

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Pavel Škrha

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?

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

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

V Praze, 6. 3. 2020

Pavel Škrha

Identifikační záznam:

ŠKRHA, Pavel. 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?]. Praha, 2020. 86 s., 8 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, II. interní klinika 3. LF UK 2019. Školitel prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

1 Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Obsah | 4 |
| 2 | Abstrakt | 7 |
| 3 | Abstract | 9 |
| 4 | Poděkování..... | 11 |
| 5 | Seznam zkratk | 13 |
| 6 | Úvod | 15 |
| 6.1 | Epidemiologie karcinomu pankreatu..... | 15 |
| 6.2 | Rizikové faktory rozvoje karcinomu pankreatu | 16 |
| 6.2.1 | Diabetes mellitus a karcinom pankreatu..... | 16 |
| 6.2.1.1 | Diabetes mellitus jako rizikový faktor karcinomu pankreatu nebo jako symptom? | 16 |
| 6.2.2 | Obezita a karcinom pankreatu | 19 |
| 6.2.3 | Inzulínová rezistence – spojovací článek mezi obezitou a diabetes mellitus..... | 21 |
| 6.3 | Současné možnosti detekce karcinomu | 22 |
| 6.4 | Markery karcinomu pankreatu | 23 |
| 6.4.1 | MicroRNA | 24 |
| 6.4.1.1 | Biosyntéza a funkce miRNA..... | 24 |
| 6.4.1.2 | Exprese miRNA u diabetes mellitus..... | 26 |
| 6.4.1.3 | Exprese miRNA u chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu..... | 28 |
| 6.4.1.4 | miRNA a terapie..... | 30 |
| 7 | Hypotézy a cíle řešení dizertační práce..... | 32 |
| 7.1 | Hypotézy | 32 |
| 7.2 | Cíle řešení | 33 |
| 8 | Pacienti a metody..... | 35 |
| 8.1 | Pacienti | 35 |

| | | |
|-------|---|----|
| 8.2 | Diagnostika onemocnění | 39 |
| 8.3 | Metody | 39 |
| 8.3.1 | Odběr krve a biochemické ukazatele | 39 |
| 8.3.2 | Výběr miRNA | 39 |
| 8.3.3 | Izolace miRNA ze séra..... | 40 |
| 8.3.4 | Reverzní transkripce | 40 |
| 8.3.5 | Real-time PCR | 41 |
| 8.3.6 | Zpracování výsledků RT-PCR..... | 41 |
| 8.3.7 | Statistické vyhodnocení..... | 42 |
| 9 | Výsledky | 43 |
| 9.1 | Základní rozdělení souboru | 43 |
| 9.2 | Rozdělení podle přítomnosti diabetu | 44 |
| 9.3 | Rozdělení podle typu diabetu u karcinomu pankreatu | 45 |
| 9.4 | Rozdělení podle hmotnostních změn pacientů s karcinomem | 46 |
| 9.5 | Porovnání výsledků u symptomatických pacientů s karcinomem (recentní diagnóza diabetes mellitus a váhový úbytek) proti osobám bez karcinomu | 47 |
| 9.6 | Rozdělení podle velikosti karcinomu | 48 |
| 9.7 | Rozdělení podle stadia karcinomu..... | 49 |
| 9.7.1 | Porovnání expresí miR-196 a miR-200 podle pokročilosti onemocnění | 49 |
| 9.8 | Rozdělení podle přítomnosti chronické pankreatitidy v osobní anamnéze pacientů s karcinomem | 51 |
| 9.9 | Korelace | 52 |
| 9.9.1 | Korelace miR-200 a CA 19-9 | 53 |
| 9.10 | Vyhodnocení testů CA 19-9 a miRNA | 53 |
| 10 | Diskuze | 56 |
| 10.1 | Epidemiologická data..... | 56 |

| | | |
|--------|---|----|
| 10.1.1 | Stadia karcinomu | 56 |
| 10.1.2 | Prevalence diabetes mellitus u karcinomu pankreatu | 57 |
| 10.1.3 | Změny hmotnosti | 58 |
| 10.2 | miRNA a CA 19-9..... | 59 |
| 10.2.1 | miR-196 | 60 |
| 10.2.2 | miR-200 | 60 |
| 10.2.3 | miR-423 | 61 |
| 11 | Řešení hypotéz | 63 |
| 12 | Závěr..... | 64 |
| 13 | Literatura..... | 65 |
| 14 | Přílohy | 85 |
| 14.1 | Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce:..... | 85 |
| 14.1.1 | Příloha 1:..... | 85 |
| 14.1.2 | Příloha 2:..... | 85 |
| 14.1.3 | Příloha 3:..... | 85 |
| 14.1.4 | Příloha 4: in extenso | 85 |
| 14.2 | Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce:..... | 85 |
| 14.2.1 | Příloha 5:..... | 85 |
| 14.2.2 | Příloha 6:..... | 85 |
| 14.2.3 | Příloha 7:..... | 86 |
| 14.2.4 | Příloha 8:..... | 86 |

2 Abstrakt

Karcinom pankreatu se řadí mezi nádory s nejhůrší prognózou. Ta je dána vysokou letalitou z důvodu absence časných symptomů a vhodných markerů. Tato kombinace vede k pozdní diagnostice, kdy už nelze kurativně léčit. Cílem práce tak je 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, porovnat jejich expresi s pacienty s chronickou pankreatitidou, jakožto hlavního rizikového faktoru rozvoje nádoru, a s kontrolními osobami. Dalším cílem je pak dále všechny výsledky rozdělit podle konkrétních kritérií (přítomnosti diabetu a jeho typu, hmotnostního úbytku, stadia karcinomu, velikosti karcinomu, přítomnosti chronické pankreatitidy u osob s karcinomem) plus provést korelační testy s CA 19-9 (současně používaným biomarkerem v laboratorní diagnostice) a vyhodnotit přínos miRNA jako markeru karcinomu.

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 ($> 5\%$ hmotnosti za 3 měsíce nebo $>10\%$ hmotnosti za 6 měsíců) byl pozorován u 52 osob s karcinomem.

Pro hodnocení diabetu, respektive prediabetu jsme použili standardní kritéria podle American Diabetes Association. 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). Diagnóza adenokarcinomu byla potvrzena biopsicky nebo po chirurgické resekci.

Expresí 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. Získané hodnoty byly následně relativně vztaženy k průměrným hodnotám miR-191 a miR-454, vybraným softwarem jako referenční miRNA. Výsledky jednotlivých skupin jsou pak předkládány jako násobky proti referenční skupině.

Velikost karcinomu byla větší nebo rovna 4 cm (T3 – T4 dle TNM klasifikace) u 94 % pacientů, pokročilý neoperabilní nález (stadium III a IV) byl diagnostikován u 46 % osob. Diabetes mellitus nebo prediabetes mělo 78 % pacientů s karcinomem, u 73 % z nich se jednalo o recentně stanovenou diagnózu. K významnému hubnutí došlo u 68 % osob.

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. Pacienti, kteří zhubli, měli významně zvýšenou expresi miR-200 proti kontrolním osobám ($p < 0,0001$) i proti pacientům bez poklesu hmotnosti ($p = 0,009$). Vyšších expresí s rostoucí velikostí nádoru a pokročilostí onemocnění dosahovaly miR-21, miR-192, miR-196 a miR-200. S CA 19-9 korelovaly exprese miR-21, miR-192 a miR-200. 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 Abstract

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, to compare their expressions among the cancer, patients with chronic pancreatitis (as the main risk factor for developing the cancer) and a control group. Another goal is to subdivide the results according to specific criteria (diabetes mellitus/prediabetes, its type, weight loss, cancer stage and size of the primary tumor, presence of chronic pancreatitis in cancer patients) and to include correlation tests with CA 19-9 (current biomarker in laboratory diagnostics) and to evaluate the contribution of miRNA as a marker of the cancer.

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 (> 5 % of body weight in 3 months or > 10 % of body weight in 6 months) was observed in 52 patients with the cancer.

Standard criteria according to American Diabetes Association (ADA) were used for diabetes/prediabetes diagnosis, patients with chronic pancreatitis were followed-up by gastroenterologists for years, the diagnosis was made according to their clinical status and imaging methods (CT, endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic ultrasound). The cancer was proven by a biopsy or after surgical resection.

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. Acquired values were adjusted to

the mean values of miR-191 and miR-454 that were chosen as a miRNA reference. To compare the expressions among the groups, one group was selected as a reference, and the other were adjusted to it. The results are thus expressed as fold changed values.

The cancer size was bigger than 4 cm (T3 – T4 according to TNM classification) in 94 % of patients, advanced stages III and IV (primarily inoperable findings) were detected in 46 % of patients. Seventy eight percent of the cancer patients had diabetes/prediabetes and in 73 % out of them this glucose metabolism disorder was of a new onset. Significant weight loss was observed in 68 % of patients with the cancer.

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. Elevated expressions of miR-200 were observed in patients with significant weight loss, compared to those without weight loss and to the control subjects. Greater expressions in miR-21, miR-192, miR-196 and miR-200 were shown together with the more advanced stages of the cancer and the bigger size of the primary tumor. A correlation was found between CA 19-9 and miR-21, miR-192 and miR-200. 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 Poděkování

Úvodem bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Michalu Andělovi, CSc. z II. interní kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady za vedení a přínosné rady nejen během postgraduálního studia, ale i při získávání odborné praxe v rámci zdravotnické specializace. Ve všech oblastech vždy podporoval kritické myšlení s formulováním mnohdy obtížně zodpověditelných otázek, které vedly k hlubšímu zamyšlení nad danou problematikou a k rozšiřování znalostí.

Rád bych také poděkoval MUDr. Janu Hajerovi, PhD. ze stejného pracoviště za velmi cenné rady v oblasti gastroenterologie, spolupráci při odběru vzorků od pacientů s chronickou pankreatitidou a především také za velmi přátelské prostředí, které navodilo příjemnou a konstruktivní atmosféru.

Za vlastní laboratorní část patří velký dík ing. Aleši Hořínkovi z III. interní kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice, který byl tím, kdo mě nasměroval k miRNA problematice, umožnil mi proniknout do laboratorní činnosti, vždy ochotně se mnou řešil obtíže spojené jak se zaváděním metod, tak také velmi napomáhal řešení vzniklých komplikací. Práce v laboratoři nejen díky němu, ale i celému kolektivu v laboratoři tak nebyla prací – povinností, ale i příjemně strávenou chvílí, která pro mě představovala vedle poučení i určitou formu odborné relaxace.

Prof. MUDr. Přemyslu Fričovi, DrSc. z Interní kliniky 1. lékařské fakulty a Ústřední vojenské nemocnice bych velmi rád poděkoval za poskytnutí vzorků sér k analýze miRNA u pacientů s karcinomem pankreatu a za činnost, kterou vyvíjí ve snaze o zlepšení prognózy pacientů s touto chorobou.

Děkuji Janě Potočkové a Blance Hornikové za pomoc při organizování odběrů vzorků od pacientů na mém pracovišti.

Za vzorky pacientů s diabetes mellitus 2. typu, za koordinaci při odběru vzorků z Ústřední vojenské nemocnice, za cenné rady a poznámky při analýze výsledků a při sepisování publikací děkuji svému otci, prof. MUDr. Janu Škrhovi, DrSc., který mě rovněž nasměroval na problematiku nejasného vztahu diabetu a karcinomu pankreatu.

Závěrem bych rád poděkoval ještě oběma rodičům a své ženě za celkovou podporu a trpělivost.

Studie byla finančně podporována z výzkumného projektu Univerzity Karlovy (PRVOUK P25/LF1/2, PROGRES Q25) a z grantu ministerstva zdravotnictví NT 14254-3/2013.

5 Seznam zkratek

| | |
|-------------|---|
| AUC | plocha pod křivkou (area under the curve) |
| BMI | index tělesné hmotnosti (body mass index) |
| CD | diferenční skupina (cluster of differentiation) |
| CEA | karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen) |
| Cq | hodnota kvantifikace cyklu (cycle quantification number) |
| CRP | C reaktivní protein (C reactive protein) |
| CT | počítačová tomografie (computer tomography) |
| DM | diabetes mellitus |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid) |
| EGFR | receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor) |
| CHP | chronická pankreatitida |
| IL | interleukin |
| IRS-1 | substrát inzulínového receptoru 1 (insulin receptor substrate 1) |
| miRNA (miR) | microRNA |
| MRI | magnetická rezonance (magnetic resonance imaging) |
| mRNA | messenger RNA |
| NADPH | nikotinamidadeninindinukleotidfosfát |
| NDM | bez diabetu (no diabetes) |
| NF-κB | nukleární faktor-κB (nuclear factor-κB) |
| 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 | operační charakteristika přijímače (receiver operating characteristic), graf, který popisuje 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 (type 2 diabetes mellitus) |
| T3cDM | sekundární diabetes mellitus u karcinomu pankreatu (type 3c diabetes mellitus – in pancreatic cancer) |
| Th1,2 | pomocné T lymfocyty 1,2 (T helper lymphocytes) |
| TNF | faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor) |
| TNM | onkologická klasifikace nádorového onemocnění (T – velikost tumoru, N – lymfatická uzlina, M – vzdálená metastáza) |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor) |

6 Úvod

6.1 Epidemiologie karcinomu pankreatu

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. Okolní evropské státy mají podobné výsledky a Maďarsko, kde je druhý nejvyšší výskyt onemocnění na světě, má incidenci 24,0. Výraznější odstup pak představuje Japonsko, kde je incidence karcinomu 33,9/100 000 obyvatel. Ve Spojených státech amerických je výskyt 15,6/100 000 obyvatel [1]. Zatímco v České republice má přibýt 20 % případů za 10 let, respektive 30 % za 20 let, v USA existují odhady na 30, respektive 50 % [2].

V České republice za posledních 10 let přibylo 15 % nově diagnostikovaných případů. V současné době se incidence pohybuje okolo 21 případů na 100 000 osob, v roce 2016 bylo registrováno 2243 nových případů. Svého maxima ve výskytu dosahuje karcinom okolo 65-75 let, nicméně výraznější vzestup je patrný již okolo 50 let, onemocnění se prakticky nevyskytuje před 20. rokem, postihuje podobně muže i ženy. Křivka mortality kopíruje křivku incidence, v roce 2016 byla mortalita necelých 19 %.

Malý rozdíl mezi incidencí a mortalitou je dán zejména pozdní diagnostikou onemocnění, jednak také omezenými terapeutickými možnostmi. To koresponduje s faktem, že pouze pětina nemocných (450 případů) byla v době diagnózy karcinomu ve stadiu I nebo II, tedy v potenciálně léčitelném stadiu. Přesto je mortalita v těchto stádiích 67 %. Oproti tomu mortalita ve stadiu III a IV je 95 % [3]. Toto číslo ale nevyovídá o letalitě onemocnění. Ta je obvykle vyjadřována pětiletým přežitím pacientů, které je celkově okolo 2-5 % pro všechna stadia.

6.2 Rizikové faktory rozvoje karcinomu pankreatu

Rizikové faktory se tradičně rozdělují na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ty neovlivnitelné patří např. rodinná anamnéza, hereditární forma chronické pankreatitidy a věk, mezi ovlivnitelné rizikové faktory se řadí zejména kouření, abúzus alkoholu, 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 nedagnostikovaných. V námi sledované populaci (u starších pacientů) se DM vyskytuje až u 25 – 30 % [4]. 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 [5], pacientů s DM a obezitou neustále přibývá [4,5].

6.2.1 Diabetes mellitus a karcinom pankreatu

Metaanalýza 35 studií s více než 9000 pacienty s karcinomem pankreatu ukázala téměř dvojnásobné riziko kancerogeneze u diabetiků [6]. Podobného výsledku dosáhla i jiná studie, kde nejvyšší (trojnásobné) riziko bylo v podskupině pacientů s nově diagnostikovaným DM (do 2 let trvání). S rostoucí dobou od stanovení pak postupně riziko klesalo až na 1,4x ve skupině pacientů s letitou anamnézou DM (> 15 let) [7]. Ben et al. prokázali u nově diagnostikovaného DM riziko čtyřnásobné, navíc bylo poukázáno na kumulaci rizikových faktorů, kde u diabetiků – kuřáků bylo riziko více než šestnásobné [8]. Prevalence diabetes mellitus, příp. porušené glukózy tolerance se u karcinomu pankreatu pohybuje v různých studiích od 40 do 80 % [9,10,11,12].

6.2.1.1 *Diabetes mellitus jako rizikový faktor karcinomu pankreatu nebo jako symptom?*

Z epidemiologických dat vyplývá, že diabetes mellitus sám o sobě představuje určité riziko. Glykémie odebraná 1 hodinu po perorálním podání 50 g glukózy zvyšovala riziko neoplázie přímo

úměrně, kdy nejvyšší riziko bylo více než dvojnásobné ve skupině pacientů s glykemií nad 11,1 mmol/l [13]. Dosud bylo publikováno několik mechanismů, které by mohly vést k nádorové transformaci. Jedním z nich je hyperinzulinémie podporující růst a proliferaci buněk. Duktální buňky exokrinní části pankreatu jsou vystaveny zvýšené koncentraci inzulínu, která vede cestou receptoru pro inzulín podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1 receptoru – IGF-1R) a substrátu inzulínového receptoru 1 (IRS-1) k aktivaci signální dráhy PI3K/Akt/mTOR [14]. Tato dráha pak spouští kroky vedoucí k proliferaci a inhibici apoptózy [15]. Navíc aktivace Akt dále zvýší expresi IGF-1R, čímž účinek potencuje a tím zvyšuje invazivitu nádorových buněk [16]. Aktivace Akt by také mohla být usnadněna porušenou expresí fosfatázového a tenzinového homologu (PTEN), tumor supresoru a inhibitoru PI3K, která byla in vitro snížena u 60 % nádorových buněk karcinomu pankreatu [17]. Samotná velikost nádoru negativně ovlivňuje přežití pacienta a představuje prediktivní faktor. U pacientů s diabetes mellitus bývá velikost nádoru větší a přežití po pankreatektomii horší než u nediabetiků [18]. Ve studii na zvířatech, kde byly experimentálně implantovány nádorové buňky křečkům, došlo k signifikantně většímu růstu nádoru u diabetických zvířat [19]. Podobně u obézních pacientů a u diabetiků bylo pozorováno zvýšení replikace exokrinních buněk pankreatu, což by mohlo souviset se zvýšením rizika chronického zánětu a nádorové transformace [20].

Nejvyšší riziko neoplázie však představuje recentní výskyt diabetu. Pokud by byl diabetes zodpovědný za nádorovou transformaci, dalo by se předpokládat, že se naopak bude riziko neoplázie s dobou diabetu zvyšovat. Epidemiologická data však ukazují pravý opak [7]. To vede k myšlence, že sám karcinom pankreatu je diabetogenní, a samotný diabetes je pak pouhým symptomem nemoci. Rovněž diagnostika diabetu často předchází o rok až dva jiné klinické symptomy karcinomu. Proto je mechanická představa destrukce beta-buněk nádorem méně pravděpodobná. U karcinomu pankreatu byla pozorována jednak porušená sekrece inzulínu [21], jednak zvýšení periferní inzulínové rezistence [22]. Ta by mohla být způsobena vyplavováním diabetogenního faktoru nádorem, neboť

po resekci pankreatu byla periferní citlivost k inzulinu zlepšena [23]. Také v jiné studii došlo u všech pacientů po pankreatektomii pro karcinom ke zlepšení glukózového metabolismu při měření orálním glukózovým tolerančním testem, a to přes celkovou redukci ostrůvků při 85% subtotální resekci. Nádor tak pravděpodobně produkuje diabetogenní faktor, který vede k vystupňování inzulinové rezistence [24]. Dříve byl popsán peptid homologní s S-100 kalcium vážícím proteinem, který narušuje metabolismus glukózy v myoblastech [25]. Dalším faktorem, který by mohl přispět k rozvoji DM, je interleukin 6, uvolňovaný při systémové zánětlivé odpovědi, jehož koncentrace byla v portálním řečišti signifikantně zvýšena u karcinomů, navíc významný rozdíl byl i při porovnání koncentrací v portálním a systémovém řečišti [26].

Novější nálezy však popisují adrenomedulin – produkt tumorózních buněk, který se prostřednictvím exosomů dostává do Langerhansových ostrůvků (beta-buněk) endocytózou a postupně navodí regresivní změny vedoucí k jejich apoptóze [27]. Vedle nádorových buněk adenokarcinomu je též diskutována role stromatu, které je tvořeno fibroblasty. Ty po aktivaci produkují fibroblastový aktivační protein α , povrchovou proteázu, která je strukturně podobná dipeptidyl peptidáze IV, jejíž zvýšená aktivita je pozorována u diabetu. Tato povrchová proteáza taktéž může vysvětlovat rozvoj diabetu u karcinomu pankreatu [28].

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 [9]. Tento diabetes je v současné době klasifikován jako T3cDM. Jako takový by diabetes, zvláště pak u neobézních jedinců bez pozitivní rodinné anamnézy DM a s rychlou progresí, mohl být použit jako časný marker neoplázie [29] a tito jedinci by mohli být cíleně vyšetřováni [30].

6.2.2 Obezita a karcinom pankreatu

Body mass index (BMI) v rozmezí 22,5-25 kg/m² vykazuje nejnižší celkovou mortalitu, jak bylo prokázáno analýzou 57 prospektivních studií s téměř 900 000 pacienty. Každé zvýšení o 5 kg/m² vedlo ke zvýšení celkové mortality téměř o 30 %, mortality z kardiovaskulárních příčin o 40 %, mortality z důvodu DM, renálních či jaterních příčin pak až o 60-120 % a v neposlední řadě i nádorové mortality o 10 % [31]. Riziko karcinomu pankreatu je zvýšeno o 2-12 % při vzestupu BMI o 5 kg/m² nad normu. Nikotinismus umocňuje toto riziko o dalších 2-6 % [32]. Pacienti s nadváhou (BMI 25-30 kg/m²) a obezitou (BMI 30-35 kg/m²) mají o 13, respektive 19 % vyšší riziko karcinomu pankreatu dle analýzy 7 prospektivních studií s celkovým počtem přes 940 000 vyšetřovaných osob. Obezita je tak nezávislým rizikovým faktorem karcinomu pankreatu [33].

Metabolický syndrom představuje souhrnné označení několika sdružených nemocí, jejichž společný výskyt potencuje rozvoj komplikací. Vznik a progresse metabolického syndromu jsou dány mimo jiné deregulací metabolicky aktivních látek (adipokinů), které produkují buňky tukové tkáně (adipocyty) [34,35,36,37]. Při obezitě dochází vlivem nadbytku tukové tkáně ke zvýšení oxidačního stresu, který způsobí následnou deregulaci adipokinů. Oxidační stres je zvýšen produkcí volných kyslíkových radikálů, respektive reaktivních forem kyslíku (ROS) vlivem aktivace nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) oxidázy, která je podmíněna zvýšenou koncentrací mastných kyselin [38]. Oxidační stres pak způsobuje DNA mutace [39], cévní změny [40], chronický zánět [41] a inzulínovou rezistenci. Vedle cytokinů a mediátorů zánětlivých signalizačních drah (například NF-κB) tak mohou i volné kyslíkové radikály vést ke snížení aktivity tumor supresorů a naopak posílení vlivu onkogenů [41]. Všechny uvedené mechanismy pak mohou potencovat rozvoj karcinomu [42].

Zvětšování masy tukové tkáně při obezitě vede k následné lokální hypoxii, která vyvolá produkci zánětlivých cytokinů, proteinů akutní fáze a transkripčního faktoru HIF-1 α (hypoxií indukovaného faktoru-1 α) [43], což zvýší expresi vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), jehož hlavní funkcí je novotvorba cév při hypoxii. VEGF bývá zvýšeno například při asthma bronchiale nebo při diabetes mellitus. Jeho role je stěžejní při rozvoji diabetické retinopatie [44]. Progrese nádorového onemocnění, a zejména pak růst samotného nádoru jsou závislé na dostatečném příjmu živin a kyslíku, který je zajištěn produkcí VEGF s následnou neovaskularizací [45]. Hypoxie se tak může podílet cestou HIF-1 α a VEGF na rozvoji a progresi karcinomu pankreatu [46]. Jak zvýšení VEGF, tak snížení endostatínu (inhibitoru angiogeneze) bylo pozorováno u jedinců s obezitou [47].

Dalšími regulačními působky účastníci se angiogeneze jsou již zmíněné hormony tukové tkáně (adipokiny), které dále zasahují do drah imunitní odpovědi, metabolismu glukózy a lipidů a ovlivňují inzulinovou senzitivitu/rezistenci. Adiponektin, protein regulující metabolismus glukózy a lipidů, je protektivním hormonem, jehož snížená hladina v krvi vede k inzulinové rezistenci, diabetu a metabolickému syndromu [48,49]. Jeho zvýšená hladina pak naopak potlačuje tento efekt a navíc snižuje riziko vzniku karcinomu pankreatu [50]. Jednou z možností vysvětlujících mechanismus tohoto účinku je protizánětlivé působení adiponektinu se supresí zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-6) a inaktivací NF- κ B [51]. Zvýšená koncentrace adiponektinu vede k aktivaci proapoptotických kaspáz s potlačením angiogeneze [52]. Protein leptin reguluje energetický příjem navázáním na receptory v hypothalamu s následným potlačením pocitu hladu. Leptinová rezistence, kterou pozorujeme u obézních jedinců, vede k pocitu hladu a k přejídání s následným prohloubením obezity a reflexní hyperleptinémii. Ta pak může vést přes aktivaci VEGF k progresi karcinomu [53]. Usnadnění invazivity a migrace umožňuje i aktivace receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) [54].

Dysfunkce tukové tkáně způsobuje vznik mírného chronického zánětu, který může rovněž vést k rozvoji karcinomu pankreatu. Tato dysfunkce je způsobena dysbalancí buněk imunitního systému s posunem od protizánětlivých (T_{reg} CD4+ lymfocyty, Th2 CD4+ lymfocyty, eozinofily) k prozánětlivým buňkám (makrofágy, neutrofil, Th1 CD4+ T lymfocyty, CD8+ T lymfocyty, B lymfocyty, dendritické buňky a žírné buňky) [55]. Samotný chronický zánět je pak charakterizován produkcí prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α), ale také proteinů akutní fáze (CRP, PAI-1) prostřednictvím aktivace dráhy NF- κ B [56,57,58].

6.2.3 Inzulinová rezistence – spojovací článek mezi obezitou a diabetes mellitus

Obezitou indukovaný chronický zánět působí spolu s oxidačním stresem a hormonální dysbalancí (adiponektin, leptin) při vzniku inzulinové rezistence [43]. Před 100 lety se ukázalo, že podávání salicylátů ve vysokých dávkách vedlo ke snížení glykémie. Protizánětlivý účinek salicylátů zřejmě potlačil chronický zánět, což vedlo ke zlepšení citlivosti k inzulinu [59].

Inzulinová rezistence vede k hyperinzulinémii, která může kompenzovat relativní nedostatek inzulinu, častěji však postupně dochází vlivem selhání β -buňky k poruše metabolismu glukózy a rozvoji diabetes mellitus. Naopak hyperinzulinémie vede ke zvýšení inzulinové rezistence. Hyperinzulinémie a inzulinová rezistence tak mají vzájemný vztah. Riziko hyperinzulinémie pro rozvoj karcinomu pankreatu spočívá jednak ve funkci inzulinu jakožto růstového hormonu, jednak v inhibici proteinu-1 vázajícího inzulinu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor binding protein-1), jehož nedostatek tak způsobí zvýšenou dostupnost volného IGF-1, taktéž významného mitogenu, který spolu s inzulinem vede k buněčné proliferaci [60].

6.3 Současné možnosti detekce karcinomu

Pozdní diagnostika onemocnění, která souvisí se špatnou prognózou pacienta, spočívá jednak v absenci časných markerů, ale zejména v samotné povaze onemocnění, pro které je charakteristická dlouhodobá absence symptomů. Bolesti, ikterus, nechutenství atd. jsou příznaky, které již predikují značnou pokročilost nemoci. Zůstává tak otázkou, koho aktivně vyšetřovat – kdo je cílovou skupinou pro skrínig. Častější prevalence poruchy metabolismu glukózy (diabetes mellitus a prediabetes) u pacientů s karcinomem, a zejména její recentní záchyt spolu s váhovým poklesem jsou významnými ukazateli, které by měly být podrobeny dalšímu vyšetřování.

K dostatečně citlivému odlišení prostého diabetu 2. typu od diabetu asociovaného s karcinomem (1-5 % DM) je zapotřebí vhodného markeru [29]. V současné době je v diagnostice karcinomu pankreatu zlatým standardem kombinace biochemických markerů a zobrazovacích metod. Ze zobrazovacích metod se jedná zejména o břišní ultrasonografii, endosonografii, CT, MRI a endoskopickou retrográdní cholangiopankreatografii. Bohužel tato vyšetření nejsou vhodná k časnému záchytu onemocnění, kdy je nádor malý, ale resekalibilní, případně jde-li o premaligní stádium – pankreatickou intraepiteliální neoplázii (PanIN), intraduktální papilární mucinózní neoplázii (IPMN) nebo pankreatickou mucinózní cystickou neoplázii. Obtížné je rovněž mnohdy rozlišení karcinomu od chronické pankreatitidy a autoimunitní pankreatitidy [61]. Z biochemických markerů se rutinně užívá CA 19-9 a CEA, jejichž senzitivita je okolo 80 a 45 % a specificita 83 a 85 % [62]. 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 [63]. Podobně jako zobrazovací metody tak příliš nepřispějí k časnému záchytu, a tím ani ke zlepšení prognózy pacienta. Proto jsou hledány další nové markery, které by dokázaly zlepšit statistické ukazatele.

6.4 Markery karcinomu pankreatu

Existuje mnoho prací, kde výsledky nových markerů jsou shodné s CA 19-9. Například analýzou téměř 2200 proteinů bylo vybráno 16 kandidátů odlišně exprimovaných u karcinomu, které byly vybrány k dalšímu testování. Na dalších pacientech byl vybrán pouze laminin gamma 2 (LAMC2), u kterého byly výsledky testu na větším vzorku pacientů srovnatelné s CA 19-9 ($AUC_{CA\ 19-9}=0,84$, $AUC_{LAM\ C2}=0,78$), třebaže v některých případech s nízkým CA 19-9 správně diagnostikoval nádor [64]. Proto jsou navrhovány kombinace biochemických ukazatelů s cílem zvýšit senzitivitu a specifitu vyšetření. Změření cathepsinu D a matrix metalloproteinázy-7 spolu s CA 19-9 v séru vedlo ke zvýšení senzitivity testu na 88 % [65]. Kombinace CA 19-9, albuminu, CRP a IL-8 odlišila karcinom od zdravých jedinců se senzitivitou 99,4 % a specificitou 90 %, avšak při porovnání karcinomu s benigním postižením slinivky (zejména chronickou pankreatitidou) byly výsledky výrazně horší. Kombinací CA 19-9, oxidu uhličitého, CRP, IL-6 dosahovala senzitivita 74 %, respektive 75 % pro časná stadia karcinomu při specificitě 90 % [66].

Karcinom je z 80 % tvořen stromatem, které obsahuje fibroblasty, endoteliální buňky, buňky imunitního systému a také extracelulární matrix obsahující kolagen, fibronectin, proteoglykany a další. Během nádorového růstu dochází ke zvýšení aktivity fibroblastové matrix metalloproteinázy a přestavbě extracelulární matrix. Výsledkem jsou degradační produkty kolagenu typu I, III a IV, které je možné detekovat v plasmě. Jejich kombinace dokázala téměř kompletně odlišit pacienty s karcinomem pankreatu od kontrol. Nicméně je známo, že ke změnám těchto degradačních produktů dochází i u jiných karcinomů (nádory prsu, jater, kolorektální karcinom aj.), případně u fibrotických procesů. Objevují se však informace o tzv. neoepitopech na povrchu degradačních fragmentů, které by mohly být více specifické pro konkrétní tkáň [28,67].

Imunologický přístup vychází z předpokladu, že měsíce až roky před diagnózou se mohou začít objevovat autoprotilátky proti antigenům asociovaným s tumorem, které zvyšují riziko karcinomu až čtyřnásobně [68]. Koncentrace sérového high mobility group box-1 (HMGB1) korelovala s výskytem a pokročilostí nádoru a spolu s CA 19-9 a CEA zvýšila tato kombinace senzitivitu a specifitu o 10 % oproti samotnému CA 19-9 [69].

Další možností k detekci je vytipování vhodných microRNA (miRNA), které by u karcinomu byly odlišně exprimovány.

6.4.1 MicroRNA

MicroRNA jsou krátké jednovláknové molekuly RNA o velikosti 21-23 nukleotidů, účastní se regulací genové exprese na posttranskripční úrovni [70]. Touto regulací tak ovlivňují mnoho fyziologických i patofyziologických pochodů, při nichž zasahují do dráhy angiogeneze, apoptózy i kancerogeneze. Odlišné exprese různých miRNA byly popsány u kardiovaskulárních, endokrinologických, neurologických, onkologických a dalších onemocnění. Šíře působení v jednotlivých orgánových systémech naznačuje, že se jedná o velmi významný regulační mechanismus v celém organismu.

Termín miRNA byl použit poprvé v roce 2001 [71], přestože první objevenou miRNA byla již v roce 1993 lin-4, kdy byla popsána inhibice proteinu lin-14 u organismu *Caenorhabditis elegans* mechanismem RNA-RNA interakce [72]. V současné době je známo přes 2600 lidských miRNA [73].

6.4.1.1 *Biosyntéza a funkce miRNA*

MicroRNA vzniká nejčastěji za účasti RNA polymerázy II jako tzv. pri-miRNA během transkripce z DNA. Po samotném přepisu dojde k vytvoření sekundární struktury za vzniku smyčky a

dvojvlákna RNA. Z jednoho vlákna pri-miRNA může vzniknout 1 až 6 zralých miRNA. Lokalizace genů pro miRNA je v oblastech mimo geny kódující proteiny nebo v intronech uvnitř sekvencí kódujících proteiny [74,75,76]. Tato pri-miRNA, tvořená asi 80 nukleotidy, je následně štěpena tzv. mikroprocesorem, tedy enzymatickým komplexem obsahujícím protein DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8), rozpoznávajícím dvouvláknovou sekvenci pri-miRNA, a enzymem Drosha s RNázovou aktivitou, díky které dojde k vlastnímu odštěpení konců pri-miRNA za vzniku prekurzorové miRNA (pre-miRNA) [77,78,79]. Ta je následně aktivně transportována pomocí transportního proteinu exportinu 5 z jádra do cytoplasmy [80,81]. Zde dojde k dalšímu štěpení (díky ribonukleázové aktivitě enzymu Dicer), při kterém nakonec z pre-miRNA odštěpením oblasti smyčky vznikne dvojvlákno miRNA. Dicer je součástí tzv. RISC (RNA-induced silencing complex) a je navíc zodpovědný za rozvolnění dvojvlákna miRNA. Nepřítomnost Diceru znamená afunkční miRNA, a tedy i poruchu posttranskripční regulace, jak bylo prokázáno in vivo na myších [82]. Ve většině případů je použito pouze 1 vlákno miRNA (z pre-miRNA), druhé je degradováno. Vlastní jednovláknová sekvence miRNA je zavzata do RISC, který zprostředkuje navázání na cílovou mRNA, a dále umožní podle míry komplementarity miRNA-mRNA buď přímo degradaci cílové mRNA (v případě úplné komplementarity bazí), anebo inhibici její translace. Degradace mRNA je umožněna RNázovou aktivitou proteinu Ago2, který je rovněž součástí RISC [83]. Oběma způsoby je dosaženo regulační funkce – inhibice vzniku proteinu.

miRNA není vázána pouze na buňku – je detekovatelná v plazmě a dalších tělních tekutinách. Nicméně volná RNA podléhá v plasmě rychlé degradaci díky přítomnosti RNáz. Proto v plasmě necirkuluje volně, ale ve vezikulech, případně navázána na protein. Tím je zabráněno její degradaci [84,85]. Vezikuly mohou být reprezentovány exosomy, mikročásticemi aktivně se uvolňujícími z buňky, nebo apoptotickými tělísky [86,87,88]. Ukázalo se, že vysoce denzní lipoprotein (HDL) má vliv nejenom na snížení kardiovaskulárního rizika ovlivněním transportu cholesterolu, ale

navíc je schopen přenášet i miRNA, chránit ji tak před degradací a jejím prostřednictvím ovlivňovat cílovou tkáň [89]. Použití HDL jako vektoru v transportu specifických miRNA je jedna z možností, kterou by bylo možno v budoucnu využít i pro cílenou léčbu některých onemocnění [90,91]. Kromě HDL cirkulují v plasmě miRNA navázané i na další proteiny, jako je například nucleophosmin 1 (NPM1) a Ago2, výše zmíněný protein, jenž je součástí RISC.

6.4.1.2 *Exprese miRNA u diabetes mellitus*

Diabetes mellitus 1. typu (T1DM) je způsoben autoimunitním mechanismem, který vede k destrukci a zániku beta buněk. Ukázalo se, že regulační T lymfocyty u diabetiků 1. typu zvýšeně exprimují miR-510, naopak miR-191 a miR-342 byly exprimovány méně v porovnání se zdravými jedinci [92]. V jiné studii byly porovnávány exprese miRNA u dětí s nově diagnostikovaným T1DM proti zdravým dětem. U 12 miRNA (miR-152, miR-30a-5p, miR-181a, miR-24, miR-148a, miR-210, miR-27a, miR-29a, miR-26a, miR-27b, miR-25, miR-200a) byla pozorována zvýšená exprese. Jedná se o miRNA, které jsou zapojeny do apoptotických dějů a regulací beta buňky. V této studii byla navíc prokázána asociace mezi miR-25 a zbytkovou funkcí beta buňky, vedoucí k lepším hodnotám glykemií [93].

U diabetes mellitus 2. typu (T2DM) byla signifikantně zvýšená exprese sedmi miRNA (miR-9, miR-29a, miR-30d, miR-34a, miR-124a, miR-146a a miR-375) v porovnání s kontrolami, přičemž u 5 z nich byla navíc signifikantně zvýšená exprese v porovnání s prediabetiky (hraniční glykémie nalačno, porušená glukózová tolerance). Rozdíl mezi prediabetiky a kontrolami nebyl zjištěn [94]. Zvýšená exprese miR-375 potlačila glukózou stimulovanou sekreci inzulínu a naopak její inhibice vedla k vyplavování inzulínu. Tato miRNA posttranskripčně reguluje translaci proteinu myotrophinu, jehož dereprese sníženou hladinou miR-375 vedla ke zvýšení produkce inzulínu [95]. Myši neexprimující miR-375 mají zmnožené alfa buňky pankreatu a zvýšenou hladinu glukagonu. Naopak množství beta

buněk je sníženo. To pak vede k hyperglykémii. miR-375 se tak účastní prostřednictvím svých cílových transkriptů i buněčného růstu a proliferace buněk [96].

miR-124, a zejména pak jeho isoforma miR-124a, se také účastní vývoje pankreatu. Inhibuje translaci transkripčního faktoru FOXA2, který reguluje specifické geny beta buňky (PDX1, KIR6.2 a SUR1). Nadbytek miR-124 vede ke snížení produkce inzulínu. Podobně jako miR-375 totiž cílí na gen MTPN, který kóduje protein myotrophin zodpovědný za uvolňování hormonu a exocytózu. Zdá se, že dráhy regulace sekrece inzulínu jsou pro miR-124 a miR-375 shodné [97].

Při rozvoji inzultidy byla pozorována zvýšená exprese miR-21, miR-34a a miR-146a [98]. miR-9 snižuje expresi granophilinu a tím i vyplavování inzulínu při stimulaci glukózou [99].

Ve velké prospektivní studii (n=822) byla sledována exprese miR-126, kdy byla prokázána významná negativní korelace mezi miR-126 a rozvojem T2DM, navíc s výrazným gradientem mezi kontrolami, prediabetiky a diabetiky. Zatímco nejvyšších hladin miR-126 dosahovala skupina kontrol, nejnižších dosahovali diabetici. Exprese u prediabetiků byla mezi těmito hodnotami. Původ miR-126 zatím není znám, ale její snížení je spojováno s nemocí periferních arterií u diabetu [100], stejně tak jako s nemocí koronárních tepen [101]. Cílovou mRNA pro miR-126 je transkript genu IRS-1. Při nadbytku miR-126 v hepatocytech dochází k redukci translace IRS-1 a tím k poruše signalizace inzulínové dráhy [102]. Při in vitro pokusu na endoteliích pěstovaných v podmínkách hyperglykémie nebyla změněna exprese miR-126, ale bylo sníženo její plnění do apoptotických tělísek [85], čímž se snížila možnost parakrinního působení a ovlivnění cílových struktur. Zůstává tedy otázkou, jestli například změna v koncentraci jiných miRNA nemůže ovlivňovat uvolňování apoptotických tělísek a způsobovat tak sníženou hladinu kolující miR-126 v krvi.

6.4.1.3 *Exprese miRNA u chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu*

Mezi miRNA, jejichž koncentrace jsou u osob s karcinomem snižené, patří miR-126, která inhibuje translaci ADAM9, proteinu s metaloproteinázovou a disintegrinovou doménou, jehož nadprodukce byla prokázána při progresi karcinomu [103,104,105]. Substituce miR-126 by tak mohla být jednou z možností prevence progresu a metastazování karcinomu [105]. Jak bylo uvedeno výše, tato miRNA má změněnou koncentraci i u jinak zdravých diabetiků, a tak by se mohlo jednat o další vysvětlení mechanismu zvýšeného rizika nádorové transformace u diabetiků.

Oblast DNA kódující miR-148a je u karcinomu pankreatu hypermetylována a exprese samotné miR-148a je pak snižená. Míra metylace této oblasti DNA by tak mohla sloužit jako diagnostický marker k odlišení karcinomu od chronického zánětu (průměrná metylace miR-148a u karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy je 4,25 %, resp. 1,21 %; $p < 0.05$) [106]. Podobně je rovněž miR-132 sniženě exprimována u karcinomů pankreatu a její genová sekvence je hypermetylována. Při in vitro pokusu na buněčných liniích došlo při podání miR-132 ke zpomalení růstu nádorových buněk a naopak při podání anti-miR-132 k progresi buněčného růstu a tvorbě větších buněčných kolonií [107].

Mezi miRNA se zvýšenou expresí u karcinomu pankreatu patří miR-16, miR-21, miR-27a, miR-100, miR-135b, miR-155, miR-181b, miR-196a, miR-200 a miR-221. Liu a kol. prokázali signifikantní zvýšení exprese u sedmi miRNA, z nichž pro diagnostiku karcinomu navrhl miR-16 a miR-196a v kombinaci s biochemickým markerem CA 19-9. Tento test k odlišení karcinomu od kontrol a pacientů s chronickou pankreatitidou dosahoval senzitivity 92 % a specifity 95,6 %. Pro odlišení karcinomu od chronického zánětu pak byla senzitivita a specifita 88,4 % a 96,3 % [108]. K odlišení nádoru od zánětu byla v jiné studii použita exprese miR-135b ve vzorku 42 pacientů s karcinomem a

33 s chronickou pankreatitidou, která byla schopna tyto jednotky odlišit se senzitivitou 92,9 % a specificitou 93,4 %. Pozitivní a negativní prediktivní hodnota testu byla 95 % a 91 % [109].

Při analýze vzorků odebraných při aspirační biopsii bylo pozorováno zvýšení exprese miR-21, miR-196a a miR-221 ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,009$) [110]. Ke zvýšení miR-21 dochází i u jiných nádorů, např. jícnu, plic, tlustého střeva, u glioblastomu [111,112,113,114]. Tato miR-21 reguluje translaci LRRFIP1, který inhibuje antiapoptotickou signalizační dráhu NF- κ B, a tím významně zasahuje do regulačních procesů buňky. Zvýšením hladiny miR-21 dojde k inhibici LRRFIP1, čímž je dráha NF- κ B deblokována a buňka chráněna před apoptózou, což vede k delšímu přežívání (až imortalizaci) a proliferaci nádorových buněk [114,115]. NF- κ B představuje společnou signalizační dráhu, která je aktivní při zánětech i nádorech. Tak lze vysvětlit pojetí chronické pankreatitidy jakožto rizikového faktoru pro rozvoj karcinomu pankreatu [116]. Míra exprese miR-21 nekorelovala s velikostí tumoru, stupněm diferenciací, ani s metastatickým postižením uzlin. Výrazně zvýšená exprese však souvisela s horší prognózou pacienta [117,118].

Koncentrace miR-155 je taktéž zvýšena u celé řady nádorů [119,120,121]. To ukazuje na společné prvky v karcinogenezi různých tkání. MicroRNA-155 reguluje translaci TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1), proteinu indukovaného při buněčném stresu, který se s p53 spolupodílí na buněčné smrti v apoptotickém procesu [122,123]. Zvýšená koncentrace miR-155 u karcinomů však vede k inhibici TP53INP1, čímž opět dojde k inhibici apoptózy a imortalizaci nádorových buněk [122].

Sestavením vhodného panelu miRNA by bylo možné získat účinný diagnostický nástroj. Bloomston a kol. vybrali 25 miRNA, které v 95 % správně určily nádor a nenádorovou tkáň (tedy kontroly a chronickou pankreatitidu), v 93 % správně zařadily nádor a chronický zánět a ve 100 % odlišily chronickou pankreatitidu od normální tkáně pankreatu [124].

6.4.1.4 *miRNA a terapie*

Studium miRNA se stává významným prvkem v porozumění mechanismů rozvoje onemocnění a zpřesnění diagnostiky, což dokládá i množství publikací vznikajících zejména v posledních 10 letech. Rostoucí počet prací směřuje k využití miRNA v diagnostice určitých chorob, ke zpřesnění zažitých testů, k přesunu od invazivní diagnostiky k méně invazivní. Zároveň roste i snaha o využití poznatků v terapii.

Aby však bylo možné ovlivnit cílovou tkáň, je potřeba konkrétní miRNA-modulátor nějakým způsobem dopravit na cílové místo. Způsob podání může být lokální nebo systémový. Zatímco lokální má výhodu v zamezení nežádoucího působení modulátoru na jiném místě v organismu, systémový má zase výhodu v možnosti semi-invazivně (intravenózně) ovlivňovat i tkáně, které nejsou přímo dostupné. Nicméně miRNA je při systémovém podání vystavena nukleázové aktivitě v krevním řečišti, a tak musí být molekula chemicky upravena, konjugována a opouzdřena, aby byla před RNázou ochráněna, dopravena na cílové místo, schopna projít buněčnou membránou a dostat se do cytoplasmy. Pouze chemická modifikace sice stabilizuje molekuly v krevním řečišti a ochrání je od RNáz, nicméně neumožní efektivní vstup do buňky. Proto byly vyvinuty nosiče na virové a neviróvé bazi, které prostup buněčnou membránou usnadní. Jako virové nosiče se používají lentiviry, adenoviry a adeno-asociované viry, mezi neviróvé nosiče se řadí liposomy, biodegradabilní polymery, kolagen 1. typu a makrofágy. Pokud se ke komplexu připojí nosič obsahující molekulu, jež bude rozeznána povrchovým receptorem konkrétní buňky, bude dosaženo cíleného působení modulátoru s minimalizováním nežádoucích účinků jinde v organismu a umožněním redukce jeho dávky. Vzhledem k často velmi limitujícím možnostem protinádorové terapie jsou sníženy nároky na bezpečnost a toxicitu protinádorového léku, což může usnadnit proniknutí miRNA-orientované léčby v oblasti onkologie. To může přinést nové a zatím netušené možnosti v nádorové terapii, ať už se bude jednat o samostatný lék nebo jako senzitizer v kombinaci s chemoterapií [125].

V současné době je již v různé fázi klinického testování několik látek, které využívají princip fungování miRNA k terapii (např. Miravirsen pro léčbu heaptitis C, ale také Atu027 k terapii karcinomu pankreatu a další) [126,127].

7 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.

7.1 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

7.2 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 specifity 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.

8 Pacienti a metody

8.1 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 |

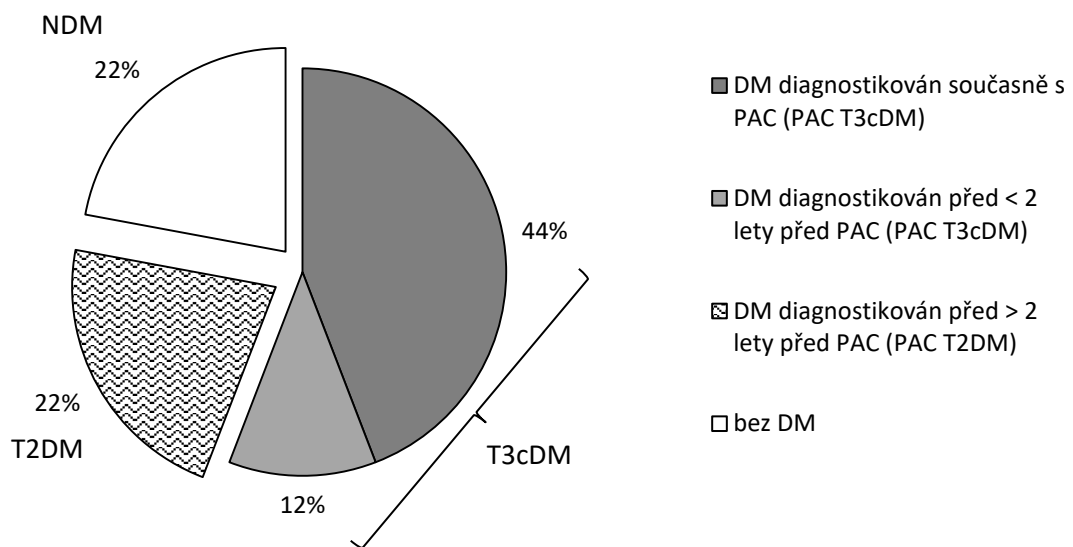
PAC – pacienti s karcinomem pankreatu, CHP – pacienti s chronickou pankreatitidou, T2DM – pacienti s diabetes mellitus 2. typu

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 %

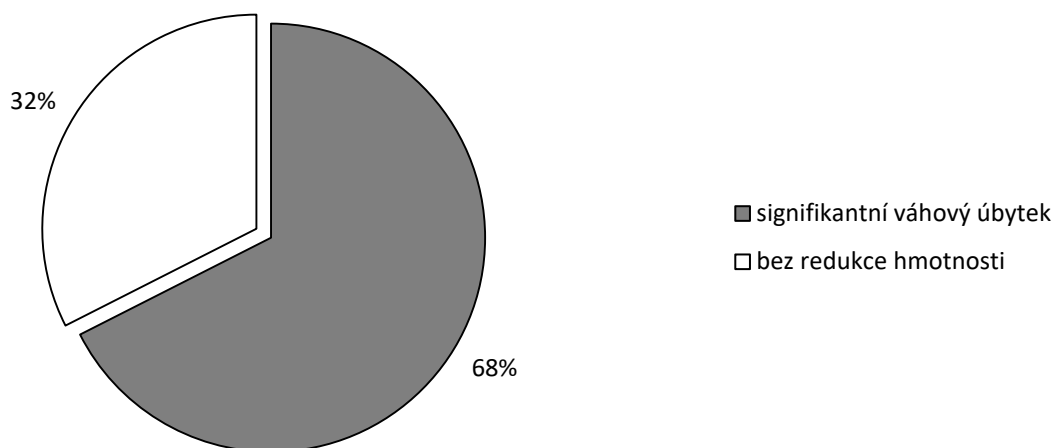
všech osob s karcinomem) bylo toto období kratší než 2 roky, u většiny (34 osob) pak byl (pre)diabetes diagnostikován až v souvislosti s karcinomem. Takový recentně zachycený diabetes hodnotíme jako sekundární pankreatogenní diabetes při karcinomu pankreatu, který je některými autory označován jako T3cDM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

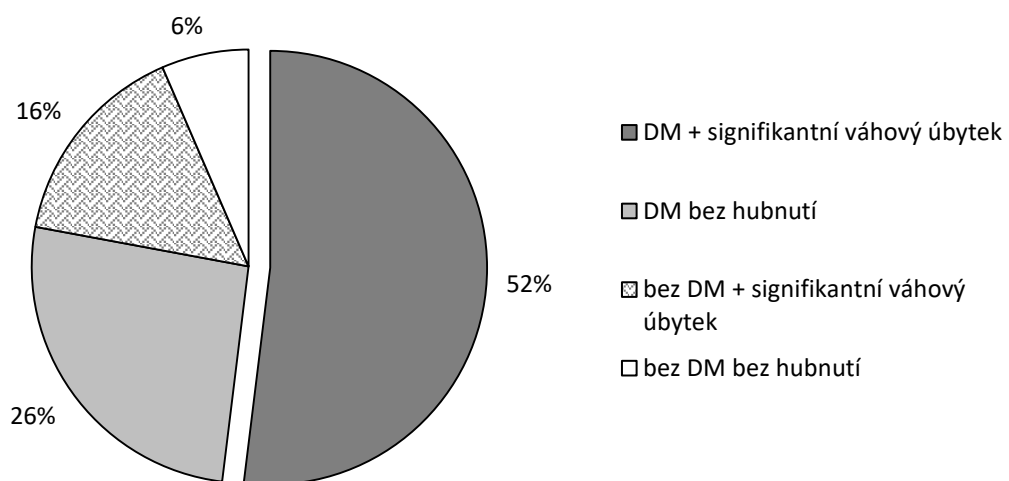
Graf 1: Výskyt typu diabetu (s ohledem na dobu trvání) u pacientů s karcinomem (PAC)



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 [3].

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 | | | |

8.2 Diagnostika onemocnění

Pro hodnocení diabetu, respektive prediabetu jsme použili standardní kritéria podle American Diabetes Association [128].

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.

8.3 Metody

8.3.1 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).

8.3.2 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.

8.3.3 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).

8.3.4 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).

8.3.5 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.

8.3.6 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.

8.3.7 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.).

9 Výsledky

9.1 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.

9.2 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 p ¹ <0,0006 p ² <0,0001 p ³ =0,02 p ⁴ =0,006 | 343,5 ± 159,2 p ¹ =0,0003 p ² =0,001 | 38,1 ± 15,5 | 77,3 ± 69,2 | 11,1 ± 1,8 | 6,5 ± 1,1 |
| 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 ¹ kontrolám, ² T2DM, ³ CHP DM- a ⁴ CHP DM+. | | | | | | |

9.3 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 | | | | |

9.4 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.

9.5 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

9.6 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.

9.7 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

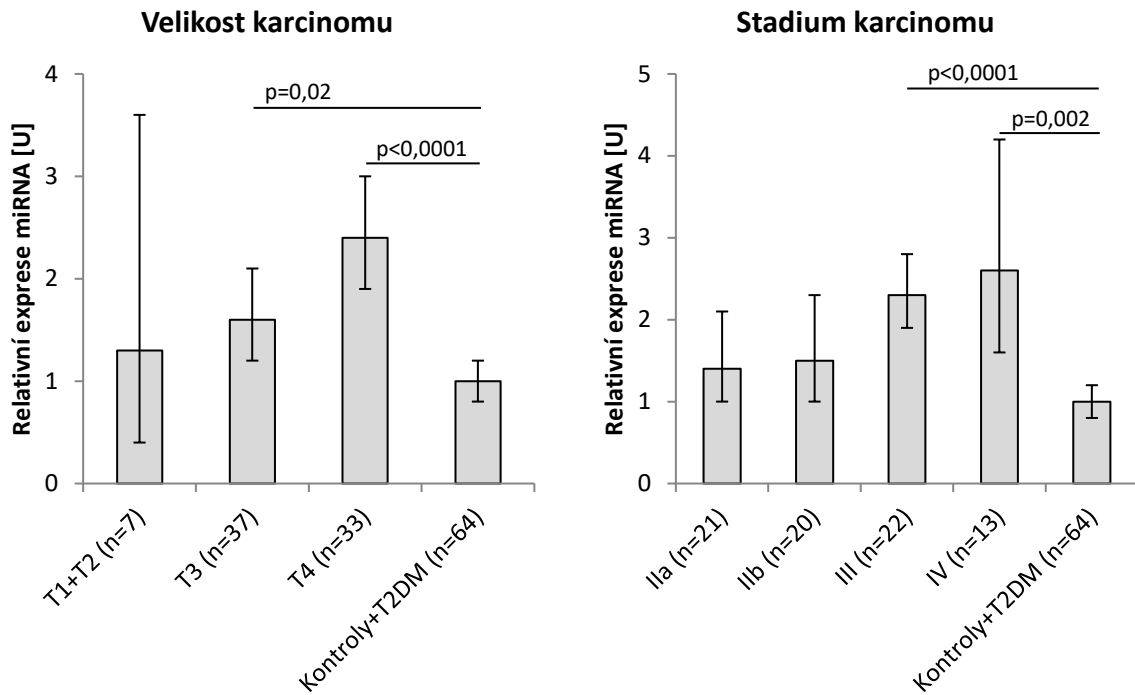
| | Ib (n=1) | Ila (n=21) | Ilb (n=20) | III (n=22) | IV (n=13) | Kontroly+ T2DM (n=64) |
|--|----------|-------------------------------------|---|---|--|--------------------------|
| miR-21 | 1,3 | 2,4 (1,6-3,5) | 3,2 (1,9-5,2) p ¹ =0,003 | 3,1 (2,5-4,0) p ¹ =0,0004 | 4,0 (2,4-6,6) p ¹ =0,002 | 1,0 (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. | | | | | | |

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

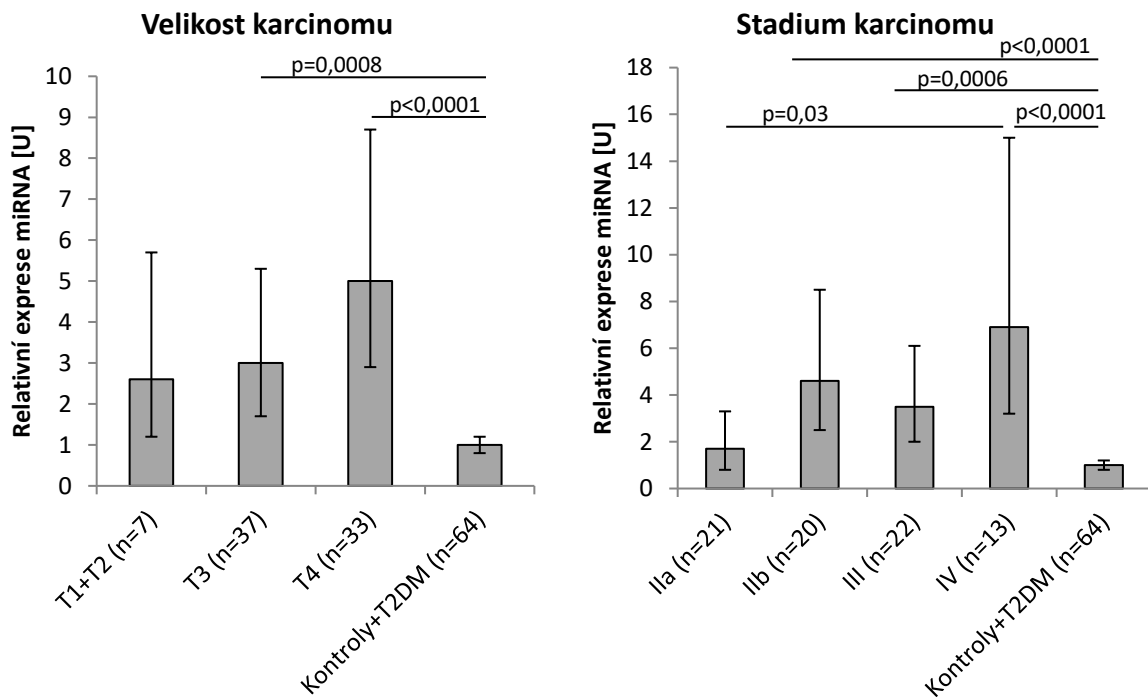
Graf 4 porovnává exprese a) miR-196, b) miR-200 podle velikosti primárního nádoru a klinického stadia karcinomu. Se závažností onemocnění stoupá exprese obou miRNA.

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

a) miR-196



b) miR-200



9.8 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.

9.9 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

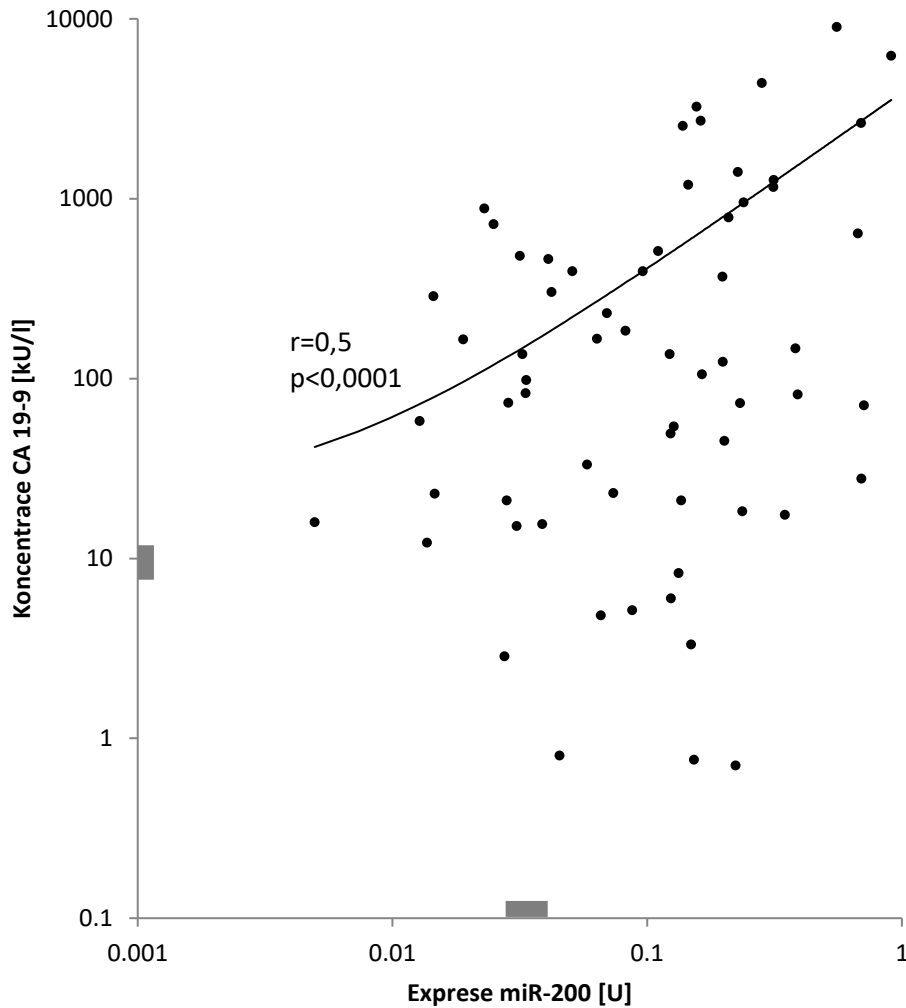
PAC CHP – pacienti s karcinomem pankreatu a chronickou pankreatitidou v osobní anamnéze

PAC NCHP – pacienti s karcinomem bez chronické pankreatitidy v anamnéze

9.9.1 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).



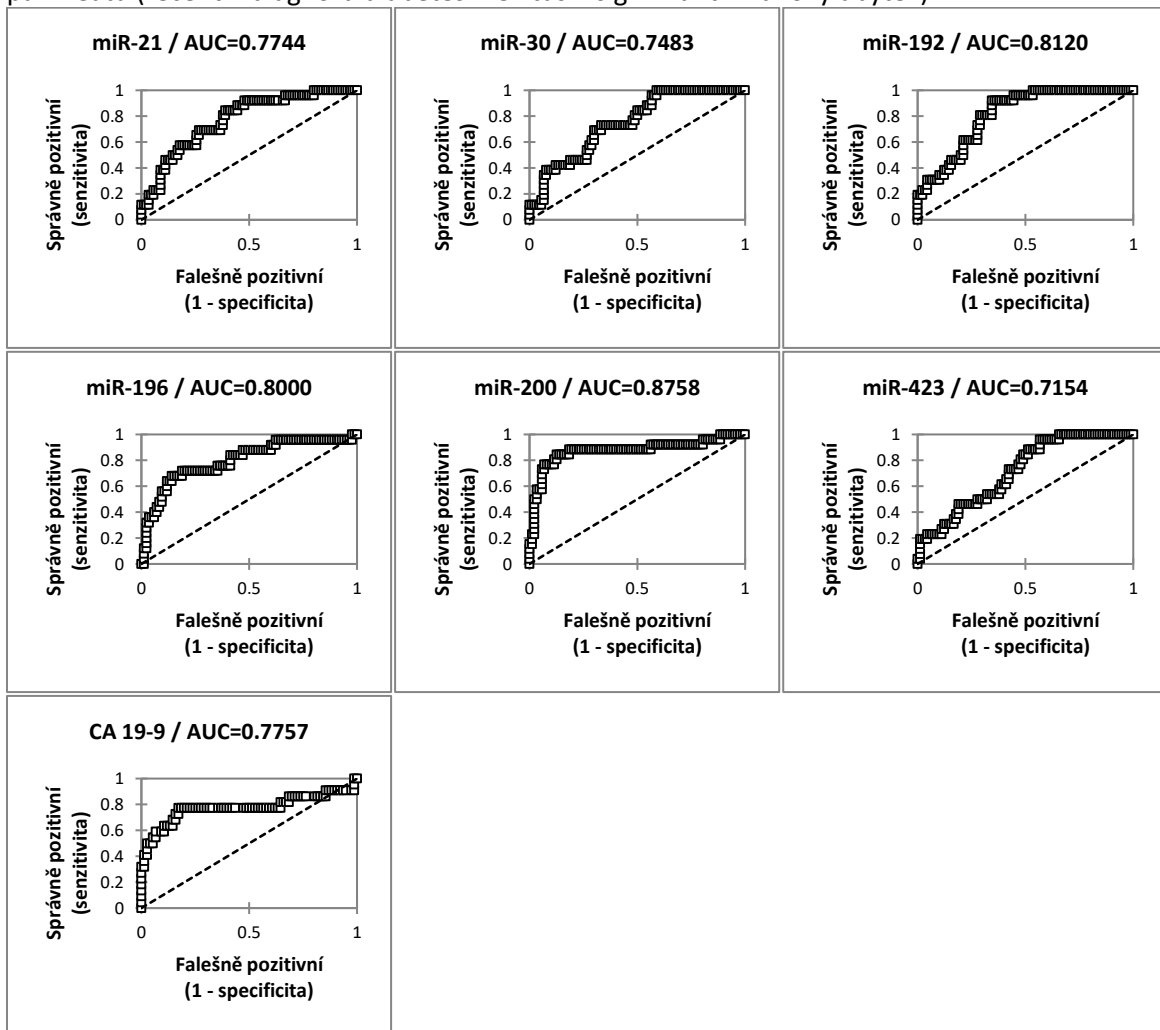
9.10 Vyhodnocení testů CA 19-9 a miRNA

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)



10 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.

10.1 Epidemiologická data

10.1.1 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.

10.1.2 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 [129].

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 % [130], 74 % [11].

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 [131].

10.1.3 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 % [132,133].

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) [134,135].

10.2 miRNA a CA 19-9

V současnosti užívaný marker CA 19-9 není dostatečně citlivý – dosahuje senzitivity okolo 68 – 78 % a specificity 70 – 83 % [136,137]. 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 [138]. 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 [139]. 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 % [108].

Otázkou zůstává, jestli změny v expresích miRNA vznikají již časně, nebo jsou patrné až v případech 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 ($p=0,04$) [140]. 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 [141]. Chirurgickou resekcí PanIN došlo k normalizaci elevovaných miRNA [142]. Zvýšené exprese

miRNA byly pozorovány i u jiného nádorového prekursoru – intraduktální papilární mucinózní neoplázie (IPMN) [143].

10.2.1 miR-196

Podle miRWalk databáze, která poskytuje přehled o možných i potvrzených interakcích miRNA s mRNA konkrétního genu, je jedním z cílů miR-196 gen PALLD, kódující protein palladin. Ten v cytoskeletu reguluje aktin a tím je spoluzodpovědný za buněčný pohyb a morfogenezi buňky [144]. Zvýšená exprese PALLD byla pozorována u familiárního i sporadického karcinomu. Trasfekce tohoto genu vedla ke změně cytoskeletu a zvýšené migraci [145]. Zvýšená koncentrace palladinu byla přítomna zejména ve stromatu infiltrativního karcinomu pankreatu [146]. Palladin je produkován nádorem pozměněnými fibroblasty, které hrají významnou roli v progresi karcinomu [147]. Zvýšená exprese miR-196 tak může být zpětnou vazbou k regulaci tvorby palladinu. V naší studii byla pozorována tím vyšší exprese miR-196, čím bylo pokročilejší stadium a velikost karcinomu (nesignifikantně). Podobně i v jiné studii byla exprese této miRNA asociována s buněčnou proliferací, migrací a invazí [148]. Nabízí se tak možnost jejího využití v časně diagnostice i jako prognostického ukazatele.

10.2.2 miR-200

Jedním z cílů miR-200 je dle databáze miRWalk gen KLF11. Protein vzniklý jeho přepisem se účastní při diferenciaci buňky, zánětu a při apoptóze. Za normálních okolností usnadňuje potlačení protoonkogenu c-myc pomocí transformačního růstového faktoru beta (TGF- β) [149,150]. Dojde-li vlivem nádorové transformace u karcinomu pankreatu k mutaci proteinu Ras, KLF11 je inaktivován a buněčný růst odblokován. Zvýšená exprese miR-200 u karcinomu pankreatu by mohla přímo inhibovat tvorbu KLF11 a vést tak k nekontrolovatelnému růstu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že zvýšená exprese miR-200 nebyla pozorována jen u karcinomu pankreatu, ale i u jiných nádorů.

Změny růstu, schopnost metastazovat a celkově horší prognóza byly ve spojitosti se zvýšenou expresí miR-200 pozorovány u karcinomu žaludku [151], dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní [152], kolorektálního karcinomu [153], karcinomu ovarií [154] a nemalobuněčného karcinomu plic [155]. Nabízí se tak možnost využití miR-200 jako prognostického markeru u osob s různými typy karcinomů [156]. Na myším modelu došlo při zvýšené expresi miR-200 rovněž k apoptóze β -buněk pankreatu, což vedlo následně k rozvoji těžkého diabetes mellitus [157]. MiR-200 by tak mohla přispět i k objasnění patofyziologie diabetu u osob s karcinomem pankreatu.

10.2.3 miR-423

Předpokládá se, že proces karcinogeneze je víceúrovňový, kdy nejprve dochází k dediferenciaci acinární buňky pankreatu v buňku duktální (metaplázie), která je za účasti proonkogenních a prozánětlivých signálů následována vlastní neoplázií. Transkripční faktor Prox1 reguluje buněčný cyklus, a účastní se tak organogeneze pankreatu. Jeho optimální koncentrace je zodpovědná nejen za správný vývoj exokrinní části pankreatu (diferenciace acinárních a duktálních buněk), ale rovněž za maturaci β -buněk. Jeho zvýšená exprese u nevyzrálých β -buněk vedla ke snížené proliferaci, porušené maturaci a apoptóze [158]. Na druhou stranu delece Prox1 vedla k předčasné diferenciaci acinárních buněk a následnému chudému větvení pankreatických vývodů [159].

Zatímco přechodná reaktivace Prox1 byla pozorována u dediferencujících se acinárních buněk, u samotných neoplázií již Prox1 chybí. Rovněž myši heterozygoti pro Prox1 vykazovali vyšší metaplastický potenciál, větší rozsah poškození tkání a prodloužené hojení při zánětu. Prox1 se tak jeví jako tumor supresor, který chrání buňku před nádorovou transformací [160].

U pacientů s karcinomem prsu byla pozorována snížená exprese dlouhé nekódující sekvence RNA LINC00968, která vedla k odblokování miR-423. Její funkcí je mimo jiné inhibice

zmiňovaného transkripčního faktoru Prox1. Odblokování miR-423 tak vede k inhibici Prox-1, která by tak mohla vést k nádorové transformaci [161]. Jelikož efekt LINC00968 byl pozorován vedle karcinomu prsu také u ostosarkomu [162] a nemalobuněčného karcinomu plic [163], lze předpokládat analogický proces i u karcinomu pankreatu. Hypoteticky by pak nižší exprese miR-423, pozorovaná v naší studii u pacientů se stabilizovanou chronickou pankreatitidou, mohla představovat skrze zvýšenou expresi Prox1 vystupňovanou ochranu proti nádorové transformaci. Rozdíl v expresi miR-423 u pacientů s karcinomem proti kontrolám a diabetikům 2. typu bez nádoru a zánětu nicméně v naší práci pozorován nebyl.

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).

11 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.

12 Závěr

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

Prokázali jsme vysokou prevalenci poruch glukózového metabolismu u osob s karcinmem, 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.

13 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. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al.: Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, 2018
3. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R: Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, Masarykova univerzita, 2019
4. Škrha J. Epidemiologie diabetu. Postgraduální medicína 2014; 4: 6-10.
5. Matoulek M, Svačina Š, Lajka J. Výskyt obezity a jejích komplikací v České republice. Vnitř Lék 2010; 56: 1019-1027.
6. 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.
7. 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.
8. Ben Q, Cai Q, Li Z, Yuan Y, Ning X, Deng S, et al. The relationship between new-onset diabetes mellitus and pancreatic cancer risk: A case–control study. European Journal of Cancer 2011; 47: 248-254.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu L, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *Journal of the American Medical Association* 2000; 283: 2552-2558.
14. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006; 7: 85-96.
15. Asano T, Yao Y, Shin S, McCubrey J, Abbruzzese JL, Reddy SAG. Insulin Receptor Substrate Is a Mediator of Phosphoinositide 3-Kinase Activation in Quiescent Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research* 2005; 65: 9164-9168.
16. Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao G-H, Testa JR. AKT Activation Up-Regulates Insulin-like Growth Factor I Receptor Expression and Promotes Invasiveness of Human Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research* 2001; 61: 589-593.

17. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 8571-80.
18. Pantalone D, Ragionieri I, Nesi G. Improved Survival in Small Pancreatic Cancer. *Digestive Surgery* 2001; 18: 41-46.
19. Fisher WE, McCullough PJ, Ray MB, Rogers DH, Bell RH. Diabetes enhances growth of pancreatic carcinoma cells. *Surgery* 1988; 104: 431-436.
20. Butler AE, Galasso R, Matveyenko A, Rizza RA, Dry S, Butler PC. Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans. *Diabetologia* 2010; 53: 21-6.
21. Basso D, Plebani M, Fogar P, Del Favero G, Briani G, Meggiato T, et al. β -Cell function in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 1994; 9: 332-335.
22. Agustsson T, D'souza MA, Nowak G, Isaksson B. Mechanisms for skeletal muscle insulin resistance in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nutrition* 2011; 27: 796-801.
23. Permert J, Adrian TE, Jacobsson P, Jorfelt L, Fruin AB, Larsson J. Is profound peripheral insulin resistance in patients with pancreatic cancer caused by a tumor-associated factor? *The American Journal of Surgery* 1993; 165: 61-67.
24. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnquist HJ, Larsson J. Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. *Br J Surg* 1993; 80: 1047-50.
25. Basso D, Greco E, Fogar P, Pucci P, Flagiello A, Baldo G, et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: An open field for proteomic applications. *Clinica Chimica Acta* 2005; 357: 184-189.

26. Fogar P, Basso D, Pasquali C, Piva MG, Brigato L, De Paoli M, et al. Portal but not peripheral serum levels of interleukin 6 could interfere with glucose metabolism in patients with pancreatic cancer. *Clinica Chimica Acta* 1998; 277: 181-189.
27. Korc M. Pancreatic cancer-associated diabetes is an "exosomopathy". *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1508-10.
28. Fric P, Zavoral M. Early diagnosis of pancreatic adenocarcinoma: role of stroma, surface proteases, and glucose-homeostatic agents. *Pancreas* 2012; 41: 663-70.
29. 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.
30. 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.
31. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373: 1083-96.
32. Preziosi G, Oben JA, Fusai G. Obesity and pancreatic cancer. *Surgical Oncology* 2014; 23: 61-71.
33. Jiao L, de Gonzalez AB, Hartge P, Pfeiffer RM, Park Y, Freedman DM, et al. Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts. *Cancer causes & control : CCC* 2010; 21: 1305-1314.

34. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 1996; 2: 800-3.
35. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
36. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-70.
37. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83.
38. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 114: 1752-1761.
39. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 499-510.
40. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44: 248-52.
41. Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 2002; 10: 153-69.

42. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract* 2013; 7: e330-41.
43. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347-55.
44. Simo R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2014; 37: 893-9.
45. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, Gurina OI. VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; 13: 423-43.
46. Bao B, Wang Z, Li Y, Kong D, Ali S, Banerjee S, et al. The complexities of obesity, diabetes, and the development and progression of pancreatic cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1815: 135-146.
47. Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 1308-14.
48. Renaldi O, Pramono B, Sinorita H, Purnomo LB, Asdie RH, Asdie AH. Hypoadiponectinemia: a risk factor for metabolic syndrome. *Acta Med Indones* 2009; 41: 20-4.
49. Ukkola O, Santaniemi M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 696-702.

50. Stolzenberg-Solomon RZ, Weinstein S, Pollak M, Tao Y, Taylor PR, Virtamo J, et al. Prediagnostic Adiponectin Concentrations and Pancreatic Cancer Risk in Male Smokers. *American Journal of Epidemiology* 2008; 168: 1047-1055.
51. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 24-30.
52. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2476-81.
53. Pan H, Guo J, Su Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 2014; 130: 157-69.
54. Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *J Cell Biochem* 2008; 105: 956-64.
55. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 446-62.
56. Dali-Youcef N, Mecili M, Ricci R, Andres E. Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. *Ann Med* 2013; 45: 242-53.
57. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1605-21.
58. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-7.
59. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1793-1801.

60. Conover CA, Lee PD, Kanaley JA, Clarkson JT, Jensen MD. Insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in obese and nonobese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1355-60.

61. 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.

62. 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.

63. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 350-5.

64. Kosanam H, Prassas I, Chrystoja CC, Soleas I, Chan A, Dimitromanolakis A, et al. Laminin, gamma 2 (LAMC2): a promising new putative pancreatic cancer biomarker identified by proteomic analysis of pancreatic adenocarcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12: 2820-32.

65. Park HD, Kang ES, Kim JW, Lee KT, Lee KH, Park YS, et al. Serum CA19-9, cathepsin D, and matrix metalloproteinase-7 as a diagnostic panel for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2012; 12: 3590-7.

66. Zhang P, Zou M, Wen X, Gu F, Li J, Liu G, et al. Development of serum parameters panels for the early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2014; 134: 2646-55.

67. Willumsen N, Bager CL, Leeming DJ, Smith V, Karsdal MA, Dornan D, et al. Extracellular matrix specific protein fingerprints measured in serum can separate pancreatic cancer patients from healthy controls. *BMC Cancer* 2013; 13: 554.

68. Bracci PM, Zhou M, Young S, Wiemels J. Serum autoantibodies to pancreatic cancer antigens as biomarkers of pancreatic cancer in a San Francisco Bay Area case-control study. *Cancer* 2012; 118: 5384-94.
69. Chung HW, Lim JB, Jang S, Lee KJ, Park KH, Song SY. Serum high mobility group box-1 is a powerful diagnostic and prognostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2012; 103: 1714-21.
70. Locke JM, Harries LW. MicroRNA expression profiling of human islets from individuals with and without type 2 diabetes: promises and pitfalls. *Biochem Soc Trans* 2012; 40: 800-3.
71. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294: 797-9.
72. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
73. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D155-d162.
74. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.
75. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j* 2004; 23: 4051-60.
76. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376-85.
77. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* 2006; 342: 33-47.

78. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.
79. Lynn FC. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 452-9.
80. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 223-9.
81. Leisegang MS, Martin R, Ramirez AS, Bohnsack MT. Exportin t and Exportin 5: tRNA and miRNA biogenesis - and beyond. *Biol Chem* 2012; 393: 599-604.
82. Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 2007; 56: 2938-45.
83. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
84. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48: 1647-53.
85. Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 555-62.
86. Xiao D, Ohlendorf J, Chen Y, Taylor DD, Rai SN, Waigel S, et al. Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes. *PLoS One* 2012; 7: e46874.
87. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3: e3694.

88. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: ra81.
89. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 423-33.
90. Liu X, Suo R, Xiong SL, Zhang QH, Yi GH. HDL drug carriers for targeted therapy. *Clin Chim Acta* 2013; 415: 94-100.
91. Uno Y, Piao W, Miyata K, Nishina K, Mizusawa H, Yokota T. High-density lipoprotein facilitates in vivo delivery of alpha-tocopherol-conjugated short-interfering RNA to the brain. *Hum Gene Ther* 2011; 22: 711-9.
92. Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KR, et al. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol* 2010; 260: 70-4.
93. Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, Bang-Berthelsen CH, Hansen L, Andersen ML, et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 896362.
94. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011; 48: 61-9.
95. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-30.

96. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5813-8.
97. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500.
98. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2010; 59: 978-86.
99. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 26932-42.
100. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107: 810-7.
101. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010; 107: 677-84.
102. Ryu HS, Park SY, Ma D, Zhang J, Lee W. The induction of microRNA targeting IRS-1 is involved in the development of insulin resistance under conditions of mitochondrial dysfunction in hepatocytes. *PLoS One* 2011; 6: e17343.
103. Zobel A, Flechtenmacher C, Edler L, Alonso A. Expression of ADAM9 in CIN3 lesions and squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 332-6.

104. Fritzsche FR, Jung M, Tolle A, Wild P, Hartmann A, Wassermann K, et al. ADAM9 expression is a significant and independent prognostic marker of PSA relapse in prostate cancer. *Eur Urol* 2008; 54: 1097-106.
105. Frampton AE, Krell J, Jacob J, Stebbing J, Castellano L, Jiao LR. Loss of miR-126 is crucial to pancreatic cancer progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; 12: 881-4.
106. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, et al. The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin Chem* 2010; 56: 1107-18.
107. Zhang S, Hao J, Xie F, Hu X, Liu C, Tong J, et al. Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1183-9.
108. 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.
109. Munding JB, Adai AT, Maghnouj A, Urbanik A, Zollner H, Liffers ST, et al. Global microRNA expression profiling of microdissected tissues identifies miR-135b as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2012; 131: E86-95.
110. Panarelli NC, Chen YT, Zhou XK, Kitabayashi N, Yantiss RK. MicroRNA expression aids the preoperative diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2012; 41: 685-90.
111. Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 255-60; discussion 260.
112. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-98.

113. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama* 2008; 299: 425-36.

114. Li Y, Li W, Yang Y, Lu Y, He C, Hu G, et al. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res* 2009; 1286: 13-8.

115. Sheikh MS, Huang Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* 2003; 2: 550-2.

116. Jackson L, Evers BM. Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers. *Cancer Treat Res* 2006; 130: 39-65.

117. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 2171-6.

118. Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, et al. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Mol Oncol* 2013; 7: 334-45.

119. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1600-8.

120. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-61.

121. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 497-505.
122. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 16170-5.
123. Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 37722-9.
124. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama* 2007; 297: 1901-8.
125. Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CM. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discov Today* 2013; 18: 282-9.
126. 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.
127. 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.
128. American Diabetes A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33: S62-S69.

129. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 81-4.
130. 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.
131. Škrha J, Frič P, Bušek P, Škrha P, Šedo A: Sporadic pancreatic cancer – glucose homeostasis and pancreatogenic Type 3 diabetes, Rijeka, InTechOpen, 2018.
132. 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.
133. Krech RL, Walsh D. Symptoms of pancreatic cancer. *J Pain Symptom Manage* 1991; 6: 360-7.
134. Lopez NE, Prendergast C, Lowy AM. Borderline resectable pancreatic cancer: Definitions and management. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2014; 20: 10740-10751.
135. 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.
136. 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.

137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. 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.
143. Hernandez YG, Lucas AL. MicroRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor lesions. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8: 18-29.
144. Otey CA, Rachlin A, Moza M, Arneman D, Carpen O: The Palladin/Myotilin/Myopalladin Family of Actin-Associated Scaffolds; In: *International Review of Cytology*, Academic Press, 2005; pp. 31-58.

145. Pogue-Geile KL, Chen R, Bronner MP, Crnogorac-Jurcevic T, Moyes KW, Downen S, et al. Palladin Mutation Causes Familial Pancreatic Cancer and Suggests a New Cancer Mechanism. *PLoS Medicine* 2006; 3: e516.
146. Salaria SN, Illei P, Sharma R, Walter KM, Klein AP, Eshleman JR, et al. Palladin is overexpressed in the non-neoplastic stroma of infiltrating ductal adenocarcinomas of the pancreas, but is only rarely overexpressed in neoplastic cells. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 324-8.
147. Sato D, Tsuchikawa T, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Marukawa K, Morooka A, et al. Stromal Palladin Expression Is an Independent Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One* 2016; 11: e0152523.
148. Alvarez-Teijeiro S, Menendez ST, Villaronga MA, Rodrigo JP, Manterola L, de Villalain L, et al. Dysregulation of Mir-196b in Head and Neck Cancers Leads to Pleiotropic Effects in the Tumor Cells and Surrounding Stromal Fibroblasts. *Sci Rep* 2017; 7: 17785.
149. Buck A, Buchholz M, Wagner M, Adler G, Gress T, Ellenrieder V. The tumor suppressor KLF11 mediates a novel mechanism in transforming growth factor beta-induced growth inhibition that is inactivated in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 861-72.
150. Ellenrieder V, Buck A, Harth A, Jungert K, Buchholz M, Adler G, et al. KLF11 mediates a critical mechanism in TGF-beta signaling that is inactivated by Erk-MAPK in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 2004; 127: 607-20.
151. Yu L, Wu D, Gao H, Balic JJ, Tsykin A, Han TS, et al. Clinical Utility of a STAT3-Regulated miRNA-200 Family Signature with Prognostic Potential in Early Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 2018; 24: 1459-1472.

152. Arunkumar G, Deva Magendhra Rao AK, Manikandan M, Prasanna Srinivasa Rao H, Subbiah S, Ilangovan R, et al. Dysregulation of miR-200 family microRNAs and epithelial-mesenchymal transition markers in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2018; 15: 649-657.
153. O'Brien SJ, Carter JV, Burton JF, Oxford BG, Schmidt MN, Hallion JC, et al. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer: a systematic review. *Int J Cancer* 2018; 142: 2501-2511.
154. Koutsaki M, Libra M, Spandidos DA, Zaravinos A. The miR-200 family in ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 66629-66640.
155. Si L, Tian H, Yue W, Li L, Li S, Gao C, et al. Potential use of microRNA-200c as a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2017; 14: 4325-4330.
156. Lee JS, Ahn YH, Won HS, Sun S, Kim YH, Ko YH. Prognostic Role of the MicroRNA-200 Family in Various Carcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 1928021.
157. Belgardt BF, Ahmed K, Spranger M, Latreille M, Denzler R, Kondratiuk N, et al. The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nat Med* 2015; 21: 619-27.
158. Paul L, Walker EM, Drosos Y, Cyphert HA, Neale G, Stein R, et al. Lack of Prox1 Downregulation Disrupts the Expansion and Maturation of Postnatal Murine beta-Cells. *Diabetes* 2016; 65: 687-98.
159. Westmoreland JJ, Kilic G, Sartain C, Sirma S, Blain J, Rehg J, et al. Pancreas-specific deletion of Prox1 affects development and disrupts homeostasis of the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 2012; 142: 999-1009.e6.

160. Drosos Y, Neale G, Ye J, Paul L, Kuliyeve E, Maitra A, et al. Prox1-Heterozygosis Sensitizes the Pancreas to Oncogenic Kras-Induced Neoplastic Transformation. *Neoplasia* 2016; 18: 172-84.

161. Sun X, Huang T, Zhang C, Zhang S, Wang Y, Zhang Q, et al. Long non-coding RNA LINC00968 reduces cell proliferation and migration and angiogenesis in breast cancer through up-regulation of PROX1 by reducing hsa-miR-423-5p. *Cell Cycle* 2019; 18: 1908-1924.

162. Liu G, Yuan D, Sun P, Liu W, Wu PF, Liu H, et al. LINC00968 functions as an oncogene in osteosarcoma by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling. *J Cell Physiol* 2018; 233: 8639-8647.

163. Wang Y, Zhou J, Xu YJ, Hu HB. Long non-coding RNA LINC00968 acts as oncogene in NSCLC by activating the Wnt signaling pathway. *J Cell Physiol* 2018; 233: 3397-3406.

14 Přílohy

14.1 Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce:

14.1.1 Příloha 1:

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

14.1.2 Příloha 2:

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

14.1.3 Příloha 3:

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

14.1.4 Příloha 4: in extenso

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

14.2 Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce:

14.2.1 Příloha 5:

Škrha P: Diabetes mellitus a karcinom pankreatu – příčina nebo následek? *Vnitr Lek* 2014; 60(9): 787-790

14.2.2 Příloha 6:

Škrha P, Anděl M: Obezita a diabetes mellitus - pandemická onemocnění jako rizikový faktor rozvoje karcinomu pankreatu. *DMEV* 2015; 18(1): 11-14

14.2.3 Příloha 7:

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

14.2.4 Příloha 8:

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