

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Od diabetu, chronické pankreatitidy po karcinom pankreatu:
miRNA - nový marker karcinomu pankreatu?**

From diabetes, chronic pancreatitis to pancreatic cancer:
miRNA – a new marker of pancreatic cancer?

MUDr. Pavel Škrha

Školitel: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Praha, 2020

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Fyziologie a patofyziologie člověka, prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc.

Školící pracoviště: Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy 3. lékařské fakulty a II. interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Autor: MUDr. Pavel Škrha

Školitel: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

1 Obsah

1	Obsah	3
2	Souhrn	5
3	Summary	6
4	Seznam zkratek	7
5	Úvod	8
6	Hypotézy a cíle řešení dizertační práce.....	10
6.1	Hypotézy	10
6.2	Cíle řešení	11
7	Pacienti a metody.....	13
7.1	Pacienti	13
7.2	Diagnostika onemocnění	17
7.3	Metody	17
7.3.1	Odběr krve a biochemické ukazatele	17
7.3.2	Výběr miRNA	17
7.3.3	Izolace miRNA ze séra.....	18
7.3.4	Reverzní transkripce	18
7.3.5	Real-time PCR	19
7.3.6	Zpracování výsledků RT-PCR.....	19
7.3.7	Statistické vyhodnocení.....	20
8	Výsledky	21
8.1	Základní rozdělení souboru	21
8.2	Rozdělení podle přítomnosti diabetu	22
8.3	Rozdělení podle typu diabetu u karcinomu pankreatu	23
8.4	Rozdělení podle hmotnostních změn pacientů s karcinomem	24

8.5	Porovnání výsledků u symptomatických pacientů s karcinomem (recentní diagnóza diabetes mellitus a váhový úbytek) proti osobám bez karcinomu	25
8.6	Rozdělení podle velikosti karcinomu	26
8.7	Rozdělení podle stadia karcinomu.....	27
8.7.1	Porovnání expresí miR-196 a miR-200 podle pokročilosti onemocnění	27
8.8	Rozdělení podle přítomnosti chronické pankreatitidy v osobní anamnéze pacientů s karcinomem	29
8.9	Korelace	30
8.9.1	Korelace miR-200 a CA 19-9	31
8.10	Vyhodnocení testů CA 19-9 a miRNA	31
9	Diskuze	34
9.1	Epidemiologická data.....	34
9.1.1	Stadia karcinomu	34
9.1.2	Prevalence diabetes mellitus u karcinomu pankreatu	35
9.1.3	Změny hmotnosti	36
9.2	miRNA a CA 19-9.....	37
10	Řešení hypotéz	39
11	Závěr.....	40
12	Literatura.....	41
13	Seznam publikací.....	43
13.1	Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce:.....	43
13.2	Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce:.....	43
13.3	Publikace s IF, které nejsou podkladem disertační práce.....	43
13.4	Publikace bez IF, které nejsou podkladem disertační práce.....	44
13.5	Monografie, kapitoly v monografiích	44

2 Souhrn

Karcinom pankreatu se řadí mezi nádory s nejhorsí prognózou. Ta je dána vysokou letalitou z důvodu absence časných symptomů a vhodných markerů. Cílem práce bylo jednak zmapovat u pacientů s karcinomem výskyt prvních nespecifických příznaků nemoci (recentní vznik diabetes mellitus a hmotnostní úbytek), dále pak otestovat vytipované miRNA jako markery karcinomu a porovnat jejich expresi s pacienty s chronickou pankreatitidou.

Do studie bylo celkem zařazeno 77 pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu, 26 s chronickou pankreatitidou, 39 diabetiků 2. typu bez prokázaného nádorového onemocnění a 25 kontrolních osob. Diabetes mellitus nebo prediabetes byl přítomen u 60 osob s karcinomem a u 18 osob s chronickou pankreatitidou. Signifikantní váhový úbytek byl pozorován u 52 osob s karcinomem. Expresi miRNA (miR-21, miR-30, miR-191, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423 a miR-454) byly stanovovány v séru metodou real-time PCR.

Rozdílná exprese miRNA mezi všemi skupinami (karcinom – chronická pankreatitida – kontrolní soubor) byla pozorována u miR-196: 1,9 (1,6-2,2); 0,4 (0,3-0,4); 1,0 (0,8-1,2) [U]. U žádné miRNA nebyl pozorován rozdíl v podskupinách podle přítomnosti diabetu. Chronická pankreatitida vykazovala výrazně sníženou expresi miR-423 proti ostatním skupinám. Při posuzování účinnosti testu s miRNA na skupině symptomatických pacientů (recentní diagnóza diabetu a signifikantní hubnutí) byly miR-192 a miR-200 účinnější než CA 19-9 ($AUC_{miR-192}=0,81$, $AUC_{miR-200}=0,88$, $AUC_{CA\ 19-9}=0,78$).

MicroRNA 192, 200 a 423 se zdají být ukazateli, které mohou přispět ke zlepšení diagnostiky karcinomu pankreatu. Jasnou výhodou je podobně jako u CA 19-9 neinvazivita vyšetření, u miR-423 výrazná diskriminace mezi chronickou pankreatitidou a karcinomem, kterou test CA 19-9 není schopen poskytnout. Předmětem dalších studií bude vyšetření panelu miRNA u pacientů s karcinomem před a po operaci nádoru, dále pak zahrnutí časných stádií karcinomu a prekanceróz.

3 Summary

Pancreatic cancer ranks among the cancers with the worst prognosis. High lethality of the disease is caused by late diagnose and a lack of powerful and early markers. The goal of this study was to observe the presence of early unspecific signs of the disease (new-onset diabetes mellitus and weight loss) and to test selected miRNAs as markers of pancreatic cancer, with an additional comparison to miRNA expressions in patients with chronic pancreatitis.

We have included 77 patients with ductal pancreatic adenocarcinoma, 26 with chronic pancreatitis, 39 patients with type 2 diabetes mellitus without any tumor disease and 25 control subjects. In the cancer group, there were 60 patients who also had diabetes/prediabetes and 18 with chronic pancreatitis in their personal history. Significant weight loss was observed in 52 patients with the cancer. Expressions of miRNAs (miR-21, miR-30, miR-191, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423 and miR-454) were measured in the serum by real-time PCR method.

Variable miRNA expressions among all 3 groups (pancreatic cancer – chronic pancreatitis – controls) were distinguished in miR-196: 1,9 (1,6-2,2); 0,4 (0,3-0,4); 1,0 (0,8-1,2) [U]. No significant difference was observed between diabetic and non-diabetic patients within the groups. MicroRNA-423 was expressed less in chronic pancreatitis compared to the other groups. MicroRNA-192 and -200 were more powerful than CA 19-9 in symptomatic patients with the cancer (new-onset diabetes and significant weight loss): AUCmiR-192=0,81, AUCmiR-200=0,88, AUCCA 19-9=0,78.

MicroRNA-192, -200 and -423 may improve the pancreatic cancer diagnosis. The advantage of such an examination consists (similarly to CA 19-9) in non-invasiveness, miR-423 can even clearly distinguish chronic pancreatitis from the cancer, which is not possible by CA 19-9. In the future, miRNA examination in the patients before and after a surgical resection of the cancer is planned, as well as in the early cancer stages and precancerosis.

4 Seznam zkratek

AUC	plocha pod křivkou (area under the curve)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
Cq	hodnota kvantifikace cyklu (cycle quantification number)
DM	diabetes mellitus
CHP	chronická pankreatitida
miRNA (miR)	microRNA
mRNA	messenger RNA
NDM	bez diabetu (no diabetes)
NCHP	bez chronické pankreatitidy (no chronic pancreatitis)
NWL	bez hubnutí (no weight loss)
oGTT	orální glukózový toleranční test (oral glucose tolerance test)
PAC	karcinom pankreatu (pancreatic adenocarcinoma)
ROC	receiver operating characteristic – graf, popisující kvalitu binárního klasifikátoru v závislosti na nastavení jeho klasifikačního prahu
SVOD	software pro vizualizaci onkologických dat
SWL	signifikantní hubnutí (significant weight loss)
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
T3cDM	sekundární diabetes mellitus u karcinomu pankreatu
TNM	onkologická klasifikace nádorového onemocnění (T – velikost tumoru, N – lymfatická uzlina, M – vzdálená metastáza)

5 Úvod

Výskyt karcinomu pankreatu celosvětově roste. Česká republika patří s incidencí 20,8 nemocných na 100 000 obyvatel v roce 2018 mezi 10 zemí světa s nejvyšším výskytem onemocnění [1]. Malý rozdíl mezi incidencí a mortalitou je dán zejména pozdní diagnostikou onemocnění, jednak také omezenými terapeutickými možnostmi. Pouze u pětiny nemocných (450 případů) byl karcinom ve stadiu I nebo II, tedy v potenciálně léčitelném stadiu. Přesto dosahuje mortalita v těchto stádiích 67 %, ve stadiu III a IV pak dokonce 95 % [2]. Průměrné pětileté přežití pro všechna stadia bývá uváděno okolo 2-5 %.

Mezi neovlivnitelné rizikové faktory patří např. pozitivní rodinná anamnéza, hereditární forma chronické pankreatitidy a věk, mezi ovlivnitelné se řadí zejména kouření, abúzus alkoholu a obezita. Na pomezí mezi ovlivnitelnými a neovlivnitelnými faktory pak stojí diabetes mellitus.

Právě diabetes mellitus (DM) a obezita jsou onemocnění, která v současné době mají ve vyspělých zemích až pandemický charakter. V ČR je v současné době asi 8,5 % diabetiků, odhaduje se, že dalších 200 000 je dosud nediodagnostikovaných. V naší sledované populaci (u starších pacientů) se DM vyskytuje až u 25 – 30 % [3]. V dospělé české populaci má nadváhu (BMI \geq 25, < 30 kg/m²) 34 % obyvatel, obezitou (BMI \geq 30 kg/m²) pak trpí 23 % obyvatel. Mezi obézními pacienty je 3x více diabetiků [4], pacientů s DM a obezitou neustále přibývá [3,4].

Diabetici mají téměř dvojnásobné riziko karcinomu pankreatu [5]. Nejvyššího (až trojnásobného) rizika dosahují pacienti s nově diagnostikovaným DM (do 2 let trvání). S rostoucí dobou od stanovení pak postupně toto riziko naopak klesá až na 1,4x ve skupině pacientů s letitou anamnézou DM (> 15 let) [6]. Prevalence diabetes mellitus, příp. porušené glukózové tolerance se u karcinomu pankreatu pohybuje v různých studiích od 40 do 80 % [7,8,9,10]. Z uvedeného vyplývá, že samotný diabetes mellitus v určité míře zvyšuje riziko výskytu nádoru (nejenom) pankreatu.

Karcinom pankreatu ale vede k rozvoji DM, jehož výskyt je pak prvním alarmujícím symptomem nemoci [7]. Tento pankreatogenní diabetes je některými autory označován jako T3cDM. Nově vzniklý diabetes, zvláště pak u neobézních jedinců bez pozitivní rodinné anamnézy DM a s rychlou progresí, by mohl být použit jako časný marker neoplázie [11]. Tito jedinci by mohli být cíleně vyšetřováni [12].

V současnosti je v diagnostice karcinomu pankreatu zlatým standardem kombinace biochemických markerů a zobrazovacích metod. Bohužel tato vyšetření nejsou vhodná k časnému (asymptomatickému) záchytu onemocnění, kdy je nádor malý, ale resekalibilní, případně jde-li o premaligní stádium – pankreatickou intraepiteliální neoplázi (PanIN), intraduktální papilární mucinózní neoplázi (IPMN) nebo pankreatickou mucinózní cystickou neoplázi. Obtížné je rovněž mnohdy rozlišení karcinomu od chronické pankreatitidy a autoimunitní pankreatitidy [13]. Z biochemických markerů se rutinně užívá CA 19-9 a CEA, jejichž senzitivita je okolo 80 a 45 % a specifická 83 a 85 % [14]. Problematika těchto markerů spočívá v tom, že mohou být zvýšeny i u akutní cholangitidy, pankreatitidy a jiných gastrointestinálních nádorů. U nízké diferencovaného karcinomu pankreatu a v časných stádiích naopak nemusí být zvýšeny vůbec [15]. Podobně jako zobrazovací metody tak příliš nepřispívají k časnému záchytu, a tím ani ke zlepšení prognózy pacienta.

Proto jsou hledány další nové markery, které by dokázaly zlepšit statistické ukazatele. Jedním z možných přístupů jsou microRNA (miRNA, též miR) – krátké jednovláknové molekuly RNA regulující tvorbu proteinu na posttranskripční úrovni. Vedle použití v diagnostice se již nachází v různé fázi klinického testování několik látek, které využívají princip fungování miRNA k terapii (např. Miravirsen pro léčbu hepatitidy C, ale také Atu027 k terapii karcinomu pankreatu a další) [16,17].

6 Hypotézy a cíle řešení dizertační práce

Dizertační práce si položila za cíl při studiu karcinomu pankreatu a) vybrat vhodné miRNA, které by mohly posloužit jako markery v diagnostice tohoto onemocnění, a b) zhodnotit jejich změny u vybraných skupin pacientů proti zdravým osobám.

Během naší pilotní studie bylo pomocí Taqman karet (celkem 754 miRNA reakcí) vytipováno 6 miRNA (miR-21, miR-30, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423), které měly odlišné exprese u pacientů s karcinomem pankreatu v porovnání se zdravými osobami.

6.1 Hypotézy

1. Vybrané miRNA jsou odlišně exprimovány u pacientů s karcinomem pankreatu v porovnání s osobami bez karcinomu a mohou tak být použity ke zlepšení neinvazivní diagnostiky.
2. Existuje rozdíl v těchto expresích mezi karcinomem a chronickou pankreatitidou
3. Existuje rozdíl v expresích v rámci heterogenní skupiny osob s diabetem:
 - diabetes jako rizikový faktor – letitá anamnéza diabetu před diagnózou karcinomu
 - diabetes jako symptom nemoci – recentně diagnostikovaný diabetes (T3cDM) před zjištěným karcinomem
 - diabetes mellitus 2. typu bez karcinomu
4. Není rozdíl v expresích podle stadia karcinomu, hmotnostních změn či přítomnosti chronické pankreatitidy v osobní anamnéze u osob s karcinomem pankreatu

6.2 Cíle řešení

Vzhledem k předpokladu využití výsledků studie ke zlepšení neinvazivní diagnostiky karcinomu pankreatu budou exprese miRNA stanovovány v séru. Budou použity jednotlivé eseje miRNA se zpracováním pomocí RT-PCR. Kruskal-Wallisova ANOVA a testy senzitivity a specificity budou použity ke statistickému zhodnocení.

Pacienti budou zařazeni do skupin podle následujících kritérií:

- 1.) karcinom pankreatu
 - a. + diabetes mellitus diagnostikovaný do 2 let před diagnózou karcinomu
 - b. + dlouhodobě (> 2 roky) léčený diabetes mellitus
 - c. bez diabetu
- 2.) chronická pankreatitida
 - a. + diabetes mellitus
 - b. bez diabetu
- 3.) diabetes mellitus 2. typu
- 4.) kontrolní soubor zdravých osob

Soubory pacientů budou vytvořeny v rámci sledování v odborných ambulancích (diabetologické, gastroenterologické) a ve spolupráci s chirurgickými pracovišti a pracovišti patologie. Všechny zařazené osoby budou komplexně vyšetřeny klinicky i laboratorně. U všech osob bude proveden odběr krve k analýzám nalačno. Podrobná data u osob s karcinomem (stadium nemoci, chronická pankreatitida v osobní anamnéze, kouření, pokles hmotnosti, klinické symptomy) budou využita k dalším subanalýzám.

Na základě hodnocení posuzovaných parametrů byl navržen statistikem nejmenší počet v jednotlivých skupinách 25 osob.

Práce by měla posloužit jako podklad k dalšímu studiu u karcinomu pankreatu kombinovaného s diabetem a především k dalším analýzám u pacientů se zaměřením na časnou diagnostiku tohoto onemocnění.

7 Pacienti a metody

7.1 Pacienti

Do studie bylo celkem zařazeno 77 pacientů s adenokarcinomem pankreatu (PAC), 26 s chronickou pankreatitidou (CHP), 39 diabetiků 2. typu (T2DM) bez prokazatelného nádorového onemocnění a 25 kontrolních osob (bez karcinomu, bez pankreatitidy a bez diabetu). Pacienti s karcinomem byli zařazováni postupně v období, jak přicházeli na pracoviště II. interní kliniky FNKV, III. interní kliniky VFN a Interní kliniky ÚVN. Pacienti s chronickou pankreatitidou jsou dlouhodobě v dispenzární gastroenterologické péči II. interní kliniky FNKV, pacienti s diabetes mellitus 2. typu bez karcinomu a bez pankreatitidy jsou dispenzarizováni na III. interní klinice VFN, kde byl rovněž vytvořen i kontrolní soubor pacientů. Základní charakteristiku souboru uvádí Tabulka 1. Pacienti souhlasili s účastí ve studii, podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena oběma etickými komisemi: 3. LF UK a FNKV.

Tabulka 1: Základní charakteristika souboru

	počet	věk	muži/ženy	BMI [kg/m ²]	glykémie na lačno [mmol/l]	HbA1c [mmol/mol]
PAC	77	68±8	44/33	25.9±5.2	7.9±3.9	48.6±18.1
CHP	26	62±11	15/11	24.3±3.1	9.0±4.7	58.2±31.7
T2DM	39	63±6	27/12	30.1±4.3	7.7±1.6	51.8±13.0
Kontroly	25	63±7	17/8	27.2±3.6	5.3±0.5	37.8±4.6

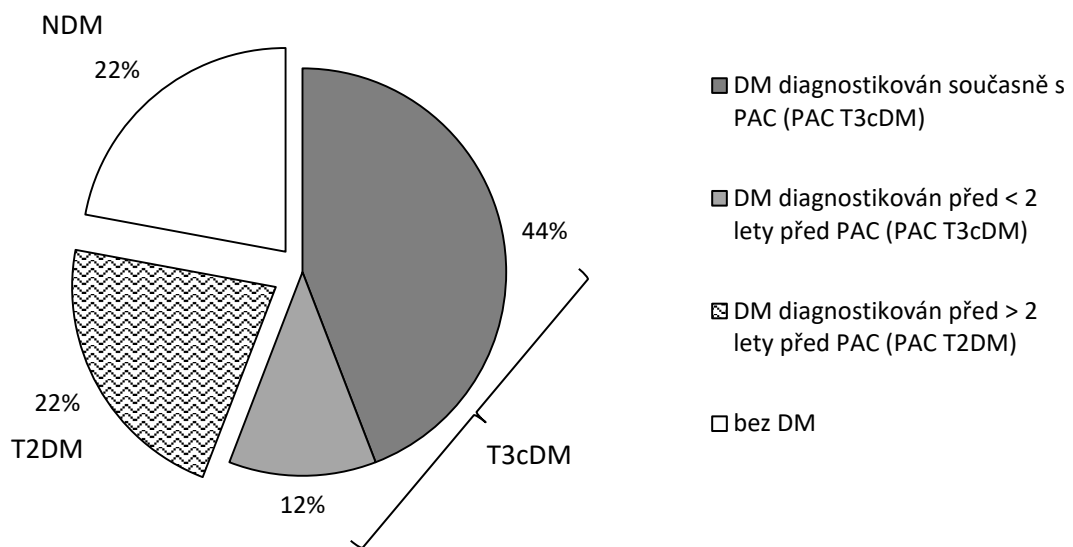
PAC – pacienti s karcinomem pankreatu, CHP – pacienti s chronickou pankreatitidou, T2DM – pacienti s diabetes mellitus 2. typu

U 14 % pacientů s karcinomem byla anamnesticky přítomna chronická pankreatitida. Šedesát pacientů (78 %) mělo poruchu glukózové regulace hodnocenou jako prediabetes nebo diabetes mellitus (PAC DM). U 17 z nich byla tato porucha dlouhodobě známa (PAC T2DM) – diagnostikována před více než 2 roky před vlastní diagnózou karcinomu. U zbylých 43 osob (tedy 56 %

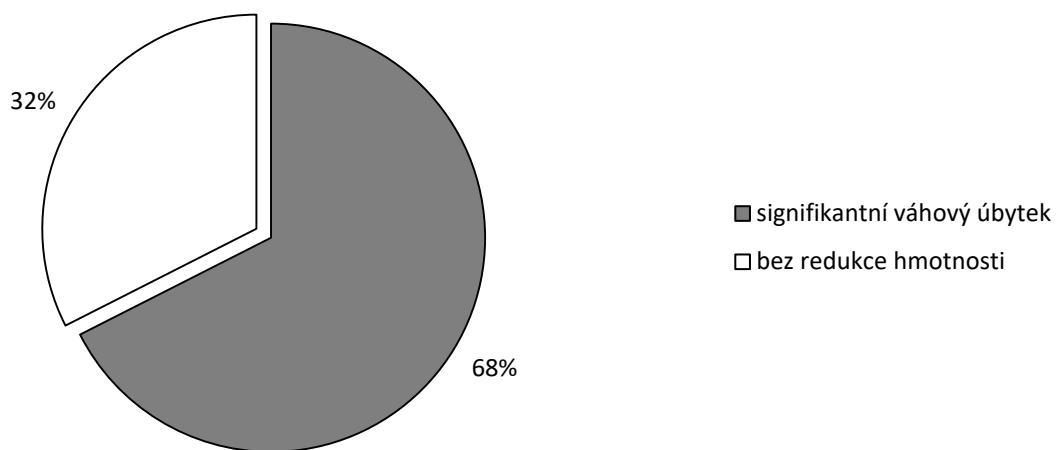
všech osob s karcinomem) bylo toto období kratší než 2 roky, u většiny (34 osob) pak byl (pre)diabetes diagnostikován až v souvislosti s karcinomem. Takový recentně zachycený diabetes hodnotíme jako sekundární pankreatogenní diabetes při karcinomu pankreatu, který je některými autory označován jako T3cDM [18] (Graf 1).

Osoby s karcinomem byly rovněž hodnoceny podle váhového úbytku. Za signifikantní váhový úbytek byl považován pokles hmotnosti větší než 5 % za 3 měsíce, respektive 10 % za půl roku). Hubnutí a jeho výskyt spolu s diabetem znázorňují Graf 2 a Graf 3. 76 % pacientů s karcinomem zhublo o více než 2 kg.

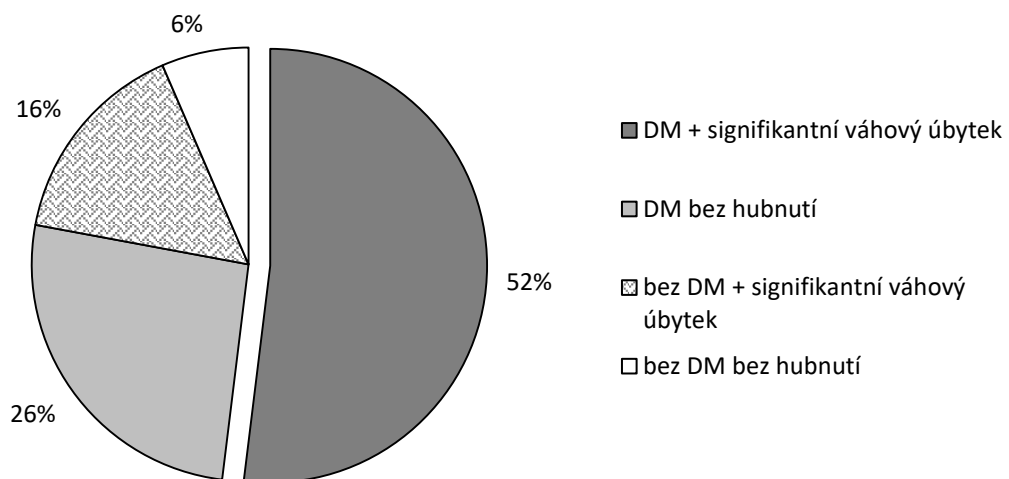
Graf 1: Výskyt typu diabetu (s ohledem na dobu trvání) u pacientů s karcinomem (PAC)



Graf 2: Hubnutí u pacientů s karcinomem



Graf 3: Diabetes mellitus a hubnutí u pacientů s karcinomem



Velikost karcinomu pankreatu u pacientů podle TNM klasifikace udává Tabulka 2.

Tabulka 2: Počty pacientů podle klasifikace velikosti nádoru

Velikost karcinomu	počet pacientů
T1	1
T2	4
T2-3	2
T3	36
T3-4	1
T4	33
T1 – velikost nádoru do 2 cm v nejdelším rozměru T2 – velikost nádoru větší než 2 cm a menší než 4 cm v nejdelším rozměru T3 – velikost nádoru větší než 4 cm T4 – nádor postihuje truncus coeliacus, a. mesenterica superior a/nebo společnou jaterní tepnu (a. hepatica communis)	

Pro klinické potřeby se z TNM klasifikace stanoví stadium karcinomu, které predikuje rozdílnou prognózu. Zastoupení jednotlivých stadií udává Tabulka 3. Poslední sloupec udává procentuální výskyt jednotlivých stadií v České republice dle registru SVOD v roce 2017 [2].

Tabulka 3: Zastoupení jednotlivých stadií karcinomu pankreatu

Staging karcinomu	počet pacientů	%	% incidence klasifikovaných karcinomů dle registru SVOD (2017)
Ia	0	0	7,4
Ib	1	1	
IIa	21	27	20,7
IIb	20	26	
III	22	29	10,4
IV	13	17	61,5
Ia – T1N0M0 Ib – T2N0M0 IIa – T3N0M0 IIb – T1-3N1M0 III – T1-3N2M0, T4 jakékoli N M0 IV – jakékoli T a N M1 T – velikost nádoru viz Tabulka 2 N0 – nádorové buňky nezastiženy v regionálních lymfatických uzlinách N1 – infiltrace nádorovými buňkami v 1-3 regionálních lymfatických uzlinách N2 – infiltrace nádorovými buňkami ve 4 a více regionálních lymfatických uzlinách M0 – bez vzdálených metastáz M1 – přítomné vzdálené metastázy			

7.2 Diagnostika onemocnění

Pro hodnocení diabetu, respektive prediabetu jsme použili standardní kritéria podle American Diabetes Association [19].

Diagnóza chronické pankreatitidy se opírala o osobní anamnézu dlouhodobě gastroenterologicky sledovaných osob, jejich klinický stav a zobrazovací metody (CT, endoskopickou ultrasonografií a endoskopickou retrográdní cholangiopankreatografií). Příčinou chronické pankreatitidy byla buď rekurentní akutní pankreatitida nebo toxonutriční etiologie.

Diagnóza adenokarcinomu byla potvrzena bioticky nebo po chirurgické resekci.

7.3 Metody

7.3.1 Odběr krve a biochemické ukazatele

Labortorní odběry byly prováděny na lačno v ranních hodinách, mezi 7. – 8. hodinou. Glykémie na lačno, glykovaný hemoglobin a CA 19-9 byly stanoveny v rutinním provozu v centrální laboratoři. K potřebám stanovení miRNA byla plná krev oddělena centrifugací do 1 hodiny od odběru, sérum bylo následně uchováno v hluboce mrazicím boxu (-70°C).

7.3.2 Výběr miRNA

Jednotlivé miRNA byly vybrány v naší pilotní studii u 20 pacientů s karcinomem a 20 pacientů bez nádoru a bez zánětu, z celkového množství 750 miRNA, které byly stanoveny na 2 kartách po 384 jamkách. Pomocí programu Biogazelle qBase+© program v2.4 (Biogazelle, Belgium) a jeho aplikace geNorm finder byly miR-191 a miR-454 vybrány jako referenční miRNA, ke kterým se pak ostatní vztahovaly.

7.3.3 Izolace miRNA ze séra

K izolaci miRNA byl požit komerční kit miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon, Dánsko). Sérum bylo po rozmrazení centrifugováno po dobu 5 minut rychlostí 3000 x g k odstranění nečistot a nerozpustných složek. 200 ul supernatantu představovalo vstupní množství séra pro další reakce. Dále proběhla lýza pomocí činidla, precipitace proteinů s následnou centrifugací po dobu 3 minut (11000 x g). K takto vzniklému supernatantu byl přidán isopropanol k navázání miRNA na membránu kolonky. Následovalo několik kroků čištění a proplachování membrány činidly z kitu, vždy s následnou centrifugací (30 sekund – 2 minuty, 11000 x g). Závěrečným krokem bylo vymytí membrány 50 ul vody bez přítomnosti RNáz. Z 200 ul séra jsme tak získali 50 ul izolované miRNA. Pokud nenásledovala bezprostředně reverzní transkripce, byl tento eluát uchován v mrazicím boxu v -20 °C (maximálně týden).

7.3.4 Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci dochází k přepisu jednovláknové miRNA do dvouvláknové cDNA. Použili jsme TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a jednotlivé primery pro konkrétní miRNA (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). V samotné reakci jsou obsaženy dNTP, reverzní transkriptáza, inhibitor RNáz, primer, pufr, voda a samotný vzorek miRNA. Po 5minutové inkubaci na ledu byly vzorky vloženy do thermocycleru k provedení vlastní reverzní transkripce. Nastavené teploty a časy byly: 16°C po dobu 30 minut, 42°C po dobu 30 minut, 85°C na 5 minut a nakonec ochlazení na 4 °C do doby dalšího zpracování. Pokud nenásledovalo ihned real-time PCR (RT-PCR), pak byly vzorky uloženy do mrazicího boxu (maximálně však jeden týden).

7.3.5 Real-time PCR

Do RT-PCR reakce vstupuje PCR Master Mix, voda a TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) – jednotlivé eseje pro konkrétní miRNA. Tento premix byl následně rozpipetován do 96-jamkové destičky, do které se pak přidala cDNA – produkt reverzní transkripce. Destička byla následně překryta optickou fólií, centrifugována a vložena do RT-PCR cycleru ABI Applied Biosystems 7900HT. Na principu fluorescenčně označených esejí je při každém kroku PCR, kdy dochází k amplifikaci signálu, analyzován optickým zařízením signál. Při dosažení prahové úrovně (tzv. treshold line), tedy softwarově stanovené meze, je přiřazeno číslo, které určuje počet cyklů amplifikace (tzv. Cq – cycle quantification number). Čím je nižší toto číslo, tím je vyšší exprese (koncentrace) dané miRNA – je potřeba méně cyklů k dosažení treshold line. Jedná se tedy o kvantitativní PCR, které kromě přítomnosti/absence dané miRNA udává i její množství, respektive expresi.

7.3.6 Zpracování výsledků RT-PCR

Získaná data 8 miRNA (miR-21, miR-30, miR-191, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423 a miR-454) byla analyzována pomocí Expression Suite Software v1.0.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Jak již bylo výše uvedeno, miR-191 a miR-454 byly užity jako komparátory. Expese jednotlivých miRNA u konkrétního jedince jsou vyjádřeny jako ΔCq , tedy rozdíl Cq dané miRNA od průměru Cq dvou referenčních miRNA. Lze tak vyjádřit, že konkrétní miRNA má expresi x -násobnou oproti referenčním miRNA, kde

$$x=2^{-(\Delta Cq)}$$

Jedná se tak o relativní vyjádření exprese.

K posouzení expresí miRNA jednotlivých skupin mezi sebou jsou pak tyto hodnoty (ΔCq) vztaženy k určité skupině, která se použije jako komparátor ($\Delta\Delta Cq$). Abychom získali násobek, kolikrát je daná miRNA vyšší/nížší než ve srovnávací skupině, použijeme vzorec:

$$x=2^{-(\Delta\Delta Cq)}$$

Kontrolní skupina pak má expresi miRNA rovnou 1.

7.3.7 Statistické vyhodnocení

Ke statistické analýze byla použita Kruskal-Wallisova analýza rozptylu (ANOVA) s mnohonásobným porovnáním, pro porovnání 2 nezávislých vzorků byl užit Mann-Whitneyův U test, ke korelacím pak Pearsonův koeficient. Výsledky byly hodnoceny jako signifikantní, když $p < 0,05$. K analýze dat byl užit software Statistica 12 (StatSoft Inc.).

8 Výsledky

8.1 Základní rozdělení souboru

Výsledky miRNA expresí dle základního rozdělení souboru do skupin ukazuje Tabulka 4. Expres miRNA byly u karcinomu signifikantně zvýšené jak proti kontrolnímu vzorku, tak proti chronické pankreatitidě ve všech případech mimo miR-423. Rozdíl byl pozorován i u CA 19-9. Chronická pankreatitida měla proti kontrolnímu vzorku sníženou expresi miR-196 a miR-423. Všechny 3 skupiny se vzájemně lišily expresí miR-196.

Tabulka 4: Relativní exprese miRNA u pacientů s karcinomem, chronickou pankreatitidou a u kontrolní skupiny

	PAC (n=77)	CHP (n=26)	kontroly + T2DM (n=64)
miR-21	3,0 (2,5-3,6) p ¹ <0,0001 p ² =0,0008	0,9 (0,5-1,7)	1,0 (0,7-1,4)
miR-30	2,0 (1,7-2,4) p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	0,7 (0,5-1,1)	1,0 (0,8-1,2)
miR-192	3,2 (2,4-4,1) p ¹ <0,0001 p ² =0,006	1,5 (1,1-2,0)	1,0 (0,8-1,3)
miR-196	1,9 (1,6-2,2) p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	0,4 (0,3-0,4) p ³ <0,0001	1,0 (0,8-1,2)
miR-200	3,7 (2,6-5,3) p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	1,0 (0,7-1,5)	1,0 (0,8-1,2)
miR-423	1,4 (1,2-1,6) p ² <0,0001	0,2 (0,2-0,3) p ³ <0,0001	1,0 (0,8-1,2)
CA 19-9 [kU/l]	846,2 ± 211,5 p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	50,2 ± 23,2	9,5 ± 1,3
Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti kontrolnímu souboru (kontroly + T2DM), jehož exprese=1 Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE			

PAC – pacienti s karcinomem pankreatu
 CHP – pacienti s chronickou pankreatitidou
 kontroly + T2DM – pacienti bez karcinomu a bez chronické pankreatitidy
 Statistická významnost p ve vztahu mezi ¹PAC a kontrolním vzorkem, ²PAC a CHP a mezi ³CHP a kontrolním vzorkem.

8.2 Rozdělení podle přítomnosti diabetu

Tabulka 5 znázorňuje exprese miRNA v rámci podskupin podle přítomnosti diabetes mellitus. Nejvyšších expresí dosahovala skupina s karcinomem a diabetem. Ta se od kontrolního souboru, osob s T2DM a osob s CHP lišila v miR-30 a miR-200.

Tabulka 5: Relativní exprese microRNA (násobky) ve vztahu ke kontrolnímu vzorku pacientů (exprese miRNA=1) podle přítomnosti diabetes mellitus.

	PAC (n=77)		CHP (n=26)		Kontroly + T2DM (n=64)	
	PAC DM+ (n=60)	PAC DM- (n=17)	CHP DM+ (n=18)	CHP DM- (n=8)	T2DM (n=39)	Kontroly (n=25)
miR-21	2,2 (1,8-2,9) p ² <0,0001 p ³ =0,01	2,2 (1,7-3,0) p ² =0,002 p ³ =0,03	0,9 (0,4-2,0)	0,3 (0,1-1,4)	0,6 (0,4-1,0)	1,0 (0,6-1,6)
miR-30	1,8 (1,5-2,2) p ¹ =0,04 p ² =0,0007 p ³ =0,005 p ⁴ =0,002	1,7 (1,1-2,4)	0,7 (0,5-1,2)	0,5 (0,2-1,2)	0,8 (0,6-1,1)	1,0 (0,8-1,3)
miR-192	3,3 (2,4-4,6) p ¹ =0,0003 p ² <0,0001	2,5 (1,9-3,3) p ¹ =0,03 p ² =0,03	1,7 (1,2-2,4)	1,0 (0,6-1,9)	1,0 (0,6-1,5)	1,0 (0,7-1,5)
miR-196	1,6 (1,3-2,0) p ² =0,005 p ³ =0,0001 p ⁴ <0,0001	1,9 (1,3-2,8) p ² =0,01 p ³ =0,0001 p ⁴ <0,0001	0,3 (0,2-0,4) p ¹ =0,0008 p ² =0,002	0,4 (0,2-0,6)	0,8 (0,7-1,0)	1,0 (0,8-1,3)
miR-200	4,1 (2,7-6,3) p ¹ =0,0006 p ² <0,0001 p ³ =0,007 p ⁴ =0,02	2,7 (1,4-5,0) p ¹ =0,05 p ² =0,02	1,1 (0,9-1,5)	0,9 (0,3-2,7)	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,7-1,4)
miR-423	1,3 (1,1-1,5)	1,3 (0,9-2,1)	0,2 (0,2-0,3)	0,2 (0,1-0,4)	0,9 (0,7-1,1)	1,0 (0,8-1,3)

	$p^3=0,0003$ $p^4<0,0001$	$p^3<0,0001$ $p^4<0,0001$	$p^1<0,0001$ $p^2<0,0001$	$p^1=0,004$ $p^2=0,02$		
CA 19-9 [kU/l]	995,2 ± 267,4	343,5 ± 159,2	38,1 ± 15,5	77,3 ± 69,2	11,1 ± 1,8	6,5 ± 1,1
	$p^1<0,0006$ $p^2<0,0001$ $p^3=0,02$ $p^4=0,006$	$p^1=0,0003$ $p^2=0,001$				

Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti kontrolám, jejichž exprese=1
Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE
PAC DM+: pacienti s karcinomem pankreatu a diabetes mellitus/prediabetem
PAC DM-: pacienti s karcinomem pankreatu bez poruchy glukózového metabolismu
CHP DM+: pacienti s chronickou pankreatitidou a diabetes mellitus/prediabetem
CHP DM-: pacienti s chronickou pankreatitidou bez poruchy glukózového metabolismu
T2DM: pacienti s diabetem 2. typu bez karcinomu a bez chronické pankreatitidy
Statistická významnost p ve vztahu ke ¹kontrolám, ²T2DM, ³CHP DM- a ⁴CHP DM+.

8.3 Rozdělení podle typu diabetu u karcinomu pankreatu

Nebyl pozorován rozdíl v expresích miRNA mezi typy diabetu v rámci skupiny pacientů s karcinomem (Tabulka 6).

Tabulka 6: Expese miRNA u pacientů s karcinomem podle přítomnosti diabetu a jeho typu (v závislosti na čase mezi diagnostikou diabetu a karcinomu)

	PAC T3cDM (n=43)	PAC T2DM (n=17)	PAC NDM (n=17)	p
miR-21	1,1 (0,8-1,5)	0,8 (0,5-1,2)	1,0 (0,7-1,3)	ns
miR-30	1,1 (0,9-1,4)	1,1 (0,8-1,5)	1,0 (0,7-1,4)	
miR-192	1,4 (1,0-2,1)	1,0 (0,5-2,2)	1,0 (0,8-1,3)	
miR-196	0,9 (0,7-1,1)	0,8 (0,6-1,2)	1,0 (0,7-1,5)	
miR-200	1,7 (1,0-2,8)	1,2 (0,6-2,6)	1,0 (0,5-1,9)	
miR-423	1,0 (0,8-1,1)	0,9 (0,7-1,3)	1,0 (0,6-1,6)	
CA 19-9 [kU/l]	1131,3 ± 365,0	671,8 ± 250,1	343,5 ± 159,2	

Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti PAC NDM, jejichž exprese=1
Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE
PAC T3cDM – pacienti s karcinomem pankreatu a diabetem, jehož diagnóza byla stanovena před < 2 roky
PAC T2DM – pacienti s karcinomem a diabetem, jehož diagnóza byla stanovena před > 2 roky
PAC NDM – pacienti s karcinomem bez diabetu

8.4 Rozdělení podle hmotnostních změn pacientů s karcinomem

Expresе všech analyzovaných miRNA byly 2-5x zvýšené u pacientů s karcinomem a signifikantním váhovým úbytkem (SWL) oproti skupinám kontrolních osob a diabetiků 2. typu bez karcinomu a bez pankreatitidy. Expresе miRNA u pacientů s karcinomem bez váhového úbytku (NWL) pak byly nižší (1,7-2,8x zvýšené) oproti komparátoru. (U miR-200 a miR-423 rozdíl mezi těmito skupinami pozorován nebyl.) Obě skupiny s karcinomem se mezi sebou lišily pouze u miR-200 (2,3x vyšší expresе u váhového úbytku) (Tabulka 7).

Rozdíl mezi skupinou s poklesem hmotnosti a bez poklesu se ještě zvýraznil při změně klasifikace, kdy za signifikantní váhový úbytek bylo považováno každé hubnutí o více než 2 kg (data nejsou uvedena).

Tabulka 7: Relativní expresе ve skupinách pacientů s karcinomem podle hmotnostní změny ve vztahu k osobám bez karcinomu a pankreatitidy

	PAC SWL (n=52)	PAC NWL (n=25)	Kontroly + T2DM (n=64)
miR-21	3,1 (2,4-3,9) p ¹ <0,0001	2,8 (2,0-4,1) p ² =0,0007	1,0 (0,7-1,4)
miR-30	2,0 (1,6-2,5) p ¹ <0,0001	1,9 (1,5-2,5) p ² =0,002	1,0 (0,8-1,2)
miR-192	3,7 (2,6-5,2) p ¹ <0,0001	2,3 (1,6-3,3) p ² =0,003	1,0 (0,8-1,3)
miR-196	2,0 (1,6-2,4) p ¹ <0,0001	1,7 (1,2-2,4) p ² =0,03	1,0 (0,8-1,2)
miR-200	4,9 (3,4-7,0) p ¹ <0,0001 p ³ =0,009	2,1 (1,0-4,6)	1,0 (0,8-1,2)
miR-423	1,6 (1,3-1,8) p ¹ =0,008	1,0 (0,8-1,4)	1,0 (0,8-1,2)
CA 19-9 [kU/l]	1007,5 ± 299,1 p ¹ <0,0001	537,1 ± 222,4 p ² <0,0001	9,5 ± 1,3

Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti pacientům bez karcinomu a bez pankreatitidy, jejichž expresе=1

Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE
 PAC SWL – pacienti s karcinomem pankreatu a signifikantním poklesem hmotnosti, tedy o více než 5 % za 3 měsíce nebo o 10 % za půl roku
 PAC NWL – pacienti s karcinomem beze změny hmotnosti
 Kontroly + T2DM – pacienti bez karcinomu a bez pankreatitidy
 Statistická významnost p ve vztahu ke ^{1,2}kontrolám+T2DM, ³PAC NWL.

8.5 Porovnání výsledků u symptomatických pacientů s karcinomem (recentní diagnóza diabetes mellitus a váhový úbytek) proti osobám bez karcinomu

Výsledky expresí miRNA a CA 19-9 u pacientů s karcinomem, kteří měli recentně diagnostikovaný diabetes mellitus a vykazovali hmotnostní úbytek, proti pacientům bez karcinomu uvádí Tabulka 8. Zvýšení expresí je patrné hlavně u miR-192, a zejména pak u miR-200, které byly až šestinásobné v porovnání s pacienty bez karcinomu.

Tabulka 8: Relativní exprese miRNA u symptomatických pacientů s karcinomem s porovnáním proti pacientům bez karcinomu

	PAC T3cDM + SWL	Kontroly + T2DM + CHP	p
miR-21	3,5 (1,2-1,7)	1,0 (0,3-0,3)	<0,0001
miR-30	2,3 (0,7-0,9)	1,0 (0,2-0,2)	0,0001
miR-192	4,1 (1,8-3,0)	1,0 (0,2-0,2)	<0,0001
miR-196	2,4 (0,7-0,9)	1,0 (0,1-0,2)	<0,0001
miR-200	5,7 (2,5-4,5)	1,0 (0,2-0,2)	<0,0001
miR-423	2,2 (0,5-0,7)	1,0 (0,2-0,2)	0,0008
CA 19-9 [kU/l]	1450,0 ± 582,2	23,4 ± 8,2	<0,0001

Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti pacientům bez karcinomu, jejichž exprese=1

Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE

PAC T3cDM + SWL – pacienti s karcinomem pankreatu a diabetem, jehož diagnóza byla stanovena před < 2 roky, a signifikantním poklesem hmotnosti, tedy o více než 5 % za 3 měsíce nebo o 10 % za půl roku

Kontroly + T2DM + CHP – pacienti bez karcinomu

8.6 Rozdělení podle velikosti karcinomu

Expresí miRNA podle velikosti nádoru jsou uvedeny v Tabulce 9. Velikost nádoru podle klasifikace T1 – T2-3 jsme pro velmi nízký počet pacientů ze statistických důvodů sloučili do jedné skupiny. U Ca 19-9, miR-21, miR-196, miR-200 a miR-423 lze pozorovat trend zvyšující se koncentrace/expresí s velikostí nádoru. Hypoteticky lze uvažovat o možnosti signifikantního rozdílu u miR-200 již u malých nádorů, pokud by byl k dispozici odpovídající počet pacientů v této skupině.

Tabulka 9: Relativní expresí miRNA podle velikosti karcinomu ve vztahu k osobám bez karcinomu a pankreatitidy

	T1 – T2-3 (n=7)	T3 (n=37)	T4 (n=33)	Kontroly+T2DM (n=64)
miR-21	2,5 (1,1-5,7)	2,9 (2,0-4,1) p ¹ =0,0003	3,2 (2,6-4,0) p ¹ <0,0001	1,0 (0,7-1,4)
miR-30	1,4 (0,8-2,4)	2,1 (1,6-2,8) p ¹ =0,0003	2,0 (1,6-2,6) p ¹ =0,0005	1,0 (0,8-1,2)
miR-192	1,9 (0,8-4,4)	3,6 (2,2-5,9) p ¹ <0,0001	3,0 (2,4-3,8) p ¹ <0,0001	1,0 (0,8-1,3)
miR-196	1,3 (0,4-3,6)	1,6 (1,2-2,1) p ¹ =0,02	2,4 (1,9-3,0) p ¹ <0,0001	1,0 (0,8-1,2)
miR-200	2,6 (1,2-5,7)	3,0 (1,7-5,3) p ¹ =0,0008	5,0 (2,9-8,7) p ¹ <0,0001	1,0 (0,8-1,2)
miR-423	1,1 (0,5-2,2)	1,3 (1,0-1,7)	1,5 (1,3-1,8) p ¹ =0,04	1,0 (0,8-1,2)
CA 19-9 [kU/l]	202,9 ± 139,0	641,2 ± 331,0 p ¹ <0,0001	1226,8 ± 307,8 p ¹ <0,0001 p ² =0,02	9,5 ± 1,3

Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti pacientům bez karcinomu a bez pankreatitidy, jejichž expresí=1

Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE

Statistická významnost p ve vztahu ke ¹kontrolám+T2DM, ²T3.

Vysvětlení klasifikace podle velikosti nádoru je uvedeno v Tabulce 2.

8.7 Rozdělení podle stadia karcinomu

Jednotlivé exprese miRNA a CA 19-9 podle stadií karcinomu jsou uvedeny v Tabulce 10. Podobně jako v předchozí tabulce při dělení podle velikosti primárního nádoru i zde je patrný trend zvyšující se exprese miRNA a koncentrace CA 19-9 spolu s pokročilostí onemocnění, kdy maximálních hodnot dosahovalo stadium IV, tedy karcinom již se vzdálenými metastázami.

Tabulka 10: Relativní exprese miRNA podle stadia karcinomu ve vztahu k osobám bez karcinomu a pankreatitidy

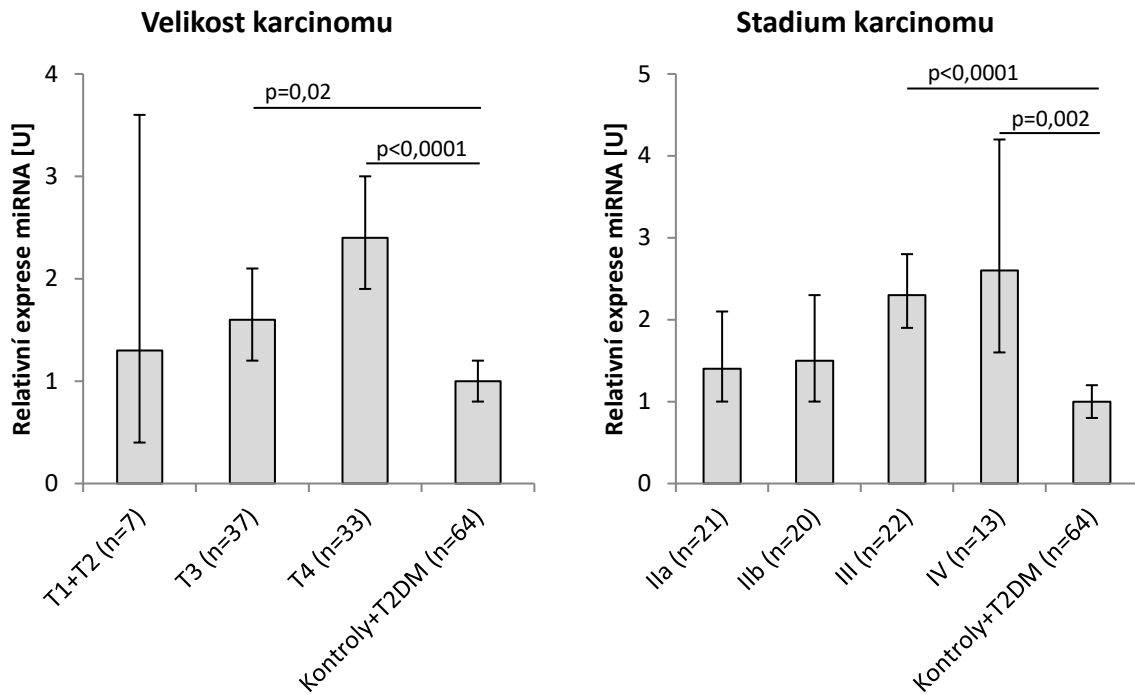
	Ib (n=1)	Ila (n=21)	Ilb (n=20)	III (n=22)	IV (n=13)	Kontroly+ T2DM (n=64)
miR-21	1,3	2,4 (1,6-3,5)	3,2 (1,9-5,2) p ¹ =0,003	3,1 (2,5-4,0) p ¹ =0,0004	4,0 (2,4-6,6) p ¹ =0,002	1,0 (0,7-1,4)
miR-30	1,0	1,8 (1,3-2,4)	2,1 (1,4-3,1) p ¹ =0,02	2,1 (1,6-2,9) p ¹ =0,004	2,2 (1,3-3,8)	1,0 (0,8-1,2)
miR-192	1,2	2,3 (1,4-4,0)	4,1 (2,2-7,8) p ¹ =0,0004	2,9 (2,2-3,9) p ¹ =0,0006	4,0 (1,8-9,2) p ¹ =0,008	1,0 (0,8-1,3)
miR-196	4,6	1,4 (1,0-2,1)	1,5 (1,0-2,3)	2,3 (1,9-2,8) p ¹ <0,0001	2,6 (1,6-4,2) p ¹ =0,002	1,0 (0,8-1,2)
miR-200	1,1	1,7 (0,8-3,3)	4,6 (2,5-8,5) p ¹ =0,0005	3,5 (2,0-6,1) p ¹ =0,0006	6,9 (3,2-15,0) p ¹ =0,0001 p ² =0,03	1,0 (0,8-1,2)
miR-423	1,0	1,0 (0,7-1,5)	1,5 (1,0-2,1)	1,5 (1,2-1,9)	1,5 (1,2-2,0)	1,0 (0,8-1,2)
CA 19-9 [kU/l]	15,5	131,8±41,6 p ¹ =0,004	739,6±497,1 p ¹ =0,001	958,3±365,7 p ¹ <0,0001	2001,7±670,5 p ¹ <0,0001	9,5±1,3
Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti pacientům bez karcinomu a bez pankreatitidy, jejichž exprese=1 Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE Statistická významnost p ve vztahu ke ¹ kontrolám+T2DM, ² stadiu Ila. Vysvětlení jednotlivých stadií je uvedeno v Tabulce 3.						

8.7.1 Porovnání expresí miR-196 a miR-200 podle pokročilosti onemocnění

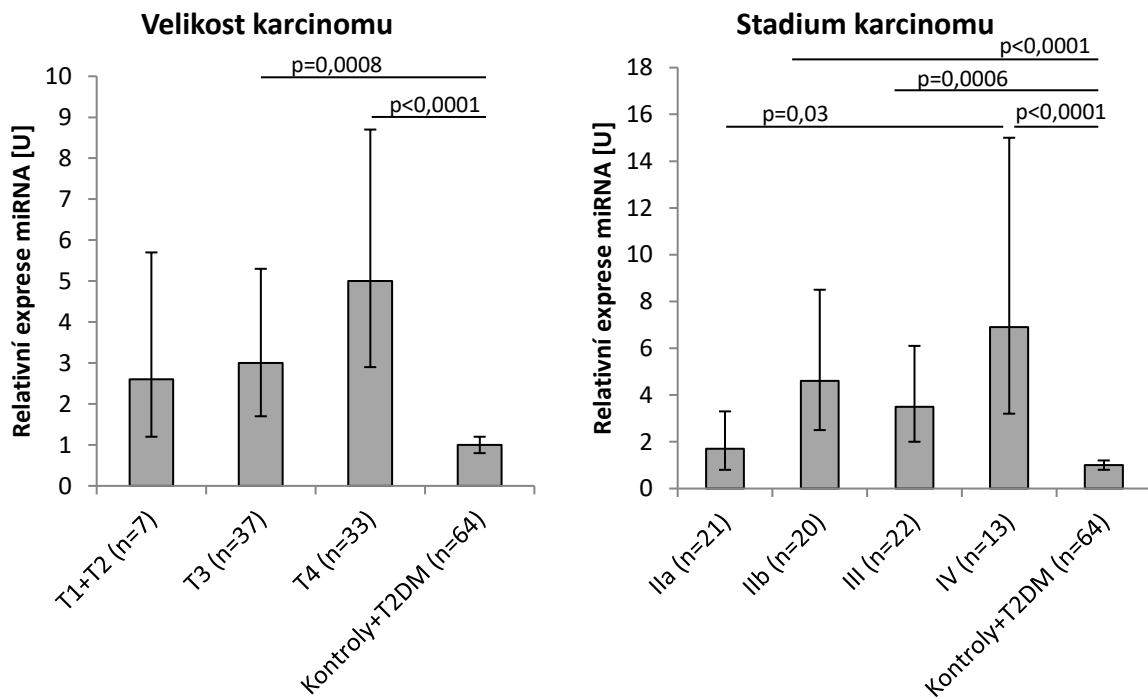
Graf 4 porovnává exprese a) miR-196, b) miR-200 podle velikosti primárního nádoru a klinického stadia karcinomu. Se závažností onemocnění stoupá exprese obou miRNA.

Graf 4: Porovnání expresí miRNA podle velikosti primárního nádoru a klinického stadia

a) miR-196



b) miR-200



8.8 Rozdělení podle přítomnosti chronické pankreatitidy v osobní anamnéze pacientů s karcinomem

Pacienti s karcinomem a chronickou pankreatitidou v osobní anamnéze dosahovali nižších expresí miRNA než pacienti s karcinomem bez pankreatitidy. Signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami ale pozorován nebyl (Tabulka 11).

Tabulka 11: Relativní exprese miRNA podle přítomnosti chronické pankreatitidy v osobní anamnéze ve vztahu k osobám bez karcinomu a pankreatitidy

	PAC CHP (n=11)	PAC NCHP (n=66)	CHP (n=26)	Kontroly+T2DM (n=64)
miR-21	2,3 (1,1-4,7)	3,1 (2,6-3,8) p ¹ <0,0001 p ² =0,0006	0,9 (0,5-1,7)	1,0 (0,7-1,4)
miR-30	1,6 (0,9-2,8)	2,1 (1,7-2,5) p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	0,7 (0,5-1,1)	1,0 (0,8-1,2)
miR-192	2,9 (1,2-7,2)	3,2 (2,4-4,2) p ¹ <0,0001 p ² =0,008	1,5 (1,1-2,0)	1,0 (0,8-1,3)
miR-196	1,5 (0,9-2,6) p ² <0,0001	2,0 (1,6-2,4) p ¹ =0,0001 p ² <0,0001	0,4 (0,3-0,4)	1,0 (0,8-1,2)
miR-200	2,8 (0,9-9,0)	3,9 (2,7-5,7) p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	1,0 (0,7-1,5)	1,0 (0,8-1,2)
miR-423	1,5 (0,9-2,5) p ² <0,0001	1,3 (1,1-1,6) p ² <0,0001	0,2 (0,2-0,3) p ³ <0,0001	1,0 (0,8-1,2)
CA 19-9 [kU/l]	223,0 ± 115,2 p ¹ =0,01	962,4 ± 247,4 p ¹ <0,0001 p ² <0,0001	50,2 ± 23,2	9,5 ± 1,3

Hodnoty expresí miRNA jsou vyjádřeny jako násobky proti pacientům bez karcinomu a bez pankreatitidy, jejichž exprese=1

Koncentrace CA 19-9 je udána jako aritmetický průměr ± SE

PAC CHP – pacienti s karcinomem pankreatu a chronickou pankreatitidou v osobní anamnéze

PAC NCHP – pacienti s karcinomem bez chronické pankreatitidy v anamnéze

Kontroly + T2DM – pacienti bez karcinomu a bez pankreatitidy

Statistická významnost p ve vztahu ke ^{1,3}kontrolám+T2DM, ²CHP.

8.9 Korelace

Vzhledem k výrazným rozdílům v expresích miRNA a CA 19-9 mezi jednotlivými skupinami byly korelační analýzy provedeny u osob s karcinomem. Výrazná asociace byla pozorována mezi CA 19-9 a miR-200 ($r=0,5$, $p<0,0001$), a to zejména v podskupinách s recentně zachyceným diabetes mellitus (PAC T3cDM) ($r=0,57$, $p<0,0001$), u pacientů bez výrazného hubnutí (PAC NWL) ($r=0,82$, $p<0,0001$) a u pacientů bez anamnézy chronické pankreatitidy (PAC NCHP) ($r=0,55$, $p<0,0001$). Výsledky ukazuje Tabulka 12.

Tabulka 12: Korelace mezi CA 19-9 a jednotlivými miRNA ve skupinách

		miR-21	miR-30	miR-192	miR-196	miR-200	miR-423
CA 19-9	PAC	0,2539 p=0,037	0,1364 p=0,271	0,3803 p=0,001	0,2069 p=0,096	0,5006 p<0,0001	0,1024 p=0,406
	PAC T3cDM	0,2676 p=0,104	0,1726 p=0,300	0,4303 p=0,007	0,2268 p=0,183	0,5704 p<0,0001	0,1723 p=0,301
	PAC T2DM	0,2325 p=0,424	-0,3117 p=0,278	0,1018 p=0,729	0,3446 p=0,228	0,2173 p=0,455	-0,0907 p=0,758
	PAC NDM	0,1473 p=0,586	0,2182 p=0,435	0,3260 p=0,218	0,1983 p=0,462	0,1348 p=0,619	0,0616 p=0,821
	PAC NWL	0,2589 p=0,222	0,1551 p=0,469	0,3258 p=0,120	0,4631 p=0,026	0,8207 p<0,0001	0,0630 p=0,770
	PAC SWL	0,2645 p=0,083	0,1276 p=0,415	0,3722 p=0,013	0,1282 p=0,413	0,4232 p=0,004	0,0716 p=0,644
	PAC CHP	0,0838 p=0,807	-0,0771 p=0,822	0,1624 p=0,633	0,0507 p=0,882	0,1348 p=0,693	-0,2077 p=0,540
	PAC NCHP	0,2694 p=0,043	0,1300 p=0,340	0,4198 p=0,001	0,2073 p=0,129	0,5459 p<0,0001	0,1339 p=0,321

Hodnoty značí Pearsonův koeficient r , p pak statistickou významnost vztahu.

PAC – pacienti s karcinomem pankreatu

PAC T3cDM – pacienti s karcinomem pankreatu a diabetem, jehož diagnóza byla stanovena před < 1 rokem

PAC T2DM – pacienti s karcinomem a diabetem, jehož diagnóza byla stanovena před >1 rokem

PAC NDM – pacienti s karcinomem bez diabetu

PAC SWL – pacienti s karcinomem pankreatu a signifikantním poklesem hmotnosti, tedy o více než 5 % za 3 měsíce nebo o 10 % za půl roku

PAC NWL – pacienti s karcinomem beze změny hmotnosti

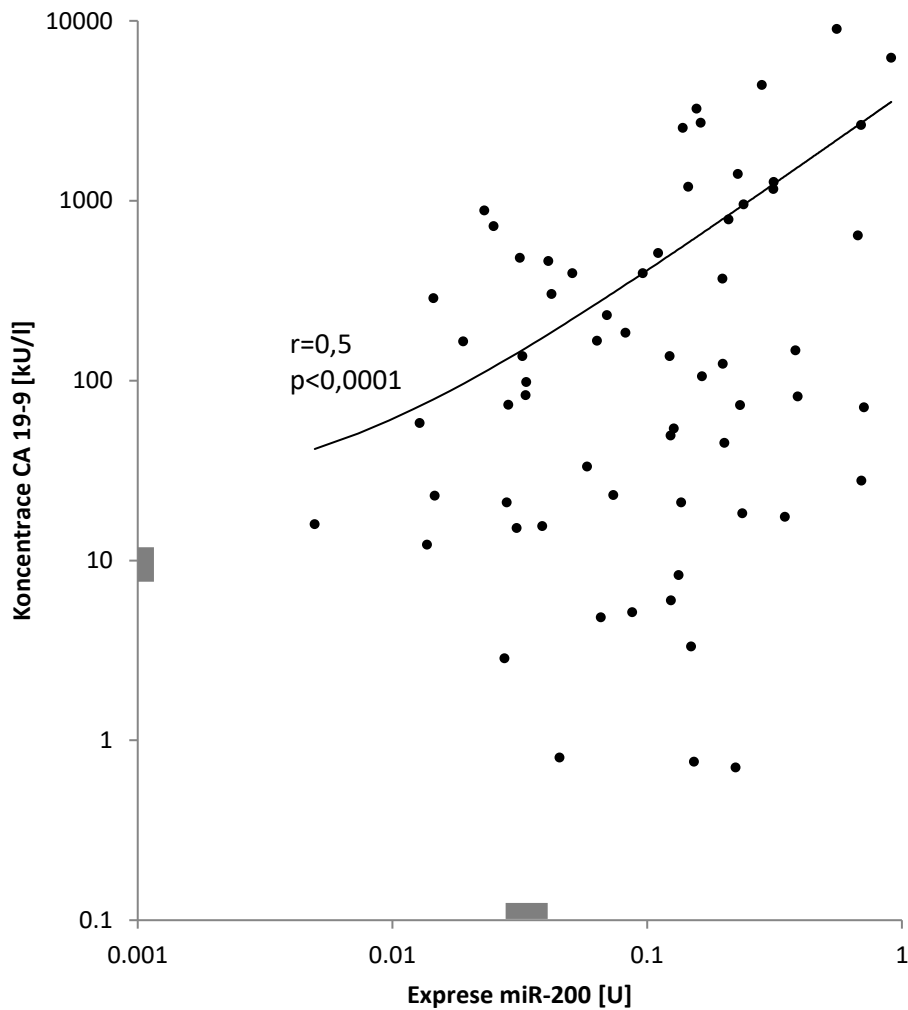
PAC CHP – pacienti s karcinomem pankreatu a chronickou pankreatitidou v osobní anamnéze

PAC NCHP – pacienti s karcinomem bez chronické pankreatitidy v anamnéze

8.9.1 Korelace miR-200 a CA 19-9

Graf 5 znázorňuje korelaci mezi expresí miR-200 a koncentrací CA 19-9.

Graf 5: Korelace mezi miR-200 a CA 19-9. U obou veličin je použito logaritmické měřítko, silná šedivá čára na osách uvádí standardní chybu průměru u kontrolního souboru (pacienti bez karcinomu a bez zánětu).



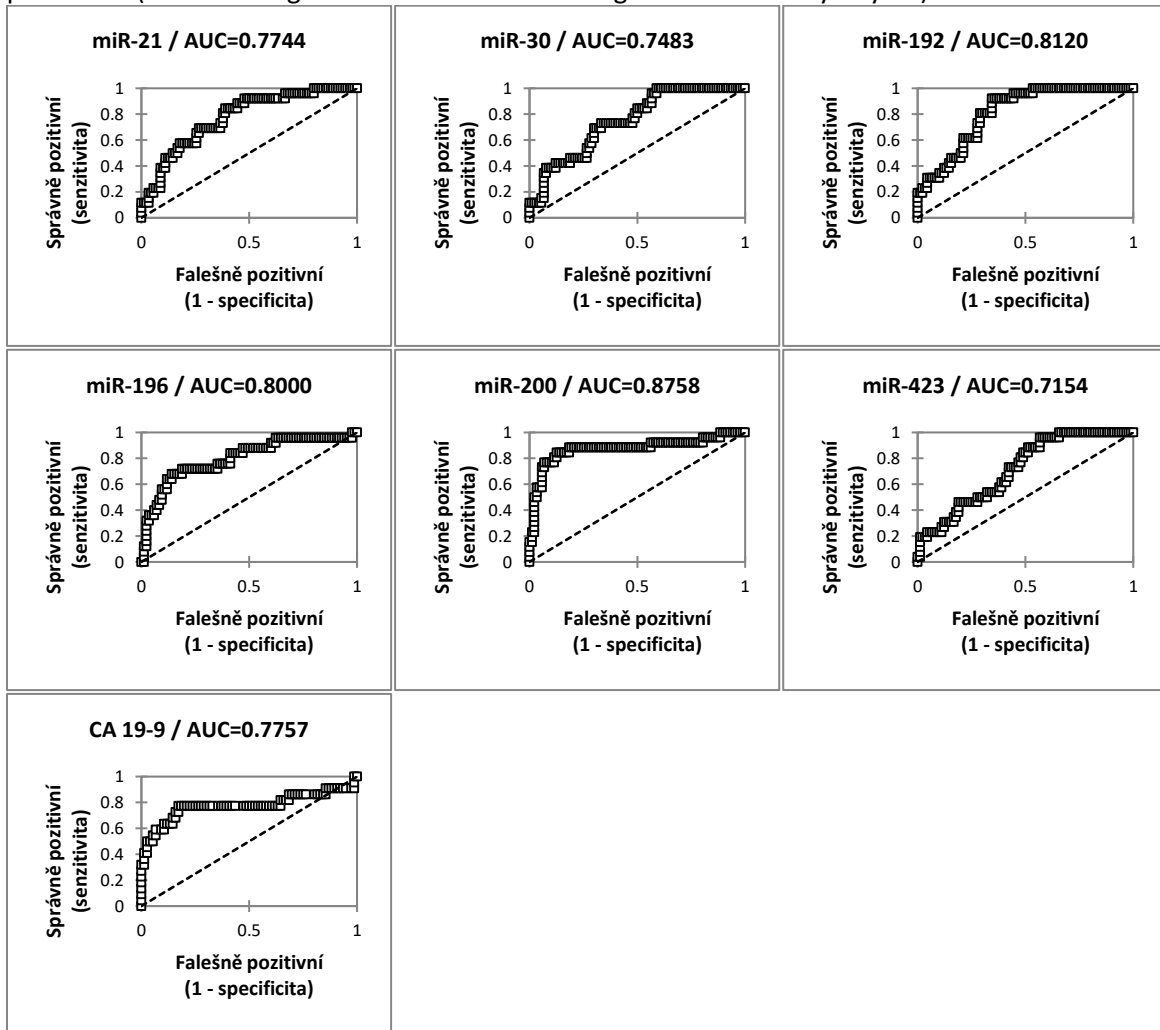
8.10 Vyhodnocení testů CA 19-9 a miRNA

K posouzení testů byly užity ROC křivky (Receiver Operating Characteristic) s vyjádřením plochy pod křivkou (AUC). Při posuzování testu, kdy za správně pozitivní byla považována detekce přítomnosti karcinomu, bylo $AUC_{CA\ 19-9}=0,86$, $AUC_{miR-21}=0,76$, $AUC_{miR-30}=0,75$, $AUC_{miR-192}=0,76$, AUC_{miR-}

$AUC_{miR-196}=0,81$, $AUC_{miR-200}=0,78$ a $AUC_{miR-423}=0,72$. Test CA 19-9 dosahoval senzitivity 86 % a specificity 82 %. Nicméně takových výsledků dosahoval při nastavení, kdy za pozitivní test byla považována koncentrace CA19-9 > 15 kU/l, tedy hodnota velmi častá u nenádorových onemocnění, která je v klinické praxi považována za negativní výsledek.

V dalším hodnocení testů jsme zahrnuli pouze pacienty s karcinomem s časnými symptomy – signifikantním hmotnostním úbytkem a recentně diagnostikovaným diabetes mellitus. (Tedy ty pacienty, u nichž by mohlo být vysloveno podezření na karcinom a kteří by tak byli ideálními kandidáty k neinvazivní diagnostice.) V takovémto nastavení pak na jedné straně klesla účinnost testu s CA 19-9 ($AUC=0,78$), naopak na druhé straně u miR-192 a zejména miR-200 došlo ke zlepšení ($AUC_{miR-192}=0,81$, $AUC_{miR-200}=0,88$) – viz Graf 6.

Graf 6: ROC křivky pro jednotlivé testy u symptomatických pacientů s karcinomem pankreatu (recentní diagnóza diabetes mellitus + signifikantní váhový úbytek)



9 Diskuze

Vysoká mortalita karcinomu pankreatu je dána pozdní diagnostikou onemocnění, kdy již není možná kompletní resekce nádoru, jakožto v současnosti jediná možnost kurativní léčby. Absence specifických časných symptomů a specifických markerů přispívá k této pozdní diagnostice. Nově zachycený diabetes mellitus spolu s jinak nevyjasněným hubnutím u pacienta by mohl sloužit jako vodítko ke screeningu karcinomu u praktických lékařů. Druhým krokem je nalezení vhodného neinvazivního a rychlého markeru.

9.1 Epidemiologická data

9.1.1 Stadia karcinomu

V souboru pacientů byla velmi málo zastoupena časná stadia karcinomu s malou velikostí primárního nádoru (1 pacient ve stadiu T1 a 4 pacienti ve stadiu T2). Podle hodnocení stadia dle prognózy byl ve stadiu I pouze 1 pacient. Pacienti byli do studie zařazováni bez selekce – tedy tak, jak přicházeli na oddělení.

Porovnáme-li zastoupení jednotlivých stadií karcinomu v naší studii proti výskytu stadií v České republice dle registru SVOD (2017), bylo stadium I zastoupeno méně (1,3 % vs 7,4 %), stadium II naopak výrazně více (53,2 % vs. 20,7 %), stadium III výrazně více (28,6 % vs. 10,4 %) a stadium IV výrazně méně (16,9 % vs. 61,5%).

V registru SVOD je klasifikováno pouze 73 % pacientů, zbylých 27 % je nezařazeno. U nich lze hypoteticky předpokládat spíše pokročilejší nálezy, které nejsou s ohledem na celkový stav pacienta blíže vyšetřovány.

Vzhledem k jednotlivcům zařazených do stadia I je statistický rozdíl mezi pozorovaným a uváděným počtem v registru zanedbatelný. Celkově vyšší zastoupení stadií II a III ve studii lze vysvětlit místem konání studie, a sice v centru specializovaném na chirurgicko-onkologickou péči o pacienty s karcinomem, kdy zejména pacienti, kteří jsou indikováni k operaci a únosní operace jsou právě sem směřováni. Naopak pokročilá stadia, kde dominuje paliativní, respektive symptomatický postup, zůstávají na pracovištích nižšího typu.

9.1.2 Prevalence diabetes mellitus u karcinomu pankreatu

Jak již bylo v úvodu uvedeno, prevalence diabetes mellitus u pacientů s karcinomem se dle studií liší. Pohybuje se v průměru mezi 40-80 %. Tuto hodnotu ovlivňuje jednak metoda, jakou byl diabetes stanoven (anamnesticky vs. měřená glykémie na lačno, eventuálně oGTT), jednak také podle toho, jestli byl hodnocen pouze samotný diabetes nebo i prediabetes, a podle jakých kritérií. Například ve studii Gulla z roku 1994 byl diabetes diagnostikován u pacientů s karcinomem pouze u 22,8 % – diabetes byl ale hodnocen zejména dle anamnestických dat, laboratorní kritéria pak byla volnější: glykémie na lačno > 7,8 mmol/l nebo libovolná glykémie > 11,1 mmol/l [20].

Vzhledem k tomu, že naše studie byla zaměřená na vztah karcinomu a diabetu, byl součástí vyšetření odběr glykémie na lačno. Do hodnocení jsme pak zahrnuli jakoukoli poruchu glukózového metabolismu (glykémie na lačno > 5,6mmol/l, tedy jak diabetes, tak prediabetes). Zjištěná vysoká prevalence diabetu tak odpovídá horní hranici dle jiných studií.

Zatímco ve výše zmíněné studii byl diabetes diagnostikovaný recentně (< 2 roky před diagnózou karcinomu) v 56,1 % případů s diabetem, v naší studii s kritérii < 1 rok a přísnějšími laboratorními cut-off hodnotami byl takový diabetes zachycen u 72 %. Při posunutí kritéria recentně diagnostikovaného diabetu na 2 roky se zvýšil počet pacientů s diabetem dokonce na 80 %.) Současná diagnóza diabetu s karcinomem proběhla v našem případě u 57 % pacientů s karcinomem a

diabetem, v dané studii pak ve 40,2 %. Jiné studie uvádí podobný výskyt recentně zachyceného diabetu jako naše studie – 88 % [21], 74 % [9].

Na druhou stranu vyšší záchyt diabetu u diabetes-asymptomatických pacientů s karcinomem může být dán podrobnější diagnostikou spojenou s primárním onemocněním. V době diagnózy diabetu je samotné odlišení T2DM a T3cDM velmi obtížné. Takový test, který by tyto typy od sebe dokázal odlišit, by mohl výrazně zlepšit samotnou nádorovou diagnostiku [22].

9.1.3 Změny hmotnosti

Redukce hmotnosti u pacienta je dalším významným symptomem nemoci. Stejně jako u metod pro stanovení diabetu je i v případě váhového úbytku nejednotný názor, jak jej charakterizovat. Shoda panuje v tom, že se jedná o nechtěný, necílený pokles hmotnosti, nicméně číselné vyjádření se značně liší. Některé práce za signifikantní považují pokles hmotnosti o více než 5 kg za 3 měsíce nebo 10 kg za půl roku, jindy je uváděn pokles hmotnosti o více než 2 kg atd. Vzhledem k tomu, že tyto 2 kg představují zcela jiný rozdíl u pacientů s hmotností např. 50 a 150 kg, zvolili jsme v naší studii pokles uvedený v % počáteční hmotnosti za 3 měsíce, resp. půl roku. Při takovém nastavení byl u 68 % pacientů zaznamenán váhový úbytek. V jiných studiích to bylo okolo 50-60 % [23,24].

Osoby s recentně zachyceným diabetem a signifikantním váhovým úbytkem představovaly 40 % všech pacientů v potenciálně kurativním stadiu I-II. U těchto symptomatických osob (T3cDM + váhový úbytek) byla právě tato stadia častější (65 %). Bývá uváděno, že chirurgická terapie je možná asi u 15 – 20 % pacientů, přičemž jsou časté relapsy onemocnění. Pětileté přežití po resekci je okolo 20 – 25 % v závislosti na stadiu a negativitě histologického vyšetření v okrajích řezu, (jde-li o tzv. R0 resekci) [25,26].

9.2 miRNA a CA 19-9

V současnosti užívaný marker CA 19-9 není dostatečně citlivý – dosahuje senzitivity okolo 68 – 78 % a specificity 70 – 83 % [27,28]. Přidání miR-196, miR-200 a miR-423 k CA 19-9 vedlo ke zvýšení senzitivity i specificity. Kombinace miRNA rovněž lépe diferencovala karcinom od chronického zánětu, kdy zejména miR-423 jasně rozlišila pacienty s chronickou pankreatitidou proti ostatním skupinám.

V minulosti byly popsány různé kombinace miRNA s podobnými výsledky jako CA 19-9 [29]. Dvě miRNA (miR-486-5p a miR-938) odlišily karcinom od kontrolních osob a od chronické pankreatitidy s AUC 0,861 a 0,706, respektive 0,693 a 0,754. Výsledky byly taktéž podobné jako u CA 19-9. Jejich kombinace však nebyla testována [30]. Kombinace miR-16, miR-196a a CA 19-9 dokázala odlišit karcinom od kontrol a chronické pankreatitidy se senzitivitou 92 % a specificitou 95,6 %. V testování odlišení samotného nádoru od chronického zánětu pak senzitivita byla 88,4 % a specificita 96,3 % [31].

Otázkou zůstává, jestli změny v expresích miRNA vznikají již časně, nebo jsou patrné až v případě pokročilých nálezů jako výsledek změny regulačních systémů. Méně než 5 let před stanovením diagnózy karcinomu nebyl v jedné studii pozorován žádný rozdíl v expresi vytipovaných miRNA proti zdravým osobám. Byla ale už hraničně zvýšená koncentrace CA 19-9 ($p=0,04$) [32]. Přestože jsme nemohli provést takovou retrospektivní analýzu vzorků krve pacientů, správné označení již malých nádorů T1 a T2 pomocí našeho kombinovaného testu naznačuje, že právě miRNA může mít v časnější diagnostice význam. Tuto myšlenku podporuje i fakt, že miR-196 již byla signifikantně zvýšena u nádorových prekursorů – pankreatické intraepiteliální neoplazie (PanIN) 2-3 [33]. Chirurgickou resekcí PanIN došlo k normalizaci elevovaných miRNA [34]. Zvýšené exprese

miRNA byly pozorovány i u jiného nádorového prekursoru – intraduktální papilární mucinózní neoplázie (IPMN) [35].

Limitací práce je malý vzorek pacientů s časnými stádii karcinomu pankreatu a absence prekanceróz. Nemůžeme se tak vyjádřit k časnosti miRNA změn pozorovaných u pacientů již s pokročilým onemocněním.

Na druhou stranu zastoupení jednotlivých stadií u pacientů tak, jak přicházeli na kliniku, odráží současnou realitu tohoto onemocnění.

Z pohledu studie se jako cíloví kandidáti pro screening karcinomu pankreatu jeví pacienti s nově diagnostikovaným diabetem, kteří zaznamenali významný pokles hmotnosti. Ti představovali ve studii 65 % pacientů s potenciálně kurativním stadiem onemocnění (stadium I a II).

10 Řešení hypotéz

1. MicroRNA-21, -30, -192, -196 a -200 jsou odlišně exprimovány u pacientů s karcinomem pankreatu v porovnání s osobami bez karcinomu. Zejména miR-192, miR-196 a miR-200 mohou přispět ke zlepšení neinvazivní diagnostiky.
2. Studované miRNA kromě miR-423 byly odlišně exprimovány u karcinomu proti chronické pankreatitidě a proti osobám bez nádoru a bez zánětu. MicroRNA-423 byla odlišně exprimována u osob s chronickou pankreatitidou proti ostatním skupinám.
3. Nebyl pozorován rozdíl v expresích miRNA v rámci skupiny osob s karcinomem pankreatu mezi jednotlivými typy diabetu (dlouhodobý diabetes mellitus 2. typu vs. sekundární diabetes T3c při karcinomu), ani proti osobám bez diabetu.
4. Zejména u miR-21, -196 a -200 byl pozorovaný trend zvyšující se exprese s větší velikostí primárního nádoru a s vyšším stupněm stadia karcinomu. Osoby s větší hmotnostní ztrátou dosahovaly vyšších expresí všech miRNA. Signifikantní rozdíl proti osobám beze změny hmotnosti byl pozorován u miR-200. Nebyl pozorován rozdíl v expresích miRNA u osob s karcinomem, u kterých byla anamnéza chronické pankreatitidy, proti těm, kteří pankreatitidu neměli.

11 Závěr

Předmětem dizertační práce byla snaha o zlepšení diagnostiky karcinomu pankreatu pomocí vytipovaných microRNA.

Prokázali jsme vysokou prevalenci poruch glukózového metabolismu u osob s karcinomem, stejně tak vysokou frekvenci nechtěného hubnutí. Vysoké zastoupení potenciálně chirurgicky řešitelných nálezů u osob s recentně zachyceným diabetes mellitus a signifikantním váhovým úbytkem ukazuje, že tyto symptomy by měly vést neprodleně k cílenému zahájení diagnostiky.

MicroRNA, zejména pak miR-196, miR-200 a miR-423, by mohly přispět k neinvazivní screeningové diagnostice u těchto rizikových pacientů. U dlouhodobě sledovaných pacientů s chronickou pankreatitidou by pak miR-423 mohla pomoci odlišit nádorovou transformaci od chronického zánětu.

Další studie s prekurzory a časnými stadii nádoru budou potřeba k posouzení dynamiky změn expresí miRNA.

12 Literatura

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al.: Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, 2018
2. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R: Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, Masarykova univerzita, 2019
3. Škrha J. Epidemiologie diabetu. *Postgraduální medicína* 2014; 4: 6-10.
4. Matoulek M, Svačina Š, Lajka J. Výskyt obezity a jejích komplikací v České republice. *Vnitř Lék* 2010; 56: 1019-1027.
5. Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, et al. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer* 2011; 47: 1928-1937.
6. Li D, Tang H, Hassan MM, Holly EA, Bracci PM, Silverman DT. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis of three large case-control studies. *Cancer Causes Control* 2011; 22: 189-97.
7. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, de Andrade M, et al. Pancreatic Cancer–Associated Diabetes Mellitus: Prevalence and Temporal Association With Diagnosis of Cancer. *Gastroenterology* 2008; 134: 95-101.
8. Mizuno S, Nakai Y, Isayama H, Takahara N, Miyabayashi K, Yamamoto K, et al. Diabetes is a useful diagnostic clue to improve the prognosis of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2013; 13: 285-289.
9. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST. Prevalence and Clinical Profile of Pancreatic Cancer–Associated Diabetes Mellitus. *Gastroenterology* 2008; 134: 981-987.
10. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnqvist HJ, Larsson J. Pancreatic cancer is associated with impaired glucose metabolism. *Eur J Surg* 1993; 159: 101-7.
11. Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *The Lancet Oncology* 2009; 10: 88-95.
12. Noy A, Bilezikian JP. Diabetes and pancreatic cancer: Clues to the early diagnosis of pancreatic malignancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79: 1223-1231.
13. Chu D, Kohlmann W, Adler DG. Identification and screening of individuals at increased risk for pancreatic cancer with emphasis on known environmental and genetic factors and hereditary syndromes. *Jop* 2010; 11: 203-12.
14. Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, et al. The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Curr Mol Med* 2013; 13: 340-51.
15. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 350-5.
16. Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharmaceutical Research* 2017; 34: 1339-1363.
17. Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gebhardt F, Keil O, et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2014; 32: 4141-8.
18. Ewald N, Kaufmann C, Raspe A, Kloer HU, Bretzel RG, Hardt PD. Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c). *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28: 338-42.
19. American Diabetes A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33: S62-S69.
20. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 81-4.
21. Chari ST, Klee GG, Miller LJ, Raimondo M, DiMagno EP. Islet amyloid polypeptide is not a satisfactory marker for detecting pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 640-5.
22. Škrha J, Frič P, Bušek P, Škrha P, Šedo A: Sporadic pancreatic cancer – glucose homeostasis and pancreatogenic Type 3 diabetes, Rijeka, InTechOpen, 2018.
23. Hart PA, Kamada P, Rabe KG, Srinivasan S, Basu A, Aggarwal G, et al. Weight loss precedes cancer-specific symptoms in pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Pancreas* 2011; 40: 768-72.
24. Krech RL, Walsh D. Symptoms of pancreatic cancer. *J Pain Symptom Manage* 1991; 6: 360-7.

25. Lopez NE, Prendergast C, Lowy AM. Borderline resectable pancreatic cancer: Definitions and management. *World Journal of Gastroenterology* : WJG 2014; 20: 10740-10751.
26. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Buchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2004; 91: 586-94.
27. Bedi MM, Gandhi MD, Jacob G, Lekha V, Venugopal A, Ramesh H. CA 19-9 to differentiate benign and malignant masses in chronic pancreatitis: is there any benefit? *Indian J Gastroenterol* 2009; 28: 24-7.
28. Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, et al. The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates. *Current molecular medicine* 2013; 13: 340-351.
29. Cao Z, Liu C, Xu J, You L, Wang C, Lou W, et al. Plasma microRNA panels to diagnose pancreatic cancer: Results from a multicenter study. *Oncotarget* 2016; 7: 41575-41583.
30. Le Large TY, Meijer LL, Prado MM, Kazemier G, Frampton AE, Giovannetti E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15: 1525-9.
31. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, et al. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2012; 131: 683-91.
32. Franklin O, Jonsson P, Billing O, Lundberg E, Ohlund D, Nystrom H, et al. Plasma Micro-RNA Alterations Appear Late in Pancreatic Cancer. *Ann Surg* 2018; 267: 775-781.
33. Xue Y, Abou Tayoun AN, Abo KM, Pipas JM, Gordon SR, Gardner TB, et al. MicroRNAs as diagnostic markers for pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor, pancreatic intraepithelial neoplasm. *Cancer Genet* 2013; 206: 217-21.
34. Slater EP, Strauch K, Rospleszcz S, Ramaswamy A, Esposito I, Kloppel G, et al. MicroRNA-196a and -196b as Potential Biomarkers for the Early Detection of Familial Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 2014; 7: 464-71.
35. Hernandez YG, Lucas AL. MicroRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor lesions. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8: 18-29.

13 Seznam publikací

13.1 Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce:

- Škrha P, Hořínek A, Pazourková E, Hajer J, Frič P, Škrha J, Anděl M: Serum microRNA-196 and microRNA-200 in pancreatic ductal adenocarcinoma of patients with diabetes mellitus. *Pancreatology* 2016; doi: 10.1016/j.pan.2016.05.005. IF: 2,763
- Frič P, Škrha J, Šedo A, Zima T, Bušek P, Kmočová K, Laclav M, Bunganič B, Solař S, Hrabal P, Bělina F, Záruba P, Škrha P, Zavoral M: Early detection of pancreatic cancer: impact of high-resolution imaging methods and biomarkers. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Dec;28(12):e33-e43. IF: 2,014
- Frič P, Šedo A, Škrha J, Bušek P, Laclav M, Škrha P, Zavoral M: Early detection of sporadic pancreatic cancer: time for change. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017 Aug;29(8):885-891. doi: 10.1097/MEG.0000000000000904. IF: 2,014
- Škrha P, Hořínek A, Hajer J, Frič P, Anděl M, Škrha J: Serum microRNA-196, -200, and -423 improve diagnostics and can differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *v recenzním řízení (European Journal of Medical Research)* IF: 1,736

13.2 Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce:

- Škrha P: Diabetes mellitus a karcinom pankreatu – příčina nebo následek? *Vnitr Lek* 2014; 60(9): 787-790
- Škrha P, Anděl M: Obezita a diabetes mellitus - pandemická onemocnění jako rizikový faktor rozvoje karcinomu pankreatu. *DMEV* 2015; 18(1): 11-14
- Škrha P, Hořínek A, Anděl M, Škrha J: miRNA-192, miRNA-21 a miRNA-200: nové markery karcinomu pankreatu u diabetiků? *Vnitr Lek* 2015; 61(4): 351-354
- Škrha P, Hajer J, Anděl M, Hořínek A, Korabečná M: miRNA jako nový ukazatel u diabetes mellitus a u rozvoje karcinomu pankreatu. *ČLČ* 2015; 154(3): 122-126

13.3 Publikace s IF, které nejsou podkladem disertační práce

- Šromová L, Bušek P, Posová H, Potočková J, Škrha P, Anděl M et al. The effect of dipeptidyl peptidase-iv inhibition on circulating t cell subpopulations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice.* doi:10.1016/j.diabres.2016.06.020 IF: 2,548
- Hirschfeldova K, Lipovska D, Škrha P, Ceska R: The apo (a) gene (TTTTA)_n promoter polymorphism and its association with variability in exons of the kringle IV types 8 to 10. *Clinica Chimica Acta* 405, 2009, 39-42 IF: 2,926

13.4 Publikace bez IF, které nejsou podkladem disertační práce

- Andel M, Škrha P, Trnka J.: Metformin: na pomezí diabetologie a onkologie. Vnitr Lek 2013; 59(8): 738-42
- Škrha P, Anděl M, Šedo A: DPP-4 inhibitory a autoimunita. DMEV 2014; 17(2): 61-64
- Hoffmanová I, Škrha P, Šedo A, Anděl M. Dynamic change of focal fatty sparing in non-alcoholic fatty liver disease after treatment with sitagliptin. Ultrasound International Open. DOI: 10.1055/s-0036-1582302

13.5 Monografie, kapitoly v monografiích

- Škrha J, Frič P, Bušek P, Škrha P, Šedo A: Sporadic Pancreatic Cancer: Glucose Homeostasis and Pancreatogenic Type 3 Diabetes, Advances in Pancreatic Cancer, Luis Rodrigo, IntechOpen, (April 2nd 2018). DOI: 10.5772/intechopen.75740.