

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Autoreferát disertační práce

**Expresse miRNA v adenokarcinomu pankreatu – vztah k morfológickým
charakteristikám a prognóze onemocnění.**

**Expression of miRNAs in pancreatic adenocarcinoma – relationship to
morphological characteristics and disease prognosis.**

MUDr. Arpád Szabó

Praha, 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor:	Biologie a patologie buňky
Předseda oborové rady:	doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.
Školící pracoviště:	Ústav patologie 3LF UK a FNKV
Autor:	MUDr. Arpád Szabó
Školitel:	prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.
Oponenti:	prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D. Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

OBSAH

1	ABSTRAKT	1
2	ABSTRACT	3
3	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	5
3.1	Duktální adenokarcinom pankreatu	5
3.2	Základní charakteristiky miRNA	6
3.3	Úloha miRNA ve vzniku PDAC	7
3.3.1	Role studovaných oncomiRNA v onkogenezi PDAC	7
3.3.2	Role studovaných tumor-supresorových miRNA v onkogenezi PDAC	8
4	PODKLADY PRO VYSLOVENÍ HYPOTÉZ	9
4.1	Hypotézy a cíle práce	10
5	PACIENTI A METODY	11
5.1	Soubory pacientů	11
5.2	Morfologická charakteristika nádorů	11
5.4	Izolace miRNA a reverzní transkripce	12
5.5	Hodnocení exprese miRNA pomocí qPCR	12
5.6	Statistická analýza	13
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	14
6.1	Výběr optimální endogenní kontroly pro normalizaci algoritmem Normfinder	14
6.2	Normalizace RT-qPCR pro hodnocení změn exprese miRNA v PDAC	15
6.3	Vztah histologické stavby PDAC k expresi miRNA a k přežití nemocných	19
6.4	Vztah exprese sledovaných miRNA k progresi nádoru a délce přežití nemocných	19
7	ZÁVĚR	22
8	PUBLIKAČNÍ ČINNOST	23
9	SEZNAM VYBRANÉ LITERATURY	24

1 ABSTRAKT

Duktální adenokarcinom (PDAC) je nejčastějším primárním nádorem pankreatu. Jeho nepříznivá prognóza je dána mimo jiné i tím, že je často diagnostikován až v inoperabilním pozdním stadiu a navíc vykazuje vysokou chemorezistenci. Pro možnost časnější diagnózy PDAC a tím zlepšení prognózy nemocných jsou hledány nové biomarkery, mezi které patří mimo jiné i microRNA (miRNA), krátké nekódující RNA molekuly, zapojené do post-transkripční regulace genové exprese.

Na rozdíl od jiných RNA jsou molekuly miRNA v biologických vzorcích stabilní. Jejich expresi je možné stanovit prostřednictvím více analytických metod, například kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR). Pro normalizaci metod používaných pro zjištění hladiny miRNA je nutné použít vhodné endogenní kontroly. Variabilní exprese endogenních kontrol však může znamenat určitou nejistotu při kvantifikaci exprese miRNA. Cílem první práce byly analýza exprese šesti miRNA, izolovaných z parafinových bloků (FFPE) biopsicky vyšetřených PDAC a určení optimální vnitřní kontroly. Při normalizaci výsledků RT-qPCR byly hodnoceny čtyři interní kontroly: arteficiální spike miR-39 od *C. elegans*, U6 snRNA, miR-16 a snoRNA U91. Hodnoty exprese všech sledovaných miRNA byly v nádorech signifikantně odlišné v závislosti na zvolené vnitřní kontrole. Mimo to vykazovala stabilita použitých vnitřních kontrol u jednotlivých nádorů signifikantní rozdíly. Jako nejstabilnější endogenní kontrola, kterou lze doporučit pro endogenní normalizaci exprese miRNA v tkáních PDAC pro normalizaci, se pomocí algoritmu NormFinder ukázala U91.

Možnost použití miRNA jako diagnostického nebo prognostického markeru maligních nádorů byla předmětem více publikací. Cílem druhé práce bylo stanovení exprese sedmi vybraných miRNA, izolovaných z formalinem fixovaných parafinových bloků (FFPE) od 54 pacientů s PDAC. Následně byl hodnocen vztah exprese těchto miRNA k histologickému uspořádání a pokročilosti nádoru, celkové délce přežití nemocných (OS) a délce přežití do progresu nemoci (PFS). Ve vyšetřených nádorech byla zjištěna zvýšená exprese miR-21, miR-155 a miR-210, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu. Naopak hladiny miR-96 a miR-217 byly u PDAC signifikantně sniženy. Patrná byla pozitivní korelace hladin miR-210 s věkem pacientů ($p=0.35$). Exprese všech sledovaných miRNA nevykazovala korelaci se sledovanými parametry nádoru – stupněm diferenciací, rozsahu lokální progresu, ani s metastatickým postižením lymfatických uzlin, perineurální invazí, vaskulární invazí a délkou přežití pacientů. Zvýšené hladiny miR-148a a miR-217 vykazovaly signifikantní korelaci s

tubulárním uspořádáním nádoru; snížená exprese miR-148a souvisela s disociativním uspořádáním nádoru. Zvýšená exprese miR-155 měla vztah k vyšší mitotické aktivitě nádorových buněk.

V předložené práci je demonstrován význam správné volby vnitřní kontroly pro normalizaci výsledků RT-qPCR při stanovení exprese miRNA. Byla potvrzena odlišná exprese miRNA v PDAC v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu. Byla prokázána signifikantní asociace histologického uspořádání nádoru a mitotické aktivity s expresí některých miRNA. Korelace mezi úrovní exprese sledovaných miRNA, progresí nádoru a délkou přežití nemocných nebyla prokázána.

2 ABSTRACT

Ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common primary pancreatic neoplasm. It's frequently diagnosed in late inoperable stage and has high resistance to chemotherapy; this situation contributes to its unfavourable prognosis. Therefore, there is a need for biomarkers enabling early detection of PDACs and by this way to improve patient prognosis. MicroRNAs (miRNA), short non-coding RNA molecules involved in post-transcriptional regulation of gene expression, belong to such markers.

Contrary to other RNA molecules, miRNAs are stable in biological samples. Their expression is measured by several analytical methods, including real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Normalization of methods determining miRNA levels requires adequate endogenous controls. However, variable expression of endogenous controls in tumors may cause bias in determining miRNA levels. The aim of the first study was to investigate the expression of six miRNAs isolated from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples of PDACs. Four controls were chosen for RT-qPCR result normalization: artificial spike miR-39 from *C. elegans*, U6 snRNA, miR-16 and snoRNA U91. Expression values of all studied miRNAs in tumors were significantly different depending on selected endogenous controls. Additionally, stability of the controls varied significantly in individual tumors, U91 was determined to be the most stable according to the NormFinder algorithm. Thus, U91 can be recommended as endogenous control for miRNA expression in PDAC tissues.

The possibility to utilize miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in malignancies has been the subject of multiple publications. The aim of the second study was to investigate the expression of seven selected miRNAs isolated from FFPE samples of 54 PDAC patients. The relationship of miRNA expression levels with tumor histology, clinico-pathological characteristics, patient overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) was subsequently evaluated. Overexpression of miR-21, miR-155 and miR-210 was observed in PDACs, in comparison with non-neoplastic pancreatic tissue. On the contrary, miR-96 and miR-217 were significantly downregulated in PDACs. Positive correlation of miR-210 levels was observed with patient age ($\rho=0.35$). Expression levels of all selected miRNAs failed to demonstrate significant correlation with tumor parameters – grade, degree of local progression, lymph node involvement, perineural invasion, vascular invasion and length of patient survival. Additionally, elevated levels of miR-148a and miR-217 have shown positive correlation with tubular arrangement of tumors; decreased miR-148a expression was

associated with dissociative tumor growth. Elevated miR-155 levels were linked to high mitotic activity in cancer cells.

This work demonstrated significance of the choice of endogenous controls for normalization of RT-qPCR results during miRNA expression analysis. The results have confirmed abnormal miRNAs expression in PDACs in comparison with adjacent non-neoplastic tissue. Significant association was detected between histological structure, mitotic activity and miRNA expression in tumors. Finally, no correlation of miRNA levels with tumor progression and length of patient survival could be demonstrated.

3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

3.1 Duktální adenokarcinom pankreatu

Duktální adenokarcinom (PDAC) představuje 90 % nově diagnostikovaných primárních malignit pankreatu (Cascinu et al. 2010) a patří mezi klinicky nejzávažnější nádorová onemocnění. Tato diagnóza tvoří jak u mužů, tak u žen čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí na zhoubný nádor. (Novotvary 2016, ÚZIS). Nejčastějším histologickým typem PDAC je adenokarcinom vývodového typu. Vzácnější histologické varianty PDAC jsou adenoskvamózní, medulární, hepatoidní, koloidní a nediferencovaná (Vincent et al. 2011). Hodnocení PDAC podle anatomického rozsahu progresu nemoci je uvedeno v TNM klasifikaci, 8. vydání (Brierley et al. 2017). Pokročilost nádoru je určována podle lokálního nálezu a podle přítomnosti metastáz do lymfatických uzlin a metastáz vzdálených.

Víc než dvě třetiny pacientů s PDAC jsou diagnostikovány s lokálně pokročilým nádorem nebo se vzdálenými metastázemi, tedy v inoperabilním stadiu (Vincent et al. 2011). V dnešní době doporučený léčebný postup u pacientů s časným operabilním tumorem je pankreatoduodenektomie, distální pankreatektomie nebo totální pankreatektomie (Acher et al. 2018; Jing et al. 2013; Andrén-Sandberg et al. 2016). Po resekci je zaváděna adjuvantní terapie gemcitabinem, případně s přidáním 5-fluorouracilu nebo dalších chemoterapeutik (Gbolahan et al. 2019).

Podle očekávání bude PDAC představovat v roce 2030 druhou nejčastější příčinu úmrtí na nádorová onemocnění (Rahib et al. 2014). Během posledních dekad došlo k významnému zlepšení přežití nemocných po chirurgickém výkonu (Shirai et al. 2016). Dlouhodobá prognóza po resekci PDAC ale zůstává nepříznivá (Huang et al. 2018). K faktorům negativně ovlivňujícím přežití u PDAC patří pozitivní resekcí okraj, přítomnost uzlinových metastáz, perineurální a vaskulární nádorová invaze (Winter et al. 2006; Bilici 2014). Z důvodu obtíží v časně diagnóze PDAC a často nepříznivého pooperačního průběhu onemocnění jsou cestou intenzivního výzkumu hledány diagnostické a prognostické biomarkery. Nejprůnosnějším v současné době klinicky používaným biomarkerem je CA19-9, který je ale pro nízkou specificitu nevhodný ke screeningu asymptomatických pacientů (Poruk et al. 2013). Karcinoembryonální antigen (CEA) se uplatňuje v klinické diagnostice PDAC v menší míře (Meng et al. 2017). V posledních letech se jako potenciální biomarkery dostaly do popředí pozornosti nekódující RNA molekuly, včetně microRNA (miRNA).

3.2 Základní charakteristiky miRNA

MiRNA patří mezi krátké nekódující vlákna RNA s průměrnou délkou 22 nukleotidů. Prvním představitelem dnes již početné rodiny miRNA je lin-4, která byla objevena v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993). V současnosti je u člověka popsáno víc než 3000 miRNA (www.mirbase.org).

První kroky syntézy miRNA probíhají v buněčném jádře; transkripce se uskutečňuje činností RNA-polymerázy II nebo RNA-polymerázy III (Ha et al. 2014). Posttranskripční modifikace primární miRNA vlákna probíhá v „mikroprocesorovém komplexu“, agregátu proteinů obsahujícím DGCR8 a ribonukleázu III Drosha (O'Brien et al. 2018). Výsledkem je pre-miRNA, která je transportována do cytoplasmy Exportinem-5; vlákno pre-miRNA je zpracováno RNázou III Dicer. Z duplexu miRNA je na základě termodynamické stability sekvence jedno z vláken (vedoucí vlákno) vybráno pro vykonání regulačních funkcí v RISC komplexu (O'Brien et al. 2018). Ve většině případů dochází současně k degradaci druhého, komplementárního vlákna miRNA (miRstar nebo miRNA*). Po dokončení syntézy je vlákno miRNA začleněno do komplexu proteinů, jehož hlavní funkční jednotkou je Argonaut (AGO). Výsledná RISC je schopna regulovat translaci cílových mRNA (Jonas et al. 2015). MiRNA jsou součástí posttranskripční regulace a působí v miRNA Induced Silencing Complex (RISC). V případě komplementarity se RISC váže na mRNA, na tzv. seed region miRNA Response Element (MRE) sekvencí. Endonukleáza AGO2 rozštěpí mRNA, přičemž dojde i k rozpadu RISK a k degradaci miRNA (Jo et al. 2015).

MiRNA představují jednu z klíčových komponent regulace genové exprese, uskutečňující se na epigenetické úrovni mechanismem tzv. RNA interference. Jedná se o posttranskripční „silencing“ mRNA molekul, vedoucí k jejich degradaci nebo k zastavení translace (Lam et al. 2015). Proces RNA interference má značný biologický význam. Hraje roli v embryogenezi a v regulacích komplexních intracelulárních pochodů, včetně apoptózy, buněčného cyklu a diferenciaci (Vidigal et al. 2015). Nedávno byla objevena aktivní sekrece miRNA prostřednictvím exosomů, představující důležitou formu intercelulární komunikace (Zhang et al. 2015). Abnormality ve spektru exprimovaných miRNA byly prokázány u většiny nádorových a nenádorových nemocí. Předpokládá se, že miRNA hrají roli v patogenezi, proto je intenzivně studováno jejich možné využití jako diagnostických nebo prognostických biomarkerů (Ardekani et al. 2010).

3.3 Úloha miRNA ve vzniku PDAC

Ve tkáni PDAC byla popsána abnormální exprese četných onkogenních a tumor-supresorových miRNA. Byl prokázán jejich podíl na ovlivňování řady procesů v nádorových buňkách, včetně podpory proliferace a invazivního růstu, inhibice apoptózy, modulace epitelově-mesenchymálního přechodu a chemorezistence (Huang et al. 2016). Pro studium byly zvoleny oncomiRNA miR-21, miR-155, miR-196a a miR-210, a dále tumor supresorové miR-96, miR-148a a miR-217.

3.3.1 Role studovaných oncomiRNA v onkogenezi PDAC.

Ze skupiny miRNA s proto-onkogenní funkcí (oncomiRNA) je nejvíce prozkoumána miR-21. Je zapojena do modulace důležitých procesů v nádorových buňkách, včetně proliferace, apoptózy, migrace, invazivity, metastazování a chemorezistence (Moriyama et al. 2009; Giovanetti et al. 2010; Zhang et al. 2018). Geny ovlivněné prostřednictvím miR-21 jsou *Bcl-2*, *Bax*, *TMI*, *PTEN* a *PDCD4* (Sicard et al. 2013; Qi et al. 2009; Wei et al. 2016). Prokázána byla rovněž nepřímá vazba na komponenty dráhy K-ras (Yu et al. 2016).

MiR-155 se v PDAC uplatňuje down-regulací genu *TP53INP*, který je součástí regulační dráhy p53. Poruchy v této dráze vedou k inhibici apoptózy a k podpoře nádorové proliferace (Gironella et al. 2007). V podmínkách *in vitro* miR-155 podporovala migraci a invazivitu nádorových buněk. Dále byla prokázána role v regulaci signální dráhy STAT3 a represí syntézy *SOCS1* (Huang et al. 2013). MiR-155 se uplatňuje i v modulaci chemorezistence buněk PDAC (Mikamori et al. 2017).

MiR-196a je deregulovaná u vysokého počtu nádorů (Lu et al. 2016). Experimentální transfekce miR-196a způsobila v buňkách PDAC pokles hladiny *ING5*, což vedlo k redukcii apoptózy, zvýšení nádorové proliferace a k vyšší invazivitě (Liu et al. 2013). Bylo též prokázáno, že miR-196a podporuje onkogenezi modulací NFkB inhibitoru α , *in vitro* dochází po introdukcii miR-196a ke zvýšení proliferace a migrace nádorových buněk (Huang et al. 2014). Další geny pod kontrolou miR-196a jsou *FOXO1*, *NME4* *Annexin A1* a členové rodiny *Hox* (Lu et al. 2016).

MiR-210 je oncomiRNA abnormálně exprimovaná u PDAC, pravděpodobně v souvislosti s hypoxií v tumoru (Ho et al. 2010; Dang a Myers 2015). Nejdůležitějším cílem miR-210 je *HIF-1a*, který představuje klíčovou komponentu dráhy regulující hypoxickou odpověď. Tato miRNA hraje též důležitou úlohu v modulaci interakcí pankreatických hvězdicových buněk (PSC) a PDAC buněk (Takikawa et al. 2017). Horizontální přenos

exosomální miR-210 mezi nádorovými buňkami *in vitro* podmínkách podporoval chemorezistenci (Yang et al. 2020).

3.3.2 Role studovaných tumor-supresorových miRNA v onkogenezi PDAC.

MiR-96 se podílí na regulaci onkogenu *KRAS* (Yu et al. 2010). Další geny, jejichž aktivita je řízena prostřednictvím miR-96, jsou *HERG1* a *NUAK1* (Feng et al. 2014; Huang et al. 2014).

MiR-148a je další miRNA s tumor-supresorovým účinkem. Buňky PDAC vykazují v porovnání s nenádorovým duktálním epitelem výraznou depleci miR-148a. Prvním identifikovaným genem regulovaným prostřednictvím miR-148a byl *CDC25* (Liffers et al. 2011). Down-regulace miR-148a se může inhibicí WNT/ β -kateninové signální dráhy podílet i na indukci epitelově-mezenchymálního přechodu (EMT) nádorových buněk (Peng et al. 2017). Další cílové geny regulace pomocí miR-148a jsou *AMPKa1*, *CCKBR*, *Bcl-2* a *GLUT1* (Zhao et al. 2013; Zhang et al. 2014; Wu et al. 2018).

MiR-217 je v nenádorové tkáni pankreatu exprimována v acinech s vysokou specificitou (Szafranska et al. 2007). V buňkách PDAC byla pomocí ISH a RT-qPCR prokázána výrazně snížená exprese miR-217 (Zhao et al. 2010). Její *in vitro* up-regulace prostřednictvím virového vektoru vedla k inhibici nádorového růstu, poklesu exprese *KRAS* a snížení fosforylace Akt (Zhao et al. 2010).

4 PODKLADY PRO VYSLOVENÍ HYPOTÉZ

Hodnocení exprese miRNA představuje komplexní proces citlivý ke změnám v metodických postupech v pre-analytickém stadiu i v analytickém stadiu měření. Normalizační strategie je jedním z faktorů, který může mít významný dopad na zjištěné hodnoty exprese miRNA. Důležitou roli hraje variabilita související s technickým zpracováním a s biologickou heterogenitou ve vzorcích. Pro normalizaci RT-qPCR jsou u miRNA zpravidla voleny krátké nekódující RNA-molekuly. Může se jednat o produkty tzv. „housekeeping genů“, které ale mnohdy nebývají stabilně exprimovány v tumorech. Další možností je přidání umělých RNA-produktů (tzv. „alien spike“) do analytu ve známých koncentracích, což umožňuje normalizaci kroků analýzy následujících po izolaci miRNA z tkáňových vzorků.

U většiny maligních nádorů, včetně PDAC, byl popsán vysoký počet deregulovaných miRNA, a to jak ve tkáni resektovaných nádorů, tak i v tělesných tekutinách. Některé miRNA působí jako onkogeny a tumor-supresory. Vzhledem k vysoké stabilitě miRNA by mohly změny jejich spektra v tělesných tekutinách sloužit pro diagnózu pacientů s PDAC v časném stadiu nemoci. Výsledky z výzkumu exprese miRNA v tkáňových vzorcích PDAC i prekurzorových lézí mohou být použity pro sestavení panelů miRNA pro tento diagnostický postup. Abnormality v expresi miRNA mohou souviset s pokročilostí tumoru nebo s přítomností metastáz, některé druhy miRNA mohou tedy sloužit k zařazení pacientů do prognostických skupin nebo pro predikci efektu protinádorové terapie. Přesný význam miRNA ve vzniku a progresi PDAC ale zůstává stále neobjasněn. Výsledky prací hodnotících expresi miRNA jsou navíc inkonzistentní; dosud nebyl stanoven univerzálně uznávaný postup pro jejich začlenění do diagnostického a terapeutického postupu PDAC.

4.1 Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem bylo přispět ke zlepšení metod hodnocení exprese miRNA u PDAC a k objasnění roli vybraných miRNA ve vlastnostech PDAC.

Konkrétně se jednalo o:

-Hodnocení vlivu různých strategií normalizace na změny exprese vyšetřených miRNA v tkáních PDAC při měření prostřednictvím RT-qPCR.

Hypotéza: volba kontroly pro normalizaci pokusu RT-qPCR ovlivňuje detegovanou hodnotu exprese vyšetřených miRNA.

-Porovnání exprese normalizačních kontrol U6, U91, miR-16 a cel-miR-39 v parafinových blocích PDAC a nenádorových tkání pankreatu pro určení nejstabilnější kontroly k normalizaci pro RT-qPCR.

Hypotéza: vybrané endogenní kontroly U6, U9, miR-16 a přidaná arteficiální „spike“ cel-miR-39 má stabilní expresi v PDAC a v nenádorových tkáních pankreatu.

-Stanovení exprese miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a, miR-210 a miR-217 v parafinových blocích PDAC a v nenádorovém parenchymu pankreatu.

Hypotéza: exprese vybraných miRNA je v nenádorové tkáni pankreatu a v PDAC odlišná.

-Určení vztahu mikroskopických vlastností nádorů - histologického uspořádání, nukleárních atypií a mitotické aktivity k expresi miRNA.

Hypotéza: histologické charakteristiky nádorů mají vztah k expresi vyšetřených miRNA.

-Určení vztahu klinicko-patologických vlastností nádoru, včetně stadia nemoci a přítomnosti metastáz k expresi miRNA.

Hypotéza: klinicko-patologické charakteristiky nádorů mají vztah ke změnám v expresi vyšetřených miRNA.

-Určení vlivu exprese vybraných miRNA na délku přežití bez progresu (PFS) a celkovou délku přežití (OS) pacientů s PDAC.

Hypotéza: délka intervalu mezi chirurgickou resekcí nádoru a progresí a délka celkového přežití pacientů nemoci souvisejí s hladinami exprese vyšetřených miRNA.

5 PACIENTI A METODY

5.1 Soubory pacientů

Obsahem disertační práce jsou 2 studie s mírně odlišným souborem pacientů operovaných na chirurgické klinice 3LF UK a FNKV v Praze. Parafinové bloky byly získány z bioptického archivu Ústavu patologie FNKV. Nádory byly histopatologicky hodnoceny podle 4. vydání WHO klasifikace tumorů trávicího ústrojí (Bosman et al. 2010). Všechny vyšetřované nádory odpovídaly konvenčnímu duktálnímu adenokarcinomu.

Do první studie bylo zahrnuto 24 pacientů, 11 žen a 13 mužů operovaných pro karcinom pankreatu v letech 2007-2012. Věk pacientů byl 36-83 let, s mediánem 65.5 let. Jeden nádor byl dobře diferencovaný, 14 nádorů bylo středně diferencovaných a 9 nádorů bylo špatně diferencovaných. Ve třech případech byla nemoc ve stadiu pT1, u pěti případů pT2, u patnácti případů pT3 a u jednoho případu pT4. Celkem u osmnácti nemocných byly popsány metastázy do lymfatických uzlin.

Do druhé studie bylo zahrnuto 54 nemocných s karcinomem pankreatu, operovaných v letech 2007-2015. V souboru bylo celkem 27 mužů a 27 žen. Věk pacientů byl 34-83 let, s mediánem 63 let. Čtyři nádory byly dobře diferencované, 27 nádorů bylo středně diferencovaných a 23 nádorů bylo špatně diferencovaných. U čtyř pacientů byl tumor ve stadiu pT1, u sedmi pacientů pT2, u 41 pacientů pT3 a u dvou pacientů pT4. Celkem u 37 nemocných byly přítomny metastázy do lymfatických uzlin. Perineurální propagace byla přítomna u 47 případů a lymfovaskulární invaze u 29 případů. Resekční okraj byl negativní (R0) ve čtyřiceti a pozitivní (R1) ve čtrnácti případech.

Databáze „the Cancer Genome Atlas“ (TCGA) obsahuje miRnom 178 resekovaných karcinomů pankreatu. Stanovení exprese miRNA bylo provedeno na přístroji Illumina-seq. Po kontrole dostupných klinických údajů (Anaya 2016) jsme z analýzy vyloučili případy neuroendokrinních nádorů a speciálních podtypů adenokarcinomu pankreatu. Vyšetřený soubor obsahoval 160 pacientů s konvenčním PDAC.

5.2 Morfologická charakteristika nádorů

Mikroskopická architektura nádorů byla klasifikována jako tubulární, kribriformní, solidně-trabekulární, mucinózní, světlobuněčná a disociativní. U jednotlivých případů bylo v archivu nalezeno 4-8 histologických preparátů obsahujících nádor. Zastoupení histologických struktur v nádoru bylo hodnoceno v celém jeho objemu, podíl jednotlivých

typů byl spočítán po pěti procentech celkového objemu nádoru. Nukleární pleomorfismus byl hodnocen dle třístupňové klasifikace jako mírný, střední nebo výrazný. Mitózy byly počítány na 10 zorných polí s velkým zvětšením (HPF) (mikroskop Olympus BX43 a objektiv Olympus Plan 40x/0.65).

5.4 Izolace miRNA a reverzní transkripce

Z archivovaných parafinových bloků byl vybrán vždy jeden blok, kde nádorová tkáň tvořila minimálně dvě třetiny rozsahu. Vzorky nenádorové tkáně pankreatu představující negativní kontrolu byly získány ze separátních parafinových bloků ze vzdálenosti minimálně 15 mm od nádoru.

Pro izolaci miRNA byly použity tři parafinové řezy tloušťky 6 μm , získané z každého vybraného bloku. Izolace byla provedena pomocí kitu miRNeasy FFPE kit (Qiagen), dle pokynů výrobce. Pro ověření kvality a čistoty izolátu bylo použito 2 mikrolitrů RNA. Poměr absorbance byl měřen multidetekčním přístrojem Synergy HT (BioTek) při vlnové délce 260 a 280 nm, použitím Take3 micro-volume ploténky. Integrita izolované RNA byla hodnocena agarózovou gelovou elektroforézou a pomocí softwaru GeneTools 3.08 (SynGene).

Pro reverzní transkripci byl použit mix stem-loop primerů. Primery byly navrženy pomocí miRNA primer design softwaru (Dr. Fuliang Xie, East Carolina University). Reverzní transkripce byla provedena použitím přístroje C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD). Reakční směs objemu 50 μl obsahovala: 1 μg DNA-free RNA, reakční pufr [50 mM Tris – HCl (pH 8.3 při 25 °C), 50 mM KCl, 4 mM MgCl_2 a 50 mM DTT]; 1 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 20 IU rRNasin ribonukleázového inhibitoru; 100 IU Moloney murine leukemia virus reverzní transkriptázy (M-MuLV RT, Thermo scientific) a primer mix, obsahující 20 pmol z každého stem-loop primeru. Spike RNA (miR-39 od *C. elegans*, 5×10^8 kopií) byla přidána do směsi před transkripcí, jako normalizační kontrola. Po denaturaci (5 minut při 70°C, následně chlazení na ledu), reakční směs byla inkubována 10 minut při 25°C, následně 60 minut při 42°C. Pro ukončení reakce byla směs zahřáta 10 minut na 70°C.

5.5 Hodnocení exprese miRNA pomocí qPCR

Vzorky cDNA byly amplifikovány v duplikátech bezprostředně po reverzní transkripci, použitím přístroje 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems) a kitu Hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne). Do reakční směsi byl přidán 10 pmol

každého primeru (miRNA specifických a univerzální) a 2 μ l cDNA. Amplifikace vzorků cDNA probíhala při následujících podmínkách: denaturace při 94 °C délky 15 minut, následně 40 cyklů tvořených denaturací při 94 °C trvající 15 s, annealingem při 62 °C trvající 60 s a DNA syntézou při 72 °C trvající 40 s. Specificita reakčních produktů byla sledována pomocí křivek tání. Metoda $\Delta\Delta$ CT byla použita pro stanovení hladin relativní exprese analyzovaných miRNA v nádorech (Pfaffl 2001).

5.6 Statistická analýza

Expese miRNA v nádorové a normální tkáni byla porovnána prostřednictvím párovaného dvouvýběrového Studentova t-testu a analýzou rozptylu (ANOVA). Hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za statisticky významné. Údaje z měření RT-qPCR (CT-threshold cykly) byly linearizovány, algoritmus NormFinder byl použit pro výběr nejstabilnějšího genu z vnitřních kontrol.

Statistická analýza dat v druhé práci byla provedena pomocí programů GenEx 6 (MultiD analyses), S.A.S. verze 9.4 (SAS Inc, Cary, NC, USA) a SPSS 25 (IBM). Expese miRNA v nádorové a normální tkáni byla porovnána pomocí párovaného Wilcoxonova testu. Vztah hladiny exprese individuálních miRNA byl hodnocen pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace. Vztah exprese miRNA a klinicko-patologických charakteristik nádoru k délce přežití pacientů s PDAC byl hodnocen univariantní analýzou a multivariantní analýzou pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik. Vztah exprese miRNA a délky přežití pacientů v databáze TCGA byl hodnocen univariantní analýzou pomocí Coxova modelu regrese. Každá testovaná hypotéza byla dvoustranná. Vybraná hladina významu byla $\alpha = 0.05$, hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výběr optimální endogenní kontroly pro normalizaci algoritmem Normfinder

Hodnocení exprese miRNA pomocí RT-qPCR se může stát důležitou součástí diagnostiky PDAC. Cílem normalizace metody je odstranit non-biologické variability v analytech, které vznikají při odběru, skladování, extrakci RNA, reverzní transkripci a kvantifikaci a dále i biologické variability podmíněné heterogenitou ve vzorcích (Peltier et al. 2008). Pro normalizaci jsou často používány endogenní krátké nekódující RNA molekuly. Jedná se o produkty tzv. „referenčních genů“, jejichž exprese je konstitutivní a má být ve tkáních konstantní, nezávisle od probíhajících patologických změn. Jedním z cílů první studie bylo určení optimálního postupu pro normalizaci metody RT-qPCR hodnocením stability vybraných endogenních kontrol v PDAC a v nenádorové tkáni pankreatu pomocí algoritmu NormFinder. Prahové cykly (CT) pro každou z endogenních kontrol se lišily v nádorech a v normálních tkáních pankreatu.

Ve většině studií zaměřených na určení exprese miRNA v resekátech PDAC byla jako endogenní kontrola pro normalizaci použita snRNA U6 (Zhang et al. 2009; Greither et al. 2010; Ma et al. 2013; Hong et al. 2014). Nevýhodou U6 je nekonstantní exprese ve více maligních nádorech (Peltier et al. 2008; Hansen et al. 2007; Appaiah et al. 2011). Cholangiocelulární karcinom vykazoval výraznější expresi U6 v nádorových buňkách v porovnání s mezenchymálním stromatem nebo v benigním vývodovém epitelem (Lou et al. 2015). Na základě našich výsledků vykazuje exprese U6 v PDAC při normalizaci k „spike“ hodnoty -1.03 až 8.12násobek normálních tkání. U6 byla nadměrně exprimována v 22 nádorech (z 24) a byla druhou nejstabilnější kontrolou pro normalizaci dle NormFinder algoritmu (hodnota stability = 0.056).

Kromě U6 se mohou pro normalizaci metody RT-qPCR uplatnit další typy nekódujících RNA vláken. Naše práce jako první studovala expresi snoRNA U91 v nenádorové tkáni pankreatu a v PDAC. U91 byla nadměrně exprimována v 14 nádorech, hodnoty U91 v nádorech vykazovaly -3.05 až 4.36násobek normální tkáně. U91 byla dle algoritmu Normfinder nejstabilnější ze zkoumaných endogenních kontrol (hodnota stability = 0.056). U6 vykazovala stejnou hodnotu stability jako U91 (hodnota stability = 0.056), demonstrovala ale vyšší hodnoty vnitroskupinové variability. Nejstabilnějším párem pro normalizaci byla kombinace U6+U91 (hodnota stability = 0.036). U91 lze tedy doporučit jako

endogenní normalizační kontrolu pro stanovení exprese miRNA v resekátech PDAC metodou RT-qPCR.

Další rozšířenou normalizační metodou je použití endogenních miRNA. Tato normalizace se uplatňuje především při stanovení cirkulující miRNA, protože jiná krátká nekódující RNA vlákna jsou v extracelulárním prostředí nestabilní (Freedman et al. 2016). Nejvíce používanou miRNA pro normalizaci byla miR-16 (Schwarzenbach et al. 2015). V jedné studii byla ale hladina cirkulující miR-16 signifikantně zvýšena u pacientů s PDAC a tato miRNA byla navržena jako plasmatický diagnostický marker (Liu et al. 2012). Exprese miR-16 byla v naší práci v tkáni PDAC značně variabilní, hodnoty miR-16 v tumorech byly - 2.94 až 7.38násobek normálních tkání. MiR-16 byla nadměrně exprimována v 18 nádorech. Podle algoritmu NormFinder byla miR-16 nejméně stabilní ze sledovaných endogenních kontrol (hodnota stability = 0.078).

Přidání exogenních nukleotidů do vzorku izolované RNA, např. cel-miR-39, cel-miR-54 nebo cel-miR-238, ve známých koncentracích (tzv. „spike-in“ kontroly) umožňuje normalizovat analytické stadium měření (Schwarzenbach et al. 2015). V naší studii byly amplifikační křivky a CT hodnoty pro „spike“ podobné u PDAC a u normálních tkání, s rozdílem menším než $n = 0.8$ cyklů. V případě dalších kontrol změny CT-hodnot činily od $n = -6.20$ do $n = 5.8$ cyklů. Podle algoritmu NormFinder se jako nejméně stabilní kontrola ukázal překvapivě „spike“ (hodnota stability = 0.085). Důvodem pro „nestabilitu“ této kontroly může být, že NormFinder dokáže určit variaci pro celé skupiny zahrnující každý případ nádoru a normální tkáň. Určení rozdílů mezi normální tkání a nádorem u jednotlivých pacientů není pomocí tohoto algoritmu možné.

6.2 Normalizace RT-qPCR pro hodnocení změn exprese miRNA v PDAC

V jednotlivých dosud uveřejněných publikacích vykazovaly průměrné zjištěné hodnoty exprese miRNA v resekátech PDAC značnou variabilitu, která může zčásti souviset i s použitím normalizační strategie. Další část první práce byla zaměřena na určení optimální kontroly pro normalizaci stanovení exprese vybraných miRNA v PDAC. Studovány byly miRNA, které jsou zapojeny do procesu kancerogeneze PDAC: miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217. Jako kontroly byly pro normalizaci metody RT-qPCR zvoleny: „spike“ (umělá miR-39 od *C. elegans*) a tři endogenní nekódující RNA - U6 snRNA, miR-16 a snoRNA U91. Porovnání exprese miRNA mezi PDAC a nenádorovou kontrolou

prokázala signifikantní variaci pro hodnotu exprese každé z vyšetřených miRNA. V druhé studii byla hodnocena exprese stejných miRNA v tkáňových vzorcích PDAC v souboru 54 pacientů pomocí RT-qPCR při použití “spike” pro normalizaci metody. Panel vyšetřených miRNA (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217) byl doplněn o miR-210.

MiR-21 se v PDAC uplatňuje jako onkogen, podporující proliferaci, metastazování a chemorezistenci nádorových buněk. Expese miR-21 v PDAC byla hodnocena ve více studiích. Při použití U6 pro normalizaci byl medián exprese miR-21 v nádoru zvýšen 2.2krát (Bloomston et al. 2007). Podobně i Zhang et al. (2009) a Hong et al. (2014) popsali při použití stejné interní kontroly signifikantní zvýšení exprese miR-21 v PDAC, v některých nádorech byla její hladina zvýšena až 6888krát (Zhang et al. 2009). V jiné studii duRieu et al. (2010) pozorovali při použití kombinace U6 a 5S jako endogenní kontroly 20.1 násobné zvýšení miR-21. V souladu s literárními údaji byla i v naší studii v nádorech prokázána zvýšená expese miR-21, naměřené výsledky exprese miR-21 byly signifikantně ovlivněny použitou normalizační kontrolou. Nejnižší průměrná hodnota byla relativně k U6 (5.5 násobné zvýšení), nejvyšší průměrná hodnota miR-21 byla zjištěna při normalizaci k U91 (17.71 násobné zvýšení). Zjištěné hodnoty exprese miR-21 se změnilly na 7.03násobek v případě miR-16 ($p < 0.01$) a na 14.56násobek při “spike” ($p < 0.01$). Hladina miR-21 byla ve vzorcích PDAC zahrnutých do druhé studie též signifikantně zvýšená (průměrně 12.01krát, nejvyšší elevace v nádoru byla 72 násobná).

Onkogenní miR-155 je klíčovou součástí regulace signalizační dráhy p53 a je zvýšeně exprimována v PDAC. Zhang et al. (2009) při normalizaci k U6 popsali až 52krát zvýšenou expresi v jednotlivých nádorech; Ma et al. (2013) změřili 2.11 násobné zvýšení v jejich souboru pacientů s toutéž endogenní kontrolou. V naší studii byla v nádorech zjištěna zvýšená expese miR-155, s významnou variací při použití různých vnitřních kontrol pro normalizaci: amplifikace miR-155 byla 15.1 násobná relativně k “spike” ($p < 0.01$); 5.05 násobná k U6 ($p < 0.01$); 6.39 násobná k miR-16 ($p < 0.01$) a 13.36 násobná k U91 ($p < 0.01$). V našem souboru pacientů s PDAC v druhé studii byla též prokázána zvýšená expese miR-155 (průměrně 22.9krát, nejvyšší hodnota exprese byla 232 násobná).

MiR-196a hraje v PDAC roli onkogenu, modulací NFkB inhibitoru α má přispívat k proliferaci a invazivitě nádorových buněk. Expese miR-196a je v PDAC deregulována; Zhang et al. (2009) popsali v jednotlivých nádorech při normalizaci k U6 signifikantní

intertumorální variabilitu její hladiny. Wang et al. (2009) demonstrovali při použití miR-16 jako endogenní kontrolu 16.0 násobné zvýšení ve vzorcích krevní plazmy pacientů s PDAC. V první práci byla exprese miR-196a mírně zvýšena relativně při normalizaci k “spike” (1.09krát) a U91 (1.13krát), aniž by byl výsledek statisticky signifikantní ($p > 0.05$). Hladina miR-196a byla statisticky významně snížena relativně k U6 (2.22krát, $p < 0.01$) a nevýznamně snížena k miR-16 (1.35krát, $p > 0.05$). V naší skupině 54 nemocných s PDAC v druhé studii byla prokázána vysoká intertumorální variabilita v hladinách miR-196a, exprese byla v jednotlivých případech 15krát snížena až 25.9krát zvýšená. Rozdíly v expresi miR-196a mezi vzorky PDAC a nenádorové kontroly ale nebyly statisticky.

Mir-210 hraje v PDAC roli onkogenu, uplatňující se při hypoxické odpovědi nádorových buněk. Exprese miR-210 byla v PDAC studována v menší míře, její elevace byla prokázána v resektátech pankreatu (Szafranska et al. 2007; Greither et al. 2010) a v pankreatické šťávě (Wang et al. 2014). V naší studii jsme prokázali signifikantní zvýšení exprese miR-210 (průměrně 15.68krát, nejvyšší hodnota 181krát) v PDAC.

MiR-96 má v PDAC funkci tumor-supresoru, podílí se na regulaci exprese *KRAS*. Literární údaje týkající se exprese miR-96 ve vzorcích PDAC jsou značně protichůdné. Analýza pomocí mikroarraye prokázala v nádorové tkáni 1.77 násobné zvýšení miR-96 v porovnání s chronickou pankreatitidou (Bloomston et al. 2007). Při použití RT-qPCR bylo naopak zjištěno 4.35 násobné snížení v nádoru při normalizaci exprese k miR-24 (Szafranska et al. 2007). Hong et al. (2014) a Feng et al. (2014) popsali v PDAC až osminásobné snížení miR-96 při normalizaci k U6. V naší studii jsme pozorovali významný rozdíl ve výsledcích exprese miR-96 získaných při použití různých kontrol pro normalizaci metody. Hodnota exprese miR-96 v PDAC nevykazovala signifikantní změny při normalizaci pomocí “spike” ($p > 0.05$) a U91 ($p > 0.05$). Exprese miR-96 byla ovšem významně down-regulovaná, když byla měřena relativně k U6 (3.22krát, $p < 0.01$) nebo miR-16 (2.32krát, $p < 0.01$). V druhé studii jsme prokázali významný pokles hladiny miR-96 ve vzorcích PDAC, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu (průměrně 1.42krát, nejnižší hodnota exprese 18 násobné snížení).

MiR-148a je v PDAC tumor-supresorem, inhibujícím proliferaci nádorových buněk a zamezujícím jejich epiteliálně-mezenchymálnímu přechodu. Exprese miR-148a je v PDAC snížena, příčinou je hypermetylace promotorové oblasti kódujícího genu (Hanoun et al. 2010). Bloomston et al. (2007) a Jamieson et al. (2012) popsali při použití mikroarraye průměrné, 5.5

násobné a 7.14 násobné snížení exprese. Szafranska et al. (2007) stanovili pomocí RT-qPCR, při normalizaci k miR-24, 6.15 násobné snížení miR-148a. Normalizace relativně k U6 prokázala 2.5 násobnou a 2.86 násobnou down-regulaci v PDAC (Zhang et al. 2009; Ma et al. 2013). V první studii nebyl prokázán signifikantní rozdíl v expresi miR-148a při normalizaci k “spike” ($p > 0.05$), nebo k U91 ($p > 0.05$). Na druhou stranu, exprese miR-148a byla signifikantně snižena při použití U6 (1.33krát, $p < 0.01$) a miR-16 (2.04krát, $p < 0.01$) pro normalizaci. Naše druhá studie neprokázala významné snížení v expresi miR-148a ve vyšetřených případech PDAC, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu ($p > 0.05$). Hladina miR-148a ale byla snižena ve více případech PDAC, až 55 násobně relativně s kontrolou.

MiR-217 je další tumor-supresor modulující funkci signalizační dráhy KRAS/Akt. Snižená exprese miR-217 byla zjištěna ve více studiích PDAC. Szafranska et al. (2007) popsali až desetinásobné relativní snížení v nádorech, při normalizaci k miR-24. Hladina miR-217 byla v nádorech 2krát snižena při normalizaci k 18S (Greither et al. 2010) a 3.91krát snižena při normalizaci k U6 (Ma et al. 2013). Hong et al. (2014) popsali při použití U6 až 62.5 násobné snížení exprese miR-217 v PDAC. V jedné práci nebyla v nádorových buňkách PDAC izolovaných po mikrodisekci detegována exprese miR-217, jejím zdrojem v dalších publikacích byly pravděpodobně složky nádorového mikroprostředí (Munding et al. 2011). V souladu s literaturou byla exprese miR-217 v našem souboru PDAC signifikantně snižena při normalizaci s každou studovanou kontrolou. Největší snížení (24.39krát) bylo relativně k U6 a nejmenší (7.19krát) bylo při použití kombinace U6+U91. V našich vzorcích PDAC v druhé studii byla hladina miR-217 signifikantně snižena. V patnácti vzorcích s nádorem nebyla exprese miR-217 detegována.

Kromě změn exprese jednotlivých miRNA jsme v druhé studii zjistili ve vzorcích PDAC i významnou pozitivní korelaci exprese tří oncomiRNA. Vysoké hladiny miR-21 souvisely s elevací miR-155 ($\rho = 0.48$, $p < 0.01$) a miR-210 ($\rho = 0.36$, $p < 0.01$). Tento nálezh svědčí pro jejich možnou kooperaci ve vzniku a v progresi PDAC (Moriyama et al. 2009; Gironella et al. 2007; Ho et al. 2010). Pozitivní korelace byla patrná také mezi tumor-supresorovými miR-148a a miR-217 ($\rho = 0.27$, $p = 0.048$), kde u obou bylo v nádorech zjištěno snížení hladin. Tyto miRNA jsou zapojeny do regulace buněčné proliferace (Feng et al. 2016; Zhao et al. 2010), jejich souběžná deaktivace může hrát důležitou roli v procesu kancerogeneze. Negativní korelace byla prokázána mezi sníženou expresí miR-96 a zvýšením

miR-196a v nádorech ($\rho = 0.42$, $p < 0.01$). MiR-96 je inhibítozem *KRAS*, snižujícím proliferaci nádorových buněk (Yu et al. 2010; Feng et al. 2014); miR-196a naopak podporuje proliferaci a migraci nádorových buněk a omezuje apoptózu (Liu et al. 2013; Huang et al. 2013). Down-regulace miR-96 spolu s up-regulací miR-196a může být významným krokem v postupující kancerogenezi.

6.3 Vztah histologické stavby PDAC k expresi vybraných miRNA a k přežití nemocných

Naše druhá studie byla zaměřena i na určení vztahu exprese vybraných miRNA k histologickým charakteristikám PDAC; tomuto tématu byla podle literárních údajů dosud věnována jen malá pozornost. Prokázali jsme významnou korelaci zvýšené hladiny miR-148a a miR-217 s tubulárním uspořádáním nádoru ($\rho = 0.39$, $p = 0.0030$; $\rho = 0.28$, $p = 0.0396$). Hodnoty miR-148a navíc vykazovaly negativní korelaci s disociativním růstem ($\rho = -0.28$, $p = 0.0338$). Zjištěná asociace zvýšené hladiny miR-155 s vyšší mitotickou aktivitou buněk PDAC ($\rho = 0.27$, $p = 0.0468$) může souviset s předpokládanou rolí této miRNA v modulaci buněčného cyklu, v *in vitro* podmínkách byla zvýšená hladina miR-155 spojena s vyšší proliferací buněk a s inhibicí apoptózy (Gironella et al. 2007). V jedné studii bylo zjištěno zvýšení hladiny miR-21 u nízké diferencovaných případů PDAC (Giovanetti et al. 2010), porovnání exprese miR-21 s histologickou stavbou nádorů však nebylo v této práci provedeno. V naší práci vztah exprese studovaných miRNA ke stupni diferenciace nádorů nebyl prokázán.

Mitotická aktivita nádorových buněk byla z morfologických parametrů nádoru nejvýznamnější při korelaci s OS a PFS ($p = 0.0093$ a $p = 0.0063$). Hranice 3 mitóz na 10 HPF 40x umožnila určit pacienty s dobrou a se špatnou prognózou. Mikroskopické uspořádání nádoru nebylo asociováno s prognózou pacientů. Solidně trabekulární uspořádání bylo při univariátní analýze na hranici významnosti s OS ($p = 0.058$). Nebyly patrné rozdíly v prognóze mezi středně a špatně diferencovanými karcinomy ($p > 0.05$).

6.4 Vztah exprese sledovaných miRNA k progresi nádoru a délce přežití nemocných

K nejdůležitějším prognostickým ukazatelům PDAC patří rozsah lokální progresi nádoru v době diagnózy a přítomnost uzlinových, popřípadě vzdálených metastáz. Kurabilní resekce nádoru v době diagnózy je možná pouze u 10-15 % nemocných (Vincent et al. 2011). Údaje o intervalu mezi chirurgickou resekci nádoru a progresí nemoci (PFS) byly dostupné u 42 pacientů, s mediánem třinácti měsíců. Celkové přežití (OS) nemocných bylo od 1 do 81

měsíců, s mediánem 19 měsíců. Sedm pacientů bylo bez relapsu po 20-81 měsíců, všichni tito nemocní přežívali až do konce sledování. Pozitivní resekční okraj byl asociován s kratším PFS ($p = 0.005$). Vaskulární invaze signifikantně korelovala s kratším OS pacientů ($p = 0.036$). Vztah exprese miRNA v chirurgických resekátech nebo v tělesných tekutinách od nemocných s PDAC k progresi nádoru byl dosud málo studován. Bylo zjištěno, že s lokální nádorovou progresí a s přítomností uzlinových metastáz je spojena elevace miR-21, miR-130b, miR-139b, miR-141, miR-146a, miR-155, miR-196a, miR-216a, miR-628 a miR-720 (Jamieson et al. 2012; Zhou et al. 2016; Lemberger et al. 2019) a snížení miR-148a (Peng et al. 2017). Určení významu hladiny miRNA v progresi PDAC ale není v literatuře jednoznačné, například Schultz et al. (2012) v souboru 170 případů PDAC vztah změn exprese miRNA k pokročilosti nádorů neprokázali. Ani naše hodnocení neodhalilo statisticky signifikantní vztah exprese vybraných miRNA k velikosti nádorů, k přítomnosti perineurální propagace, vaskulární invaze nebo metastáz do lymfatických uzlin. Patrná byla pozitivní korelace hladin miR-210 s věkem pacientů ($\rho=0.35$).

Navzdory významným pokrokům v protinádorové terapii nedošlo ke zlepšení přežití pacientů s PDAC. Dosud byl identifikován větší počet miRNA, u kterých byl zjištěn vztah jejich hladiny k prognóze pacientů (Wald et al. 2017). Většina prací hodnotících vliv změn exprese miRNA na délku přežití byla provedena retrospektivně, s malým počtem pacientů. Součástí naší práce bylo zjistit, zda existuje vztah exprese vybraných miRNA k délce přežití nemocných s PDAC.

Nejvíce prozkoumaným prognostickým markerem u maligních nádorů ze skupiny miRNA je onkogenní miR-21 (Zhu et al. 2014). Prognostický význam exprese miR-21 v resekátech PDAC byl předmětem více studií (Dillhoff et al. 2008; Giovannetti et al. 2010; Hwang et al. 2010; Jamieson et al. 2012; Nagao et al. 2012; Kadera et al. 2013; Papaconstantinou et al. 2013, Dhayat et al. 2015) a meta-analýz (Zhu et al. 2014; Frampton et al. 2015; Negoj et al. 2017); v souboru 2000 nemocných s PDAC byl zjištěn signifikantní vztah zvýšené exprese miR-21 ke zkrácení OS a PFS. V literatuře však není úplná shoda ohledně prognostického významu miR-21. Schultz et al. (2012), Ali et al. (2015) a Calatayud et al. (2017) neprokázali statisticky významnou vazbu exprese miR-21 na délku přežití v souboru 225, 37 a 165 pacientů.

Zvýšená exprese miR-155 představovala v jedné studii, spolu s miR-21, nezávislý prediktivní faktor pro délku OS pacientů s PDAC (Papaconstantinou et al. 2013). Souvislost

zvýšené exprese této miRNA s kratší délkou přežití u PDAC byla potvrzena i v další studii (Greither et al. 2010). Ma et al. (2013) a Calatayud et al. (2017) popsali zvýšenou expresi miR-155 v PDAC, bez statisticky významného ovlivnění OS pacientů.

MiR-196a představuje u PDAC jednou z prvních miRNA, kde byl zjištěn vztah k délce přežití pacientů. Zvýšená exprese miR-196a spolu s elevací miR-219 v resekovaných PDAC byla spojena se zkrácením OS pacientů (Bloomston et al. 2007).

Zvýšená exprese miR-210 v resekátech PDAC byla v jedné práci asociována s kratší délkou přežití operovaných nemocných (Greither et al. 2010). Naproti tomu studie zaměřená na vztah hladiny miR-210 ve vzorcích plazmy k přežití pacientů s PDAC ukázala, že její snížená hladina souvisí s horší prognózou nemocných (Yu et al. 2017).

MiR-96 se u PDAC uplatňuje jako tumor-supresor; v jedné práci byla prokázána souvislost její snížené exprese se zkrácením OS (Li et al. 2014).

Vztah snížené hladiny miR-148a k délce přežití pacientů s PDAC byl dosud málo studován; korelace její -3p formy (miR-148*) s přežitím byla dosud identifikována jen v jedné práci. Snížení exprese miR-148a* resekátech PDAC bylo nezávislým prognostickým ukazatelem pro kratší délku přežití (Schultz et al. 2012).

U PDAC nebyl v literatuře dosud prokázán vztah exprese miR-217 k délce OS a PFS nemocných (Ma et al. 2013; Vychytilova-Faltejškova et al. 2015).

Více studií se zabývalo analýzou dat z miRNA sekvenace pankreatických nádorů obsažených v databázi TCGA, s cílem identifikovat miRNA predikujících délku OS pacientů (Zhou et al. 2016; Liang et al. 2018; Shi et al. 2018; You et al. 2019). Složení panelů se značně lišilo mezi jednotlivými publikacemi. MiR-21 byla uvedena jako prognosticky významná pouze v jedné z publikací (Zhou et al. 2016). Zjištěné rozdíly v prognosticky významných miRNA mohou souviset s odlišnou strukturou studií a rozdílnou analýzou dat. V našem vyšetření skupiny 160 resekovaných PDAC z databáze TCGA nesouvisela exprese žádné ze studovaných miRNA se zkrácenou délkou OS pacientů.

V naší práci jsme vztah změn exprese námi sledovaných miRNA (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196, miR-210 a miR-217) k délce OS a PFS pacientů s PDAC neprokázali.

7 ZÁVĚR

Možnosti praktického využití detekce miRNA v nádorové tkáni a v tělesných tekutinách pro časnou diagnózu PDAC a pro stanovení prognózy nemocných jsou v současné době intenzivně diskutovány. MiRNA, krátké nekódující RNA molekuly uplatňující se v post-transkripční regulaci genové exprese, hrají významnou roli v kancerogenezi a progresi nádorů. Předložená disertační práce byla zaměřena na určení optimální endogenní kontroly pro normalizaci exprese ve tkáních PDAC a na uplatnění prognostického významu vybraných miRNA u nemocných s PDAC. K hlavním výsledkům práce patří:

- 1) Byla prokázána odlišná hladina U6, U91 miR-16 a cel-miR-39 ve vzorcích resekátů PDAC a v nenádorové tkáni pankreatu. Endogenní vnitřní kontroly U6, U91 a miR-16 vykazovaly významnou intertumorální variabilitu. Jako nejstabilnější endogenní kontrola pro normalizaci při stanovení exprese miRNA ve tkáni PDAC pomocí RT-qPCR se podle algoritmu NormFinder ukázala U91.
- 2) Naměřené hodnoty exprese miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217 v nádorové tkáni se signifikantně liší v závislosti na zvolené kontrole. Tato okolnost může značně limitovat porovnatelnost výsledků mezi studii používajícími odlišné strategie normalizace pro kvantifikaci exprese miRNA v PDAC.
- 3) V souboru 54 nemocných s PDAC byly prokázány rozdíly v expresi miR-21, miR-96, miR-155, miR-210 a miR-217 ve vzorcích z resekátů nádoru, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu.
- 4) Byl prokázán vztah zvýšené exprese miR-148a a miR-217 k tubulárnímu uspořádání nádoru. Snížená exprese miR-148a souvisela s disociativním růstem v PDAC. Elevovaná exprese miR-155 korelovala se zvýšenou mitotickou aktivitou nádorových buněk.
- 5) Nebyla prokázána souvislost změněné exprese vybraných miRNA s pokročilostí nádoru, stupněm diferenciací, přítomností uzlinových metastáz, perineurální propagace a lymfovaskulární invaze. Exprese vybraných miRNA nesouvisela s celkovou délkou přežití pacientů s PDAC, ani s délkou přežití do progresu nádoru.

8 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Publikace vztahující se k disertační práci

Popov A, **Szabo A**, Mandys V. 2015. Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15: 774. (IF 3.265)

Szabo A, Gurlich R, Liberko M, Soumarova R, Vernerova Z, Mandys V, Popov A. 2020. Expression of selected MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: is there relation to tumor morphology, progression and patient's outcome? *Neoplasma*. (IF 1.771) **Práce byla přijata k publikaci.**

Další publikace

Benešová M, Trejbalová K, Kučerová D, Vernerová Z, Hron T, **Szabó A**, Amouroux R, Klézl P, Hajkova P, Hejnar J. 2017. Overexpression of TET dioxygenases in seminomas associates with low levels of DNA methylation and hydroxymethylation. *Mol Carcinog* 56 (8): 1837-50. (IF 3.851)

Hoffmanova I, Gurlich R, Janik V, **Szabo A**, Vernerova Z. 2016. Dilemmas in autoimmune pancreatitis. Surgical resection or not? *Bratisl Lek Listy* 117 (8): 463-7. (IF 0.64)

Szabó A, Richter I, Frydrychová D, Saláková M, Jirásek T. 2017. Lymph node metastasis of Merkel cell carcinoma without known cutaneous primary - case report. *Cs Patol* 53 (3): 135-8.

9 SEZNAM LITERATURY

- Acher AW, Bleicher J, Cannon A, Scaife C. 2008. Advances in surgery for pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol* 9 (6): 1037–43.
- Ali S, Almhanna K, Chen W, Philip PA, Sarkar FH. 2010. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. *American Journal of Translational Research* 3 (1), 28–47.
- Anaya J. 2016. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. *PeerJ Comput. Sci* 2: e67.
- Andrén-Sandberg Å, Ansorge C, Yadav T. 2016. Are There Indications for Total Pancreatectomy in 2016? *Dig Surg* 33: 329–34.
- Appaiah HN, Goswami CP, Mina LA, Badve S, Sledge GW Jr, Liu Y, Nakshatri H. 2011. Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 13 (5), R86.
- Ardekani AM, Naeini MM. 2010. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol* 2 (4): 161–79.
- Bilici A. Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. 2014. *World J Gastroenterol* 20 (31): 10802–812.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. 2007. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297: 1901–8.
- Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. 2010. WHO Classification of Tumours of the Digestive System vol. 3., 4th ed. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*. ISBN-13: 978-92-832-2432-7
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. 2017. TMN 8. vydání. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha. ISBN: 978-80-7472-173-1
- Calatayud D, Dehlendorff C, Boisen MK, Hasselby JP, Schultz NA, Werner J, Immervoll H, Molven A, Hansen CP, Johansen JS. 2017. Tissue MicroRNA profiles as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and periampullary cancers. *Biomark Res* 21 (5): 8.
- Cascinu S, Falconi M, Valentini V, Jelic S. 2010. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5: v55-8.
- Dang K, Myers KA. 2015. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci* 16 (3): 6353–72.
- Dhayat SA, Abdeen B, Köhler G, Senninger N, Haier J, Mardin WA. 2015. MicroRNA-100 and microRNA-21 as markers of survival and chemotherapy response in pancreatic ductal adenocarcinoma UICC stage II. *Clin Epigenetics* 7:132. Published 2015 Dec 23.
- Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. 2008. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 12 (12): 2171–6.
- du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrère N, Buscail L, Cordelier P. 2011. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 56 (4): 603–12.
- Feng H, Wang Y, Su J, Liang H, Zhang CY, Chen X, Yao W. 2016. MicroRNA-148a Suppresses the Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cells by Down-regulating ErbB3. *Pancreas* 45: 1263–71.
- Feng J, Yu J, Pan X, Li Z, Chen Z, Zhang W, Wang B, Yang L, Xu H, Zhang G, Xu Z. 2014. HERG1 Functions as an Oncogene in Pancreatic Cancer and is Downregulated by miR-96. *Oncotarget* 14 (5): 5832–44.
- Feng, Y. H., & Tsao, C. J. 2016. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomedical Reports* 5 (4): 395–402.

- Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, Gall TM, Giovannetti E, Funel N, Mato Prado M, Krell D, Habib NA, Castellano L, Jiao LR, Stebbing J. 2015. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 51: 1389–404.
- Freedman JE, Gerstein M, Mick E, Rozowsky J, Levy D, Kitchen R, Das S, Shah R, Danielson K, Beaulieu L, Navarro FC, Wang Y, Galeev TR, Holman A, Kwong RY, Murthy V, Tanriverdi SE, Koupenova-Zamor M, Mikhalev E, Tanriverdi K. 2016. Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nature Communications* 7: 11106.
- Gbolahan OB, Tong Y, Sehdev A, O'Neil B, Shahda S. 2019. Overall survival of patients with recurrent pancreatic cancer treated with systemic therapy: a retrospective study. *BMC Cancer* 19 (1): 468.
- Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozcenci LA, Vasile E, Leon LG, Pollina LE, Groen A, Falcone A, Danesi R, Campani D, Verheul HM, Boggi U. 2010. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 70: 4528–38.
- Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Dusetti NJ. 2007. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155 and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (41): 16170–5.
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H. 2010. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126 (1): 73-80.
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H. 2010. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126 (1): 73-80.
- Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 509–24.
- Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, Tsongalis GJ, Dufresne M, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. 2010. The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis, *Clinical Chemistry* 56 (7): 1107-18.
- Hansen CN, Ketabi Z, Rosenstjerne MW, Palle C, Boesen HC, Norrild B. 2007. Expression of CPEB, GAPDH and U6 snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development. *APMIS* 117 (1): 53–9.
- Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC. 2010. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 3: 109–13.
- Hong TH, Park IY. 2014. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Ann Surg Treat Res* 87 (6): 290–297.
- Huang C, Li H, Wu W, Jiang T, Qiu Z. 2013. Regulation of miR-155 affects pancreatic cancer cell invasiveness and migration by modulating the STAT3 signaling pathway through SOCS1. *Oncol Rep* 30 (3): 1223-30.
- Huang F, Tang J, Zhuang X, Zhuang Y, Cheng W, Chen W, Yao H, Zhang S. 2014. MiR-196a promotes pancreatic cancer progression by targeting nuclear factor kappa-B-inhibitor alpha. *PloS One* 9 (2): e87897.
- Huang J, Liu J, Chen-Xiao K, Zhang X, Lee WN, Go VL, Xiao GG. 2016. Advance in microRNA as a potential biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Biomarker Research* 4: 20.
- Huang L, Jansen L, Balavarca Y, Babaei M, van der Geest L, Lemmens V, Van Eycken L, De Schutter H, Johannesen T. B, Primic-Žakelj M, Zadnik V, Besselink MG, Schrotz-King P, Brenner H. 2018. Stratified survival of resected and overall pancreatic cancer patients in Europe and the USA in the early twenty-first century: a large, international population-based study. *BMC Medicine* 16 (1): 125.
- Huang X, Lv W, Zhang JH, Lu DL. 2014. miR-96 functions as a tumor suppressor gene by targeting NUA1 in pancreatic cancer. *Int J Mol Med* 34 (6): 1599-605.
- Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim SW, Del Chiaro M, Peters GJ, Giaccone G. 2010. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PloS One* 5 (5): e10630.

- Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA. 2012. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 18 (2): 534-45.
- Jing W, Zhu G, Hu X, Jing G, Shao C, Zhou Y, He T, Zhang Y. 2013. Distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection for the treatment of locally advanced pancreatic body and tail cancer. *Hepatogastroenterology* 60 (121): 187-90.
- Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. 2015. Human Argonaute 2 Has diverse reaction pathways on Target RNAs. *Mol Cell* 59: 117-24.
- Jonas S, Izaurralde E. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16: 421-33.
- Kadera BE, Li L, Toste PA, Wu N, Adams C, Dawson DW, Donahue TR. 2013. MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PLoS One* 8 (8): e71978.
- Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 4 (9): e252.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5): 843-54.
- Lemberger M, Loewenstein S, Lubezky N, Nizri E, Pasmanik-Chor M, Barazovsky E, Klausner JM, Lahat G. 2019. MicroRNA profiling of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) reveals signature expression related to lymph node metastasis. *Oncotarget* 10 (27): 2644-56.
- Li C, Du X, Tai S, Zhong X, Wang Z, Hu Z, Zhang L, Kang P, Ji D, Jiang X, Zhou Q, Wan M, Jiang G, Cui Y. 2014. GPC1 regulated by miR-96-5p, rather than miR-182-5p, in inhibition of pancreatic carcinoma cell proliferation. *International Journal Of Molecular Sciences* 15 (4): 6314-27.
- Liang L, Wei DM, Li JJ, Luo DZ, Chen G, Dang YW, Cai XY. 2018. Prognostic microRNAs and their potential molecular mechanism in pancreatic cancer: A study based on The Cancer Genome Atlas and bioinformatics investigation. *Molecular medicine reports* 17: 939-51.
- Liffers S, Munding J, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, Nambiar S, Maghnooj A, Mirmohammadsadegh A, Hahn SA, Tannapfel A. 2011. MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Lab Invest* 91: 1472-79.
- Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wan W, Kong X. 2012. Combination of plasma microRNAs with serum CA19- 9 for early detection of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 131: 683-91.
- Liu M, Du Y, Gao J, Liu J, Kong X, Gong Y, Li Z, Wu H, Chen H. 2013. Aberrant expression miR-196a is associated with abnormal apoptosis, invasion and proliferation of pancreatic cancer cells. *Pancrea*. 42 (7): 1169-81.
- Lou G, Ma N, Xu Y, Jiang L, Yang J, Wang C, Jiao Y, Gao X. 2015. "Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification". *International Journal of Molecular Medicine* 36 (5): 1400-8.
- Lu YC, Chang JT, Chan EC, Chao YK, Yeh TS, Chen JS, Cheng AJ. 2016. miR-196, an Emerging Cancer Biomarker for Digestive Tract Cancers. *Journal of Cancer* 7 (6): 650-5.
- Ma MZ, Kong X, Weng MZ, Cheng K, Gong W, Quan ZW, Peng CH. 2013. Candidate microRNA biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: meta-analysis, experimental validation and clinical significance. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 32 (1): 71.
- Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Xu W, Ji S, Zhang B, Ni Q, Xu J, Yu X. 2017. Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotargets and Therapy* 10: 4591-98.
- Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, Asaoka T, Noda T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Mori M, Doki Y. 2017. MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Scientific reports* 7: 42339.

- Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Nabae T, Takahata S, Toma H, Nagai E, Tanaka M. 2009. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 8: 1067-74.
- Munding JB, Adai AT, Maghnoij A, Urbanik A, Zöllner H, Liffers ST, Chromik AM, Uhl W, Szafranska-Schwarzbach AE, Tannapfel A, Hahn SA. 2012. Global microRNA expression profiling of microdissected tissues identifies miR-135b as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 131: E86-E95.
- Nagao Y, Hisaoka M, Matsuyama A, Kanemitsu S, Hamada T, Fukuyama T, Nakano R, Uchiyama A, Kawamoto M, Yamaguchi K, Hashimoto H. 2012. Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCD4 and TIMP3, in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 25: 112–21.
- Negoi I, Hostiuc S, Sartelli M, Negoi RI, Beuran M. 2017. MicroRNA-21 as a prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer - A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg* 214: 515–24.
- Novotvary 2016. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha. ISSN: 1210-857X, (0862-576X, 0862-5778)
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions and Circulation. *Front Endocrinol* 9: 402.
- Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, Lyberopoulou A, Lykoudis PM, Polymeneas G, Voros D. 2013. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas* 42: 67–71.
- Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, Lyberopoulou A, Lykoudis PM, Polymeneas G, Voros D. 2013. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas* 42: 67–71.
- Peltier HJ, Latham GJ. 2008. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14 (5): 844–52.
- Peng L, Liu Z, Xiao J, Tu Y, Wan Z, Xiong H, Li Y, Xiao W. 2017. MicroRNA-148a suppresses epithelial-mesenchymal transition and invasion of pancreatic cancer cells by targeting Wnt10b and inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Reports* 38 (1): 301-8.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 45e–45.
- Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. 2013. The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Current Molecular Medicine* 13 (3): 340–51.
- Qi L, Bart J, Tan L. P, Platteel I, Sluis T, Huitema S, Harms G, Fu L, Hollema H, Berg A. 2009. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer* 9: 163.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res* 74: 2913–21.
- Shi Xh, Li X, Zhang H, He Rz, Zhao Y, Zhou M. 2018. A Five-microRNA Signature for Survival Prognosis in Pancreatic Adenocarcinoma based on TCGA Data. *Sci Rep* 16: 7638.
- Shirai Y, Shiba H, Horiuchi T, Saito N, Furukawa K, Sakamoto T, Gocho T, Ishida Y, Yanaga K. 2016. Assessment of Outcome After Pancreaticoduodenectomy by Junior Surgeons. *Anticancer Res* 36 (7): 3505-10.
- Schultz NA, Andersen KK, Roslind A, Willenbrock H, Wøjdemann M, Johansen JS. 2012 Prognostic MicroRNAs in Cancer Tissue from Patients Operated for Pancreatic Cancer-Five MicroRNAs in a Prognostic Index. *World J Surg* 36: 2699–707.
- Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. 2015. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 61 (11): 1333–42.
- Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P. 2013. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol Ther* 21 (5): 986–94.

- Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoij A, Labourier E, Hahn SA. 2007. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adeno-carcinoma. *Oncogene* 26: 4442–52.
- Takikawa T, Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Kogure T, Shimosegawa T. 2017. Exosomes Derived From Pancreatic Stellate Cells: MicroRNA Signature and Effects on Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* 46 (1): 19-27.
- Vidigal JA, Ventura A. 2015. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 25 (3): 137–47.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* 378 (9791): 607–20.
- Vychytilova-Faltejskova P, Kiss I, Klusova S, Hlavsa J, Prochazka V, Kala Z, Mazanec J, Hausnerova J, Kren L, Hermanova M, Lenz J, Karasek P, Vyzula R, Slaby O. 2015. MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Diagnostic Pathology* 10: 38.
- Wald P, Liu XS, Pettit C, Dillhoff M, Manilchuk A, Schmidt C, Wuthrick E, Chen W, Williams TM. 2017. Prognostic value of microRNA expression levels in pancreatic adenocarcinoma: a review of the literature. *Oncotarget* 8 (42): 73345–61.
- Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. 2009. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prevention Research* 2 (9): 807–13.
- Wang J, Raimondo M, Guha S, Chen J, Diao L, Dong X, Wallace MB, Killary AM, Frazier ML, Woodward TA, Wang J, Sen S. 2014. Circulating microRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer. *J Cancer* 5 (8): 696-705.
- Wei X, Wang W, Wang L, Zhang Y, Zhang X, Chen M, Wang F, Yu J, Ma Y, Sun G. 2016. MicroRNA-21 induces 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer cells by regulating PTEN and PDCD4. *Cancer medicine* 5 (4): 693–702.
- Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, Hodgins MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ. 2006. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg* 10 (9): 1199-210
- Wu L, Qiu W, Sun J. 2018. Down regulation of miR-148a is related to enhanced pancreatic cancer pathogenesis through targeting GLUT1. *Int J Clin Exp Pathol* 11 (10): 4950–6.
- Yang Z, Zhao N, Cui J, Wu H, Xiong J, Peng T. 2020. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210. *Cell Oncol* 43 (1): 123-36.
- You L, Wang J, Zhang F, Zhang J, Tao H, Zheng X, Hu Y. 2019. Potential four-miRNA signature associated with T stage and prognosis of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma identified by co-expression analysis. *Molecular medicine reports* 19: 441–51.
- Yu Q, Xu C, Yuan W, Wang C, Zhao P, Chen L, Ma J. 2017. Evaluation of Plasma MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma: miR-196a and miR-210 Could Be Negative and Positive Prognostic Markers, Respectively. *BioMed Research International* 6495867.
- Yu S, Lu Z, Liu C, Meng Y, Ma Y, Zhao W, Liu J, Yu J, Chen J. 2010. miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70 (14): 6015-25.
- Yu SN, Ma YH, Zhao WG, Jin XL, Yang HY, Liu PP, Chen J. 2016. KRAS-related noncoding RNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chronic Diseases And Translational Medicine* 2 (4): 215–22.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting and function. *Genomics, Proteomics And Bioinformatics* 13 (1): 17–24.
- Zhang L, Yao J, Li W, Zhang C. 2018. Micro-RNA-21 Regulates Cancer-Associated Fibroblast-Mediated Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Oncol Res* 26 (6): 827-35.
- Zhang R, Li M, Zang W, Chen X, Wang Y, Li P, Du Y, Zhao G, Li L. 2014. MiR-148a regulates the growth and apoptosis in pancreatic cancer by targeting CCKBR and Bcl-2. *Tumour Biol* 35: 837–44.

- Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C. 2009. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 33 (4): 698-709.
- Zhao G, Zhang JG, Liu Y, Qin Q, Wang B, Tian K, Liu L, Li X, Niu Y, Deng SC, Wang CY. 2013. miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPK α 1. *Mol Cancer Ther* 12 (1): 83-93.
- Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, Ma YH, Gu YM, Chen J. 2010. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* 31 (10): 1726–33.
- Zhou X, Huang Z, Xu L, Zhu M, Zhang L, Zhang H, Wang X, Li H, Zhu W, Shu Y, Liu P. 2016. A panel of 13-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in pancreatic cancer. *Oncotarget* 7: 69616-24.
- Zhu W, Xu B. 2014. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PLoS One* 9 (8): e103373.

