modeliavimui, gauta iš įvairių klinikinių mėginių, įskaitant plonos adatos aspiracinę biopsiją, chirurgines rezekcijas ir autopsijas; visi tyrimo duomenys buvo surinkti iš keleto gydymo įstaigų. Atlikus išsamią genominę ir transkriptominę analizę, nustatyta, kad sukurti organoidų modeliai tiksliai atspindėjo esminius genetinius kasos duktalinės adenokarcinomos požymius, įskaitant pagrindinių genų, tokių kaip KRAS, TP53, CDKN2A ir SMAD4, mutacijas. Be to, tyrimas parodė didelį pirminių navikų ir pagal juos sukurtų individualių organoidų molekulinį profilių atitikimą.

Siekdami panaudoti šių organoidinių kultūrų potencialą klinikinėje aplinkoje, Tiriac ir kt. sukūrė vaistų testavimo, arba farmakotipavimo, platformą. Šis vaistų patikros metodas suteikė galimybes kiekviename organoido modelyje nustatyti jautrumo vaistams profilius per kliniškai reikšmingą laikotarpį. Vertindami individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių terapinį potencialą, Tiriac su kolegomis pritaikė išsamų farmakotipų nustatymo tyrimą 66 pagal kasos navikų medžiagą sukurto organoidų kultūroms. Farmakotipavimo metu vertintas organoidų atsakas į penkis chemoterapinius agentus, kurie klinikinėje praktikoje įprastai naudojami gydant kasos duktalinę adenokarcinomą: gemcitabiną, nab-paklitakselį (organoidų atsakui vertinti kaip atitinkmuo buvo pasirinktas paklitakselis), irinotekaną (kad būtų galima įvertinti organoidų atsaką, irinotekanas pateiktas aktyvaus metabolito SN-38 formoje), 5-fluorouracilą (5-FU) ir oksaliplatiną.

Tiriac ir kt. tyrimo metu išsiaiškinta, jog individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių farmakotipų nustatymo rezultatai atspindėjo reikšmingą skirtingų pacientų atsaką į gydymui taikytus chemoterapinius preparatus. Pacientų organoidų atsako į vaistus kintamumas buvo matuojamas pasitelkus dozės ir atsako kreives, o kiekvieno terapinio agento veiksmingumas pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos navikų organoidų modeliuose buvo kiekybiškai įvertintas apskaičiuojant plotą po kreive (angl. area under the curve, AUC). Tyrėjai suskirstė organoidines ląstelių kultūras į tris skirtingus pogrupius, atsižvelgdami į jų reakciją į kiekvieną atitinkamai taikytą chemoterapinį agentą. Pirmajam pogrupiui buvo priskirti 34 % su didžiausiomis AUC reikšmėmis susijusių organoidų, o tai atspindėjo mažiausią jautrumą ir kartu didžiausią atsparumą chemoterapiniam agentui. Į antrąjį pogrupį buvo įtraukti 33 % organoidų, pasižymėję jautriausiu atsaku į taikytą chemoterapiją, kurių atitinkamos AUC reikšmės buvo mažiausios. Vidutinio atsako pogrupiui priklausė 33 % organoidų, kurių AUC reikšmės atspindėjo vidutinį atsaką į taikytus chemoterapinius vaistus. Pažymėtina, kad farmakotipo nustatymo rezultatai išliko stabilūs po kelių organoidų kultivavimo ciklų (buvo pastebėti tik nedideli pokyčiai), o tai rodo organoidų, kaip vaistų testavimui pritaikomų modelių, reprezentatyvumą ir patikimumą.

Individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių prognostines galimybes iliustruoja Tiriac ir kt. straipsnyje aprašytas klinikinis atvejis. Iš pradžių kasos duktalinė adenokarcinoma sergantis pacientas buvo gydomas keturių vaistų deriniu, įskaitant oksaliplatiną, 5-FU (pastariesiems vaistams individualiame paciento organoido modelyje buvo stebimas vidutinis jautrumas) ir paklitakselį, kurio poveikiui paciento organoidas buvo atsparus. Be to, šis pacientas pasižymėjo ankstyvu ligos progresavimu tiek pirminėje naviko vietoje, tiek metastazių srityse, kaip ir buvo tikėtasi ištyrus vėžio vystymosi dinamiką paciento individualiame organoido modelyje. Progresuojant ligai, paciento gydymo režimas buvo pakeistas į antros eilės gydymą, susidedantį iš gemcitabino ir SN-38: paciento organoido farmakotipavimo metu buvo nustatytas didelis naviko jautrumas abiems paminėtiems vaistams. Pakoreguotas gydymo režimas lėmė dalinį atsaką, kuris truko 388 dienas, o tai rodo reikšmingai pratęstą ligos kontrolės laikotarpį. Ligos eigoje pacientui buvo taikyti trečios ir ketvirtos eilės gydymo režimai, kol galiausiai jis mirė praėjus 1020 dienų po diagnozės nustatymo. Taigi, Tiriac ir kt. straipsnyje aprašytas paciento atvejis patvirtina įsitikinimą, kad organoidų modelių farmakotipavimas gali tiksliai atspindėti klininius rezultatus, taip suteikiant vertingų įžvalgų, galinčių padėti priimti terapinius sprendimus. Sąsaja tarp organoidų jautrumo profilio ir paciento faktinio gydymo atsako rodo, kad organoidų modelių pritaikymas farmakotipavimui galėtų padėti individualizuoti vėžio terapiją ir optimizuoti vaistų

pasirinkimą kiekvienam pacientui. Tyrimo autoriai, išanalizavę individualių organoidų modelių jautrumą vaistams, pagal tai sukūrė atitinkamus genų raiškos profilius (angl. transcriptional signatures), kurie gana tiksliai atspindėjo paciento gydymo rezultatus klinikinėje aplinkoje, ypač po pritaikyto gydymo gemcitabinu arba modifikuotu FOLFIRINOX režimu. Mokslininkų sukurti genų raiškos profiliai pirmiausia yra skirti identifikuoti į pirmosios eilės chemoterapiją reaguojančius pacientus (angl. common responders to first-line chemotherapy) ir taip pasiekti greitesnį klinikinį efektą, be to, šie genų raiškos profiliai suteikia vertingų įžvalgų apie individualizuoto gydymo galimybes pacientams, sulaukiantiems atsako į gydymą po ilgesnio laikotarpio (angl. long-term responders).

Visgi genų raiškos profilių taikymas tyrimuose yra siejamas su tam tikrais šio metodo trūkumais ir apribojimais. Remiantis Tiriac ir kt. straipsnio duomenimis, 5-FU jautrumo profilis parodė žemą efektyvumą, vertinant klinikinių pacientų atsaką, todėl norint pasiekti tikslesnių rezultatų, reikalinga toliau tobulinti šį 5-FU jautrumo profilį. Panaši tendencija buvo pastebėta COMPASS tyrime, kuomet SN-38 genų raiškos profilis nevisiškai paaikškino pacientų atsaką į oksaliplatiną, greičiausiai dėl irinotekano dozavimo skirtumų arba netikslaus profilio kalibravimo. Nepaisant paminėtų apribojimų, gemcitabino, oksaliplatinos ir paklitakselio profiliai reikšmingai atitiko klinikinius pacientų atsakus, o paciento ir jo organoidų atsakų į gydymą nesutapimo atvejai, kaip manoma, gali būti susiję su intratumoriniu heterogeniškumu arba sparčiu atsparių subklonų atsiradimu. Šiuo atveju, neinvaziniai biožymenų tyrimai galėtų padėti greitai pritaikyti gydymą, kad jis atitiktų kintančią ligos dinamiką.

Tiriac ir kt. tyrimo rezultatai taip pat atskleidė, kad farmakotranskriptominių genų raiškos (jautrumo vaistams) profilių tobulinimas yra tikslingas, siekiant juos pasitelkti tolesnėse kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo strategijų paieškose. Tyrėjai nustatė, kad maždaug trečdalyje organoidų kultūrų nestebėta jautrumo nė vienai iš penkių standartinių chemoterapijų. Tačiau daugiau nei pusė šių chemoterapijai atsparių individualių organoidų modelių parodė jautrumą tikslingai paskirtiems terapiniams agentams, o tai rodo, kad vaistų derinių ar tiriamųjų terapijų tyrimas klinikiniuose tyrimuose gali suteikti didelių klinikinių galimybių. Be to, nors pirminiai kasos navikai dažnai pasižymi mažu vėžinių ląstelių skaičiumi (angl. low cellularity) ir tai pasunkina molekulinę analizę, organoidų kultūros geba perteikti aukštos kokybės genetinius duomenis, kuriais remiantis identifikuojamos mutacijos ir sudėtingi genetiniai persitvarkymai. Pavyzdžiui, kaip buvo pastebėta Tiriac ir kt. tyrime, KRAS laukinio tipo kasos duktalinės adenokarcinomos atvejai buvo susiję su retais onkogeniniais veiksniais, tokiais kaip ERBB2S310F ir PIK3CAE110del, kurie atitinkamai reagavo į tikslines terapijas, kaip antai, į gydymą afatinibu ir everolimuzu [43].

Galima teigti, kad individualių organoidų modelių farmakotipų nustatymas ir farmakotranskriptominių genų raiškos profilių sukūrimas yra greitai įgyvendinami ir kliniškai reikšmingi sprendimai, pasitelktini kasos duktalinės adenokarcinoma sergančių pacientų stratifikavimui, atsižvelgiant į jų tikimybę reaguoti į atitinkamai paskirtą chemoterapijos režimą. Toks organoidų pritaikymas klinikinėje praktikoje, kartu integruojant alternatyvius gydymo atsako vertinimo metodus, galėtų prisidėti prie pradinių pacientų gydymo strategijų tobulinimo ir optimizuoti individualizuotą priežiūrą, derinant visa tai su konkretaus paciento molekulinio profiliavimo duomenimis (angl. longitudinal molecular profiling) [43].

Inovatyvių tiriamųjų metodų, kaip antai, naujos kartos sekoskaitos (angl. clinical next-generation sequencing, NGS) ir farmakotipavimo, taikymas individualiuose kasos duktalinės

adenokarcinomos organoidų modeliuose padeda mokslininkams kurti dar efektyvesnes personalizuoto kasos vėžio gydymo schemas. Seppälä su kolegomis (2022 m.) ištyrė kasos duktalinės adenokarcinomos modelių pritaikymą gerinant klinikinio naujos kartos sekoskaitos panaudojimo galimybes ir įgalinant ex vivo chemoterapijos testavimą (farmakotipavimą). Individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos modeliai, išauginti iš chirurginių ir biopsinių mėginių, padėjo tiksliau aptikti somatinės mutacijas ir kopijų skaičiaus variantus (angl. copy number variants), ypač po biopsinių mėginių biomasės padauginimo (angl. biomass expansion) o tai labai svarbu nustatant kliniškai reikšmingas kasos duktalinės adenokarcinomos mutacijas. Tyrėjai atliko farmakotipavimą, kuris padėjo numatyti specifinį paciento jautrumą chemoterapijos režimams, ypač FOLFIRINOX (FFX), be to, gauti rezultatai koreliavo su palankiomis klinikinėmis pasekmėmis, tokiomis kaip naviko žymens CA-19-9 sumažėjimas ir pagerėjęs RECIST (angl. Response Evaluation Criteria in Solid Tumor) atsako kriterijus, vertintas atliekant kompiuterinę tomografiją. Seppälä ir kt. parodė, kad CLIA (angl. Clinical Laboratory Improvement Amendments) sertifikuotose laboratorijose sukurti organoidai gali būti patikimai pasitelkiami kaip nuspėjamieji chemoterapinio atsako biožymenys (angl. biomarkers). Tarp Seppälä ir kt. straipsnyje minimų organoidų modelių pranašumų paminėtinas šios tiriamosios platformos panaudojimas taikant individualius gydymo režimus, ypač tiems pacientams, kuriems reikalinga atlikti chirurginę intervenciją, tinkamai parenkant adjuvantinę terapiją. Taip pat tyrimo metu atliktas organoidų farmakotipavimas parodė specifinį paciento jautrumą vaistams, o ne sinerginį kelių terapinių agentų režimų poveikį, todėl ši organoidų modelių savybė įrodo jų vaidmens svarbą tiksloje terapijoje. Tyrimas taip pat pabrėžia organoidų modelių suteikiamą galimybę atlikti sekoskaitos metodu pagrįstą DNR analizę, šiuo tikslu išgryninus piktybinių epitelinių ląstelių komponentus (atskyrus nepiktybinių ląstelių DNR) mažai vėžinių ląstelių turinčiuose navikuose (angl. paucicellular tumors) – visa tai įgalintų geresnį mutacijų aptikimą. Nepaisant tam tikrų tyrimo apribojimų, tokių kaip mažas imties dydis ir laiko kaštai, Seppälä su kolegomis pateikia svarbių įžvalgų apie individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių integravimą į klinikinę praktiką, siekiant patobulinti ligos gydymo strategijas [193].

Individualūs pacientų navikų organoidų modeliai vis dažniau pasitelkiami didelio našumo vaistų patikros tyrimuose (angl. *high-throughput drug screening*), siekiant numatyti pacientų atsakus tiek į tradicinius, tiek į naujai tiriamus terapinius režimus. Kaip pavyzdį galima paminėti Armstrong ir kolegų atliktą tyrimą (2021 m.), kurio metu mokslininkai sukūrė didelio našumo vaistų atrankos platformą, pasitelkdami individualius pacientų organoidų modelius, sukurtus panaudojus medžiagą iš Rush universiteto medicinos centre (angl. Rush University Medical Center) atliktų biopsijų. Organoidus pavyko sėkmingai išauginti 15 iš 18 biopsijų, tad jų generavimo sėkmės rodiklis buvo gana aukštas (sudaro 83%). Mokslininkų sukurti organoidų modeliai buvo veikiami 18 vaistų, įskaitant standartiškai kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui skiriamus pirmosios eilės chemoterapinius agentus, pvz., FOLFIRINOX, gemcitabino ir nab-paklitakselio derinį, kartu su FDA patvirtintomis taikinių terapijos vaistais (angl. FDA-approved targeted therapies). Tyrimo metu vertinant organoidų atsakus į paskirtus chemoterapinius vaistus, buvo naudojamas specialus ląstelių gyvybingumo testas „Cell-Titer GLO 3D viability test“, o plotas po kreive (angl. area under the curve, AUC) buvo apskaičiuotas ir normalizuotas iki intervalo nuo 0 iki 1, siekiant užtikrinti rezultatų nuoseklumą bei palyginamumą tarp skirtingų tyrimų. AUC intervalo normalizavimas leido pašalinti bet koki tyrimo rezultatų šališkumą, kuris gali atsirasti dėl absoliučių verčių skirtumų, taip buvo standartizuotas vaistų atsako palyginimas tarp tirtų mėginių. Taip pat Armstrong ir

kolegos atliko molekulinio profiliavimo tyrimą, panaudodami RNR sekoskaitą, bei identifikavo skirtingus transkriptominius žymenis, susijusius su skirtingu jautrumu vaistams. Informaciją apie žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos transkriptomą mokslininkai surinko iš Vėžio genomo atlase (The Cancer Genome Atlas, TCGA) pateiktų duomenų. Tyrimo metu nustatyta, kad bendras atsparumo konvencinei terapijai transkriptominis profilis (angl. transcriptomic profile of overall resistance) buvo susijęs su prastesniu kasos duktaline adenokarcinoma sergančių pacientų išgyvenamumu; šiuos rezultatus patvirtino ir transkriptominiai duomenys iš Vėžio genomo atlaso. Be to, tikslinė signalizavimo kelių analizė (angl. targeted pathway analysis) parodė, kad tam tikri genų žymenys gali padėti numatyti terapinius atsakus į taikinius vaistus, tokius kaip palbociclibas ir olaparibas. Šie Armstrong ir kt. tyrimo radiniai suteikia vertingos informacijos, kuriant biožymenimis pagrįstus kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo metodus [194].

Siekiant palyginti organoidų modelių tikslumą nustatant jautrumą chemoterapiniams vaistams su kliniškai stebimais pacientų atsakais į jiems pritaikytą gydymą, neseniai buvo atliktas HOPE tyrimas (angl. The HOPE trial - Harnessing Organoids for PErsonalized Therapy). Grossman ir kolegų publikuotame straipsnyje (2022 m.) pateikiamos tyrimo išvados suteikia tvirtą pagrindą manyti, kad individualius kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius galima klasifikuoti pagal jų jautrumą arba atsparumą chemoterapijai, parodant ryšį tarp atsakų į gydymą organoidų modeliuose ir faktinių pacientų klinikinių rezultatų. HOPE pilotinės studijos metu organoidų modeliai buvo sukurti iš įvairialypės pacientų grupės, įtraukus tiek bazinio, tiek klasikinio kasos duktalinės adenokarcinomos potipių mėginius. Nepaisant iššūkių kuriant pacientų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius iš negausių biopsinių audinių, ypač kai paimtuose iš pacientų mėginiuose naviko ląstelių skaičius buvo mažesnis nei 20%, tyrimas parodė sėkmingus rezultatus 42% atvejų, kuomet organoidų auginimui iš pacientų buvo išgauta pakankamai ląstelių. Be to, tyrėjai atkreipė dėmesį, kad kepenų metastazių mėginiai buvo susiję su didesniu pacientų organoidų modelių generavimo sėkmės rodikliu, palyginus su pirminio kasos audinio biopsine medžiaga.

HOPE tyrime dalyvavo 76 kasos duktaline adenokarcinoma sergantys pacientai, kuriems pirmausia buvo taikomos standartinės chemoterapijos schemos, tokios kaip FOLFIRINOX ar gemcitabinas derinyje su nab-paklitakseliu; iš pacientų mėginių buvo sukurti individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai. Iš 76 pacientų 46 buvo patvirtinta patologinė diagnozė tarp tyrimo metu atliktų biopsijų mėginių, iš viso pacientų organoidų modelių kūrimui buvo atrinkti 75 mėginiai. Individualius pacientų organoidų modelius pavyko sėkmingai sukurti 31 iš 75 mėginių (41%), o 13 iš jų buvo kultivuojami toliau tam, kad būtų galima ištirti jautrumą vaistams. Tyrėjai nustatė, kad tokie veiksniai kaip biopsijos paėmimo būdas ir naviko ląstelingumas turi įtakos organoidų generavimui, o didesnis ląstelių kiekis (> 20%) padidina sėkmingo organoidų modelių išauginimo tikimybę. Tyrimo metu buvo klasifikuojami kasos duktalinės adenokarcinomos potipiai, naudojant imunohistocheminius ir RNR sekoskaitos metodus, identifikuojant bazinio ir klasikinio potipio navikus: išsiaiškinta, kad pacientų organoidų modeliai išlaikė fenotipinę ir genetinę homologiją, palyginus su donorų navikais. Taip pat DNR sekos nustatymas atskleidė kliniškai reikšmingas mutacijas, įskaitant dažnai pasitaikančias genų, tokių kaip KRAS, TP53 mutacijas, bei CDKN2A/2B ir SMAD4 genų inaktyvaciją. HOPE tyrimo metu buvo pasitelktas naujas metodas, skirtas klasifikuoti atsakus į chemoterapinius vaistus, panaudojus dozės ir atsako profilių plotą po kreive (angl. the area under the curve (AUC) of dose-response profiles), - tai padėjo numatyti klinikinę ligos

kontrolę. Iš viso 12 organoidų modelių buvo stebimi individualūs atsakai į paskirtus chemoterapinius vaistus, be to, organoidų jautrumas tam tikriems terapiniams agentams, kaip antai, irinotekanui ir trametinibui, koreliavo su pacientų klinikiniais rezultatais. Atkreiptinas dėmesys, jog ne visi tyrime naudoti vaistai buvo išbandyti konkrečiai kiekvienam organoido modeliui: terapinių agentų grupė buvo sudaroma ir pritaikoma pagal tai, kokius vaistus tiriamasis gavo iki savo organoidinio modelio generavimo ir kokius vaistus jis, tikėtina, turės vartoti jau vėliau, gydymo režimo pakeitimo atveju. Taigi, galiausiai HOPE tyrimo išvados įrodo, kad individualūs organoidų modeliai gali veiksmingai numatyti pacientų atsakus į konkrečiai jiems paskirtą terapinį režimą ir pateikia perspektyvų požiūrį individualizuoto kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo kontekste [40].

Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai, kaip vaistų testavimo platforma, mokslininkams suteikia galimybes tirti naujai kuriamas kasos vėžio gydymo schemas, skirtas chemoterapijos sukkelto toksiškumo mažinimui. Lei ir kt. tyrimo (2021 m.) aprašyme pristatomas daug žadantis kasos duktalinės adenokarcinomos terapinis metodas, galintis padėti sumažinti standartiškai šios ligos gydymui pasitelkiamo FOLFIRINOX režimo šalutinius poveikius, gydant pažengusios stadijos kasos navikus, - tai polimerinių micelių sistema, kurioje kartu yra inkapsuliuotos chemoterapinių vaistų - irinotekano (SN38) ir oksaliplatinos (DACHPt) - aktyvios veikliosios formos. Panaudodami PEG-PGlu kopolimerus (angl. PEG-PGlu copolymers), tyrėjai sukūrė 45 nm dydžio micles, kurias stabilizavo pritaikę kryžminio jungimo metodą (angl. crosslinking), taip užtikrindami kontroliuojamą terapinių agentų išsiskyrimą iš micelių ir pagerintą polimerinių sistemų struktūrinį stabilumą. Mokslininkų sukurtos micelės pasižymėjo geru koloidiniu stabilumu ir sinchronizuotu abiejų vaistų (irinotekano ir oksaliplatinos) išsiskyrimu iš micelių, pailgindamos veikliųjų medžiagų veikimo laiką, esant fiziologinėms sąlygoms. Atlikus in vitro eksperimentus, pastebėta, jog kasos vėžio ląstelėse pasireiškė stiprus citotoksinis dvigubo vaistų derinio, pasiekusio ląsteles micelių pavidalo sistemoje, poveikis. Dvigubo vaistų derinio micelių (angl. dual-drug micelles) sistemos efektas buvo siejamas su didesniu terapiniu veiksmingumu ir poveikio sinergija, palyginus su vieno vaisto sistemų arba laisvų vaistų derinių poveikiais. Be to, svarbu paminėti, kad dvigubo vaisto micelės pasižymėjo mažesniu toksiškumu sveikoms kasos ląstelėms, palyginus su laisvų vaistų deriniais. Lei ir kt. taip pat patvirtino, jog organoidų modeliuose, sukurtuose iš pelių navikų, kuriuose buvo nustatytos Kras^{G12D}; Trp^{53R172H/+}; Pdx1-Cre mutacijos, dvigubo vaisto micelės reikšmingai slopino vėžio ląstelių augimą, skatino apoptozę ir nekrozę, veikdamos efektyviau nei laisvų vaistų deriniai ar vieno vaisto micelės. In vitro eksperimentų tendencijos pasitvirtino ir patikrinus dvigubo vaistų derinio (SN38 + DACHPt) micelių poveikį in vivo sąlygomis: ortotopiniuose pelių kasos duktalinės adenokarcinomos pelių modeliuose buvo reikšmingai nuslopintas naviko ląstelių augimas ir galimybės metastazuoti, pranokstant tiek laisvų vaistų, tiek vieno vaisto micelių poveikius. Be to, in vivo histologinė navikų analizė parodė, jog pelių kasos duktalinės adenokarcinomos tiriamųjų modelių grupėse, kuriose buvo taikyta micelių terapija (angl. micelle-treated groups), užfiksuota sumažėjusi vėžio ląstelių proliferacija (remiantis Ki67 žymeniu) ir suaktyvėjusi apoptozė (tą įrodė aptiktas skilęs kaspazės-3 žymuo, angl. cleaved caspase-3). Tyrimo metu taip pat pastebėta, jog 50% micelėmis gydytų pelių neišsivystė navikų metastazės, o likusiai daliai nustatyti nežymūs kasos vėžio metastazavimo požymiai. Lei ir kt. akcentuoja ir dar vieną svarbų micelių poveikio komponentą – terapinės sistemos paskatintą naviko mikroaplinkos pertvarkymą. Polimerinės micelių sistemos remodeliavo naviko mikroaplinką, sumažindamos joje kolageno tankį, fibroblastų aktyvumą (tą įrodė ląstelėse aptikta sumažėjusi α -SMA raiška)

ir pagerindamos kraujagyslių struktūrinį taisyklingumą (identifikuotos CD31 teigiamos kraujagyslės, pasižyminčios normalia struktūra, angl. CD31-positive vessels). Mokslininkai remdamiesi tyrimo metu gautais stebėjimų duomenimis, susiejo inovatyvių micelių sistemų pritaikymą su galimybėmis efektyviau tiekti terapinius agentus į jų tikslas poveikio vietas, padidinti standartinių chemoterapinių vaistų efektyvumą ir sumažinti sisteminę terapijos toksiškumą (hematologinius, kepenų funkcijos sutrikimus), kuris dažnai pasireiškia pacientams, gydomiems laisvų vaistų režimais (angl. free drug regimens). Lei ir kt. tyrimo rezultatai pabrėžia dvigubo vaisto micelių sistemų panaudojimo kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui galimybes: tikimasi, kad pasitelkus šias terapines sistemas, ateityje pavyks pagerinti FOLFIRINOX režimo veiksmingumą, sumažinti jo toksinį poveikį, gydant kasos vėžiu sergančius pacientus, tačiau siekiant patvirtinti šio terapinio metodo efektyvumą pabrėžtinai tolesnių ikiklinikinių bei klinikinių vertinimų poreikis [195].

Individualizuotų kasos navikų jautrumo priešvėžiniams vaistams analizių atlikimą įgalina šiuo metu moksliniuose tyrimuose taikomi metodai, pavyzdžiui, pastaruoju tikslu specialiai kuriamos terapinių agentų testavimo chemogramos. Neseniai publikuotame Boilève ir kolegų tyrime (2024 m.) reprezentuojančiame straipsnyje buvo nagrinėjamas kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių pritaikomumas, vertinant ligos jautrumą vaistams, pritaikius chemogramų analizes ir projektuojant pacientų atsakus ex vivo sąlygomis, klinikinėje aplinkoje, kur susiduriama su terapinių galimybių ribotumu. Į tyrimą buvo įtraukti 87 pacientai, sergantys pažengusia kasos duktaline adenokarcinoma (tiriamųjų vertinimas atliktas juos sekant 2021–2022 m. laikotarpiu). Mokslininkai stengėsi įvertinti, ar individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai gali būti pasitelkiami ligos gydymo strategijų kūrimui. Tyrimo metu organoidai buvo sėkmingai išauginti 54-iems iš atrinktų pacientų (62 %), o kartu pastebėta, kad organoidų modelius galima sukurti net ir esant atsparios, pažengusios ligos stadijos atveju. Be to, tyrime minimi organoidų modeliai pasižymėjo dideliu suderinamumu (91%) su ištirtų pradinių navikų genetinėmis ir fenotipinėmis savybėmis, įskaitant įprastas mutacijas, tokias kaip KRAS (atitikimas 96%), TP53 (atitikimas 88%) ir CDKN2A/B (atitikimas 22%). Pagrindinis tyrimo tikslas buvo sukurti testavimo „chemogramą“: ji apėmė individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių ištyrimą pagal vaistų grupę, į kurią buvo įtraukti 25 patvirtinti priešvėžiniai vaistai. Vidutinis chemogramos generavimo laikas buvo 6,8 savaitės – tai kliniškai svarbus laikotarpis gydant pacientus, sergančius pažengusia kasos duktaline adenokarcinoma. Atlikus tyrimą, gauti daug žadantys rezultatai: 91 % pacientų organoidų buvo jautrūs bent vienam vaistui, o chemograma parodė 83,3 % jautrumą ir 92,9 % specifiskumą numatant paciento atsaką. Šie radiniai teikia vilčių, kad individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų tikslingas panaudojimas galėtų žymiai pagerinti terapinius rezultatus, vertinant naviko atsaką tiek į dažniausiai ligos atveju paskiriamus vaistus, tiek ir į nestandartinius vaistus (angl. non-standard-of-care (non-SOC) drugs). Boilève ir kt. tyrime nestandartiniai vaistai, kurių teigiamas poveikis mažinant vėžinių ląstelių gyvybingumą buvo identifikuotas organoidų testavimo chemogramose, sudarė didelę dalį tarp visų tyrime sėkmingą atsaką suteikusių, patikroje dalyvavusių vaistų. Be to, šio tyrimo autoriai apsvairstė organoidų, kaip ikiklinikinių modelių, potencialą kuriant naujus vaistus. Ypatingas dėmesys buvo skiriamas terapinio agento MRTX1133 (KRASG12D mutacijos inhibitoriaus) poveikio supratimui: buvo tiriami šiuo vaistu paveikti organoidai su KRASG12D mutacija ir be jos. Nors KRAS geno mutacijos inhibitoriaus poveikis įvardintas kaip nežymus, tyrime nustatytas tvirtas teigiamas sinerginis ryšys tarp MRTX1133 ir anti-EGFR terapijų, ypač akivaizdžiai tai buvo matoma organoidų

modeliuose, turinčiuose KRASG12D mutaciją. Šis atradimas pabrėžia kombinatorinių terapijų potencialą pagerinti gydymo veiksmingumą genetiškai apibrėžtuose pacientų pogrupiuose. Boilève ir kt. tyrimo išvados teikia svarbų pagrindą tiksliosios onkologijos pažangai, ypač kasos duktalinės adenokarcinomos kontekste, kur gydymo galimybės dažnai yra ribotos, o rezultatai išlieka prasti. Mokslininkai pabrėžia, kad norint patvirtinti organoidų modelių pagrindu sukurtų chemogramų testavimo platformų klinikinį naudingumą, būtina atlikti tolesnius perspektyvinius atsiktinių imčių klinikinius tyrimus [196].

Natūralu manyti, jog kasos duktalinės adenokarcinomos navikai geba išvystyti atsparumo mechanizmus dažniausiai jų gydymui pasitelkiamiems chemoterapiniams vaistams, tačiau egzistuoja daugelis terapinių agentų, kurių poveikis kasos navikams kol kas neištirtas, nors yra daroma prielaidų, kad tam tikri vaistai galėtų būti pasitelkiami kaip alternatyva standartiniams kasos vėžio gydymui skiriamiems preparatams. Šiuo aspektu reaguodami į kasos navikų gydymo kontekste iškylančią chemoterapinio atsparumo problemą Zhou su kolegomis (2023 m.) sukūrė žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos organoidinių modelių biologinį banką, į kurį įtraukė įvairius kasos duktalinės adenokarcinomos navikų potipius, bei patikrino 1304 JAV maisto ir vaistų administracijos (angl. Food and Drug Administration, FDA) patvirtintų junginių poveikius tam, kad nustatytų potencialius kandidatus, galinčius įveikti atsparumą chemoterapijai. Svarbu atkreipti dėmesį, jog Zhou ir kt. tyrimas parodė, kad individualūs pacientų organoidų modeliai, kultivuojami 3D matricoje, pasižymi geresniu stabilumu ir reprezentatyvumu, palyginus su 2D ląstelių linijomis ir pacientų ksenograftų modeliais, todėl jie yra patikimesni vaistų patikrai. Mokslininkų sukurto genetiškai skirtingų kasos duktalinės adenokarcinomos organoidinių ląstelių linijų biobanko (angl. biobank of genetically distinct pancreatic ductal adenocarcinoma organoid lines) duomenys patvirtino, kad analizuotų organoidų morfologija, genetinis fonas ir atsakas į vaistus buvo labai panašus į pirminių kasos duktalinės adenokarcinomos naviko audinių sandarą bei koreliavo su pacientų terapinių atsakų vertinimu.

Zhou ir kt. straipsnyje konstatuojama, kad irbesartanas, angiotenzino II 1 tipo receptorių antagonistas, tyrimo metu pasirodė kaip perspektyvus junginys, galintis įjautrinti kasos duktalinės adenokarcinomos ląsteles chemoterapijai, ypač gemcitabino ir nab-paklitakselio derinio režimui. Mokslininkai, pasitelkę tiek in vitro, tiek in vivo eksperimentinius tyrimo modelius, patvirtino irbesartano efektyvumą: individualiuose pacientų organoidų, ksenograftų ir genetiškai modifikuotuose pelių modeliuose (angl. genetically engineered mouse models) buvo užfiksuota, kaip irbesartanas padidino kasos duktalinės adenokarcinomos navikų jautrumą chemoterapijai, slopindamas Hippo/YAP1 signalizavimo kelią ir sumažindamas transkripcijos faktoriaus c-Jun ekspresiją. Autoriai taip pat atkreipė dėmesį į ankstesnių tyrimų duomenis, rodančius, kad angiotenzino receptorių blokatoriai, tokie kaip irbesartanas ir losartanas, geba veikti sinergistiškai kartu su chemoterapiniais vaistais, kaip manoma, dėl šių vaistų gebėjimo slopinti kasos žvaigždinių ląstelių (angl. pancreatic stellate cells, PSCs) aktyvumą ir sumažinti desmoplaziją – tankią fibrozinę stromą, kuri trukdo vaisto patekimui. Zhou ir kolegų tyrimo išvados atskleidė, kad irbesartanas ne tik sumažino desmoplaziją, bet ir slopino mechaninį spaudimą (angl. solid stress) naviko viduje, taip padidindamas vaistų difuziją ir intratumorinę gemcitabino koncentraciją. Šie efektai buvo patvirtinti KPC genetiškai modifikuotuose pelių modeliuose (angl. KPC genetically engineered mouse models), kurie gana gerai imitavo kasos duktalinės adenokarcinomos navikų desmoplastinę aplinką. Pritaikę CRISPR/Cas9 geno redagavimo metodą, mokslininkai patvirtino, kad irbesartanas slopina

kamieninių ląstelių žymenų (angl. stemness markers), tokių kaip SOX9, SOX2 ir OCT4, taip pat su geležimi susijusių genų (angl. iron-related genes), tokių kaip TFRC ir FTL, ekspresiją, tiesiogiai prisijungdamas prie jų promotorių regionų per c-Jun transkripcijos faktorių. Šie radiniai pabrėžia irbesartano potencialą neutralizuoti atsparumą chemoterapijai ne tik modifikuojant naviko mikroaplinką, bet ir nukreipiant gydymą tiesiogiai į vėžinių ląstelių vidinius kelius (angl. intrinsic pathways). Pažymėtina, kad 77,6% pažengusia kasos duktalinė adenokarcinoma sergančių pacientų, kuriems Zhou ir kt. tyrimo metu buvo nustatyta didelė c-Jun ekspresija, susidūrė su atsparumu chemoterapijai, o tai rodo, kad irbesartanas gali būti ypač veiksmingas šiame pacientų pogrupyje.

Apibendrinus pastebėjimus iš Zhou ir kt. tyrimo, teigtina, kad irbesartano derinys su gemcitabino/nab-paklitakselio chemoterapija yra veiksmingesnė gydymo strategija nei monochemoterapija. Vienu metu veikdamas naviko ir stromos ląsteles bei pagrindinius chemoterapinio atsparumo kelius, irbesartanas yra vilčių teikiantis terapinis agentas, kurį ateityje būtų galima pritaikyti klinikinėje praktikoje, siekiant pagerinti kasos duktalinė adenokarcinoma sergančių pacientų (ypač tų, kuriems nustatyta didelė c-Jun ekspresija) gydymo rezultatus [197].

Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliai, kaip įrodo naujausi duomenys iš mokslinės literatūros, gali būti pritaikomi tyrimuose kaip patikima eksperimentinė platforma vaistų testavimui ir pacientų terapinių atsakų vertinimui. Atliekant farmakotipavimą, t. y. nustatant individualų kasos duktalinės adenokarcinomos navikų jautrumą testuojamiems vaistams, organoidų modeliuose pavyksta gana tiksliai atspindėti pacientų klinikinius atsakus į taikomas chemoterapijos schemas (pvz., FOLFIRINOX, gemcitabiną) ir atrasti veiksmingus vaistų derinius, tarp kurių paminėtinos tokios terapinių agentų kombinacijos, kaip antai, irinotekano ir oksaliplatinos micelių sistema arba AKT inhibitoriaus MK2206 derinys su auranofinu. Be to, viliamasi, jog organoidų modeliuose ištirtos alternatyvios terapinės strategijos, pavyzdžiui, Hippo/YAP1/c-Jun signalizavimo kelio slopinimas ir mitochondrijų funkcijos trikdymas pirvinio pamoatu, gali padėti sumažinti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų atsparumą chemoterapijai ir pagerinti šia liga sergančių pacientų klinikines išėitis.

IŠVADOS

Individualūs kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai šiuo metu yra laikomi vienais iš pažangiausių trimačių eksperimentinių modelių, suteikiančių galimybes tirti navikų biologines savybes ir optimizuoti kasos vėžiu sergančių pacientų gydymo strategijas. Remiantis naujausioje mokslinėje literatūroje pastebimomis tendencijomis, atkreiptinas dėmesys, jog pastaraisiais metais reikšmingai patobulėjo organoidų modelių kūrimo metodikos: šios trimatės tiriamosios sistemos modeliuojamos pasitelkus inovatyvias kultivavimo technologijas, kaip antai, panaudojant mikroskysčių ir bioinžinerines platformas, siekiant geriau perteikti pirminiams navikams būdingas savybes, pavyzdžiui, sudėtingas jų mikroaplinkos sąlygas.

Be to, individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų generavimo tikslais neseniai pradėtos naudoti kraujyje cirkuliuojančios naviko ląstelės (CTC), tapusios alternatyva kitiems įprastai organoidų modeliavimui pasitelkiamiems žaliavų šaltiniams - kasos navikų chirurginių rezekcijų medžiagai ir biopsijų mėginiams. Cirkuliuojančios naviko ląstelės įgalina organoidų formavimąsi iš nedidelių paciento naviko biologinės medžiagos kiekių, todėl tikimasi, jog šių ląstelių pagrindu sukurti organoidų modeliai artimiausiu metu galės būti pasitelkiami ankstyvai kasos vėžio diagnostikai ir individualių pacientų terapinių atsakų vertinimui. Nors šio

organoidų kultivavimo metodo taikymas klinikinėje praktikoje kol kas yra ribotas, mokslinėje literatūroje pateikiama patikimų įžvalgų, įrodančių, kad cirkuliuojančių naviko ląstelių pagrindu sukurti organoidai geba atspindėti kasos vėžiui būdingą biologinių savybių heterogeniškumą ir numatyti potencialius navikų atsakus į jų atžvilgiu pritaikytą gydymą.

Pažymėtina, jog individualūs organoidų modeliai vis dažniau naudojami tiriant ankstyvus vėžinius pažeidimus. Kasos duktalinės adenokarcinomos atveju šios tiriamosios platformos mokslininkams padeda analizuoti priešvėžinius kasos audinio pakitimus ir stebėti šių ankstyvųjų pataloginių pokyčių vystymąsi bei virtimą kasos navikiniais pažeidimais, imituojanč juose vykstančias genetines ir epigenetines transformacijas.

Tarp pagrindinių organoidų modelių privalumų, svarbių kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų kontekste, paminėtinas šių trimačių eksperimentinių platformų gebėjimas atkartoti kasos navikų mikroaplinkos sąlygas ir išlaikyti pirminiams pacientų navikams būdingas genetines mutacijas. Palyginus su dvimatėmis ląstelių kultūromis, organoidai geriau atspindi naviko ląstelių sąveikas su aplinkinės stromos komponentais, fibroblastais ir imuninėmis ląstelėmis. Vis dėlto, vienas iš esminių organoidų modelių trūkumų yra naviko kraujagyslių tinklo nebuvimas, o tai siejama su šiose tiriamosiose platformose atliekamų eksperimentų apribojimais, pavyzdžiui, sutrikusiu chemoterapinių vaistų patekimu į naviką ir netiksliomis naviko metabolizmą atspindinčių parametrų interpretacijomis.

Bene perspektyviausia individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių taikymo sritimi galima įvardinti tyrimus, kurių metu vertinamas chemoterapijos efektyvumas, gydant kasos vėžiu sergančius pacientus. Šiuo metu mokslinėje literatūroje pateikiama duomenų, įrodančių organoidų modelių galimybes atkartoti individualius kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų atsakus į chemoterapiją bei prognozuoti kasos vėžio gydymo efektyvumą. Atliekama vis daugiau tyrimų, kuriais siekiama įtvirtinti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modeliavimo klinikinę reikšmę, pavyzdžiui, nagrinėjant kasos vėžio terapinį atsparumą, susijusį su naviko ląstelių prisitaikymu prie chemoterapinių agentų poveikio bei priklausomą nuo tokių veiksnių, kaip antai, epitelio-mezenchimos tranzicijos procesas ir naviko imuninio atsako mechanizmai.

Organoidų modeliai taip pat gali būti pasitelkiami diagnostinių ir terapinių (teranostinių) kasos duktalinės adenokarcinomos biožymenų identifikavimui. Galiausiai, tiksliosios medicinos tyrimų kontekste individualūs kasos navikų organoidų modeliai pasitelktini atliekant farmakotipavimo analizes bei kuriant personalizuotas terapines strategijas, skirtas konkrečių kasos duktalinę adenokarcinoma sergančių pacientų gydymui. Nepaisant naujausiuose moksliniuose tyrimuose išryškinamų organoidų modelių privalumų, jų pritaikymas klinikinėje aplinkoje šiuo metu siejamas su atitinkamais iššūkiais, kaip antai, kultivavimo metodų kintamumu tarp skirtingų laboratorijų ir standartizuotų organoidų generavimo protokolų stoka. Taigi, apibendrinant svarbu akcentuoti, jog individualūs organoidų modeliai šiuo metu yra laikytini perspektyvia eksperimentine platforma, suteikiančia galimybes gana tiksliai analizuoti kasos duktalinės adenokarcinomos navikų savybes, tačiau atsižvelgiant į tam tikrus šių vėžio modeliavimo sistemų trūkumus bei siekiant užtikrinti geresnes organoidų klinikinio pritaikymo sąlygas, būtina atlikti išsamesnius tyrimus.

REKOMENDACIJOS

Remiantis naujausioje mokslinėje literatūroje pateikiamais įrodymais, iliustruojančiais individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių panaudojimo klinikinėje praktikoje galimybes, taip pat atkreiptinas dėmesys, jog siekiant sukurti palankesnes sąlygas šių tiriamųjų platformų pritaikymui platesniame tyrimų kontekste, pirmiausia reikalinga pasitelkti specialias modeliavimo procesų standartizavimo priemones. Stengiantis užtikrinti optimalias kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų kultūrų kultivavimo sąlygas, svarbu palaikyti stabilų ląstelių diferenciacijos procesą ir organoidų struktūrų vientisumą, pasirenkant subalansuotos sudėties augimo terpes, praturtintas tokiais komponentais, kaip antai, Wnt, R-spondinas, Noggin, bei kitais organoidų struktūros formavimuisi reikalingais veiksniais, pavyzdžiui, epidermio augimo faktoriumi ir fibroblastų augimo faktoriumi.

Organoidų modelių kultivavimo efektyvumą būtų galima padidinti pasitelkus pažangius ląstelių kultūrų auginimo metodus. Kaip pavyzdį galima paminėti trimačių tiriamųjų sistemų kultivavimui taikytinas mikroskysčių platformas, kurios mokslininkams šiuo metu suteikia galimybę auginti organoidų kultūras iš minimalių biopsinės žaliavos kiekių, taip atsisakant būtinybės papildomai naudoti tradicinius bazinės membranos ekstraktus, tokius kaip *Matrigel*, ir kartu mažinant sukurtų organoidų modelių biologinių savybių kintamumą.

Vienas iš svarbiausių tikslų, kurį svarbu numatyti kuriant individualius kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius, yra pacientų navikų genetinių ir fenotipinių ypatybių reprezentatyvumas, užtikrinant, kad pagrindinės kasos vėžiui būdingos mutacijos, tokios kaip KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4 ir BRCA1/2, išliktų stabilios ir atitiktų pirminių navikų genetinių profilių savybes. Taip pat siekiant, kad kasos duktalinės adenokarcinomos organoidai kuo tiksliau atkartotų pacientų navikams būdingus biologinius požymius, į šias modeliavimo sistemas būtina įtraukti papildomus mikroaplinkos komponentus, kurie leistų geriau imituoti naviko-stromos sąveikas ir imuninio atsako mechanizmus. Naujausi duomenys iš mokslinės literatūros leidžia daryti prielaidą, jog kasos navikų stromos ląstelių, pavyzdžiui, kasos žvaigždinių ląstelių ir su naviku susijusių fibroblastų bei makrofagų, integracija į organoidų sistemas gali reikšmingai pagerinti šių modelių reprezentacinį tikslumą, o tokių medžiagų, kaip bioinžineriniai hidrogeliai, praturtinti I tipo kolagenu, fibronektinu, lamininu ir hialuronanu, pritaikymas organoidų modelių kūrimui galėtų užtikrinti preciziškesnes kasos navikų stromos modeliavimo galimybes.

Atsižvelgiant į pastaruoju metu mokslinėje literatūroje įvardijamus individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų trūkumus, siejamus su šių tiriamųjų platformų ribotomis galimybėmis modeliuoti tam tikrus kasos navikų biologinius procesus, kaip antai, naviko aprūpinimą krauju, iškyla alternatyvių kultivavimo sprendimų poreikis. Siūlytina, kad šiuo tikslu būtų pasitelkiamos ir toliau tobulinamos atitinkamai kasos vėžio angiogenezės procesų modeliavimui pritaikytos sistemos, pavyzdžiui, dirbtiniai kapiliarų tinklai arba jau minėtos mikroskysčių platformos. Be to, vertinant individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių funkcinį reprezentatyvumą, t. y., gebėjimą atspindėti pacientų kasos navikuose vykstančius dinامينius pokyčius, siejamus su tokiomis savybėmis, kaip invazyvumas ir polinkis metastazuoti, taip pat atkreiptinas dėmesys ir į tam tikrų šiose tiriamosiose sistemose perteikiamų procesų, kaip, pavyzdžiui, epitelio-mezenchimos tranzicijos (EMT), nuoseklią stebėseną.

Siekiant išplėsti individualių kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų klinikinio pritaikymo galimybių spektrą, svarbu užtikrinti efektyvų šių tiriamųjų modelių panaudojimą

atliekant vaistų testavimo ir farmakotipavimo tyrimus. Viliamasi, kad standartizuotų individualių organoidų platformų, pritaikytų vaistų patikrai, kūrimas padėtų kiekvienam kasos vėžiui sergančiam pacientui parinkti tinkamiausią chemoterapinę režimą, įvertinant dažniausiai kasos duktalinės adenokarcinomos gydymui pasitelkiamų vaistų, tokių kaip irinotekanas, paklitakselis, gemcitabinas, oksaliplatina ir 5-FU, efektyvumą. Stengiantis numatyti kasos duktalinės adenokarcinomos pacientų terapinius atsakus, ateityje, greičiausiai, bus rekomenduotina remtis individualiuose organoidų modeliuose nustatytais prognostiniais biožymenimis: pavyzdžiui, šiuo metu yra žinoma, kad tokie kasos navikams būdingų molekuliniai pokyčiai indikatoriai, kaip antai, KRAS, TP53, BRCA1/2 mutacijos, CD44v6 ir ANXA11 baltymai, yra sietini su specifinėmis kasos duktalinės adenokarcinomos navikų reakcijomis į atitinkamai gydymui taikomų chemoterapinių, imunoterapinių taikinių terapijos agentų poveikius. Kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių tobulinimui taip pat pasitelktini genetinių pokyčių modeliavimo metodai (pavyzdžiui, CRISPR-Cas9 technologija), kurie, kaip tikimasi, padės mokslininkams aiškinantis mutacijų poveikio reikšmę kasos vėžio navikų biologinėms savybėms bei sudarys galimybes tiksliau identifikuoti ligos terapinius taikinius.

Reikšmingu veiksniu, į kurį būtina atsižvelgti kuriant individualius kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelius, išlieka jų generavimo trukmė, kadangi nuo to priklauso šių tiriamųjų platformų klinikinio pritaikymo efektyvumas. Taigi, iškyla poreikis optimizuoti organoidų kūrimo metodus, todėl šiuo tikslu siūlytina pasitelkti specialiai modifikuotas terpes (pavyzdžiui, WRN terpę, praturtintą atitinkamais augimo faktoriais – Wnt, R-spondin ir Noggin baltymais) ir vienos ląstelės kultivavimo sistemas, leidžiančias sukurti organoidus per maždaug dvi savaites – laikotarpį, kuris atitinka naujos kartos sekoskaitos rezultatų gavimo terminą.

Galiausiai, siekiant patvirtinti kasos duktalinės adenokarcinomos organoidų modelių, kaip tiriamosios vėžio platformos, klinikinio pritaikomumo reikšmę, reikalinga atlikti didelių imčių tyrimus, kurių metu būtų vertinamas šių eksperimentinių sistemų prognostinis potencialas, numatant taikomo gydymo poveikį modeliuojamuose navikuose bei lyginant organoiduose fiksuojamus terapinius rezultatus su atitinkamais pacientų klinikiniais atsakais. Toliau vystant individualių organoidų modelių panaudojimo potencialą kasos duktalinės adenokarcinomos tyrimų kontekste, svarbiausia sutelkti pastangas šių tiriamųjų sistemų kultivavimo sąlygų tobulinimui ir reprezentatyvumo užtikrinimui, stengiantis kuo tiksliau perteikti pirminiems pacientų navikams būdingas biologines ypatybes. Siektina, kad individualūs organoidų modeliai taptų patikimu pagalbiniu įrankiu kuriant personalizuoto kasos duktalinės adenokarcinomos gydymo schemas, optimizuojant standartinių terapinių metodų efektyvumą bei prognozuojant kasos vėžiui sergančių pacientų klinikines išėitis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. M. Orth, P. Metzger, S. Gerum, J. Mayerle, G. Schneider, C. Belka, M. Schnurr, K. Lauber, Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches, *Radiat. Oncol.* 14 (2019).
2. Frappart PO, Hofmann TG. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Organoids: The Shining Light at the End of the Tunnel for Drug Response Prediction and Personalized Medicine. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 24;12(10):2750.

3. Heinrich MA, Mostafa AMRH, Morton JP, Hawinkels LJAC, Prakash J. Translating complexity and heterogeneity of pancreatic tumor: 3D in vitro to in vivo models. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Jul;174:265–93.
4. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* 2020, 70, 7–30. [CrossRef]
5. Holokai L, Chakrabarti J, Lundy J, Croagh D, Adhikary P, Richards SS, et al. Murine- and Human-Derived Autologous Organoid/Immune Cell Co-Cultures as Pre-Clinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2020 Dec 17;12(12):3816.
6. Moreira L, Bakir B, Chatterji P, Dantes Z, Reichert M, Rustgi AK. Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017 Dec 16;5(3):289–298. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.004. PMID: 29541683; PMCID: PMC5849862.
7. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68, 394–424. [CrossRef]
8. Low, R.R.J.; Lim, W.W.; Nguyen, P.M.; Lee, B.; Christie, M.; Burgess, A.W.; Gibbs, P.; Grimmond, S.M.; Hollande, F.; Putoczki, T.L. The Diverse Applications of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Organoids. *Cancers* **2021**, 13, 4979. <https://doi.org/10.3390/cancers13194979>
9. D'Agosto S, Andreani S, Scarpa A, Corbo V. Preclinical Modelling of PDA: Is Organoid the New Black? *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 5;20(11):2766. doi: 10.3390/ijms20112766. PMID: 31195689; PMCID: PMC6600483.
10. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research.* 2014 May 29;74(11):2913–21.
11. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol.* 2016;55:1158–1160.
12. Rémond MS, Pellat A, Brezault C, Dhooge M, Coriat R. Are targeted therapies or immunotherapies effective in metastatic pancreatic adenocarcinoma? *ESMO Open.* 2022 Dec;7(6):100638.
13. Iovanna J, Dusetti N. Speeding towards individualized treatment for pancreatic cancer by taking an alternative road. *Cancer Lett.* 2017 Dec 1;410:63–7.
14. Wang S, Li Y, Xing C, Ding C, Zhang H, Chen L, You L, Dai M, Zhao Y. Tumor microenvironment in chemoresistance, metastasis and immunotherapy of pancreatic cancer. *Am J Cancer Res.* 2020 Jul 1;10(7):1937–1953. PMID: 32774994; PMCID: PMC7407356.
15. Ryan, D.P.; Hong, T.S.; Bardeesy, N. Pancreatic adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2014, 371, 1039–1049. [CrossRef] [PubMed]
16. Katz, M.H.; Pisters, P.W.; Evans, D.B.; Sun, C.C.; Lee, J.E.; Fleming, J.B.; Vauthey, J.N.; Abdalla, E.K.; Crane, C.H.; Wol, R.A.; et al. Borderline resectable pancreatic cancer: The importance of this emerging stage of disease. *J. Am. Coll. Surg.* 2008, 206, 833–846. [CrossRef] [PubMed]
17. T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J.L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J.B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Groupe Tumeurs Digestives of, P. Intergroup, FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer, *The New England journal of medicine*, 364 (2011) 1817–1825.
18. Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., et al. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185–e13. doi:10.1016/j.ccell.2017.07.007
19. Mehdi M, Kamgar M, George B, et al. Impact of KRAS alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *J Clin Oncol.* 2021;39:4136.
20. Pan M, Jiang C, Zhang Z, et al. TP53 gain-of-function mutations and impact on CDKN2A mutation on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2022;40(suppl 16):e16294.
21. Cicenias J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte Kausilene E, Skeberdyte A, Cicenias J. Kras, tp53, cdkn2a, smad4, brca1, and brca2 mutations in pancreatic cancer. *Cancers* 2017;9:42.
22. Stefanoudakis, D.; Frountzas, M.; Schizas, D.; Michalopoulos, N.V.; Drakaki, A.; Toutouzas, K.G. Significance of TP53, CDKN2A, SMAD4 and KRAS in Pancreatic Cancer. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, 46, 2827–2844. <https://doi.org/10.3390/cimb46040177>
23. Ren, B.; Liu, X.; Suriawinata, A.A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. *Am. J. Pathol.* 2019, 189, 9–21. [CrossRef]
24. Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., et al. (2011). Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat. Med.* 17, 500–503. doi:10.1038/nm.2344
25. Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., et al. (2016). Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. *Nature* 531, 47–52. doi:10.1038/nature16965
26. Sankarasubramanian S, Pfohl U, Regenbrecht CRA, Reinhard C, Wedeken L. Context Matters-Why We Need to Change From a One Size Fits all Approach to Made-to-Measure Therapies for Individual Patients With Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:760705.

27. Alvarez, M. A., Freitas, J. P., Mazher Hussain, S., and Glazer, E. S. (2019). TGF- β Inhibitors in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Canc* 50, 207–213. doi:10.1007/s12029-018-00195-5
28. Puleo, F.; Nicolle, R.; Blum, Y.; Cros, J.; Marisa, L.; Demetter, P.; Quertinmont, E.; Svrcek, M.; Elarouci, N.; Iovanna, J.; et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* 2018, 155, 1999–2013.e3. [CrossRef]
29. Moffitt, R.A.; Marayati, R.; Flate, E.L.; Volmar, K.E.; Loeza, S.G.H.; Hoadley, K.A.; Rashid, N.U.; Williams, L.A.; Eaton, S.C.; Chung, A.H.; et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* 2015, 47, 1168. [CrossRef]
30. Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O’Kane, G. M., et al. (2020). Transcription Phenotypes of Pancreatic Cancer Are Driven by Genomic Events during Tumor Evolution. *Nat. Genet.* 52, 231–240. doi:10.1038/s41588-019-0566-9
31. Juiz, N. A., Iovanna, J., and Dusetti, N. (2019). Pancreatic Cancer Heterogeneity Can Be Explained beyond the Genome. *Front. Oncol.* 9, 246. doi:10.3389/fonc.2019.00246
32. Singhi AD, George B, Greenbowe JR, Chung J, Suh J, Maitra A, et al. Real-Time Targeted Genome Profile Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Identifies Genetic Alterations That Might Be Targeted With Existing Drugs or Used as Biomarkers. *Gastroenterology*. 2019 Jun 1;156(8):2242-2253.e4.
33. Waddell, N.; Pajic, M.; Patch, A.M.; Chang, D.K.; Kassahn, K.S.; Bailey, P.; Johns, A.L.; Miller, D.; Nones, K.; Quek, K.; et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015, 518, 495–501. [CrossRef]
34. Smith, E.; Cochrane, W.J. Cystic organoid teratoma; report of a case. *Can. Med. Assoc. J.* 1946, 55, 151
35. Sato, T.; Vries, R.G.; Snippert, H.J.; Van De Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D.E.; Van Es, J.H.; Abo, A.; Kujala, P.; Peters, P.J.; et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009, 459, 262–265.
36. Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the lgr5/r-spondin axis. *EMBO J* 2013; 32:2708–2721.
37. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvisé M, Tiriác H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Ohlund D, Handly Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FH, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RG, Clevers H, Tuveson DA. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015;160:324–338.
38. Lancaster, M.A.; Huch, M. Disease modelling in human organoids. *Dis. Model Mech.* 2019, 12. [CrossRef] [PubMed]
39. Hwang CI, Boj SF, Clevers H, Tuveson DA. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol.* 2016 Jan;238(2):197–204.
40. Grossman JE, Muthuswamy L, Huang L, Akshinthala D, Perea S, Gonzalez RS, et al. Organoid Sensitivity Correlates with Therapeutic Response in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2022 Feb 15;28(4):708–18.
41. Sandhya S, Hogenson TL, Fernandez-Zapico ME. Patient-derived organoids, creating a new window of opportunities for pancreatic cancer patients. *EMBO Mol Med.* 2022 Apr 7;14(4):e15707.
42. Romero-Calvo, I.; Weber, C.; Ray, M.; Brown, M.; Kirby, K.; Nandi, R.K.; Long, T.M.; Sparrow, S.M.; Ugolkov, A.; Qiang, W.; et al. Human Organoids Share Structural and Genetic Features with Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors. *Mol. Cancer Res.* 2018, 17, 70–83. [CrossRef]
43. Tiriác, H.; Belleau, P.; Engle, D.D.; Plenker, D.; Deschenes, A.; Somerville, T.; Froeling, F.E.M.; Burkhart, R.A.; Denroche, R.E.; Jang, G.H.; et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Discov.* 2018, 8, 1112–1129. [CrossRef]
44. Seino, T.; Kawasaki, S.; Shimokawa, M.; Tamagawa, H.; Toshimitsu, K.; Fujii, M.; Ohta, Y.; Matano, M.; Nanki, K.; Kawasaki, K.; et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem. Cell* 2018, 22, 454–467.e6. [CrossRef]
45. Noll, E.M.; Eisen, C.; Stenzinger, A.; Espinet, E.; Muckenhuber, A.; Klein, C.; Vogel, V.; Klaus, B.; Nadler, W.; Rösli, C.; et al. CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Med.* 2016, 22, 278–287.
46. K.Miyabayashi, L.A. Baker, A. Deschênes, B. Traub, G. Caligiuri, D. Plenker, B. Alagesan, P. Belleau, S. Li, J. Kendall, G.H. Jang, R.K. Kawaguchi, T.D.D. Somerville, H. Tiriác, C.-I. Hwang, R.A. Burkhart, N.J. Roberts, L.D. Wood, R.H. Hruban, J. Gillis, A. Krasnitz, C.R. Vakoc, M. Wigler, F. Notta, S. Gallinger, Y. Park and D.A. Tuveson, *Cancer Discovery* 10, 1566–1589 (2020). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-20-0133>
47. Bengtsson A, Andersson R, Rahm J, Ganganna K, Andersson B, Ansari D. Organoid technology for personalized pancreatic cancer therapy. *Cell Oncol (Dordr).* 2021 Apr;44(2):251–60.

48. M. Lin, M. Gao, P.K. Pandalai, M.J. Cavnar, J. Kim, An organotypic microcosm for the pancreatic tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 12, 811 (2020)
49. Reichert, M.; Takano, S.; Heeg, S.; Bakir, B.; Botta, G.P.; Rustgi, A.K. Isolation, culture and genetic manipulation of mouse pancreatic ductal cells. *Nat. Protoc.* 2013, 8, 1354–1365. [CrossRef]
50. Baker, L.A.; Tiriach, H.; Tuveson, D.A. Generation and Culture of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Organoids from Resected Tumor Specimens. *Methods Mol. Biol.* 2019, 1882, 97–115. [CrossRef] [PubMed]
51. Baker, L.A.; Tuveson, D.A. Generation and Culture of Tumor and Metastatic Organoids from Murine Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Methods Mol. Biol.* 2019, 1882, 117–133. [CrossRef]
52. E. Driehuis, A. van Hoeck, K. Moore, S. Kolders, H.E. Francies, M.C. Gulersonmez, E.C.A. Stigter, B. Burgering, V. Geurts, A. Gracanin, G. Bounova, F.H. Morsink, R. Vries, S. Boj, J. van Es, G.J.A. Offerhaus, O. Kranenburg, M.J. Garnett, L. Wessels, E. Cuppen, L.A.A. Brosens, H. Clevers, Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 26580 (2019)
53. Tsai, S.; McOlash, L.; Palen, K.; Johnson, B.; Duris, C.; Yang, Q.; Dwinell, M.B.; Hunt, B.; Evans, D.B.; Gershan, J.; et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer* 2018, 18, 1–13. [CrossRef]
54. S. Hou, H. Tiriach, B.P. Sridharan, L. Scampavia, F. Madoux, J. Seldin, G.R. Souza, D. Watson, D. Tuveson, T.P. Spicer, Advanced development of primary pancreatic organoid tumor models for high-throughput phenotypic drug screening. *SLAS Discov* 23, 574–584 (2018)
55. E. Maloney, C. Clark, H. Sivakumar, K. Yoo, J. Aleman, S.A.P. Rajan, S. Forsythe, A. Mazzocchi, A.W. Laxton, S.B. Tatter, R.E. Strowd, K.I. Votanopoulos, A. Skardal, Immersion bioprinting of tumor organoids in multi-well plates for increasing chemotherapy screening throughput. *Micromachines (Basel)* 11, 208 (2020)
56. Ž.P. Kačarević, P.M. Rider, S. Alkildani, S. Retnasingh, R. Smeets, O. Jung, Z. Ivanišević, M. Barbeck, An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. *Materials (Basel)* 11, 2199 (2018)
57. D. Hakobyan, C. Médina, N. Dusserre, M.L. Stachowicz, C. Handschin, J.C. Fricain, J. Guillermet-Guibert, H. Oliveira, Laser assisted 3D bioprinting of exocrine pancreas spheroid models for cancer initiation study. *Biofabrication* 12, 035001 (2020)
58. Kramer, B.; Haan, L.d.; Vermeer, M.; Olivier, T.; Hankemeier, T.; Vulto, P.; Joore, J.; Lanz, H.L. Interstitial Flow Recapitulates Gemcitabine Chemoresistance in A 3D Microfluidic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Model by Induction of Multidrug Resistance Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4647. <https://doi.org/10.3390/ijms20184647>
59. Buscail, E.; Alix-Panabieres, C.; Quincy, P.; Cauvin, T.; Chauvet, A.; Degrandi, O.; Caumont, C.; Verdon, S.; Lamrissi, I.; Moranvillier, I.; et al. High Clinical Value of Liquid Biopsy to Detect Circulating Tumor Cells and Tumor Exosomes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients Eligible for Up-Front Surgery. *Cancers* 2019, 11. [CrossRef] [PubMed]
60. Sun, Y.; Wu, G.; Cheng, K.S.; Chen, A.; Neoh, K.H.; Chen, S.; Tang, Z.; Lee, P.F.; Dai, M.; Han, R.P.S. CTC phenotyping for a preoperative assessment of tumor metastasis and overall survival of pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *EBioMedicine* 2019, 46, 133–149. [CrossRef]
61. Arnoletti, J.P.; Fanaian, N.; Reza, J.; Sause, R.; Almodovar, A.J.; Srivastava, M.; Patel, S.; Veldhuis, P.P.; Griffith, E.; Shao, Y.P.; et al. Pancreatic and bile duct cancer circulating tumor cells (CTC) form immune-resistant multi-cell type clusters in the portal venous circulation. *Cancer Biol. Ther.* 2018, 19, 887–897. [CrossRef] [PubMed]
62. Zhang Z, Shiratsuchi H, Lin J, Chen G, Reddy RM, Azizi E, Fouladdel S, Chang AC, Lin L, Jiang H, Waghay M, Luker G, Simeone DM, Wicha MS, Beer DG, Ramnath N, Nagrath S. Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):12383-97. doi: 10.18632/oncotarget.2592. PMID: 25474037; PMCID: PMC4323004.
63. Archibugi L, Testoni SGG, Redegalli M, Petrone MC, Reni M, Falconi M, Doglioni C, Capurso G, Arcidiacono PG. New era for pancreatic endoscopic ultrasound: From imaging to molecular pathology of pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2019 Nov 15;11(11):933-945. doi: 10.4251/wjgo.v11.i11.933. PMID: 31798775; PMCID: PMC6883177.
64. Chen S, Wang M, Liu L, Wang G, Wang L, Zhong C, et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration/biopsy-based pancreatic organoids establishment: an alternative model for basic and preclinical research. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2023;11:goad019.
65. Juiz N, Elkaoutari A, Bigonnet M et al. Basal-like and classical cells coexist in pancreatic cancer revealed by single-cell analysis on biopsy-derived pancreatic cancer organoids from the classical subtype. *FASEB J* 2020;34:12214–28.
66. Bian B, Juiz NA, Gayet O et al. Pancreatic cancer organoids for determining sensitivity to Bromodomain and Extra-Terminal inhibitors (BETi). *Front Oncol* 2019;9:475
67. Dantes Z, Yen H-Y, Pfarr N et al. Implementing cell-free DNA of pancreatic cancer patient-derived organoids for personalized oncology. *JCI Insight* 2020;5:e137809.

68. Seppälä TT, Zimmerman JW, Sereni E, Plenker D, Suri R, Rozich N, et al. Patient-derived organoid pharmacotyping is a clinically tractable strategy for precision medicine in pancreatic cancer. *Ann Surg*. 2020 Sep 1;272(3):427–35.
69. Demyan L, Habowski AN, Plenker D et al. Pancreatic cancer patient-derived organoids can predict response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 2022;276:450–62.
70. Dobrynin YV. Establishment and characteristics of cell strains from some epithelial tumors of human origin. *J Natl Cancer Inst* 1963;31:1173–1195.
71. Pham, K.; Delitto, D.; Knowlton, A.E.; Hartlage, E.R.; Madhavan, R.; Gonzalo, D.H.; Thomas, R.M.; Behrns, K.E.; George, T.J., Jr.; Hughes, S.J.; et al. Isolation of Pancreatic Cancer Cells from a Patient-Derived Xenograft Model Allows for Practical Expansion and Preserved Heterogeneity in Culture. *Am. J. Pathol.* 2016, 186, 1537–1546. [CrossRef]
72. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 2017, 32, 266–277. [CrossRef]
73. Ben-David, U.; Siranosian, B.; Ha, G.; Tang, H.; Oren, Y.; Hinohara, K.; Strathdee, C.A.; Dempster, J.; Lyons, N.J.; Burns, R.; et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* 2018, 560, 325–330. [CrossRef] [PubMed]
74. Hidalgo, M.; Amant, F.; Biankin, A.V.; Budinska, E.; Byrne, A.T.; Caldas, C.; Clarke, R.B.; de Jong, S.; Jonkers, J.; Maclandsmo, G.M.; et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014, 4, 998–1013. [CrossRef]
75. Pauli, C.; Hopkins, B.D.; Prandi, D.; Shaw, R.; Fedrizzi, T.; Sboner, A.; Sailer, V.; Augello, M.; Puca, L.; Rosati, R.; et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov.* 2017, 7, 462–477. [CrossRef] [PubMed]
76. G. Lyman, G. Mathus, D. Root, Apparatus for growing tissue cultures in vitro, in: C. Corporation (Ed.), Costar Corporation, United States, 1986.
77. K.L. Fetah, B.J. DiPardo, E.M. Kongadzem, J.S. Tomlinson, A. Elzagheid, M. Elmusrati, A. Khademhosseini, N. Ashammakhi, Cancer modeling-on-a-chip with future artificial intelligence integration, *Small* 15 (2019) e1901985.
78. S.T. Chen, T.C. Kuo, Y.Y. Liao, M.C. Lin, Y.W. Tien, M.C. Huang, Silencing of MUC20 suppresses the malignant character of pancreatic ductal adenocarcinoma cells through inhibition of the HGF/MET pathway, *Oncogene* 37 (2018) 6041–6053.
79. Z. Yan, K. Ohuchida, S. Fei, B. Zheng, W. Guan, H. Feng, S. Kibe, Y. Ando, K. Koikawa, T. Abe, C. Iwamoto, K. Shindo, T. Moriyama, K. Nakata, Y. Miyasaka, T. Ohtsuka, K. Mizumoto, M. Hashizume, M. Nakamura, Inhibition of ERK1/2 in cancer-associated pancreatic stellate cells suppresses cancer-stromal interaction and metastasis, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38 (2019) 221.
80. A.S. Nunes, A.S. Barros, E.C. Costa, A.F. Moreira, I.J. Correia, 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs, *Biotechnol. Bioeng.* 116 (2019) 206–226.
81. S.J. Kim, E.M. Kim, M. Yamamoto, H. Park, H. Shin, Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) 2000608.
82. C. Jensen, Y. Teng, Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?, *Front. Mol. Biosci.* 7 (2020) 33.
83. N.E. Ryu, S.H. Lee, H. Park, Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells, *Cells* 8 (2019) 1620.
84. M. Zanoni, M. Cortesi, A. Zamagni, C. Arienti, S. Pignatta, A. Tesei, Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids, *J. Hematol. Oncol.* 13 (2020) 97.
85. D.L. Priwitaningrum, J.P.G. Blondé, A. Sridhar, J. van Baarlen, W.E. Hennink, G. Storm, S. Le Gac, J. Prakash, Tumor stroma-containing 3D spheroid arrays: A tool to study nanoparticle penetration, *J. Control. Release* 244 (2016) 257–268.
86. D.F. Mardhian, A. Vrynas, G. Storm, R. Bansal, J. Prakash, FGF2 engineered SPIONs attenuate tumor stroma and potentiate the effect of chemotherapy in 3D heterospheroidal model of pancreatic tumor, *Nanotheranostics* 4 (2020) 26–39.
87. S. Roovers, J. Deprez, D. Priwitaningrum, G. Lajoinie, N. Rivron, H. Declercq, O. De Wever, E. Stride, S. Le Gac, M. Versluis, J. Prakash, S.C. De Smedt, I. Lentacker, Sonoprinting liposomes on tumor spheroids by microbubbles and ultrasound, *J. Control. Release* 316 (2019) 79–92.
88. G. Lazzari, V. Nicolas, M. Matsusaki, M. Akashi, P. Couvreur, S. Mura, Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity, *Acta Biomater.* 78 (2018) 296–307.
89. K. Kong, M. Guo, Y. Liu, J. Zheng, Progress in animal models of pancreatic ductal adenocarcinoma, *J. Cancer* 11 (2020) 1555–1567.
90. H. Yıldız, A. Koç, D. Yıldız, H. Oztas, Inhibitory effects of Aspirin on Azaserine initiated pancreatic carcinogenesis in rat, *Indian Vet. J.* 85 (2008) 187–191.

91. Z. Zhu, T. Liu, F. Han, S.-D. Zhan, C.-Y. Wang, Mutations in the p16 gene in DMBA-induced pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer in rats, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 14 (2015) 208–214.
92. L. Gómez-Cuadrado, N. Tracey, R. Ma, B. Qian, V.G. Brunton, Mouse models of metastasis: progress and prospects, *Dis. Model. Mech.* 10 (2017) 1061–1074.
93. M. He, M. Henderson, S. Muth, A. Murphy, L. Zheng, Preclinical mouse models for immunotherapeutic and non-immunotherapeutic drug development for pancreatic ductal adenocarcinoma, *Ann. Pancreat. Cancer* 3 (2020), 7.
94. K.T. Ostapoff, M.T. Dellinger, N. Awasthi, R.A. Brekken, R.E. Schwarz, *Mouse Models of Pancreatic Cancer, Experimental Metastasis: Modeling and Analysis*, 2013, pp. 57–91.
95. M. Nikfarjam, D. Yeo, H. He, G. Baldwin, T. Fifis, P. Costa, B. Tan, E. Yang, S.W. Wen, C. Christophi, Comparison of Two Syngeneic Orthotopic Murine Models of Pancreatic Adenocarcinoma, *J. Invest. Surg.* 26 (2013) 352–359.
96. L.I. Partecke, M. Sendler, A. Kaeding, F.U. Weiss, J. Mayerle, A. Dummer, T.D. Nguyen, N. Albers, S. Speerforck, M.M. Lerch, C.D. Heidecke, W. von Bernstorff, A. Stier, A Syngeneic Orthotopic Murine Model of Pancreatic Adenocarcinoma in the C57/BL6 Mouse Using the Panc02 and 6606PDA Cell Lines, *Eur. Surg. Res.* 47 (2011) 98–107.
97. Y. Wang, Y. Zhang, J. Yang, X. Ni, S. Liu, Z. Li, S.E. Hodges, W.E. Fisher, F.C. Brunicardi, R.A. Gibbs, M.C. Gingras, M. Li, Genomic Sequencing of Key Genes in Mouse Pancreatic Cancer Cells, *Curr. Mol. Med.* 12 (2012) 331–341.
98. C.D. Logsdon, T. Arumugam, V. Ramachandran, *Animal Models of Gastrointestinal and Liver Diseases. The difficulty of animal modeling of pancreatic cancer for preclinical evaluation of therapeutics*, *Am. J. Physiol. Gastr. L.* 309 (2015) G283–G291.
99. D.M. Walters, J.B. Stokes, S.J. Adair, E.B. Stelow, C.A. Borgman, B.T. Lowrey, W. Xin, E.M. Blais, J.K. Lee, J.A. Papin, J.T. Parsons, T.W. Bauer, Clinical, Molecular and Genetic Validation of a Murine Orthotopic Xenograft Model of Pancreatic Adenocarcinoma Using Fresh Human Specimens, *PLoS One* 8 (2013) e77065.
100. E. Jun, J. Jung, S.Y. Jeong, E.K. Choi, M.B. Kim, J.S. Lee, S.M. Hong, H.S. Seol, C. Hwang, R.M. Hoffman, I.K. Shim, S. Chang, S.C. Kim, Surgical and Oncological Factors Affecting the Successful Engraftment of Patient-derived Xenografts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Anticancer Res.* 36 (2016) 517–521.
101. Khorana, A.A.; Mangu, P.B.; Berlin, J.; Engebretson, A.; Hong, T.S.; Maitra, A.; Mohile, S.G.; Mumber, M.; Schulick, R.; Shapiro, M.; et al. Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2017, 35, 2324–2328. [CrossRef] [PubMed]
102. Lee, B.; Lipton, L.; Cohen, J.; Tie, J.; Javed, A.A.; Li, L.; Goldstein, D.; Burge, M.; Cooray, P.; Nagrial, A.; et al. Circulating tumor DNAs as potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* 2019, 30, 1472–1478. [CrossRef] [PubMed]
103. Neoptolemos, J.P.; Palmer, D.H.; Ghaneh, P.; Psarelli, E.E.; Valle, J.W.; Halloran, C.M.; Faluy, O.; O'Reilly, D.A.; Cunningham, D.; Wadsley, J.; et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2017, 389, 1011–1024. [CrossRef]
104. VonHoff, D.D.; Ervin, T.; Arena, F.P.; Chiorean, E.G.; Infante, J.; Moore, M., et al. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* 369, 1691–1703. doi:10.1056/nejmoa1304369
105. Saito, T., Ishido, K., Kudo, D., Kimura, N., Wakiya, T., Nakayama, Y., et al. (2017). Combination Therapy with Gemcitabine and Nab-Paclitaxel for Locally Advanced Unresectable Pancreatic Cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 6, 963–967. doi:10.3892/mco.2017.1251
106. P. Duconseil, M. Gilabert, O. Gayet, C. Loncle, V. Moutardier, O. Turrini, E. Calvo, J. Ewald, M. Giovannini, M. Gasmi, E. Bories, M. Barthet, M. Ouassiss, A. Goncalves, F. Poizat, J.L. Raoul, V. Secq, S. Garcia, P. Viens, J. Iovanna, N. Dusetti, Transcriptomic analysis predicts survival and sensitivity to anticancer drugs of patients with a pancreatic adenocarcinoma, *The American journal of pathology*, 185 (2015) 1022–1032.
107. V.R. Penchev, Z.A. Rasheed, A. Maitra, W. Matsui, Heterogeneity and targeting of pancreatic cancer stem cells, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18 (2012) 4277–4284.
108. Fares CM, Van Allen EM, Drake CG, Allison JP, Hu-Lieskovan S. Mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients? *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2019;39:147–164.
109. Geyer M, Queiroz K. Microfluidic Platforms for High-Throughput Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Organoid Culture and Drug Screening. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:761807.
110. Nywening, T. M., Wang-Gillam, A., Sanford, D. E., Belt, B. A., Panni, R. Z., Cusworth, B. M., et al. (2016). Targeting Tumour-Associated Macrophages With CCR2 Inhibition in Combination With FOLFIRINOX in Patients With Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Cancer: a single-centre, Open-Label, Dose-Finding, Non-randomised, Phase 1b Trial. *Lancet Oncol.* 17, 651–662. doi:10.1016/s1470-2045(16)00078-4

111. Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-Retamozo, V., Garriss, C., Pucci, F., et al. (2016). Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity*. 44, 343–354. doi:10.1016/j.immuni.2015.11.024
112. Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., et al. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients With Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2455–2465. doi:10.1056/nejmoa1200694
113. Zambirinis, C. P., Levie, E., Nguy, S., Avanzi, A., Barilla, R., Xu, Y., et al. (2015). TLR9 Ligation in Pancreatic Stellate Cells Promotes Tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 212, 2077–2094. doi:10.1084/jem.20142162
114. Yuki, K., Cheng, N., Nakano, M., and Kuo, C.J. (2020). Organoid Models of Tumor Immunology. *Trends Immunol.* 41 (8), 652–664. doi:10.1016/j.it.2020.06.010
115. Ying, H., Elpek, K. G., Vinjamoori, A., Zimmerman, S.M., Chu, G.C., Yan, H., et al. (2011). PTEN Is a Major Tumor Suppressor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Regulates an NF- κ B-Cytokine Network. *Cancer Discov.* 1, 158–169. doi:10.1158/2159-8290.cd-11-0031
116. Karnoub, A. E., and Weinberg, R. A. (2008). Ras Oncogenes: Split Personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 517–531. doi:10.1038/nrm2438
117. Muzumdar, M.D., Chen, P.-Y., Dorans, K. J., Chung, K. M., Bhutkar, A., Hong, E., et al. (2017). Survival of Pancreatic Cancer Cells Lacking KRAS Function. *Nat. Commun.* 8, 1090. doi:10.1038/s41467-017-00942-5
118. Ozkan-Dagliyan, I., Diehl, J. N., George, S. D., Schaefer, A., Papke, B., Klotz-Noack, K., et al. (2020). Low-Dose Vertical Inhibition of the RAF-MEK-ERK Cascade Causes Apoptotic Death of KRAS Mutant Cancers. *Cel Rep.* 31, 107764. doi:10.1016/j.celrep.2020.107764
119. Bryant, K. L., Stalneck, C. A., Zeitouni, D., Klomp, J. E., Peng, S., Tikunov, A. P., et al. (2019). Combination of ERK and Autophagy Inhibition as a Treatment Approach for Pancreatic Cancer. *Nat. Med.* 25, 628–640. doi:10.1038/s41591-019-0368-8
120. Hobbs, G. A., Baker, N. M., Miermont, A. M., Thurman, R. D., Pierobon, M., Tran, T. H., et al. (2020). Atypical KRASG12R Mutant Is Impaired in PI3K Signaling and Macropinocytosis in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 10, 104–123. doi:10.1158/2159-8290.cd-19-1006
121. Moore, M.J.; Goldstein, D.; Hamm, J.; Figer, A.; Hecht, J.R.; Gallinger, S.; Au, H.J.; Murawa, P.; Walde, D.; Wolff, R.A.; et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2007, 25, 1960–1966. [CrossRef]
122. Kim, S.T.; Lim, D.H.; Jang, K.-T.; Lim, T.; Lee, J.; Choi, Y.-L.; Jang, H.-L.; Yi, J.H.; Baek, K.K.; Park, S.H.; et al. Impact of KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Pancreatic Cancer Patients Treated with First-line Gemcitabine-Based Chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 2011, 10, 1993.
123. Sohal, D.P.S.; Kennedy, E.B.; Cinar, P.; Conroy, T.; Copur, M.S.; Crane, C.H.; Garrido-Laguna, I.; Lau, M.W.; Johnson, T.; Krishnamurthi, S.; et al. Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Guideline Update. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2020, 38, 3217–3230. [CrossRef]
124. Golan, T.; Hammel, P.; Reni, M.; van Cutsem, E.; Macarulla, T.; Hall, M.J.; Park, J.-O.; Hochhauser, D.; Arnold, D.; Oh, D.-Y.; et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2019, 381, 317–327. [CrossRef] [PubMed]
125. Kindler, H.L.; Niedzwiecki, D.; Hollis, D.; Sutherland, S.; Schrag, D.; Hurwitz, H.; Innocenti, F.; Mulcahy, M.F.; O'Reilly, E.; Wozniak, T.F.; et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: Phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2010, 28, 3617–3622. [CrossRef] [PubMed]
126. Goncalves, A.; Gilibert, M.; Francois, E.; Dahan, L.; Perrier, H.; Lamy, R.; Re, D.; Largillier, R.; Gasmi, M.; Tchiknavorian, X.; et al. BAYPAN study: A double-blind phase III randomized trial comparing gemcitabine plus sorafenib and gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* 2012, 23, 2799–2805. [CrossRef]
127. Casamitjana J, Espinet E, Rovira M. Pancreatic Organoids for Regenerative Medicine and Cancer Research. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:886153.
128. Lee JH, Kim H, Lee SH, Ku JL, Chun JW, Seo HY, et al. Establishment of Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids from Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsies. *Gut and Liver.* 2022 Jul 15;16(4):625–36.
129. Choi D, Gonzalez-Suarez AM, Dumbrava MG, Medlyn M, de Hoyos-Vega JM, Cichocki F, et al. Microfluidic Organoid Cultures Derived from Pancreatic Cancer Biopsies for Personalized Testing of Chemotherapy and Immunotherapy. *Adv Sci (Weinh).* 2024 Feb;11(5):e2303088.
130. Gao M, Harper MM, Lin M, Qasem SA, Patel RA, Mardini SH, et al. Development of a Single-Cell Technique to Increase Yield and Use of Gastrointestinal Cancer Organoids for Personalized Medicine Application. *J Am Coll Surg.* 2021 Apr;232(4):504–14.

131. Lumibao JC, Okhovat SR, Peck KL, Lin X, Lande K, Zou J, et al. The impact of extracellular matrix on the precision medicine utility of pancreatic cancer patient-derived organoids. *bioRxiv*. 2023 May 9;2023.01.26.525757.
132. Lumibao JC, Okhovat SR, Peck KL, Lin X, Lande K, Yomtoubian S, et al. The effect of extracellular matrix on the precision medicine utility of pancreatic cancer patient-derived organoids. *JCI Insight*. 2024 Jan 9;9(1):e172419.
133. Lee, J., Snyder, E. R., Liu, Y., Gu, X., Wang, J., Flowers, B. M., et al. (2017). Reconstituting Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia from Primary Human Pancreas Duct Cells. *Nat. Commun.* 8(1),1–14. doi:10.1038/ncomms14686
134. Hogenson TL, Xie H, Phillips WJ, Toruner MD, Li JJ, Horn IP, et al. Culture media composition influences patient-derived organoid ability to predict therapeutic responses in gastrointestinal cancers. *JCI Insight*. 2022 Nov 22;7(22):e158060.
135. Ehlen L, Arndt J, Treue D, Bischoff P, Loch FN, Hahn EM, et al. Novel methods for in vitro modeling of pancreatic cancer reveal important aspects for successful primary cell culture. *BMC Cancer*. 2020 May 13;20(1):417.
136. Huang L, Bockorny B, Paul I, Akshinthala D, Frappart PO, Gandarilla O, et al. PDX-derived organoids model in vivo drug response and secrete biomarkers. *JCI Insight*. 2020 Nov 5;5(21):e135544, 135544.
137. Ferreira, R. M. M., Sancho, R., Messal, H. A., Nye, E., Spencer-Dene, B., Stone, R. K., et al. (2017). Duct- and Acinar-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Show Distinct Tumor Progression and Marker Expression. *Cel. Rep.* 21 (4), 966–978. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.09.
138. Flowers, B. M., Xu, H., Mulligan, A. S., Hanson, K. J., Seoane, J. A., Vogel, H., et al. (2021). Cell of Origin Influences Pancreatic Cancer Subtype. *Cancer Discov.* 11 (3), 660–677. doi:10.1158/2159-8290.cd-20-0633
139. Huang, L., Holtzinger, A., Jagan, I., Begora, M., Lohse, I., Ngai, N., et al. (2015). Ductal Pancreatic Cancer Modeling and Drug Screening Using Human Pluripotent Stem Cell- and Patient-Derived Tumor Organoids. *Nat. Med.* 21 (11), 1364–1371. doi:10.1038/nm.3973
140. Hohwieler, M., Illing, A., Hermann, P. C., Mayer, T., Stockmann, M., Perkhof, L., et al. (2017). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Acinar/Ductal Organoids Generate Human Pancreas upon Orthotopic Transplantation and Allow Disease Modelling. *Gut* 66 (3), 473–486. doi:10.1136/gutjnl-2016-312423.
141. Kang Y, Deng J, Ling J, Li X, Chiang YJ, Koay EJ, et al. 3D imaging analysis on an organoid-based platform guides personalized treatment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest*. 2022 Dec 15;132(24):e151604.
142. Osuna de la Peña D, Trabulo SMD, Collin E, Liu Y, Sharma S, Tatari M, et al. Bioengineered 3D models of human pancreatic cancer recapitulate in vivo tumour biology. *Nat Commun*. 2021 Sep 24;12(1):5623.
143. Yeo D, Bastian A, Strauss H, Saxena P, Grimison P, Rasko JEJ. Exploring the Clinical Utility of Pancreatic Cancer Circulating Tumor Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 31;23(3):1671.
144. Effenberger, K.E.; Schroeder, C.; Hanssen, A.; Wolter, S.; Eulenburg, C.; Tachezy, M.; Gebauer, F.; Izbicki, J.R.; Pantel, K.; Bockhorn, M. Improved Risk Stratification by Circulating Tumor Cell Counts in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2018, 24, 2844–2850. [CrossRef]
145. Rosenbaum, M.W.; Cauley, C.E.; Kulemann, B.; Liss, A.S.; Castillo, C.F.; Warshaw, A.L.; Lillemoe, K.D.; Thayer, S.P.; Pitman, M.B. Cytologic characteristics of circulating epithelioid cells in pancreatic disease. *Cancer Cytopathol.* 2017, 125, 332–340. [CrossRef]
146. Gao, D.; Vela, I.; Sboner, A.; Iaquinta, P.J.; Karthaus, W.R.; Gopalan, A.; Dowling, C.; Wanjala, J.N.; Undvall, E.A.; Arora, V.K.; et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014, 159, 176–187. [CrossRef] [PubMed]
147. Wu YH, Hung YP, Chiu NC, Lee RC, Li CP, Chao Y, et al. Correlation between drug sensitivity profiles of circulating tumour cell-derived organoids and clinical treatment response in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2022 May;166:208–18.
148. Bernard V, Semaan A, Huang J, San Lucas FA, Mulu FC, Stephens BM, et al. Single-cell transcriptomics of pancreatic cancer precursors demonstrates epithelial and microenvironmental heterogeneity as an early event in neoplastic progression. *Clin Cancer Res.* 2019;25:2194–205.; Patra KC, Bardeesy N, Mizukami Y. Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: the genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm. *Clin Transl Gastroenterol.* 2017;8: e86.
149. Agostini A, Guerriero I, Piro G, Quero G, Roberto L, Esposito A, et al. Talniflumate abrogates mucin immune suppressive barrier improving efficacy of gemcitabine and nab-paclitaxel treatment in pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2023 Nov 23;21(1):843.
150. Fernández LP, Sánchez-Martínez R, Vargas T, Herranz J, Martín-Hernández R, Mendiola M, et al. The role of glycosyltransferase enzyme GCNT3 in colon and ovarian cancer prognosis and chemoresistance. *Sci Rep.* 2018;8:8485.
151. Hu T, Shukla SK, Vernucci E, He C, Wang D, King RJ, et al. Metabolic Rewiring by Loss of Sirt5 Promotes Kras-Induced Pancreatic Cancer Progression. *Gastroenterology*. 2021 Nov;161(5):1584–600
152. Skrypek K, Balog S, Eriguchi Y, Asahina K. Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase Induces the Unfolded Protein Response in Pancreatic Tumors and Suppresses Their Growth. *Pancreas*. 2021 Feb 1;50(2):219–26.

153. Malinova A, Veghini L, Real FX, Corbo V. Cell Lineage Infidelity in PDAC Progression and Therapy Resistance. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:795251.
154. Yao J, Yang M, Atteh L, Liu P, Mao Y, Meng W, et al. A pancreas tumor derived organoid study: from drug screen to precision medicine. *Cancer Cell Int.* 2021 Jul 27;21(1):398.
155. Raghavan, S., Winter, P. S., Navia, A. W., Williams, H. L., DenAdel, A., Kalekar, R. L., et al. (2021). The Tumor Microenvironment Drives Transcriptional Phenotypes and Their Plasticity in Metastatic Pancreatic Cancer. *bioRxiv.* doi:10.1101/2020.08.25.256214
156. Kumarasamy V, Wang J, Frangou C, Wan Y, Dynka A, Rosenheck H, et al. The Extracellular Niche and Tumor Microenvironment Enhance KRAS Inhibitor Efficacy in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 2024 Apr 1;84(7):1115–32.
157. Frappart PO, Walter K, Gout J, Beutel AK, Morawe M, Arnold F, et al. Pancreatic cancer-derived organoids - a disease modeling tool to predict drug response. *United European Gastroenterol J.* 2020 Jun;8(5):594–606.
158. Pham NA, Radulovich N, Ibrahimov E, Martins-Filho SN, Li Q, Pintilie M, et al. Patient-derived tumor xenograft and organoid models established from resected pancreatic, duodenal and biliary cancers. *Sci Rep.* 2021 May 19;11(1):10619.]
159. Dimitrov-Markov S, Perales-Patón J, Bockorny B, Dopazo A, Muñoz M, Baños N, et al. Discovery of New Targets to Control Metastasis in Pancreatic Cancer by Single-cell Transcriptomics Analysis of Circulating Tumor Cells. *Mol Cancer Ther.* 2020 Aug;19(8):1751–60.
160. Solanki A, King D, Thibault G, Wang L, Gibbs SL. Quantification of fluorophore distribution and therapeutic response in matched in vivo and ex vivo pancreatic cancer model systems. *PLoS One.* 2020;15(2):e0229407.
161. Hoare O, Fraunhoffer N, Elkaoutari A, Gayet O, Bigonnet M, Roques J, et al. Exploring the Complementarity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Preclinical Models. *Cancers (Basel).* 2021 May 19;13(10):2473.
162. Le Compte M, De La Hoz EC, Peeters S, Fortes FR, Hermans C, Domen A, et al. Single-organoid analysis reveals clinically relevant treatment-resistant and invasive subclones in pancreatic cancer. *NPJ Precis Oncol.* 2023 Dec 8;7(1):128.
163. Krieger, T.G., Le Blanc, S., Jabs, J. et al. Single-cell analysis of patient-derived PDAC organoids reveals cell state heterogeneity and a conserved developmental hierarchy. *Nat Commun* 12, 5826 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26059-4>
164. Raimondi G, Mato-Berciano A, Pascual-Sabater S, Rovira-Rigau M, Cuatrecasas M, Fondevila C, et al. Patient-derived pancreatic tumour organoids identify therapeutic responses to oncolytic adenoviruses. *EBioMedicine.* 2020 Jun;56:102786.
165. Ferreira N, Kulkarni A, Agorku D, Midelashvili T, Hardt O, Legler TJ, Ströbel P, Conradi LC, Alves F, Ramos-Gomes F, Markus MA. OrganoIDNet: a deep learning tool for identification of therapeutic effects in PDAC organoid-PBMC co-cultures from time-resolved imaging data. *Cell Oncol (Dordr).* 2024 May 28. doi: 10.1007/s13402-024-00958-2. Epub ahead of print. PMID: 38805131.
166. Geyer M, Gaul LM, D Agosto SL, Corbo V, Queiroz K. The tumor stroma influences immune cell distribution and recruitment in a PDAC-on-a-chip model. *Front Immunol.* 2023;14:1155085.
167. Shinkawa T, Ohuchida K, Mochida Y, Sakihama K, Iwamoto C, Abe T, et al. Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Mar 10;41(1):89.
168. Grünwald BT, Devisme A, Andrieux G, Vyas F, Aliar K, McCloskey CW, et al. Spatially confined sub-tumor microenvironments in pancreatic cancer. *Cell.* 2021 Oct 28;184(22):5577-5592.e18.
169. Schuth S, Le Blanc S, Krieger TG, Jabs J, Schenk M, Giese NA, et al. Patient-specific modeling of stroma-mediated chemoresistance of pancreatic cancer using a three-dimensional organoid-fibroblast co-culture system. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Oct 22;41(1):312.
170. Feldmann K, Maurer C, Peschke K, Teller S, Schuck K, Steiger K, et al. Mesenchymal Plasticity Regulated by Prrx1 Drives Aggressive Pancreatic Cancer Biology. *Gastroenterology.* 2021 Jan;160(1):346-361.e24.
171. Broekgaarden M, Anbil S, Bulin AL, Obaid G, Mai Z, Baglo Y, et al. Modulation of redox metabolism negates cancer-associated fibroblasts-induced treatment resistance in a heterotypic 3D culture platform of pancreatic cancer. *Biomaterials.* 2019 Nov;222:119421.
172. Haque MR, Wessel CR, Leary DD, Wang C, Bhushan A, Bishehsari F. Patient-derived pancreatic cancer-on-a-chip recapitulates the tumor microenvironment. *Microsyst Nanoeng.* 2022;8:36.
173. Kinny-Köster B, Habib JR, Wolfgang CL, He J, Javed AA. Favorable tumor biology in locally advanced pancreatic cancer-beyond CA19-9. *J Gastrointest Oncol.* 2021 Oct;12(5):2484–94.
174. Engle DD, Tiriach H, Rivera KD, Pommier A, Whalen S, Oni TE, et al. The glycan CA19-9 promotes pancreatitis and pancreatic cancer in mice. *Science.* 2019 Jun 21;364(6446):1156–62.
175. Nicolle R, Gayet O, Bigonnet M, Roques J, Chanez B, Puleo F, et al. Relevance of biopsy-derived pancreatic organoids in the development of efficient transcriptomic signatures to predict adjuvant chemosensitivity in pancreatic cancer. *Transl Oncol.* 2022 Feb;16:101315.

176. Nicolle R, Bachet JB, Harlé A, Iovanna J, Hammel P, Rebours V, et al. Prediction of Adjuvant Gemcitabine Sensitivity in Resectable Pancreatic Adenocarcinoma Using the GemPred RNA Signature: An Ancillary Study of the PRODIGE-24/CCTG PA6 Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2024 Mar 20;42(9):1067–76.
177. Zheng S, Tian Q, Yuan Y, Sun S, Li T, Xia R, et al. Extracellular vesicle-packaged circBIRC6 from cancer-associated fibroblasts induce platinum resistance via SUMOylation modulation in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023 Nov 28;42(1):324.
178. Gao C, Wisniewski L, Liu Y, Staal B, Beddows I, Plenker D, et al. Detection of Chemotherapy-resistant Pancreatic Cancer Using a Glycan Biomarker, sTRA. *Clin Cancer Res*. 2021 Jan 1;27(1):226–36.
179. Ruta V, Naro C, Pieraccioli M, Leccese A, Archibugi L, Cesari E, et al. An alternative splicing signature defines the basal-like phenotype and predicts worse clinical outcome in pancreatic cancer. *Cell Rep Med*. 2024 Feb 20;5(2):101411.
180. Farshadi EA, Chang J, Sampadi B, Doukas M, Van 't Land F, van der Sijde F, et al. Organoids Derived from Neoadjuvant FOLFIRINOX Patients Recapitulate Therapy Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2021 Dec 1;27(23):6602–12.
181. Zhou X, An J, Kurilov R, Brors B, Hu K, Peccerella T, et al. Persister cell phenotypes contribute to poor patient outcomes after neoadjuvant chemotherapy in PDAC. *Nat Cancer*. 2023 Sep;4(9):1362–81.
182. Qin H, Chen J, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Meng YM, Grier JB, Jiang X, et al. Immunization with a multi-antigen targeted DNA vaccine eliminates chemoresistant pancreatic cancer by disrupting tumor-stromal cell crosstalk. *J Transl Med*. 2023 Oct 9;21(1):702.
183. Raufi AG, Pellicciotta I, Palermo CF, Sastra SA, Chen A, Alouani E, et al. Cytotoxic chemotherapy potentiates the immune response and efficacy of combination CXCR4/PD-1 inhibition in models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *bioRxiv*. 2023 Dec 25;2023.12.24.573257.
184. Hasselluhn MC, Schlösser D, Versemann L, Schmidt GE, Ulisse M, Oschwald J, et al. An NFATc1/SMAD3/cJUN Complex Restricted to SMAD4-Deficient Pancreatic Cancer Guides Rational Therapies. *Gastroenterology*. 2024 Feb 1;166(2):298–312.e14.
185. Koikawa K, Kibe S, Suizu F, Sekino N, Kim N, Manz TD, et al. Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy. *Cell*. 2021 Sep 2;184(18):4753–4771.e27.
186. Kang HW, Kim JH, Lee DE, Lee YS, Kim MJ, Kim HS, et al. Combination therapy of niclosamide with gemcitabine inhibited cell proliferation and apoptosis via Wnt/ β -catenin/c-Myc signaling pathway by inducing β -catenin ubiquitination in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 2023 Dec 31;24(1):2272334.
187. Kumarasamy V, Ruiz A, Nambiar R, Witkiewicz AK, Knudsen ES. Chemotherapy impacts on the cellular response to CDK4/6 inhibition: distinct mechanisms of interaction and efficacy in models of pancreatic cancer. *Oncogene*. 2020 Feb;39(9):1831–45.
188. Yuen JG, Hwang GR, Fesler A, Intrigo E, Pal A, Ojha A, et al. Development of gemcitabine-modified miRNA mimics as cancer therapeutics for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Ther Oncol*. 2024 Mar 21;32(1):200769.
189. Mahajan UM, Li Q, Alnatsha A, Maas J, Orth M, Maier SH, et al. Tumor-Specific Delivery of 5-Fluorouracil-Incorporated Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Aptamers as an Efficient Treatment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Models. *Gastroenterology*. 2021 Sep;161(3):996–1010.e1.
190. Rana M, Kansal RG, Bisunke B, Fang J, Shibata D, Bajwa A, et al. Bromo- and Extra-Terminal Domain Inhibitors Induce Mitochondrial Stress in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2023 Aug 1;22(8):936–46.
191. Okuno K, Xu C, Pascual-Sabater S, Tokunaga M, Han H, Fillat C, et al. Berberine Overcomes Gemcitabine-Associated Chemoresistance through Regulation of Rap1/PI3K-Akt Signaling in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Sep 28;15(10):1199.
192. Okuno K, Xu C, Pascual-Sabater S, Tokunaga M, Takayama T, Han H, et al. Andrographis Reverses Gemcitabine Resistance through Regulation of ERBB3 and Calcium Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomedicines*. 2023 Jan 3;11(1):119.
193. Seppälä TT, Zimmerman JW, Suri R, Zlomke H, Ivey GD, Szabolcs A, et al. Precision Medicine in Pancreatic Cancer: Patient-Derived Organoid Pharmacotyping Is a Predictive Biomarker of Clinical Treatment Response. *Clin Cancer Res*. 2022 Aug 2;28(15):3296–307.
194. Armstrong A, Haque MR, Mirbagheri S, Barlass U, Gilbert DZ, Amin J, et al. Multiplex Patient-Based Drug Response Assay in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomedicines*. 2021 Jun 23;9(7):705.
195. Lei F, Xi X, Rachagani S, Seshacharyulu P, Talmon GA, Ponnusamy MP, et al. Nanoscale platform for delivery of active IRINOX to combat pancreatic cancer. *J Control Release*. 2021 Feb 10;330:1229–43.
196. Boilève A, Cartry J, Goudarzi N, Bedja S, Mathieu JRR, Bani MA, et al. Organoids for Functional Precision Medicine in Advanced Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 2024 Oct 1;167(5):961–976.e13.
197. Zhou T, Xie Y, Hou X, Bai W, Li X, Liu Z, et al. Irbesartan overcomes gemcitabine resistance in pancreatic cancer by suppressing stemness and iron metabolism via inhibition of the Hippo/YAP1/c-Jun axis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023 May 4;42(1):111.