

Univerzita Karlova v Praze

1.lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



1. LÉKAŘSKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

MUDr. Pavel Hrabák

Biomarkery u karcinomu pankreatu

Biomarkers in pancreatic cancer

Disertační práce

Školitelka: prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D.

Konzultant: doc. MUDr. Tomáš Krechler, CSc.

Praha, 18.6. 2024

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 dne 18.6. 2024

Pavel Hrabák

Identifikační záznam:

Pavel Hrabák, Biomarkery u karcinomu pankreatu (Biomarkers in pancreatic cancer), Praha
2024. 119 s., 3 přílohy, Disertační práce (PhD.) Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská
fakulta, vedoucí práce Kalousová Marta

1. Abstrakt

Karcinom pankreatu (PDAC) je závažnou malignitou se stoupající incidencí. Většina pacientů je diagnostikována v pokročilých stádiích onemocnění. Nejužívanější parametr CA19-9 nemá dostatečnou efektivitu v diagnostice časných forem PDAC či pro screening. Vzhledem k poznatkům o interakcích mezi extracelulární matrix (ECM), buňkami nádorového stroma a buňkami PDAC, se slibným cílem výzkumu jeví pankreatické stelátní buňky. Tyto buňky produkují většinu ECM pankreatického tumoru a akumulují retinol.

Cílem disertační práce bylo analýzou širokého spektra parametrů popsat cirkulující biomarker nebo jejich panel, který by dokázal odlišit nemetastazující PDAC od pacientů s diabetem 2. typu (T2DM), chronické pankreatitidy (ChP) a zdravých kontrol. Dalším cílem bylo v tomto souboru pacientů změřit hladiny retinolu a ATRA a určit jejich význam.

U celkem 220 pacientů s PDAC, ChP, T2DM a u zdravých kontrol jsme stanovovali různými biochemickými metodami, především imunochemicky metodou ELISA koncentrace řady speciálních a běžně vyšetřovaných parametrů. Na základě rozdílů mezi jednotlivými skupinami jsme definovali panely biomarkerů, jejichž efektivitu jsme porovnávali s CA19-9. Dále jsme pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí stanovili v těchto skupinách koncentrace retinolu a ATRA.

Výsledkem práce jsou panely biomarkerů, které zlepšují efektivitu CA19-9 nebo tento marker zcela nahrazují. Panel „CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3a, HSP27“ detekuje PDAC mezi T2DM, panel „S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3a“ odliší PDAC od ChP, panel „MMP-7, Reg3a, sICAM1, OPG, CB, feritin odliší PDAC od zdravých jedinců, panel „CA19-9, S100P-plazma, AAT, albumin, adiponektin, IGF-1, MMP7, S100A11“ odliší PDAC od ostatních. Všechny panely mají vyšší efektivitu než CA 19-9 ($p < 0,05$). Při vyloučení CA19-9 odliší panel „CEA, HbA1c, AST, HDL-cholesterol, prealbumin, SAA, IGF-2, CB“ PDAC od zdravých kontrol lépe nežli v porovnání s CA19-9. Dále jsme prokázali signifikantní pokles hladin retinolu u PDAC v srovnání s ostatními skupinami a pokles koncentrací ATRA u PDAC ve srovnání se zdravými kontrolami a diabetiky.

Výsledky práce dokládají heterogenní biochemické změny doprovázející rozvoj PDAC. Získané panely zlepšují diagnostiku PDAC ve srovnání s CA19-9. Zároveň potvrzují roli

retinoidů v rozvoji PDAC, jakkoli výsledky nepotvrzují jejich využitelnost jako biomarkeru časného PDAC.

Klíčová slova: karcinom pankreatu, chronická pankreatitida, diabetes mellitus 2. typu, retinol, all-trans retinová kyselina, cirkulující biomarkery, pankreatické stelátní buňky, imunoenzymatická analýza (ELISA), HPLC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2. Abstract

Pancreatic cancer (PDAC) is malignancy with increasing incidence. Most of the patients are diagnosed in advanced stages of the disease. Due to its low efficacy CA19-9 is neither useful for identification of early PDAC nor for its screening. There is strong evidence about the relationship between extracellular matrix (ECM), tumour stroma and PDAC cells. Thus, retinol storing pancreatic stellate cells which produce majority of ECM seem to be promising target of the research.

The aim of this work was to analyse to broad spectre of circulating biomarkers and define one or more biomarkers, which can identify PDAC among chronic pancreatitis (ChP), type 2 diabetes mellitus (T2DM) and healthy controls. Another goal was to measure levels of ATRA and retinol in these groups and define their role as a biomarker. We used several methods, mainly ELISA, to measure concentrations of many common and special parameters in 220 patients with PDAC, T2DM, ChP and healthy controls. Based on the differences in concentrations, panels of biomarkers were defined, and their efficacy was compared to CA19-9. We used high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection to determine the serum levels of retinol and ATRA among those groups.

The result of our study are panels of biomarkers which define PDAC among other groups better ($p < 0,05$) than solitary CA19-9. Panel „CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3a, HSP27“ detects PDAC among T2DM, panel „S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3a“ detects PDAC among ChP, panel „MMP-7, Reg3a, sICAM1, OPG, CB, ferritin detects PDAC among controls better that CA 19-9. After exclusion of CA19-9 from the panels, set of markers „CEA, HbA1c, AST, HDL-chol., prealbumin, SAA, IGF-2, total protein“ detects PDAC among healthy controls better than solitary CA19-9.

We also proved significantly lower levels of retinol in PDAC compared to other groups and significant decrease of ATRA levels in PDAC compared to healthy controls and T2DM.

The results confirm heterogenic changes accompanying PDAC. Although not suitable as a diagnostic biomarker of early PDAC, retinol and ATRA seem to have important role in PDAC pathogenesis.

Key words: pancreatic cancer, chronic pancreatitis, type 2 diabetes mellitus, retinol, all trans retinoic acid, circulating biomarkers, pancreatic stellate cells, ELISA, enzyme linked immunosorbent assay, HPLC, high-performance liquid chromatography.

3. Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce prof. MUDr. Martě Kalousové, Ph.D. z Laboratoře pro komplexní výzkum nových biomarkerů Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za výborné odborné vedení, trpělivost a ochotu vést tuto práci svými podněty, připomínkami a radami.

Dále děkuji svému školiteli-konzultantovi doc. MUDr. Tomáši Krechlerovi CSc. za pomoc s realizací práce a za předání cenných rad a zkušenosti z klinické pankreatologie a pokročilé endoskopie.

Dík dále patří prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc, MBA a celému kolektivu spoluautorů publikačních výstupů mého postgraduálního studia. Bez jejich nasazení a pomoci by tato práce nemohla v této podobě vzniknout.

Děkuji rovněž Ing. Miroslavě Zelenkové za neocenitelnou pomoc s některými laboratorními technikami a za cenné poznámky k metodice laboratorních vyšetření.

Stejně tak můj dík patří kolektivu Laboratoře pro komplexní výzkum nových biomarkerů, zejména pak Ditě Hudcové.

Děkuji i Ing. Janu Hrabákovi ml. za jeho trpělivost a nasazení při snaze pomoci mi pochopit principy pokročilých statistických metod.

Můj dík náleží i kolegyním a kolegům ze IV. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, bez jejichž podpory a spolupráce by mé postgraduální studium bylo mnohem obtížnější.

V neposlední řadě pak děkuji svým rodičům za podporu v mém životním směřování, své ženě a dětem pak za trpělivost a podporu, bez níž by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Tato práce vznikla díky podpoře grantů TIP ČR FR-TI3/666, Progres Q25, BBMRI-CZ LM2018125, BBMRI.cz LM2023033, Cooperatio DIAG, Cooperatio INDI, MH CZ-DRO-VFN64165 a projektů Specifického vysokoškolského výzkumu SVV260630 a SVV 260524/2020

Obsah:	strana
1. Abstrakt.....	4
2. Abstract.....	6
3. Poděkování.....	7
4. Seznam zkratk.....	11
5. Karcinom pankreatu - úvod.....	14
5.1. Epidemiologie.....	14
5.2. Etiologie.....	16
5.3. Histologická a molekulární charakteristika.....	17
5.3.1. Histologie.....	17
5.3.2. Molekulární charakteristika.....	17
5.4. Staging.....	18
5.5. Rizikové faktory karcinomu pankreatu.....	19
5.5.1. Chronická pankreatitida jako rizikový faktor rozvoje karcinomu pankreatu.....	20
5.5.2. Diabetes mellitus 2. typu jako rizikový faktor karcinomu pankreatu.....	21
5.5.3. Nově vzniklý diabetes mellitus.....	21
5.6. Pankreatické stelátní buňky, PDAC, T2DM a chronická pankreatitida.....	22
5.6.1. Pankreatické stelátní buňky a diabetes mellitus 2. typu.....	28
5.6.2. Pankreatické stelátní buňky a karcinom pankreatu.....	28
5.6.3. Pankreatické stelátní buňky a chronická pankreatitida.....	31
5.7. Zánět a systémová imunitní odpověď u pacientů s karcinomem pankreatu.....	32
5.7.1. Známky systémového zánětu u karcinomu pankreatu.....	33
5.8. Metabolické důsledky diabetu 2. typu, karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy.....	33

5.9. Vitamin A a all-trans retinová kyselina v patogenezi karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy.....	34
5.10. Diagnostika a screening karcinomu pankreatu.....	37
5.10.1. Zobrazovací metody u karcinomu pankreatu.....	38
5.10.1.1. Abdominální ultrasonografie.....	38
5.10.1.2. Výpočetní tomografie (CT).....	39
5.10.1.3. Magnetická rezonance/ MR-cholangiopankreatikografie (MR/MRCP).....	39
5.10.1.4. Endoskopická ultrasonografie.....	39
5.10.2. Laboratorní parametry u karcinomu pankreatu.....	40
5.10.2.1. Rutinně stanovované parametry.....	40
5.10.2.1.1. Sérová amyláza a lipáza.....	40
5.10.2.1.2. Jaterní testy.....	41
5.10.2.1.3. Lipidy.....	41
5.10.2.2. Známé a potenciální markery karcinomu pankreatu.....	41
5.10.2.2.1. CA19-9.....	42
5.10.2.2.2. Karcinoembryonální antigen.....	43
5.10.2.2.3. CA125.....	43
5.10.2.2.4. Osteopontin.....	43
5.10.2.2.5. Osteoprotegerin (OPG).....	43
5.10.2.2.6. REG proteiny (regenerating proteins).....	44
5.10.2.2.7. S100 proteiny.....	44
5.10.2.2.8. Matrix metaloproteinázy (MMP).....	45
5.10.2.2.9. Trefoil faktory (TTF).....	46
5.10.2.2.10. Růstové faktory.....	46
5.10.2.2.11. Lipidomika.....	47
5.10.2.2.12. Glykoproteomika.....	47
5.10.2.2.13. mikro RNA (miRNA).....	48
5.10.2.2.14. Liquid biopsy -„tekutá biopsie“.....	48
6. Hypotéza a cíle práce.....	50
6.1. Hypotéza.....	50
6.2. Cíle práce.....	50

7. Metodika.....	52
7.1. Soubory pacientů.....	52
7.1.1. Soubory pacientů Studie I: biomarkery u karcinomu pankreatu.....	52
7.1.2. Soubor pacientů Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM.....	53
7.2. Laboratorní metody.....	54
7.2.2. Stanovení koncentrací IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3.....	54
7.2.3. Stanovení sérových koncentrací osteopontinu, TIMP-1, MCP-1, HSP-27, MMP-9 a ICAM-1.....	56
7.2.4. Stanovení sérových koncentrací HSP60 a HSP70.....	58
7.2.5. Stanovení koncentrace MMP7.....	59
7.2.6. Stanovení koncentrací CEACAM-1, DJ-1 a ALCAM.....	61
7.2.7. Další laboratorní parametry.....	62
7.2.8. Stanovení sérových hladin ATRA a retinolu.....	63
7.3. Statistické zpracování.....	64
7.3.2. Statistická analýza Studie I – Biomarkery u karcinomu pankreatu.....	64
7.3.3. Statistické zpracování Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM.....	66
8. Výsledky.....	67
8.1. Studie I: Výsledky	67
8.2. Studie II: Výsledky	76
9. Diskuse.....	80
10. Závěr.....	87
11. Seznam literatury.....	89
12. Seznam publikací autora.....	117
12.1. Publikace, které jsou podkladem disertační práce.....	117
12.2. Publikace, které nejsou podkladem disertační práce.....	117
13. Přílohy.....	119

4. Seznam zkratk:

AAT: α -1-antitrypsin

ADM: acinární duktální metaplázie (acinar to ductal metaplasia)

AJCC: American Joint Committee on Cancer classification

ALCAM: aktivovaná adhezní molekula leukocytů (activated leukocyte cell adhesion molecule)

ALP: alkalická fosfatáza

ALT: alaninaminotransferáza

AMS-P: pankreatická amyláza

ANOVA: analýza rozptylu (analysis of variance)

ApoB: apolipoprotein B

AST: aspartátaminotransferáza

ATRA: kyselina all-trans retinová (all-trans retinoic acid)

AUC: plocha pod křivkou (area under the curve)

BMI: body mass index

CA19-9: carbohydrate antigen 19-9

CA72-4: carbohydrate antigen 72-4

CB: celková bílkovina

CEA: karcinoembryonální antigen

CEACAM: adhezní molekuly asociované s karcinoembryonálním antigenem

CLIA: chemiluminescenční analýza

CRP: C-reaktivní protein

DJ-1: protein deglykláza DJ-1

DM: diabetes mellitus

ECLIA: elektrochemiluminescenční analýza

ECM: extracelulární matrix

EDTA: ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA: imunoenzymatická analýza (enzyme linked immunosorbent assay)

GGT: γ - glutamyltransferáza

Glyk. prot.: glykovaný protein (fruktosamin)

HbA1c: hemoglobin A1c (glykovaný hemoglobin)

HDL: lipoprotein s vysokou hustotou

HRP: křenová peroxidáza (horseradich peroxidase)

HP: hereditární (chronická) pankreatitida

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

HSC: jaterní stelátní buňky (hepatic stellate cells)

HSP: protein teplotního šoku (heat shock protein)

Chol: cholesterol

ChP: chronická pankreatitida

IGF: inzulínu podobný růstový faktor (insuline like growth factor)

IGFBP: protein vázající inzulínu podobný růstový faktor (IGF binding protein)

INS: inzulín

KRAS: produkt genu *KRAS* (Kirsten- rat sarkoma virus oncogene homolog)

LR: logistická regresní analýza

MCP-1: chemotaktický cytokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein -1)

MIC-1: makrofágy inhibující cytokin 1

MMP: matrix metaloproteináza

OPG: osteoprotegerin

PANDER: pankreatický odvozený faktor

PCT: prokalcitonin

PDAC: pankreatický duktální adenokarcinom /karcinom pankreatu;

PPAR: receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem (peroxisome proliferator-activated receptors)

Prealb: prealbumin

PRSSI: gen pro trypsin-1

PSC: pankreatické hvězdicovité (stelátní) buňky (pancreatic stellate cells)

RAR: receptor kyseliny retinové

RBP4: retinol vázající protein 4

REG: regenerating protein

RF: analýza metodou náhodný les (random forest analysis)

RXR: retinoic X receptor

SAA: sérový amyloid A

SD: standard deviation (směrodatná odchylka)

sICAM: solubilní mezibuněčná adhezní molekula (soluble Intercellular Adhesion Molecule)

sRAGE: solubilní receptor konečných produktů pokročilé glykace (soluble receptor for advanced glycation end-products)

T2DM: diabetes mellitus 2. typu

T3cDM: diabetes mellitus typu 3c

TAG: triacylglycerol

TFF1: trefoil faktor

TIMP: tkáňový inhibitor matrixových metaloproteináz

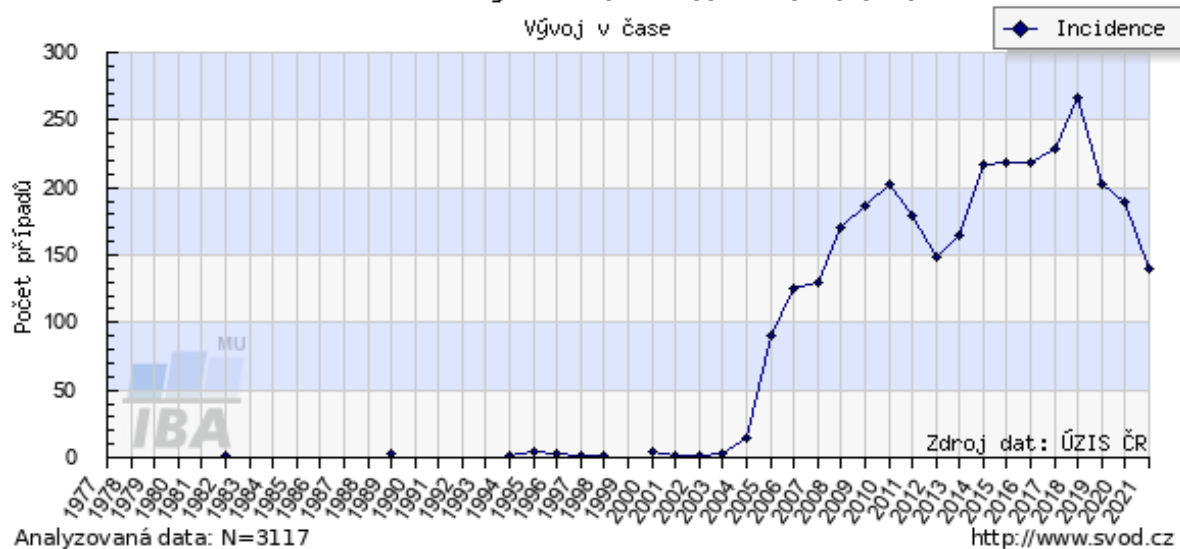
5. Karcinom pankreatu – úvod

Karcinom pankreatu (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) patří mezi nezávažnější onemocnění trávicí soustavy. Je osmou nejčastější příčinou úmrtí na maligní onemocnění celosvětově a jeho incidence v rozvinutých zemích neustále stoupá. (Rahib L. et al., 2021) V současné době je jedinou metodou, která vede k úplnému vyléčení PDAC chirurgická terapie. Podmínkou úspěšné chirurgické léčby je dosažení R0 resekce, tj. odstranění nádoru s dostatečným lemlem zdravé tkáně při nepřítomnosti diseminace onemocnění. Bohužel, u většiny pacientů je v době diagnózy PDAC již v natolik pokročilém stadiu, že je kurativní resekce nemožná.

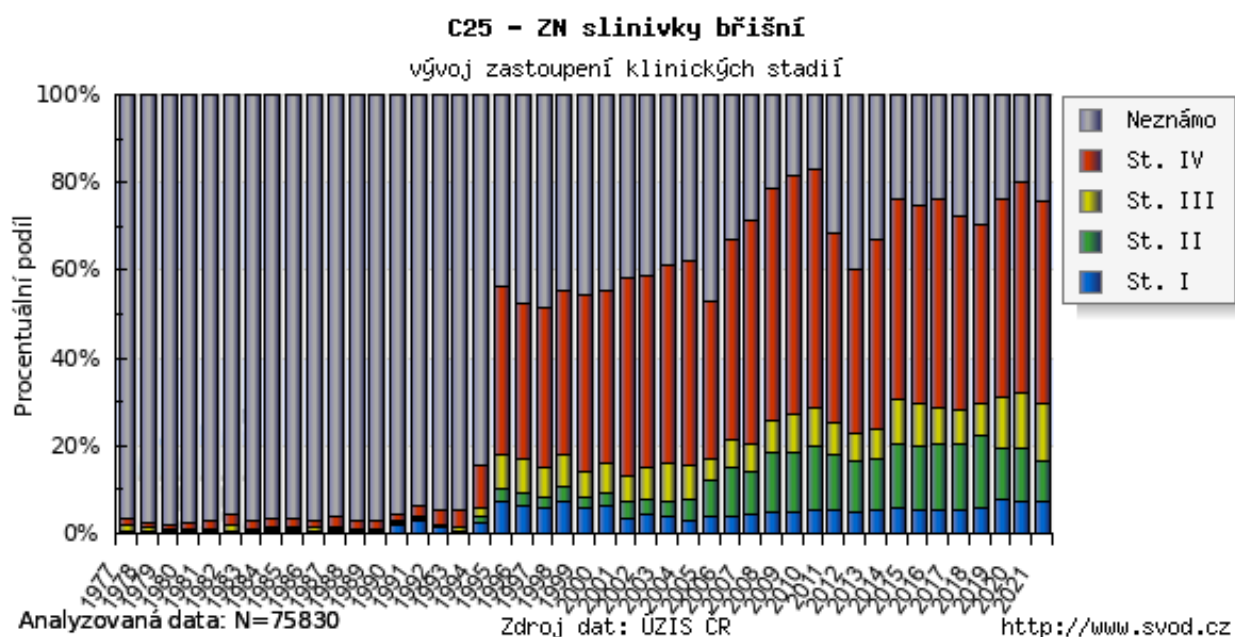
5.1. Epidemiologie

Karcinom pankreatu je celosvětově 8. nejčastější malignitou. Ve srovnání s evropskými státy patří Česká republika, kde v r. 2021 dosahovala incidence 22,9/100 000 osob mezi země s nejvyšším výskytem PDAC. V ČR bylo v letech 2017 -2021 zachyceno ročně průměrně 2 448 nových případů a průměrná mortalita činila 2 236 případů/rok. Maximum výskytu onemocnění je mezi 65. a 79. rokem života. V prvních dvou deceniích života se prakticky neobjevuje, výrazný nárůst incidence je patrný od 60. roku života. Křivka mortality PDAC do značné míry koresponduje s křivkou incidence (mortalita v ČR v roce 2021 činila 22,31/100 000), což PDAC řadí mezi nejzlobnější nádory vůbec. Jednou z hlavních příčin infaustní prognózy většiny pacientů s PDAC je pozdní diagnostika tohoto onemocnění. Jen necelých 20 % pacientů je zachyceno v I. nebo II. stadiu onemocnění. Ve stadiu T1-4 N0-1 M0 dle MKN bylo v ČR v roce 2021 zachyceno jen 277 z 2393 diagnostikovaných případů. (Národní onkologický registr ČR, spravovaný ÚZIS ČR). (Obrázek 1)

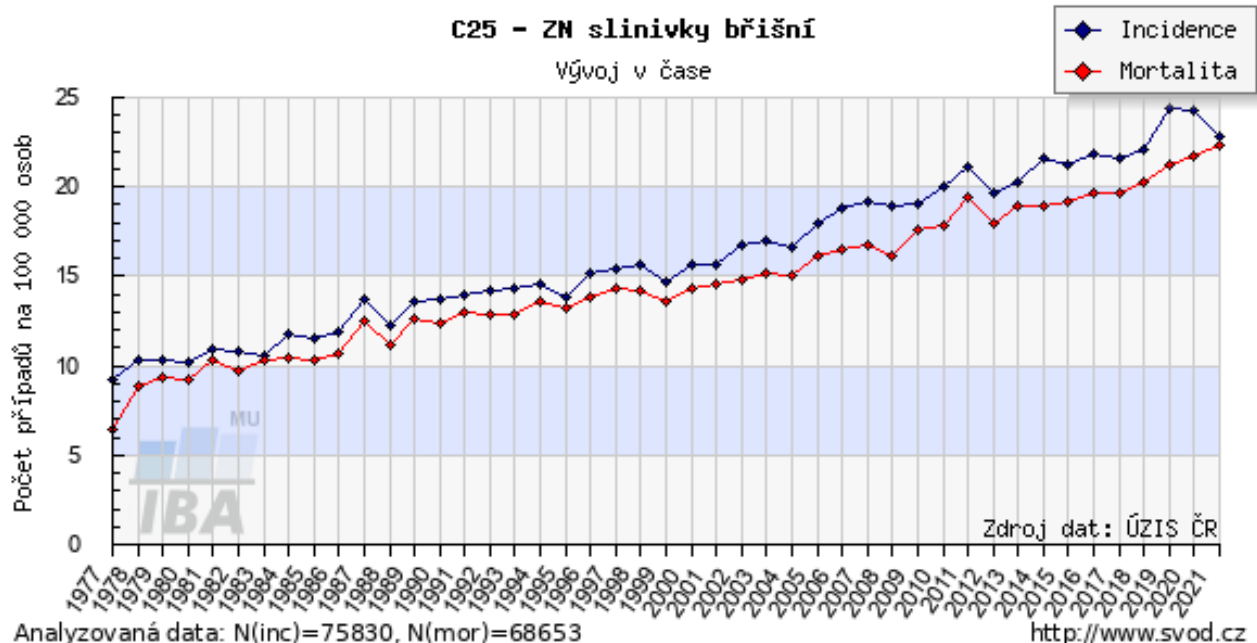
C25 - ZN slinivky břišní, stad.: I+II, N:1, M:0



a/



b/



c/

Obr. 1 a-c: Epidemiologická data karcinomu pankreatu v ČR

a/ incidence stadií I-II karcinomu pankreatu

b/ zastoupení jednotlivých stadií karcinomu pankreatu v čase

c/ vývoj incidence a mortality karcinomu pankreatu

Zdroj: (Dušek L, 2024) (použito se svolením)

5.2. Etiologie

PDAC je onemocnění vznikající obvykle důsledkem akumulace somatických mutací tumor supresorových genů a/nebo onkogenů. Obvykle se jedná o pozvolný mnohastupňový proces. Konsenzuálně se popisují morfologické jednotky, které korelují s akumulací alterovaných mutací. Jejich definice byla ustanovena r. 1999 a publikována v roce 2001. Tento konsensus definoval na základě histomorfologických charakteristik pankreatické intraepitelové neoplázie (PanIN) 1-3, kdy PanIN 1-2 jsou low-grade a PanIN 3 high-grade léze. (Hruban RH. et al., 2001). Toto dělení rovněž reflektuje četnost somatických mutací. V časných stadiích je

nejčastější mutací genu *KRAS*, dále se objevují mutace tumor supresorových genů – *SMAD4*, *Tp53*, *p16*, *BRCA2*, *Her 2/neu*.

Vývoj zdravé tkáně v invazivní karcinom je pravděpodobně poměrně dlouhý (až 10 let), teoreticky tak skýtá možnost časně diagnostiky. Bohužel, v současné době nemáme spolehlivý biomarker či zobrazovací vyšetření schopné detekovat prekursorové léze PDAC.

5.3. Histologická a molekulární charakteristika karcinomu pankreatu

5.3.1. Histologie:

Zhruba 90 % všech karcinomů pankreatu tvoří duktální adenokarcinom, který lze dle histologické charakteristiky blíže klasifikovat jako mucinózní, hepatoidní, adenoskvamózní, medulární, mikropapilární, z buněk pečetního prstenu, sarkomatoidní či anaplastický. (Taherian M. et al., 2022, Mizrahi JD et al., 2020).

Výraznou menšinu pak tvoří acinární karcinom a nádory vycházející z prekursorových cystických lézí – serózní cystadenokarcinom, solidní pseudopapilární karcinom, intraduktální papilární karcinom a mucinózní cystický karcinom. Vliv jednotlivých subtypů PDAC na prognózu není zcela objasněn, některá klinická data však nasvědčují, že karcinomy vycházejících z intraduktální pseudopapilární mucinózní neoplázie (IPMN) či mucinózní cystické neoplázie (MCN) mají lepší prognózu než PDAC. (Furukawa T. et al., 2011, Cros J et al., 2018)

Identifikace medulárního typu PDAC pravděpodobně zasluhuje bližší pozornost, neboť u tohoto typu nádoru bývá přítomna mutace v opravném systému chybného párování bazí DNA (DNA mismatch repair system) a lze u něho předpokládat efekt imunoterapie. (Di Federico A. et al., 2022)

5.3.2. Molekulární charakteristika

Se současným rozvojem onkologické terapie a díky rozvinutým možnostem molekulární diagnostiky nabývá na významu definování molekulárně genetického profilu malignit. Studie publikovaná r 2015 v Nature (Waddell N. et al., 2015) zkoumající genomické charakteristiky

primárně resekovaných nádorů (n=100) rozlišuje PDAC na 4 základní subtypy v závislosti na množství strukturálních variant detekovaných v genomu

- stabilní: < 50 změn ve struktuře chromozomů
- rozptýlený (scattered): 50-200 změn ve struktuře chromozomů
- lokálně přeskupený (rearranged): >200 změn ve struktuře chromozomů na <3 chromozomech
- nestabilní: >200 změn ve struktuře chromozomů

Toto dělení má i klinický korelát, kdy např. přítomnost genomové nestability a BRCA mutace je asociovaná s efektivitou terapie cis-platinou.

5.4.Staging

Staging PDAC je stanovován na základě TNM klasifikace (AJCC 8. vydání 2017 + WHO 2019). (Tabulka 1)

Primární tumor	TX	Nelze hodnotit
	T0	Bez známek primárního nádoru
	Tis	Carcinoma in situ / PanIn-3
	T1	Nádor omezen na pankreas, vel ≥ 2 cm
	T2	Nádor omezen na pankreas, vel. >2 cm, ale <4 cm
	T3	Nádor >4 cm
	T4	Postižení truncus coeliacus, arteria mesenterica superior nebo arteria hepatica communis
	NX	Nelze hodnotit
	N0	Regionální uzliny bez metastáz

Lymfatické uzliny	N1	Metastázy v maximálně 3 regionálních uzlinách
	N2	Metastázy ve více než 3 lymfatických uzlinách
Metastázy	M0	Nejsou vzdálené metastázy
	M1	Vzdálené metastázy přítomny
Staging/klinické stadium	Stadium 0	TisN0M0
	Stadium IA	T1N0M0
	Stadium IB	T2N0M0
	Stadium IIA	T3N0M0
	Stadium IIB	T1-3N1M0
	Stadium III	T1-4N2M0 T4N0-2 M0
	Stadium IV	T1-4 N0 – 2 M1

Tabulka 1: Staging karcinomu pankreatu (Kang H. et al., 2022)

5.5. Rizikové faktory karcinomu pankreatu

Existuje celá řada rizikových faktorů PDAC. Rozsáhlá metaanalýza 117 studií publikovaná r. 2015 popisuje jako rizikové faktory mj. chronickou pankreatitidu, metabolický syndrom, kouření, diabetes mellitus či rodinnou zátěž. (Lang J. et al., 2021, Maisonneuve P. et al., 2015)

Mezi neovlivnitelné faktory patří zejména věk a genetická dispozice (rodinná zátěž a/nebo vrozená mutace). Známé ovlivnitelné faktory zvyšující riziko PDAC jsou stravovací návyky s převahou příjmu energie nad výdejem ústící v obezitu a metabolický syndrom, kouření a abúzus alkoholu. Alkohol však není pravděpodobně přímým kancerogenem, je ale

etiologickým faktorem chronické pankreatitidy, která prokazatelně zvyšuje riziko vzniku PDAC. (Lucenteforte E. et al., 2012) Jak chronická pankreatitida (ChP), tak diabetes mellitus (DM) mají k PDAC výjimečný vztah.

5.5.1. Chronická pankreatitida jako rizikový faktor rozvoje karcinomu pankreatu

Chronická pankreatitida je chronické progredující onemocnění charakterizované postupnou náhradou funkční exokrinní pankreatické tkáně vazivem následkem čehož dochází ke ztrátě exokrinní a endokrinní funkce. V drtivé většině případů je hlavním etiologickým faktorem ChP v západních zemích chronický abusus ethanolu. U menší části pacientů je chronická pankreatitida následkem autoimunitního procesu, prodělaných akutní pankreatitid či na základě vrozených genetických abnormalit. V rozvinutých zemích je incidence ChP cca 5-12/100 000 obyvatel. V ČR je incidence udávána 7,9/100 000 (Dítě P. et al., 2001). Prevalence ChP je cca 30-50/100 000 obyvatel. (Cohen SM. et al., 2023) Dle metaanalýzy 13 studií se zdá, že u pacientů s ChP je celoživotní riziko PDAC zvýšeno 16x. (Kirkegard J. et al., 2017) Nicméně jen 5 % pacientů s ChP vyvine PDAC. ChP je tedy stále poměrně vzácnou příčinou PDAC. Naproti tomu akutní pankreatitida, která se objeví do dvou let před manifestací PDAC je pravděpodobně první manifestací toho nádorového onemocnění. Naopak jen malá část (5 %) pacientů s PDAC se manifestuje jako akutní pankreatitida. (Munigala S. et al., 2014)

Zvláštní skupinou jsou pak pacienti s hereditární chronickou pankreatitidou (HP). Jedná se o autosomálně dominantní onemocnění s neúplnou penetrancí (cca 80 %). Příčinou jsou mutace genu *PRSS-1*, jehož produktem je kationický trypsinogen. Mutace vede k produkci trypsinogenu, který je náchylnější k intrapancreatické aktivaci. (Girodon E. et al., 2021) Toto onemocnění se manifestuje jako rekurentní akutní pankreatitida již v dětském věku. Riziko rozvoje PDAC u těchto pacientů je cca 70x vyšší než v běžné populaci (v závislosti na typu mutace). Riziko PDAC u těchto pacientů je tedy zhruba 40 %. Současná expozice dalším rizikovým faktorům (zejména kouření) podstatně snižuje věk rozvoje PDAC s HP. Byla popsána celá řada dalších mutací v různých genech (*CFTR*, *SPINK-1*, *CTRC*, *CTRB1/B2...*), které se mohou spolupodílet na rozvoji ChP. Vzhledem k výše uvedenému zvýšenému riziku rozvoje PDAC u HP jsou tito pacienti indikováni k dlouhodobému sledování v rámci programu surveillance PDAC v ČR. (Vaněk P. et al., 2023)

V posledních letech se objevují práce popisující zvýšené riziko PDAC u pacientů s autoimunitní pankreatitidou zejména I. typu. (Kunovský L. et al., 2021, Mačinga P. et al., 2021)

5.5.2. Diabetes mellitus 2. typu jako rizikový faktor karcinomu pankreatu

Protože právě pankreas, resp. jeho endokrinní část, je klíčovým orgánem regulace glukózové homeostázy v organismu, je vztah mezi T2DM a PDAC v mnoha ohledech specifický.

Předně, T2DM je významným rizikovým faktorem rozvoje PDAC. V závislosti na studiích je relativní riziko rozvoje PDAC u diabetiků 1,5-2,0. (Everhart J. et al., 1995) U pacientů, kteří mají současně diabetes i PDAC se ve většině případů projevil diabetes v období kratším než 24 měsíců před diagnózou PDAC. (Pannala R. et al., 2008) Ve studii z r. 2013 byl na 100 pacientech s různými typy nádorových onemocnění diabetes prokázán u 68 % pacientů s PDAC, zatímco u ostatních nádorových onemocnění a u zdravých kontrol nepřesáhla přítomnost diabetu 25%. (Aggarwal G. et al., 2013)

Dosud byla představena řada mechanismů, kterými T2DM riziko PDAC zvyšuje. Předně samotná dlouhodobá hyperglykemie stimuluje řadu procesů, které vedou ke karcinogenezi. Vysoké hladiny krevní glukózy aktivují transforming growth factor-1 (TGF 1), který svou signální dráhou stimuluje epiteliální-mesenchymální přeměnu (epitelial-mesenchymal transition) - iniciální krok v rozvoji PDAC. (Rahn S. et al., 2017) Zvýšená aktivace receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE) u pacientů s T2DM stimuluje růst a metastazování PDAC. (Tesarova P. et al., 2016, Grote VA. et al., 2012) Hyperinzulinémie přítomná u T2DM stimuluje duktální buňky pankreatu aktivací signální dráhy PI3K/Akt/mTOR prostřednictvím inzulínu podobného růstového faktoru (IGF-1). Aktivace této dráhy stimuluje růst a proliferaci buněk PDAC. (Stanciu S. et al., 2022)

5.5.3. Nově vzniklý diabetes mellitus

Specifickou situací u PDAC je přítomnost pankreatogenního diabetu, tzv. T3cDM. Tento termín je vyhrazen pro pacienty, u nichž se diabetes rozvinul v terénu chronické pankreatitidy a pro stav, kdy je DM diagnostikován ne déle než 2 roky před diagnózou PDAC. Jedná se tak tedy o jednotný termín pro skupinu diabetiků, u nichž příčina diabetu tkví v alteraci

pankreatické tkáně, avšak konkrétní patofyziologický proces vedoucí k rozvoji DM může být rozdílný. Označení toho typu diabetu jako T3c pramení z jeho zařazení v tabulce publikované pravidelně americkou pracovní skupinou pro diagnostiku a klasifikaci DM (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003)

Prevalence T3cDM u ChP je zhruba 80 % a u PDAC cca 50 %. (Hart PA. et al., 2016)

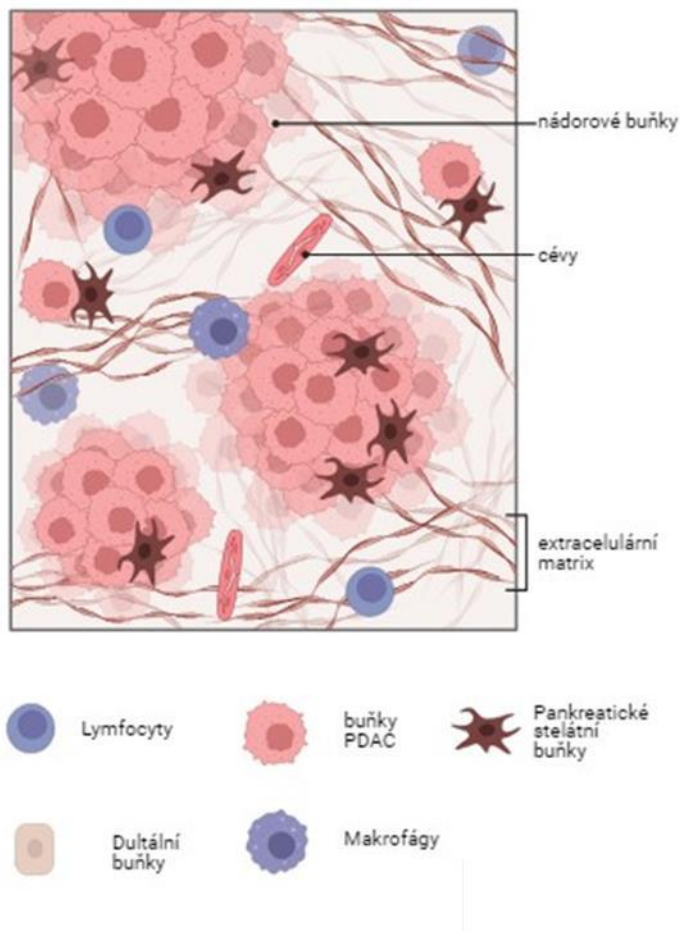
Celkem tvoří T3cDM pravděpodobně 0,5-1 % pacientů s DM. Podle některých autorů však může tvořit až necelých 10 %. (Ewald N. et al., 2012) Zároveň u 0,85 % pacientů s nově diagnostikovaným DM byl prokázán PDAC. (Chari ST. et al., 2005) Lze tedy říci, že dlouhotrvající T2DM zvyšuje riziko rozvoje PDAC, zatímco nově vzniklý DM může u části pacientů být paraneoplastickým projevem této malignity. Odlišit pacienty s T3cDM od T2DM by proto mohlo zvýšit detekci PDAC a racionalizovat tak další diagnostický proces.

Roku 2018 byl představen diagnostický model založený na stanovení rizika PDAC u nově vzniklého DM na základě změny hmotnosti, vývoje glykemií a věku pacienta v době diagnózy (END-PAC). (Sharma A. et al., 2018) Ukazuje se, že zejména anamnéza poklesu hmotnosti v době diagnózy DM je pro pacienty s T3cDM typická (59 % vs 30 % u T2DM). (Hart PA. et al., 2011)

Recentní práce ukazuje na možný přínos biomarkerů – kombinace adiponektinu a interleukinu-1 dokázala statisticky významně odlišit pacienty s T3cDM a T2DM (plocha pod křivkou (area under the curve - AUC) 0,91; 95 % interval spolehlivosti (confidence interval-CI: 0,84-0,99). (Oldfield L. et al., 2021)

5.6. Pankreatické stelátní buňky, PDAC, T2DM a chronická pankreatitida

Samotné buňky PDAC tvoří jen malou část hmoty maligního tumoru. Cca 90 % tumoru tvoří pankreatické stroma – extracelulární matrix, neovaskularizace, imunitní buňky a řada dalších buněk – zejména s nádorem asociované fibroblasty (cancer associated fibroblasts CAF). Vzhledem k nepoměru maligních buněk a zbytku stroma lze předpokládat, že nádorové stroma se bude aktivně podílet na vývoji nádoru, a že interakce mezi organismem, pankreatickým stroma a nádorovými buňkami je potenciálním prostorem pro diagnostiku a terapii PDAC. (Obrázek 2)



Obrázek 2: Stroma PDAC

Většinu hmoty tumoru tvoří v případě PDAC extracelulární matrix. Dále jsou přítomné s nádorem asociované fibroblasty, zejména PSC, makrofágy, lymfocyty a cévy. (vytvořeno ve volné verzi programu BioRender.com)

Zkratky: PDAC: karcinom pankreatu, PSC: pankreatické stelátní buňky

CAF je souhrnný pojem pro skupinu buněk různého původu, které jsou si však podobné svou morfológií, lokalizací a expresí specifických markerů (vimentin, destičkový růstový faktor – platelet derived growth factor (PDGF α)). Zároveň ale nenesou genomové mutace, kterými jsou charakteristické nádorové buňky. Tato absence typických mutací odlišuje CAF i od nádorových buněk, u kterých proběhla tzv. epiteliální-mesenchymální transformace a svým

fenotypem se tak fibroblastům přibližují. Zdrojem CAF mohou být epiteliální buňky, endotelové buňky, hvězdicovité buňky pankreatu (PSC) a rezidentní fibroblasty pankreatu. (Sperb N. et al., 2020, Sahai E. et al., 2020) CAF zajišťují tvorbu extracelulární matrix a řady cytokinů. Nejvýznamnějším zdrojem CAF jsou v případě karcinomu pankreatu pankreatické stelátní buňky, na jejichž funkci a význam v patofyziologii PDAC se zaměříme v dalších kapitolách. (Neuzillet C. et al., 2019)

Endotelové buňky patří k méně zastoupeným buněčným populacím nádorového stroma. Navzdory silnému angiogennímu působení řady cytokinů, produkovaných PSC neumožňuje výrazná hustota pankreatického stroma efektivní angiogenezi. Vaskularizace PDAC je tedy menší nežli u jiných solidních nádorů, což se významně uplatňuje zejména v chemorezistenci PDAC. (Longo V. et al., 2016)

Buňky imunitního systému se významně podílejí na rozvoji PDAC. PDAC je charakterizován snížením počtu cytotoxických T-lymfocytů, které by za fyziologických okolností nádorové buňky likvidovaly. Působení T lymfocytů je rovněž potlačováno působením myeloidních supresorových buněk a makrofágů. (Li KY. et al., 2020)

Extracelulární matrix (ECM) tvoří nebuněčnou složku masy PDAC. ECM má zásadní patofyziologickou úlohu v rozvoji PDAC. Stejně jako v za fyziologických podmínek ve zdravých orgánech je klíčovým prvkem mezibuněčné komunikace, neboť svou strukturou a napojením na buněčné receptory vytváří prostorovou komunikační síť. Nadto svou strukturou zajišťuje stabilitu tumorózní masy. (Weniger M. et al., 2018)

Nejvíce zastoupenou složkou ECM je kolagen. V případě PDAC je typické výrazné zastoupení kolagenu I, jehož koncentrace je rovněž negativně korelována s délkou přežití. (Whatcott CJ. et al., 2015) Přítomnost kolagenu pravděpodobně usnadňuje migraci maligních buněk. Nádorové prostředí je vzhledem k defektní vaskularizaci relativně chudé na živiny. V tomto terénu slouží kolagen pravděpodobně jako zdroj energie nádorovým buňkám. (Olivares O. et al., 2017) Kolagen je důležitou komunikační složkou ECM. Hraje roli signální molekuly, případně ligandu integrinových receptorů buněk PDAC. (Ohlund D. et al., 2013) Vyšší denzita pankreatického stromatu způsobená depozicí ECM je rovněž nepříznivým faktorem negativně ovlivňujícím přežití pacientů s PDAC. (Laklai H. et al., 2016)

Nabízí se otázka, jak v terénu prakticky neproniknutelné masy ECM, která obklopuje maligní buňky PDAC, může docházet tak rychle k šíření maligních buněk a k jejich

metastazování. Klíčem k dílčí odpovědi na tuto otázku je oboustranný vztah mezi ECM a buňkami PDAC. V případě ECM se jedná o regulaci rovnováhy mezi metaloproteinázami, které dokáží rozkládat všechny složky ECM, a tkáňovými inhibitory metaloproteináz (tissue inhibitors of metalloproteinases -TIMPs). (Bonnans C. et al., 2014)

Na význam proteoglykanů a glykoproteinů by bylo možné usuzovat již z faktu, že zatím nejužívanější marker PDAC – CA19-9 je strukturálně glykoproteinem. Obecně se jedná o proteiny, které podstoupily sekundární glykosylaci. Ta však bývá v nádorovém prostředí často aberantní. (Pan S. et al., 2016) Pro PDAC je typické zastoupené galektinu 1 a fibronektinu, glykoproteinů, které se podílejí na chemorezistenci, invazivitě a proliferaci PDAC. (Miyamoto H. et al., 2004)

Nejvýznamnějším producentem ECM u PDAC jsou tzv hvězdicovité nebo též stelátní buňky pankreatu (pancreatic stellate cells – PSC). Tyto buňky byly popsány roku 1876 Kupfferem, který je pozoroval v jaterních perisinusoidálních prostorech. Považoval však tyto buňky za fagocyty. (von Kupffer, 1876) V dalších desetiletích byla zjištěna jejich schopnost ukládat vitamin A. Ve druhé polovině 20.století autoři Wake, Suzuki a Ito charakterizovali v řadě prací morfologii těchto buněk a dalším výzkumem byla odhalena jejich klíčová role v patogenezi jaterní fibrózy. Název „jaterní hvězdicovité buňky“, založený na charakteristickém tvaru těchto elementů, se ustálil v 90.letech 20. století.

Překvapivě nebyla podobná pozornost věnována pankreatickým stelátním buňkám, které byly popsány až roku 1982(!) – tedy více než 100 let po Kupfferově iniciálním objevu. (Watari N. et al., 1982) V roce 1998 byla vyvinuta metoda izolace PSC, která umožnila jejich další studium. Za fyziologických podmínek tvoří PSC zhruba 7 % pankreatické tkáně, kde se nacházejí jak v exokrinní, tak v endokrinní části pankreatu. Jejich ontogenetický původ je nejasný, předpokládá se, že jsou mesenchymálního původu. (Asahina K. et al., 2009)

PSC obklopují malé pankreatické vývody a cévy, kde jsou typicky přítomné na bazolaterální straně acinárních buněk. Na základě přítomnosti specifických proteinů (vimentin, desmin, neurální růstový faktor, synemin a nestin) je lze identifikovat imunohistochemickými metodami. (Apte MV. et al., 1998)

Jsou-li vystaveny UV záření o vlnové délce 328nm, jsou PSC charakteristické svou fluorescencí. Tento jev je způsobem akumulací vitaminu A ve vakuolách PSC.

Funkce PSC se mění v závislosti na jejich lokalizaci a aktivaci. PSC nacházíme v pankreatu v aktivní nebo neaktivní formě. Neaktivní PSC obsahují množství vitamínu A ve vakuolách, exprimují desmin, gliový fibrilární kyselý protein (glial fibrillary acidic protein - GFAP), který je pro PSC specifický, a dále nestin a vimentin. Proliferační a migrační schopnost těchto buněk je výrazně omezená. Tyto buňky se nacházejí v blízkosti bazolaterálního pólu acinárních buněk nebo v blízkosti cév a díky tvorbě malého množství metaloproteináz a jejich inhibitorů se podílejí na udržování homeostázy extracelulární matrix. (Apte MV. et al., 1998, Ding Y. et al., 2008)

Po aktivaci se fenotyp PSC dramaticky mění. Svým charakterem se podobají myofibroblastům, exprimují rozličné proteiny – např desmin, α -hladkosvalový aktin (α -smooth muscle actin - SMA (čímž se odlišují od pravých fibroblastů), kolagen I a III, různé metaloproteinázy a jejich inhibitory, dále fibronectin a kadherin 11. (Masamune A. et al., 2002) Rovněž ztrácí vakuoly s vitamínem A. Aktivované PSC mají vřetenovitý tvar a získávají řadu schopností, jejichž hlavním účelem je reparace poškozené pankreatické tkáně. Toho dosahují výraznou produkcí extracelulární matrix, kterou nahrazují zničené buňky pankreatu. Za fyziologických okolností je tento proces omezen na místo poškození. Za patologických stavů, jakým je třeba chronická pankreatitida nebo PDAC není tento proces dostatečně limitován a nevyhnutelně vyústí ve fibrózu pankreatické tkáně a ztrátě funkcí pankreatického parenchymu. Tento proces je navíc udržován autoaktivací pankreatických buněk řadou cytokinů, které samy produkují. Zdá se, že aktivace PSC je jednou z klíčových událostí, které vedou k tvorbě specifického mikroprostředí a k progresi jak chronické pankreatitidy, tak zejména PDAC. Je to tedy rovněž právě specifické prostředí nádorového stroma, které se významně podílí na rychlém šíření metastazování a chemorezistenci PDAC. (Hrabák P. et al., 2021)

Mechanismů, které vedou k (auto)aktivaci PSC je celá řada. Není náhodou, že valnou většinu cytokinů, o kterých soudíme, že aktivují PSC, produkují právě tyto buňky. Tento fakt jen potvrzuje klíčovou úlohu těchto buněk v regulaci extracelulární matrix. (Jin G. et al., 2020) Mezi tyto cytokiny patří především transforming growth factor β 1 (TGF β 1), který pomocí kaskády MAPK/ERK/JNK vede k transformaci neaktivních PSC v jejich aktivovanou formu. (Xu XF. et al., 2018, Fitzner B. et al., 2004). Někteří autoři uvádějí, že právě tento cytokin je důležitým patofyziologickým prvkem, který se podílí na excesivní fibróze u pacientů s chronickou pankreatitidou. (Sarper M., et al., 2016) Pozoruhodný je pak vztah mezi ATRA a

TGFβ1. ATRA brání tvorbě komplexů mezi TGFβ1a jeho vázajícím proteinem (TGFβ1-binding protein) a tedy jeho uvolňování z buněk.

Dalšími cytokiny podílejícími se na aktivaci PSC jsou z destiček odvozený růstový faktor (platelet-derived growth factor – PDGF) či Yes-asociovaný protein (YAP). Tento protein je zmiňován v souvislosti s řadou nádorových onemocnění, kde hraje roli v regulaci proliferace a apoptózy. YAP interaguje se signální drahou SMAD, která má významnou roli v aktivaci PSC. (Lin H. et al., 2021)

PDGF je v pankreatické tkáni vytvářen zejména makrofágy a za patologických okolností i nádorovými buňkami PDAC. Jeho zdrojem jsou ovšem i krevní destičky, které se v případě poškození tkáně – k jakému dochází například u akutní pankreatitidy, akumulují v zánětlivé postižených okřscích pankreatu, kde pomocí PDGF stimulují tvorbu ECM právě prostřednictvím aktivace PSC. Produkce PDGF je nicméně rovněž zvýšena u chronické pankreatitidy. (Luttenberger T. et al., 2000, Ebert MP. et al., 1998, Gress, T. et al., 1994)

Hypoxie je dalším faktorem, který stimuluje aktivaci PSC. Tento faktor je významný zejména proto, že k hypoxii dochází často právě vlivem excesivní produkce ECM. PSC jsou aktivovány mimo jiné i hypoxií indukovaným faktorem-1 (hypoxia inducible factor -1), který je zvýšeně exprimován za hypoxických podmínek, které se vyskytují například právě v nádorovém stroma. (Ide T. et al., 2006)

PSC mohou pravděpodobně být stimulovány i mechanicky. Asaumi et al. prokázali, že jsou-li vystaveny zvýšenému vnějšímu tlaku, produkují PSC více ECM. Autoři tak cíleně simulovali prostředí zvýšeného tlaku v terénu edému doprovázejícího zánětlivé afekce pankreatické tkáně. (Asaumi H. et al., 2007, Apte MV. et al., 2000)

Vzhledem ke známému vztahu alkoholu a chronické i akutní pankreatitidy není překvapením, že lze nalézt vztah mezi ethanolem a PSC. Alkohol aktivuje PSC několika různými způsoby. Stěžejním mechanismem je pravděpodobně vliv acetaldehydu (PSC obsahují alkoholdehydrogenázu) a nepřímý vliv alkoholu prostřednictvím oxidativního stresu, který vzniká v prostředí alkoholem indukované pankreatitidy. Ethanol a acetaldehyd spouštějí MAPK-kinázovou dráhu, která se na aktivaci PSC podílí. Dalším nepřímým mechanismem aktivace PSC je pravděpodobně jejich aktivace prostřednictvím toll-like receptorů. Tyto receptory reagují na lipopolysacharidy a endotoxiny, které se dostávají do organismu při

zvýšené propustnosti intestinální bariéry obvyklé u abúzu alkoholu. (Vonlaufen A. et al., 2007, McCarroll JA. et al., 2003)

Regulace buněčných dějů pomocí Ca^{2+} je univerzálním mechanismem sdíleným napříč celým organismem. Na rozdíl od acinárních buněk, u PSC nedochází v reakci na acetylcholin nebo cholecystokinin ke vzestupu intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Reagují naopak na bradykinin (PSC exprimují receptor pro bradykinin typ 2), jehož hladiny se zvyšují například při (alkoholem indukované) akutní pankreatitidě. (Gryschenko O. et al., 2016)

5.6.1. Pankreatické stelátní buňky a diabetes mellitus 2. typu

PSC exprimují receptory pro glukózu GluT 1-3 a reagují tedy na zvýšené hladiny krevní glukózy svou aktivací a proliferací. (Kiss K. et al., 2015)

T2DM je s metabolismem PSC úzce svázán vzájemnými vztahy. Předně, aktivace PSC, ke které dochází v prostředí T2DM prostřednictvím mj. i renin-angiotensin-aldosteronovým systémem vedoucím k syntéze TGF β , vede k fibróze pankreatických ostrůvků. Tento stav je akcentován v situaci, kdy v prostředí ostrůvků pankreatu jsou PSC pacientů s T2DM vystavovány vysokým hladinám glukózy a inzulinu. (Yang J. et al., 2020)

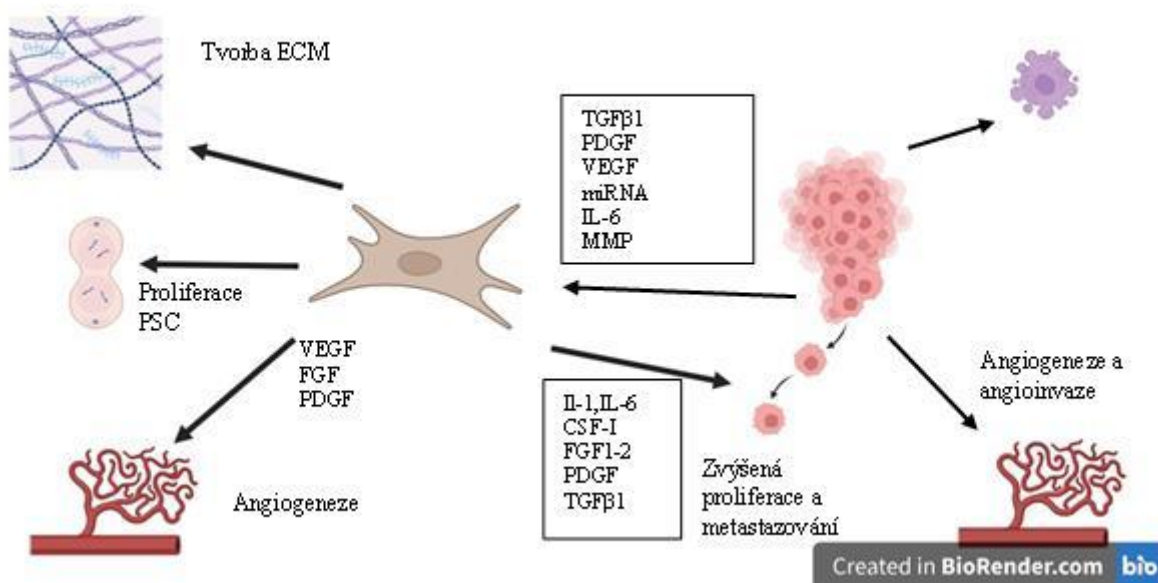
Chronická hyperglykemie vede k diferenciaci v myofibroblasty připomínající fenotyp pomocí signální dráhy svázané s p38 MAP-kinázou. Pravděpodobně zvýšená spotřeba kyslíku vysoce aktivními β -buňkami pankreatických ostrůvků zapříčiňuje relativní hypoxii PSC, která výše popsanými mechanismy rovněž přispívá k jejich zvýšené aktivitě. Zajímavý je fakt, že i hypovitaminóza A vede k aktivaci PSC. Tento proces lze zmírnit suplementací toho vitamínu. (Kiss K. et al., 2015, Zhou Y. et al., 2020)

5.6.2. Pankreatické stelátní buňky a karcinom pankreatu

PSC tvoří za fyziologických podmínek jen cca 5 % pankreatické tkáně, ale tvoří cca 50 % stroma PDAC, které samo o sobě tvoří až 90 % hmoty tohoto zhoubného nádoru. (Farran B. et al., 2019) PDAC je typický masivní desmoplastickou reakcí, které se zúčastní celá řada různých buněk, mimo jiné i PSC. Výzkum posledních let, který se stále více zaměřuje na interakci mezi pankreatickým stroma, organismem a nádorovými buňkami, odhaluje důležitou

roli PSC v patogenezi PDAC. Pochopení těchto vztahů může vést k odhalení potenciálně účinné terapie tohoto onemocnění.

Zkoumáním vztahu mezi PCS a PDAC jak „in vivo“ tak „in vitro“ bylo zjištěno, že aktivované PSC ovlivňují řadu procesů, například angioneogenezi, produkci extracelulární matrix, růst a invazi PDAC stejně tak jako jeho chemorezistenci. Vztah PDAC a PSC je oboustranný. PCS usnadňují migraci buněk PDAC i jejich diferenciaci, naopak nádorové buňky ovlivňují aktivaci PSC, jejich migraci i proliferaci a produkci ECM. (Obrázek 3)



Obrázek 3: Vztahy mezi PSC a buňkami PDAC

PSC prostřednictvím řady cytokinů stimuluji proliferaci a šíření buněk PDAC. PSC spolu s buňkami PDAC stimuluji angioneogenezi. Buňky PDAC naopak aktivují PSC, stimuluji jejich proliferaci. (vytvořeno ve volné verzi programu BioRender.com)

Zkratky : ECM: extracelulární matrix, VEGF : vaskulární endoteliální růstový factor, FGF: fibroblastový růstový factor, CSF: kolonie stimující factor, PDGF: destičkový růstový factor, TGF: transformující růstový factor, MMP: matrixová metaloproteináza, IL – interleukin, miRNA – mikro ribonukleová kyselina

Aktivace PCS v nádorovém stroma je stimulována např. interleukiny IL-1, IL-6, kolonie stimujícími faktorem I (CFS-I), destičkovým růstovým faktorem (PDGF – platelet derived growth factor), TGFβ1, fibroblastovým růstovým faktorem (FGF). (Carter EP. et al., 2021)

Posledně jmenovaný faktor, přítomný v řadě jiných tkání, je součástí signálních drah vedoucí k proliferaci a diferenciaci buněk, FGF 1 a 2 jsou v prostředí PDAC přítomny ve vyšších koncentracích než ve zdravém pankreatu. FGF 1 a 2 pravděpodobně ovlivňuje i diferenciaci PDAC. FGF produkovaný PSC indukuje tvorbu TGF β 1 buňkami PDAC, což vede zpětně ke stimulaci PSC. (Kang X. et al., 2019) TGF β 1 je rovněž faktorem, který u PDAC vede k snížení hladin L1-adhezní molekuly (L1CAM) což vede k agresivnějšímu fenotypu PDAC. Tento proces je ale popisován jen u pokročilého PDAC. Překvapivě v časných stádiích PDAC by TGF β 1 mohl mít na PDAC inhibiční účinek. (El-Hariry I. et al., 2001, Cave DD. et al 2020)

Dalším faktorem interakce mezi PCS a PDAC je miRNA. PSC produkují exosomální miRNA, která je zachycována buňkami PDAC a její zvýšená přítomnost v nádorových buňkách přispívá např prostřednictvím cesty MiR-4459/KIAA0513 k jejich výšene migraci a proliferaci. (Ma Q. et al., 2020, Shao F. et al., 2020) Vzájemný vztah PSC a PDAC demonstruje i fakt, že společná kultivace PSC a buněk PDAC vede ke změně fenotypu PSC, snížení odpovědi PDAC k terapii gemcitabinem a zvýšení migrace těchto buněk. (Kikuta K. et al., 2010, Liu Z. et al., 2018)

Důležitým mezníkem v patogenezi PDAC je tzv. epiteliální-mezenchymální transformace, proces, při němž dochází k přeměně polarizované epiteliální buňky v buňku s fenotypem připomínající buňky mesenchymálního původu. Tyto buňky pak nabývají zvýšené schopnosti migrovat, růst a odolávat apoptotickým signálům. (Kalluri R. et al., 2010) Tento proces rovněž svým působením ovlivňují PSC, zejména jsou-li kultury PSC a PDAC vystaveny hyperglykemickému prostředí – tedy prostředí podobné tomu, které „in vivo“ pozorujeme u pacientů s T2DM. Rovněž IL-6 produkovaný PSC cestou Stat3/mrf2 dráhy stimuluje EMT u PDAC. (Karnevi E. et al., 2016, Wu YS. et al., 2017, Seifert AM. et al., 2020)

Mimobuněčná matrix tvořená z velké části PSC je esenciálním faktorem umožňující přežívání buňkám PDAC. Hraje významnou roli v metabolismu těchto nádorových buněk – například kolagen produkovaný aktivovanými PSC jakožto hlavní komponenta ECM, slouží jako metabolický substrát nádorovým buňkám. (Olivares O. et al., 2017) Jak již bylo uvedeno výše, hypoxie způsobuje aktivaci PSC. Aktivované PSC produkují růstový faktor pojiva (connective tissue growth factor) a matrixové metaloproteinázy (MMP), mezi nimiž MMP-3 a MMP-10 usnadňují invazi buněk PDAC. (Liu D. et al., 2020) Excesivní tvorba ECM

prohlubuje hypoxii nádorového stroma, což opět zvyšuje aktivaci PSC. PSC prostřednictvím miRNA miR4465 a miR-616-3p zvyšují invazivitu a proliferaci PDAC, případně tvorbou periostinu zvyšují resistenci PDAC k hypoxii. (Cao W. et al., 2021, Liu L. et al., 2015)

Vaskularizace tumoru je zásadní pro zajištění přísunu nutrientů do nádorové tkáně, a tedy i pro další růst a šíření nádorového procesu. K zajištění neovaskularizace využívají nádorové buňky řadu mechanismů. Jedním z nich je produkce vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Stejně tak mají PSC schopnost produkovat řadu látek stimulujících angiogenezi – např. FGF, periostin či PDGF. V „in vitro“ studii byla prokázána schopnost PSC zvyšovat novotvorbu cév endotelovými buňkami pomocí HGF/c-MET dráhy. (Kuninty PR. et al., 2016, Patel MB. et al., 2014)

Zajímavá je i role PSC u pankreatické bolesti pacientů s PDAC. Signální sonic-hedgehog protein produkovaný buňkami PDAC aktivuje u PSC dráhu vedoucí k sekreci řady neurotrofních látek, které se podílejí na rozvoji typické pankreatické bolesti. (Han L. et al., 2016)

PSC jsou schopné intra/extravazace do/z cév a migrovat spolu s PDAC do vzdálených orgánů, kde vytvářejí mikroklima, které usnadňuje další růst těchto metastáz. (Suetsugu A. et al., 2015) PSC se pravděpodobně podílejí na chemorezistenci PDAC. Ochranu buněk před chemoterapeutiky zajišťuje již samotná produkce ECM stelátními buňkami, která brání pronikání léčiva k maligním buňkám. Krom toho produkují PSC látky, které přímo zvyšují chemorezistenci buněk PDAC. Příkladem je deoxycytidin – pyrimidinový deoxynukleosid produkovaný PSC, který snižuje efekt nukleosidového analoga gemcitabinu. (Dalín S et al., 2019)

5.6.3. Pankreatické stelátní buňky a chronická pankreatitida

ChP je chronické onemocnění charakterizované náhradou funkčního parenchymu pankreatu vazivovou tkání. Rovněž je rizikovým faktorem rozvoje PDAC. (Kirkegård J. et al., 2017) Přetrvávající a excesivní aktivace PSC následkem opakovaných pankreatitid či jiných patologií je klíčovým prvkem této remodelace. Aktivace PSC provází zánětlivé afekce pankreatu včetně ChP. Rovněž alkohol se výše zmíněnými mechanismy podílí na jejich aktivaci. (Jin G. et al., 2020, McCarroll JA. et al., 2003)

Kouření je další z faktorů podílející se na rozvoji ChP. Cigaretový kouř obsahuje mimo řady toxických látek i nitrosamid methylnitrosamino-1-(3-pyridyl) -1-butanon (NNK), na který reagují PSC pomocí acetylcholinových receptorů. Cigaretový kouř rovněž stimuluje T-lymfocyty, což vede ke zvýšení koncentrací interleukinu IL-22 který je aktivátorem PSC. (Lee AT. et al., 2015, Xue J. et al., 2016)

Významným hráčem na poli ChP jsou M2 makrofágy (na rozdíl od akutní pankreatitidy, kde zásadní roli hrají M1 makrofágy). (Hu F. et al., 2020) Tyto makrofágy produkují řadu cytokinů, které mají schopnost aktivovat PSC (TGF β 1, PDGF...). PSC jsou zároveň producenty interleukinu IL-4, který dále stimuluje jak PSC, tak makrofágy. Nehledě na to, že IL-4 je zároveň potentním růstovým faktorem působící na buňky PDAC. (Liu Z. et al., 2018, Prokopchuk O. et al., 2005)

TGF β 1 aktivuje NK- κ B dráhu PSC, což vede ke zvýšené tvorbě tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP) těmito buňkami. Vychýlení rovnováhy mezi MMP a TIMP vede k převaze fibrogenese. Touto drahou je rovněž i spouštěna produkce cytokinu MCP-1, který přitahuje makrofágy do zasažených oblastí. Tímto mechanismem je tak uzavírán bludný kruh fibrogenese u pacientů s chronickou pankreatitidou. (Lee H et al., 2008, Shek FW. et al., 2002)

5.7. Zánět a systémová imunitní odpověď u pacientů s karcinomem pankreatu

Přítomnost zánětlivé odpovědi je společným znakem pacientů s chronickou pankreatitidou, PDAC a do jisté míry i T2DM. (Donath M. et al., 2011, Robinson SM. et al.2019) V případě chronické pankreatitidy a T2DM je chronický zánět faktorem, který přispívá ke zvýšenému riziku PDAC u těchto onemocnění. U T2DM se na rozvoji zánětlivé odpovědi podílí chronická hyperglykemie a oxidativní stres, který vede k produkci volných radikálů. To vede mimo jiné k sekreci řady prozánětlivých cytokinů. (Oguntibeju OO., 2019)

Chronická pankreatitida je rovněž charakterizována systémovými zánětlivými změnami, vyjádřené mimo jiné zvýšenou koncentrací sérových hladin TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-1 β , MMP-9, IFN- γ a IL-8, doprovázené zvýšenou aktivitou Th1 a Th17 lymfocytů. Aktivita těchto buněk byla prokázána u řady zánětlivých stavů. Zároveň jsou sníženy hladiny inzulínu a leptinu. (Komar HM. et al., 2017, Rasch S. et al., 2016, Noack M. et al., 2014)

5.7.1. Znamky systémového zánětu u karcinomu pankreatu

Vztah mezi imunitní/zánětlivou odpovědí a nádorovým bujením může zjednodušeně nabývat následujících podob:

a/ imunitní systém dokáže odhalit a eliminovat nádorové buňky,

b/ síly imunitního systému a nádorového bujení jsou vyrovnané, imunitní systém tak brání prudkému růstu či rozsevu nádoru, ale nedokáže zabránit „kontrolovanému růstu“,

c/ nádorové bujení se dostává mimo kontrolu imunitního systému a dochází k rychlému šíření nádorového procesu.

Mechanismus vztahu mezi imunitním systémem a zhoubným nádorem je komplexní a z velké části závislý na cytokinech produkovaných jak imunitním systémem, nádorovými buňkami, tak například buňkami nádorového stroma. Důsledek chronického systémového zánětlivého stavu může pak být zejména u PDAC kachexie. Cirkulující cytokiny (interleukiny IL-6 a IL-1 β či TNF α) mohou zapříčinit paraneoplastické projevy jako je zvýšená teplota. TNF α je zároveň hlavním proteinem zodpovědným za nádorovou kachexii. (Petruzzelli M. et al., 2016) Ukazuje se rovněž, že dynamika hodnot systémového zánětu v reakci na chemoterapii je prognostickým faktorem délky přežití pacientů s PDAC. (Aziz MH. et al., 2019)

5.8. Metabolické důsledky diabetu mellitu 2. typu, karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy

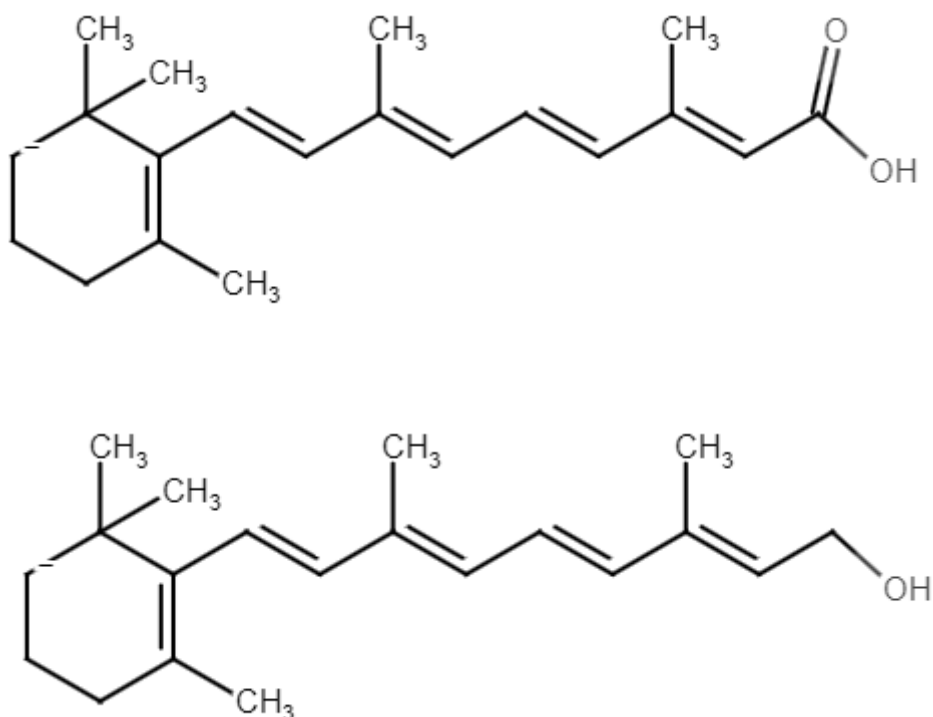
V případě metabolických změn u PDAC přinesli pozoruhodnou informaci autoři Sah, Sharma et al. v práci publikované roku 2019 v Gastroenterology. Zde autoři na souboru 219 pacientů s PDAC a 657 zdravých kontrolách demonstrují metabolické změny, ke kterým dochází před samotnou diagnózou PDAC. Sledováním řady parametrů jako glukózy, sérových lipidů, TAG; cholesterolu; hmotnosti, podkožního tuku, zastoupení tělesné a viscerální tukové tkáně a svaloviny identifikovali autoři tři fáze metabolických změn předcházející dg. PDAC. V první fázi, nastávající cca tři roky před diagnózou PDAC se objevuje hyperglykémie. V další fázi, cca 1,5 roku před diagnózou PDAC, klesá koncentrace sérových lipidů a hmotnost. Ve třetí fázi klesá množství svaloviny, tukové tkáně i cirkulujících lipidů, trvá vzestup glykémie. (Sah SM. et al., 2019)

Naproti tomu, T2DM je dobře charakterizován dyslipidemií s vyššími hodnotami LDL a TAG a poklesem HDL. (Ronald M. et al., 2004) Společná pro PDAC i T2DM je hyperglykemie, která je ovšem u T2DM důsledkem insulinové rezistence. T2DM je zároveň součástí metabolického syndromu charakterizovaného mj. obezitou, kdy u těchto pacientů jsou hodnoty glykemie korelovány s tělesnou hmotností. (Vazquez E. et al., 2022)

Chronická pankreatitida je onemocnění, které je charakterizováno poruchou exokrinní a/nebo endokrinní funkce. To ve svém důsledku vede jednak k rozvoji diabetu (T3cDM) (až u 80% pacientů s ChP) tak malabsorpci vedoucí ke ztrátě hmotnosti a deficitu v tukách rozpustných vitamínů (A, D, E, K). (Malka D. et al., 2000, Hrabák P. et al., 2023) Nejběžnější klinickou manifestací tohoto deficitu je kostní choroba, která je úzce svázána s poruchou metabolismu vitamínu D a kalcia. (Duggan SN. et al., 2014) Na druhou stranu, přítomnost metabolického syndromu může sama o sobě být rizikovým faktorem rozvoje chronické pankreatitidy. (Bojkova M. et al., 2020) Specifický je pak vztah vitamínu A a jeho metabolitů v patogenezi ChP a PDAC. (Hrabák P. et al., 2021)

5.9. Vitamin A a all-trans retinová kyselina v patogenezi karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy

Vitamin A (retinol) a jeho deriváty nazvané též retinoidy získáváme z potravy zejména ve formě prekurzorů (provitaminů) – karotenoidů. Karotenoidy spolu s dalšími hydrofobními molekulami (například žlučové soli, cholesterol) tvoří micely. V této formě jsou vstřebávány v tenkém střevě a následně metabolizovány na retinol. Ten je z velké části, poté co je esterifikován mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem, ve formě chylomikronů uvolněn do oběhu. Menší část neesterifikovaného retinolu je transportována do jater, kde je skladován v jaterních stelátních buňkách ve formě retinyl-esterů.



Obrázek 4: a/ All trans retinová kyselina – chemická struktura, b/ retinol - chemická struktura, vytvořeno ve freeware programu MolView (<https://molview.org/>)

Retinol je vitamín rozpustný v tucích, tedy jej lze krevním oběhem transportovat pouze ve vazbě na specifické vazebné proteiny (např. retinol vázající protein 4 – RBP4) nebo v chylomikronech. Absorbovaný nebo internalizovaný retinol může být buďto skladován v jaterních stelátních buňkách či v PSC, nebo dále metabolizován a pomocí specifické aldehyd-dehydrogenázy oxidován na all-trans retinovou kyselinu (all-trans retinoic acid – ATRA) (Obrázek 4). V jaterních stelátních buňkách je skladováno zhruba 80 % tělesného retinolu. (Blaner WS. et al., 2019, von Lintig J. et al., 2020)

Retinol má v lidském organismu řadu zásadních funkcí. Dobře je popsána jeho role ve fyziologii vidění, embryonálního vývoje, buněčné diferenciaci, proliferaci a regulaci transkripce. (Balmer JE. et al., 2002)

Mechanismus transkripce ovlivňuje hlavní aktivní metabolit retinolu – ATRA – cestou specifických receptorů – retinoic acid receptor (RAR) a retinoic X receptor (RXR). Touto cestou ovlivňuje expresi cca 500 genů, které hrají roli v diferenciaci tkání, buněčném cyklu, apoptóze nebo růstu buňky.

Existuje řada prací, které ukazují na vztah mezi ATRA, retinolem a některými patologiemi pankreatu. Svým vlivem na embryonální vývoj organismu a buněčnou diferenciaci se retinol podílí už na samotném vývoji pankreatu. (Brun PJ. et al., 2016, Bleul T. et al., 2015, Chronopoulos A. et al., 2016)

Retinoidy mají vliv na funkci pankreatických ostrůvků zejména prostřednictvím RXR a RAR. (Brun PJ. et al., 2016) Jsou esenciální pro zajištění jejich homeostázy, brání jejich apoptóze a podílejí se na fyziologické sekreci inzulínu z β buněk pankreatu.

Některé práce ukazují na možný vliv retinolu na patogenezi PDAC. ATRA má prostřednictvím svých receptorů inhibiční účinky na proliferaci buněk, podporuje ale jejich diferenciaci. Ztráta RAR- β vedla v experimentálních modelech k dediferenciaci pankreatických buněk. Kaiser et al., prokázali ve své práci kompletní ztrátu RAR β u jedné třetiny PDAC. (Kaiser A. et al., 1997)

ATRA je rovněž ligandem receptorů aktivovaných proliferátory peroxisomů (peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)). Signální dráhy svázané s těmito nitrojadernými receptory ovlivňují transkripci řady genů, jejichž produkty jsou mj. zodpovědné za účinky inzulínu. ATRA tak hraje roli v regulaci energetického metabolismu a citlivosti k inzulínu. (Lee CH. et al., 2006, Soška V. 2006)

Řada studií zkoumala vztah retinolu a inzulínu podobného růstového faktoru a jeho vazebného proteinu (IGF/IGFBP). Význam dráhy IGF/IGFBP tkví zejména v jeho vlivu na kancerogenezi. Ukazuje se, že vyšší hladiny IGF-1 a IGFBP-3 jsou asociovány s horší prognózou karcinomu pankreatu. (Lin Y. et al., 2004) Metaanalýza z r 2017 nicméně neprokázala, že by zvýšené hladiny IGF zvyšovaly (na rozdíl od jiných malignit) riziko PDAC. (Gong Y. et al., 2017)

Jedinými buňkami pankreatu, ve kterých je ukládán retinol, jsou PSC. Díky přítomnosti vakuol s vitamínem A tak získávají svou typickou vlastnost – fluorescenci při osvětlení světlem o vlnové délce 325nm. V souhrnu lze říci, že studie sledující hladiny retinolu u pacientů s T2DM, ChP i PDAC nepřináší jednoznačnou informaci o hladinách tohoto vitamínu u jednotlivých onemocnění. Zároveň je nutné zasadit event. změny v koncentracích retinolu a ATRA do kontextu jejich efektu na patofyziologii výše zmíněných onemocnění, kdy je pravděpodobné, že případné změny koncentrací obou látek nejsou jen odrazem těchto nemocí,

ale přímo se na patofyziologii těchto procesů podílejí. Mohou tedy být markery diagnostickými i prognostickými potažmo terapeutickými cíli.

5.10. Diagnostika a screening karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu je onemocnění, které je i v 21. století obtížné diagnostikovat v časných stádiích. V současnosti není k dispozici metoda, která by umožnila efektivní plošný screening tohoto onemocnění. Pozdní diagnostika karcinomu pankreatu má pravděpodobně několik základních příčin. Pokud bychom se zaměřili na malignity s příznivější diagnózou, zjistíme že (velmi zjednodušeně), tkví rozdíl mezi PDAC a těmito malignitami v několika bodech

- a/ využití relativně jednoduchých, standardizovaných, rutinních a v neposlední řadě levných screeningových metod, které umožňující vyšetření široké populace (kolorektální karcinom, karcinom prsu),
- b/ identifikace přesně definovaných vysoce rizikových skupin populace, u který jsou prováděna kontrolní vyšetření (kolorektální karcinom, karcinom plic)
- c/ možnost neinvazivní diagnostiky suspektních prekanceróz (kolorektální karcinom, maligní melanom)
- d/ účinná (obvykle systémová) terapie i pokročilých forem onemocnění
- e/ relativně indolentní chování některých malignit (např. chronická lymfocytární leukemie).

V případě PDAC se však setkáváme s onemocněním, které je většinou sporadické, a tedy identifikace rizikových skupin má jen malý populační přínos ve smyslu snížení celkové incidence. PDAC vzniká obvykle u starších pacientů, kdy může být řada biochemických parametrů alterována přidruženými chorobami. Naopak u mladších pacientů mohou kompenzační mechanismy jinak zdravého organismu přechodně zakrývat dopady rozvoje PDAC. A konečně, agresivní povaha PDAC vede k poměrně nízké účinnosti systémové onkologické terapie, která prakticky plní jen roli paliativní.

V současnosti chybí široce dostupný, levný a jednoduchý nástroj, který by umožnil záchyt časných stadií PDAC nebo jejich prekancerózních stavů. Vzhledem k poměrně nedostatečně efektivní laboratorní diagnostice, náročnému a často invazivnímu vyšetřovacímu procesu v případě „pozitivního“ výsledku iničiálního laboratorního vyšetření, a v neposlední řadě

s ohledem na dopady na psychický stav vyšetřovaných není v současné době doporučovaný screening PDAC.

V některých zahraničních zemích a aktuálně i v ČR je zaváděn program surveillance PDAC u přesně definovaných rizikových (relativní riziko PDAC >5 %) skupin. Jedná se zejména o pacienty s cystickými tumory pankreatu, hereditární chronickou pankreatitidou či pacienty s vysokou genetickou zátěží (např. *BRCA2*, *STK11*, *CDKN2A* mutace či výrazná rodinná zátěž). Sledování je založeno na zobrazovacích metodách, doplněných v jistých případech o parametr CA19-9 (Vaněk P. et al., 2023).

Přínosný může být i přístup britského National Institute for Health and Care Excellence, který doporučuje zvážit provedení časného (do dvou týdnů) CT vyšetření pacientům starším 60 let se ztrátou hmotnosti, kteří zároveň trpí některou z obtíží charakteru zvracení, průjmů, bolestí zad, nevolnosti, zácpy či nově vzniklým diabetem. (National Collaborating Centre for Cancer (UK), 2015)

Využití zobrazovacích metod, jako první modality pro detekci PDAC je zde ovšem rovněž odrazem nedostatečné efektivity nebo dostupnosti neinvazivních laboratorních vyšetření. (Yang 2021, Halbrook CJ. et al., 2023, O'Neill RS. et al., 2021, Pereira SP. et al., 2020)

Nalezení vhodného cirkulujícího biomarkeru karcinomu pankreatu by mělo dramatický dopad na prognózu pacientů s PDAC. V současnosti je cílem výzkumu celá řada rutinních i více specifických „nových“ biomarkerů.

5.10.1. Zobrazovací metody u karcinomu pankreatu

5.10.1.1. Abdominální ultrasonografie

Jen poměrně omezenou roli hraje v diagnostice PDAC abdominální ultrasonografie, jejíž senzitivita 75 % a specificita 90% zaostává za CT i MR. Nevýhodou vyšetření je zejména velmi nízká citlivost v zachycení malých (<2cm) ložisek. USG obvykle zobrazí nepřímé známky expanzivního ložiska pankreatu – prestenostické dilatace choledochu a Wirsungova vývodu, či známky obstrukční chronické pankreatitidy.

5.10.1.2. Výpočetní tomografie (CT)

Zlatým standardem diagnostiky PDAC je výpočetní tomografie (CT) s intravenózně podanou jodovou kontrastní látkou. V pankreatické fázi (40-50s po podání kontrastu) se PDAC obvykle zobrazuje jako hypodenzní neostře ohraničené ložisko. Senzitivita CT v detekci PDAC je 89 % a specifická 90 %. (Treadwell JR. et al., 2016) Nespornou výhodou CT vyšetření je to, že poskytuje informaci o vztahu tumoru k okolním, zejména cévním strukturám a bývá tak obvykle klíčovým vyšetřením při úvahách o chirurgickém výkonu.

5.10.1.3. Magnetická rezonance/ magnetická rezonance- cholangiopankreatikografie (MR/MRCP)

Výtěžnost MR v diagnostice PDAC je srovnatelná s kontrastním CT. Výhodou MRCP je detailní zobrazení žlučového stromu (na rozdíl od ERCP i proximálně od případně stenózy), vyšší citlivost i CT izoechogenních lézí a, při aplikaci hepatospecifických kontrastních látek, vyšší specifická a senzitivita v záchytu jaterních metastáz.

5.10.1.4. Endoskopická ultrasonografie (EUS)

EUS hraje v diagnostice PDAC významnou roli zejména u pacientů s podezřením na PDAC, u nichž na CT či MR nebyla zachycena léze, neboť dobře zobrazuje i ložiska menší než 2cm. Senzitivita tohoto vyšetření je cca 87% a specifická 98%. (Kanno A. et al., 2018)

Další nespornou výhodou EUS je možnost odběru vzorku na histologickou nebo cytologickou analýzu, v závislosti na použité biopsické jehle. (Obrázek 5)



Obrázek 5: Tenkojehlová biopsie tumoru pankreatu pod endosonografickou kontrolou. Foto autor

5.10.2. Laboratorní parametry u karcinomu pankreatu

5.10.2.1. Rutinně stanovované parametry

Karcinom pankreatu, stejně jako jiná onkologická onemocnění, má významný dopad na řadu metabolických procesů lidského organismu. Vznik a rozvoj PDAC je obvykle doprovázen změnou celé řady biochemických parametrů (mj. sedimentace erytrocytů, krevní obraz, jaterní testy či glykémie.), z nichž některé mohou hrát roli v diagnostice či stanovení prognózy tohoto onemocnění. Spíše než jejich patologicky změněné hodnoty, které jsou PDAC nespecifické a mohou být změněny vlivem jiných onemocnění, může hrát důležitou roli jejich dynamika.

Dle recentně publikované studie se ukazuje, že již v průběhu pěti let před diagnostikováním PDAC dochází ke změnám v některých základních běžně měřených parametrech (jaterní testy, glykovaný hemoglobin, počet trombocytů i bílých krvinek a koncentrace hemoglobinu). V kombinaci se základním biometrickým parametrem, body mass indexem (BMI), lze vyzorovat specifickou dynamiku těchto markerů u karcinomu pankreatu. Autoři demonstrovali na sledovaném souboru bifázický trend poklesu BMI a rovněž dvoufázový vzestup glykovaného hemoglobinu. Pozorovaný byl naopak postupný vzestup jaterních testů, leukocytů a krevních destiček. (Tan PS. et al., 2023)

5.10.2.1.1. Sérová amyláza a lipáza

Pankreatická amyláza a lipáza jsou nezastupitelné markery zejména v diagnostice akutní pankreatitidy, kde jejich zvýšení jejich aktivity nad > 3 násobek horního referenčního rozmezí je jedním z diagnostických kritérií tohoto onemocnění. V případě chronické pankreatitidy je však interpretace těchto hodnot obtížnější.

Obecně lze říci, že zvýšení sérové aktivity pankreatické amylázy a lipázy může být způsobena narušením struktury pankreatické tkáně zánětem či tumorem a přestupem těchto enzymů do oběhu. Typickým příkladem je právě akutní pankreatitida. V případě nádoru či chronické pankreatitidy však dochází jednak k poškozování tkáně, které vede k přestupu těchto enzymů do krve, tak k destrukci žlázy, což vede k poruše její funkce. Snížená produkce pankreatických enzymů v terénu chronické pankreatitidy či karcinomu pankreatu se může projevit abnormálně nízkou sérovou aktivitou těchto pankreatických enzymů. (Hansen SEJ. et al., 2021)

5.10.2.1.2. Jaterní testy

Cholestáza doprovázená změnami koncentrací sérových hladin jaterních enzymů je častou součástí klinického obrazu karcinomu pankreatu. Mezi běžně stanovované jaterní enzymy patří alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), γ -glutamyltransferáza (GGT) a alkalická fosfatáza (ALP). Alkalické fosfatázy jsou enzymy přítomné v řadě orgánů. Jejich funkcí je katalyzovat hydrolýzu esterů fosfátu za vzniku fosfátu anorganického. Jejich abnormální hodnoty byly popsány u řady maligních onemocnění včetně karcinomu pankreatu. Elevace ALP a GGT patří mezi negativní prognostické faktory metastazujícího karcinomu pankreatu u pacientů léčených chemoterapií. (Catalano M. et al., 2023) Vzhledem k možné falešně zvýšeným hladinám CA19-9 u pacientů s cholestázou či cholangitidou je kombinace CA19-9/AST a CA19-9/GGT přesnějším předoperačním prognostickým markerem přežití u PDAC nežli samotný CA19-9, jsou-li hladiny bilirubinu vyšší než 102,6 $\mu\text{mol/l}$. (Huang X. et al., 2021) O jaterních transaminázách tak lze v některých situacích uvažovat jako o doplňujících markerech CA19-9.

5.10.2.1.3. Lipidy

Některé práce ukazují vztah mezi dynamikou hladin cholesterolu a časným karcinomem pankreatu, resp. poukazují na pokles hladin sérového cholesterolu předcházející několik měsíců diagnóze PDAC. (Chen WC. et al., 2019, Wang L. et al., 2022) Dále upozorňují na asociaci mezi hypercholesterolemií a vyšším rizikem rozvoje PDAC. (Wang J. et al., 2015) Naopak vyšší hodnoty cholesterolu měřené po resekci PDAC jsou asociovány s lepší prognózou těchto pacientů. To je nejspíše dáno jejich lepším nutričním stavem. Nízké sérové hladiny LDL navozené statiny, vedly na zvířecích modelech k vyšší agresivitě PDAC prostřednictvím aktivace TGF β signalizace. (Leslie K. et al., 2020)

5.10.2.2. Známé a potenciální markery karcinomu pankreatu

Snaha o nalezení dostupné metody identifikace pacientů s vysokým rizikem rozvoje PDAC, tedy s prekancerózním stavem, případně pacienty v časném (a tedy resekovatelném) stádiu PDAC, se stala klíčovým úkolem řady vědních oborů posledních desetiletí. Tento výzkum vyústil v identifikaci celé řady biomarkerů, které svou heterogenitou vypovídají o komplexnosti problematiky PDAC.

Biomarkery lze získat buďto z tělních tekutin – tzv. cirkulující biomarkery, nebo přímo z tumorózní tkáně – tzv. tkáňové biomarkery. Získání cirkulujících biomarkerů je levné a

snadné a minimálně invazivní, naproti tomu tkáňové biomarkery je nutno vyšetřovat ve vzorku získaného biopsicky - v případě PDAC jde nejčastěji o EUS s biopsií tenkou jehlou (fine needle biopsy - FNB), případně aspiraci (fine needle aspiration - FNA) tekutiny z cystické léze pankreatu.

V této práci se zaměříme na biomarkery identifikované v séru/plazmě – tedy cirkulující biomarkery. Mezi potenciální cirkulující biomarkery patří celá řada glykoproteinů, glykolipidů, proteinů, adhezivních molekul, růstových faktorů či jejich receptorů, cytokinů nebo cirkulující miRNA.

5.10.2.2.1. CA19-9

V současnosti stále zůstává suverénním markerem karcinomu pankreatu CA19-9. A to i přes svou falešnou negativitu u pacientů s deficitem fukosyltransferázy a falešnou pozitivitu u pacientů s cholangitidou, akutní či chronickou pankreatitidou, jaterní cirhózou či obstrukčním ikterem a nízkou senzitivitu v zachytu lézí menších 3 cm. (Scarà S. et al., 2015, Ballehaninna UK. et al., 2012) Jeho význam je mimo jiné v tom, že s výkonností CA19-9 jsou porovnávány ostatní potenciální biomarkery. Vzhledem k jeho nízké pozitivní prediktivní hodnotě není však CA19-9 vhodný k použití coby screeningová metoda PDAC.

CA19-9 – karbohydrát antigen 19-9, případně sialyl Lewis A byl poprvé identifikován v roce 1979 v buňkách kolorektálního karcinomu. (Luo G. et al., 2021) (Koprowski H. et al., 1979) Pro jeho syntézu je nutná přítomnost Lewisova enzymu (fukosyltransferázy), který u části populace není tvořen, a tedy tito pacienti (zhruba 5-10% populace) CA19-9 netvoří ani v případě, že se u nich rozvine PDAC. (Guo M. et al., 2017)

U pacientů, u nichž je CA19-9 tvořen jeho hladiny korelují s velikostí tumoru či přítomností metastáz, s existencí možnosti kurativní resekce, a tedy i s prognózou. Kombinace stagingu (na základě zobrazovacích vyšetření) a hladin CA19-9 hraje klíčovou roli v rozhodování o resekci PDAC. U pacientů, s vysokými hodnotami CA19-9 prokazatelně klesá resekabilita. (Hartwig W. et al., 2013) Karcinom pankreatu se sérovou hladinou CA19-9 >500U/ml je dle konsenzu Mezinárodní pankreatologické asociace považován za tzv. hraničně resekabilní i bez průkazu metastáz. (Isaji S. et al., 2018)

Zároveň hraje CA19-9 důležitou roli v predikci a monitoraci efektu neoadjuvantní onkologické léčby, v predikci pooperačního průběhu a v dlouhodobém sledování pacientů po kurativní resekci. Elevace CA19-9 u PDAC může předcházet jeho detekci zobrazovacími

metodami až o 6 měsíců. (Rieser CJ. et al., 2018) Monitorace CA19-9 je dále například nedílnou součástí surveillance pacientů s intraduktální papilární mucinosní neoplázií (IPMN). (Del Chiaro, 2018)

5.10.2.2.2. Karcinoembryonální antigen (CEA)

CEA je fetální glykoprotein s molekulovou hmotností 180-200 kDa. CEA byl roku 1965 izolovaný z buněk kolorektálního karcinomu. (Gold P. et al., 1965) Jeho hladiny bývají zvýšené u celé řady tumorů (mj. kolorektální karcinom, karcinom prsu) včetně PDAC. V případě PDAC bývá zvýšen u 30-60 % pacientů. (Meng Q. et al., 2017) Recentní metaanalýza neprokázala vyšší efektivitu CEA proti CA19-9. (Xing H. et al., 2018) Svou roli tak může mít zejména u pacientů, kteří CA19-9 netvoří. Kombinace markerů CA19-9, CEA, CA125, a CA242 prokázala 9 % senzitivitu a 93% specifitu v detekci PDAC. (Gu YL. et al., 2015)

5.10.2.2.3. CA125

Cirkulující CA125 je produkt membránového mucinu MUC16. Je popsán jeho diagnostický potenciál zejména u karcinomu ovaria. (Charkhchi P. et al., 2020) Na rozvoji PDAC se podílí několika mechanismy: mj. se účastní signální dráhy RAF1/MEK/ERK, zvyšuje motilitu nádorových buněk a invazivitu tumorových buněk. (Qi ZH. et al., 2018) Je lepším markerem mikrometastáz PDAC nežli CA19-9. (Liu L. et al., 2015) Hladiny CA125 rovněž na rozdíl od CA19-9 nejsou ovlivněny hyperbilirubinemií. U pacientů s obstrukcí žlučových cest je tedy CA125 nejspíše důvěryhodnějším markerem PDAC. (Haglund C., 1986)

5.10.2.2.4. Osteopontin

Osteopontin, jehož exprese je zvýšena u PDAC, je součástí extracelulární matrix pankreatických tumorů, kde je tvořen mj. pankreatickými stelátními buňkami. Jeho úloha v patofyziologii řady malignit byla zevrubně popsána. (Moorman HR. et al., 2020) Osteopontin v mikroprostředí PDAC pravděpodobně usnadňuje metastazování nebo růst tumoru. (Kolb A. et al., 2005) Osteopontin byl zkoumán jako marker PDAC v terénu chronické pankreatitidy. (Rychlíková J. et al., 2016)

5.10.2.2.5. Osteoprotegerin (OPG)

OPG je syntetizován aktivovanými PSC. Je receptorem pro ligand TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand). Vazbou s tímto ligandem dochází k jeho inhibici a tak zvýšení

resistence nádorových buněk k apoptotickým signálům. (Emery JG. et al., 1998, Wen Z. et al., 2019, Brand R. et al., 2011)

5.10.2.2.6. REG proteiny (regenerating proteins)

REG proteiny bílkoviny jsou přítomné v buňkách acinů. Byly identifikovány u pacientů s akutní pankreatitidou. V současné době do rodiny lidských REG proteinů řadíme proteiny REG1A, REG1B, REG3A, REG3G a REG4. Za fyziologických okolností hrají tyto proteiny zásadní roli v regeneraci poškozeného pankreatického parenchymu. Proteiny REG1 a REG3 byly popsány jako součást tzv. proteinových zátek, popisovaných u pacientů s chronickou pankreatitidou. (Bluth M. et al., 2008) Proteiny REG 1,2 a 4 jsou exprimovány buňkami PDAC. (Takehara A. et al., 2006)

Roli REG proteinů v patogenezi PDAC podporují práce, které prokázaly vyšší koncentrace REG3A u PDAC a PanIN. (Li Q. et al., 2016) REG proteiny byly prokázány v moči a séru pacientů s PDAC. (Radon TP. et al., 2015, Legoffic A. et al., 2009)

5.10.2.2.7. S100 proteiny

Rodina S100 proteinů čítá na 25 molekul. Některé z těchto molekul hrají významnou roli v patogenezi neoplázií. (Bresnick AR. et al., 2015) Účastní se regulace hladin intracelulárního kalcia, ovlivňují růst, proliferaci, diferenciaci a energetický metabolismus buněk. S100 proteiny reagují s celou řadou receptorů, mimo jiné s receptory pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE), toll-like receptory a s receptory asociovanými s G proteiny. Prostřednictvím těchto receptorů ovlivňují celou řadu intracelulárních procesů, které v případě PDAC vedou k jeho progresi. Některé S100 proteiny pak mohou sloužit jako potenciální biomarker PDAC.

Protein S100A2 má pravděpodobně tumor supresorové působení u některých typů karcinomů. (Luo J. et al., 2011) Nicméně byla prokázána jeho zvýšená exprese u PDAC ve srovnání s non-PDAC či PanIN. (Ohuchida K. et al., 2007) Elevace S100A4 je markerem PDAC a svědčí zejména pro přítomnost metastáz a horší prognózu. (Huang S. et al., 2016)

Expresí S100A6 je limitována prakticky jen na buňky PDAC a stoupá s progresí velikosti tumoru. Ke zvýšení exprese S100A6 dochází pravděpodobně již v časných stádiích rozvoje PDAC a tedy může být nápomocen v detekci high-risk lézí nebo časného PDAC. (Ohuchida K. et al., 2007)

S100P je protein, který je rovněž zvýšeně exprimován u PDAC nebo intraduktální pseudopapilární mucinozní neoplazie (IPMN) a míra této exprese koreluje s progresí stupně PanIN lézí. (Nakata K. et al., 2010) Jeho potenciální role v diagnostice PDAC byla prokázána i v kombinaci s endoskopickou ultrasonografií a s biopsií tenkou jehlou. (Aksoy-Altinboga A. et al., 2018, Wu Y. et al., 2021)

Některé S100 proteiny jsou ligandy receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE). Tyto receptory jsou zvýšeně exprimovány ve tkáni PDAC a jejich aktivace v konečném důsledku vede k proliferaci tumoru. Jedná se rovněž o jeden z mechanismů, který stojí za zvýšeným rizikem rozvoje malignity u stavů charakterizovaných chronickou hyperglykemií (T2DM), kdy dochází k tvorbě AGEs (konečných produktů pokročilé glykace) - tedy ligandů RAGE. (Abbruzzese JL. et al., 2018)

5.10.2.2.8. Matrix metaloproteinázy (MMP)

Potenciál MMP coby biomarkerů vyplývá z jejich úlohy ve formaci nádorového stroma. MMP jsou endopeptidázy mající ve své struktuře obsažený zinek. V závislosti na cílovém peptidu je lze rozlišovat na kolagenázy, želatinázy, matrilysiny apod. MMP se účastní zánětlivých reakcí či hojení tkání. (Kuhlmann KF. et al., 2007) Jejich aberantní aktivita je jedním z atributů jak ChP, tak PDAC. MMP byly rovněž zkoumány jako potenciální cirkulující biomarker PDAC, kdy byla řadou autorů zjištěna jejich zvýšená exprese jak v nádorové tkáni, tak vyšší koncentrace v krvi. (Slapak EJ. et al., 2020) V současnosti je popsáno přes 20 MMP. Četné práce poukazují na vliv MMP na kancerogenezi, proliferaci nádorových buněk a metastazování. (Knapinska AM. et al., 2017, Huang K. et al., 2018, Koikawa K. et al., 2018)

MMP se podílí na procesu epiteliální-mezenchymální transformace (EMT) – klíčovém procesu iniciace kancerogeneze – tím, že svým proteolytickým působením rozrušují e-kadherin v mezibuněčných spojích. Pokles koncentrací e-kadherinu je negativním prognostickým faktorem PDAC. (Dardare J. et al., 2021) Rovněž se MMP podílí se na patologické přeměně acinárního fenotypu na duktální (tzv. acinar to ductal metaplasia). (Fukuda A. et al., 2011) MMP-7 byla detekována v nádorové i premaligní (PanIN 1-3), nikoli však zdravé pankreatické tkáni. (Crawford HC. et al., 2002, Van Doren SR. et al., 2022)

Jakkoli u některých MMP lze usuzovat, že přispívají k rozvoji PDAC, data o jejich celkovém vlivu na PDAC nejsou zcela konzistentní. (Slapak EJ. et al., 2020)

5.10.2.2.9. Trefoil faktory (TTF)

TTF 1-3 jsou malé molekuly, které se za fyziologických okolností podílí na ochraně sliznic trávicího traktu. Byl však popsán jejich podíl na řadě malignit. (Perry JK. et al., 2008) Vzhledem k velikosti a stabilitě těchto molekul byly zvažovány jako potenciální marker PDAC. (Harsha HC. et al., 2009) Jejich význam byl v tomto směru několika pracemi potvrzen. (Jahan R. et al., 2019) Exprese TTF1 byla popsána v buněčných liniích PDAC stejně jako jeho role v patogenezi ChP. (Ebert EP. et al., 1999)

5.10.2.2.10. Růstové faktory

Růstové faktory, jako např. midkine či IGF byly rovněž zkoumány jako potenciální onkomarkery vzhledem ke svému zdokumentovanému vlivu na kancerogenezi.

Midkine (neurite promoting growth factor 2) se řadí mezi růstové faktory, které mají vliv na rozvoj malignit gastrointestinálního traktu. (Aridome K. et al., 1995) Zajímavý je jeho potenciální vliv na chemorezistenci vůči gemcitabinu u PDAC, zprostředkovaný aktivací Notch signalizace prostřednictvím $\text{NK}\kappa\text{B}$. (Rawnaq T. et al., 2014)

Dysregulace drah růstových hormonů a jejich receptorů jsou jedním z klíčových faktorů přispívajících k onkogenezi. Příkladem může být insulinu podobný růstový faktor (IGF I-II) jeho vazebný protein (IGF-binding protein/IGFBP I-VI). Jejich fyziologie je rovněž svázána s glukózovým metabolismem, což z nichž činí zajímavý cíl zkoumání v souvislosti s patologiemi pankreatu. IGF mají prostřednictvím svých receptorů (IGF-R) cestou IGF1/AKT antiapoptotický a proliferační účinek, podílejí se na regulaci funkce β buněk pankreatu. Jejich funkce v metabolismu jsou v některých ohledech úzce spjaty s inzulinem (Gong Y. et al., 2017). IGF-1 je rovněž produkován tukovou tkání, a tedy zvýšeně při obezitě, která je stejně jako T2DM součástí metabolického syndromu. (Calle E. et al., 2004)

Buňky PDAC exprimují vysoké množství receptorů pro IGF (IGF-R). (Chi F. et al., 2013) Jejich zvýšená exprese koreluje z horší prognózou pacientů s PDAC. (Du C. et al., 2020). Rovněž touto cestou dochází k autokrinní aktivaci PDAC buněk i při absenci *KRAS* mutací, která je jinak nejběžnější cestou aktivace drah vedoucí k proliferaci PDAC. (Rajbhandari N. et al., 2017) Insulin je rovněž ligandem IGF-R, nabízí se tedy souvislost mezi stavy charakteristické hyperinzulinémií (T2DM) a PDAC. IGFBP2 a IGF-1 byly zkoumány u

pacientů s PDAC, ChP, PanIN lézemi i jako potenciální markery PDAC. (Włodarczyk B. et al., 2021, Dahlem C. et al., 2019, Kendrick ZW. et al., 2014)

5.10.2.2.11. Lipidomika

Pokročilá analýza spektra krevních lipidů se ukazuje být slibnou metodou detekce PDAC. Některá recentní data ukazují na efektivitu analýzy sérového lipidomického profilu pomocí hmotnostní spektrometrie v detekci nejen PDAC. (Wolrab D. et al., 2022, Naudin S. et al., 2023) Tato metoda, odhalující změny ve složení sfingomyelinů, ceramidů a fosfatidylcholinů, dosahuje senzitivity i specifity vyšší než 90 % a to i v časných stádiích PDAC. Charakter lipidového profilu má patrně souvislost i s fenotypem PDAC. Ve studii zaměřené na metabolický profil PDAC popisují autoři vyšší zastoupení glycerofosfolipidů u méně agresivních a vyšší zastoupení triacylglycerolů u agresivnějších fenotypů PDAC. (Kaoutari AE. et al., 2021)

5.10.2.2.12. Glykoproteomika

Glykoproteomika zkoumá profil glykovaných proteinů (ostatně CA19-9 je rovněž glykoprotein, a známé prekancerózy – mucinozní cystické neoplázie a IPMN – jsou charakteristické tvorbou glykoproteinů- mucinů) a odhaluje specifické patologické glykoproteiny typické pro jednotlivé malignity. Někteří autoři prezentují na glykoproteinech založené diagnostické panely karcinomu pankreatu. (Aronsson L. et al., 2018, Liu Y. et al., 2018)

Patofyziologickým podkladem využití glykoproteomiky k diagnostice neoplázií je přítomnost tzv. aberantní glykosylace. Glykosylace je jednou z posttranslačních modifikací struktury proteinů. Odehrává se v Golgiho aparátu či vakuolách endoplazmatického retikula a je důležitá pro tvorbu specifických konformací proteinů nebo pro jejich další funkci. Aberantní glykosylace může spočívat v odlišné struktuře navázaného polysacharidu a/nebo v odlišném počtu polysacharidů navázaných na konkrétní protein. Aberantní glykosylace proteinů není jen dobře známou vlastností řady nádorů, ale tyto patologické glykoproteiny se mohou přímo podílet na progresi maligního tumoru. (Pan S, 2016)

K identifikaci širokého spektra glykoproteinů je využívána kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Lze rovněž využívat techniky založené na použití lektinů – proteinů, které se váží na volné konce polysacharidových řetězců. K identifikaci

konkrétního patologického glykoproteinu tak lze využít např. na lektinu založenou imunoesej (lectin-ELISA). (Ahn YH, 2015, Wang M. et al., 2019)

5.10.2.2.13. mikro RNA (miRNA)

Tyto molekuly jsou nekódující jednovláknové struktury, které slouží k regulaci genové exprese mRNA k níž jsou komplementární. Předpokládá se, že se mimo jiné účastní regulace buněčného cyklu, a tedy, že mají potenciální vliv na kancerogenezi. Nadto nejsou tyto molekuly vázány jen intracelulárně, ale mohou být detekovány v plazmě, kde jsou obvykle transportovány v exosomech nebo ve vazbě na různé molekuly (např. HDL). (Prinz C. et al., 2022) Tato exosomální miRNA má rovněž vliv na kancerogenezi, kdy např. miRNA 301 -a dokáže ovlivnit polarizaci M2 makrofágů. (Wang X. et al., 2018) Profil miRNA je ovlivněn již časnými stadii *KRAS* mutací, tedy často ještě ve stadiu PanIN. (Humeau M et. al.2013)

MiRNA plazmatický profil se ukazuje být potenciálně užitečným diagnostickým markerem gastrointestinálních malignit včetně PDAC. (Škrha P. et al., 2015, Le Large TY et al., 2015)

V posledním desetiletí byla identifikována řada miRNA, které mohou sloužit jako diagnostický nebo prognostický faktor PDAC. (Daoud AZ. et al., 2019) Panely obsahující množství různých miRNA dosahují impresivních výsledků jak v detekci PDAC (90%, panel 25 miRNA), tak v jeho odlišení od chronické pankreatitidy (93%, panel 23 miRNA). (Bloomston M. et al., 2007, Yang J. et al., 2021)

5.10.2.2.14. „Liquid biopsy“ – „tekutá biopsie“

Rozvoj pokročilých analytických metod umožnil zaměřit pozornost na tzv. tekuté biopsie (liquid biopsies). Tato metoda využívá analýzy cirkulujících nádorových buněk, exosomální RNA či cirkulující nádorové DNA (ctDNA) v tekutých složkách lidského organismu (krev, moč, sliny, pankreatické šťávy, event. stolice). Výhodou je non-invazivita a tedy bezpečnost a snadná opakovatelnost vyšetření. Nevýhodou je t.č. chybějící standardizace a nízká senzitivita tohoto vyšetření ve srovnání s biopsií nádorové tkáně.

Cirkulující DNA pocházející z nádorových buněk se většinou do oběhu dostává při nekrotázách nebo apoptóze těchto buněk. Již samotná detekce cirkulujících nádorových buněk (75% senzitivita a 96,4% specifická pro PDAC) u pacientů s PDAC je tak negativním prognostickým faktorem (Xie ZB. et al., 2016, Ankeny JS. et al., 2016). V této DNA lze identifikovat specifické mutace jako např. mutace genu *KRAS*, které jsou pro PDAC charakteristické. Zejména v kombinaci s detekcí dalších mutací dalších genů

(*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*), případně jinými biomarkery (CA19-9, CEA, hepatocytární růstový faktor, osteopontin) dosahují tyto tekuté biopsie vysoké senzitivity a specificity (64% a 99.5% , resp. 80% a 100%). (Cohen JD. et al., 2017, Liu X. et al., 2019)

Patobiochemické změny u pacientů s PDAC, T2DM a ChP jsou komplexní povahy, společným znakem všech tří onemocnění je přítomnost zánětu, oxidačního stresu, alterace glukozového metabolismu a narušení metabolické homeostázy organismu. V případě ChP a PDAC je dominantním jevem provázející tato onemocnění tvorba extracelulární matrix pankreatickými stelátními buňkami. Interakce mezi PSC, extracelulární matrix, imunitním systémem, nádorovými buňkami a tkání pankreatu jsou důležitou a potenciálně terapeuticky ovlivnitelnou součástí onemocnění.

Rovněž není neobvyklé, že se diabetes či ChP a PDAC objevují u jednoho pacienta společně (typicky PDAC v terénu chronické pankreatitidy), T2DM a ChP jsou zároveň rizikovými faktory vzniku PDAC. Přístup k pacientům s jednotlivými chorobami se ale zásadně liší, stejně tak i jejich prognóza. Vzhledem k infaustní prognóze pokročilého karcinomu pankreatu je klíčovým úkolem identifikovat mezi těmito úzce spojenými patologiemi pacienty s PDAC, a to ideálně v časně fázi onemocnění. Identifikace biomarkerů spojených s PDAC je důležitá mimo jiné i pro pochopení patofyziologie tohoto onemocnění, což může přispět k rozvoji účinnější terapie PDAC.

6. Hypotéza a cíle práce

6.1. Hypotéza

Je zjevné, že zkoumaná onemocnění (chronická pankreatitida, karcinom pankreatu a diabetes mellitus 2. typu) jsou onemocnění s širokými dopady na celý organismus. Domníváme se, že analýzou širokého spektra parametrů lze definovat specifické biomarkery nebo jejich panely, které umožní časnou diagnostiku karcinomu pankreatu i mezi rizikovými skupinami pacientů. Domníváme se také, že jednotlivé markery nebo jejich skupiny by mohly odrážet specifické odlišnosti jednotlivých onemocnění, a tak nepřímo přispět k lepšímu pochopení jejich patofyziologie.

Za potenciální zdroj nových biomarkerů pak rovněž považujeme interakci mezi buňkami nádorového stroma, zejména pankreatickými stelátními buňkami, a buňkami nádorovými. PSC jsou jediné buňky pankreatu ukládající retinol. Hlavní aktivní metabolit retinolu – ATRA se podílí na řadě procesů, jejichž alterace může vést k rozvoji PDAC. Dosud publikované studii nabízejí nejednoznačné nebo i konfliktní údaje o hladinách vitamínu A či ATRA u patologií pankreatu. Vzhledem k vlivu pankreatických stelátních buněk, retinolu a ATRA na fyziologii pankreatu se domníváme, že změny v koncentracích ATRA a retinolu mohou korespondovat s rozvojem patologických stavů pankreatické tkáně. Retinol i ATRA, vzhledem ke svým komplexním úlohám v patogenezi sledovaných onemocnění, mohou být zvažovány jako diagnostické biomarkery PDAC.

6.2. Cíle práce

Studie I: Biomarkery u karcinomu pankreatu

Cílem práce bylo komplexní analýzou řady rutinních parametrů včetně základních antropometrických údajů a cíleně vybraných sérových markerů určit biomarker nebo jejich panel, umožňující odlišení pacientů s PDAC od probandů s T2DM, chronickou pankreatitidou či zdravých kontrol.

Mimo měření rutinně stanovovaných parametrů jsme si dali za cíl analýzu řady potenciálních biomarkerů PDAC. Tyto parametry byly vybrány na základě dříve provedených studií, případně se přímo se podílejí na karcinogenezi (DJ-1, HSP27, IGF 1-2, IGFBP, MIC1,

MMP7, Reg3A, S100A11, S100P, sICAM1, TFF1, RAGE), hrají roli v nádorovém stroma (metaloproteinázy, S100 proteiny) či jsou jejich hodnoty zpravidla alterovány u pacientů s T2DM a ChP

Konkrétní cíle práce:

a/ analyzovat koncentrace potenciálních biomarkerů u pacientů s ChP, T2DM a PDAC a zdravých kontrol

b/ stanovit biomarker nebo jejich panel, který by umožnil rozlišení PDAC od ostatních zkoumaných skupin s větší efektivitou nežli CA19-9.

Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM

Cílem práce bylo stanovit sérové koncentrace ATRA a retinolu u pacientů s PDAC, ChP, T2DM a u zdravých kontrol pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Konkrétní cíle práce:

a/ stanovit a porovnat koncentrace retinolu a ATRA u pacientů s ChP, T2DM a PDAC a zdravých kontrol

b/ ověřit možný potenciál retinolu a ATRA jako diagnostického biomarkeru PDAC

c/ popsat eventuální korelace mezi ATRA, retinolem a dalšími stanovovanými potencionálními biomarkery

7. Metodika

7.1. Soubory pacientů

7.1.1. Soubory pacientů Studie I: biomarkery u karcinomu pankreatu:

Do studie I byly zahrnuty osoby s karcinomem pankreatu, chronickou pankreatitidou, diabetem 2. typu a odpovídající zdravé kontroly. Celkem bylo zařazeno celkem 186 pacientů, 60 pacientů s T2DM, 47 pacientů s chronickou pankreatitidou, 28 pacientů s PDAC ve I-III stadiu a 51 zdravých kontrol (Tabulka 1)

Pacienti s histologickým vyšetřením potvrzeným karcinomem pankreatu byli na základě stagingu dle kritérií AJCC - American Joint Committee on Cancer classification – zařazeni do skupin I-IV. Do první studie byli zařazováni jen pacienti s PDAC stadium I-III dle AJCC.

Pacienti s chronickou pankreatitidou byli diagnostikováni na základě M-ANNHEIM kritérií. (Schneider A. et al., 2007) Pacienti s diabetem 2. typu byli diagnostikováni nejdéle 3 roky před zařazením do studie a byli sledováni na 3. interní klinice VFN. Diagnóza T2DM byla stanovena v souladu s doporučením Americké diabetické asociace. (ADA, 2010) Studie proběhla v souladu s aktuální verzí Helsinské deklarace a byla schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice. Osoby účastníci se této studie podepsaly informovaný souhlas se svým zařazením.

	Počet probandů	Věk	BMI (kg/m ²)	Pohlaví M/Ž
Chronická pankreatitida	47	55±12	23,9±4,22	32/15
T2DM	60	62±8	35,3±30,34	32/28
Zdravé kontroly	51	54±9	25,8±4,28	21/30
PDAC	28	66±6	26,1±3,30	14/14

Tabulka 2: Základní charakteristika souboru studie I: Biomarkery u karcinomu pankreatu.

Věk a BMI jsou uvedeny jako průměr ± SD (směrodatná odchylka)

7.1.2. Soubor pacientů Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM

Soubor pacientů této studie vycházel ze Studie I. Byl však navíc rozšířen i o pacienty ve IV. stadiu PDAC. Studie proběhla v souladu s aktuální verzí Helsinské deklarace a byla schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice. Osoby účastníci se této studie podepsaly informovaný souhlas se svým zařazením.

Do studie II tedy bylo zařazeno celkem 220 pacientů. 59 pacientů s diabetem 2. typu, 37 pacientů s chronickou pankreatitidou, 64 pacientů s karcinomem pankreatu (5 v I. Stadiu, 8. ve II. stadiu, 14 ve III. stadiu, 37 ve IV. stadiu) a 51 zdravých kontrol. Žádný z pacientů ani z kontrol neužíval suplementaci vitamínu A.

	počet	věk	BMI (kg/m²)	pohlaví m/ž
PDAC všechny skupiny	64	63 ± 8,86	25 ± 6,41	47/17
PDAC st I+II	13	66 ± 7,7	27 ± 2,8	6/7
PDAC st III	14	66 ± 4,5	26 ± 4	11/3
PDAC st IV	37	61 ± 10	25 ± 7,6	30/7
T2DM	59	63 ± 8,23	31 ± 5,82	31/28
Chronická pankreatitida	46	55 ± 12,28	24 ± 4,27	31/15
Zdravé kontroly	51	54 ± 8,68	26 ± 6,2	31/20

Tabulka 3: Soubor pacientů Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM

Věk a BMI jsou uvedeny jako průměr ± SD (směrodatná odchylka)

Vzorky krve byly získány od probandů ve Všeobecní fakultní nemocnice v Praze odběrem z vena basilica. Základní biochemické parametry byly stanovovány v rámci běžných vyšetření krve. Vzorky krve k analýze speciálních parametrů byly k získání séra odebrány do zkumavek bez přidání antikoagulancií. K získání plazmy byly vzorky odebírány do zkumavek s EDTA.

Vzorky byly centrifugovány při rychlosti 1450 ot./min (centrifuga EBA20, Hettich Zentrifugen, Německo) a před provedením analýzy skladovány v hlubokomrazicím boxu při -80°C. Laboratorní měření vybraných markerů byla provedena v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

7.2. Laboratorní metody

7.2.1. Stanovení koncentrací IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3

Sérové hladiny IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 byly stanovovány pomocí kitů ELISA firmy Mediagnost, Německo.

Princip použité metody

Principem kvantitativní sendvičové enzymové imunoanalýzy (ELISA – enzyme linked immunosorbent assay), je vazba mezi specifickou monoklonální protilátkou navázanou na povrch jamek mikrotitrační destičky a sledovaným antigenem (je-li ve vzorku přítomen). Ten vytváří s monoklonální protilátkou komplex, na který je v dalším kroku navázána biotinylovaná protilátka. Po promytí mikrotitrační destičky je do jamek přidán streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou. Ten se naváže na přítomný komplex protilátka/antigen/biotinylovaná protilátka. Po dalším promytí je přidán substrátový roztok. Enzymatickou reakcí pak vzniká barevného produktu, jehož množství odpovídá množství antigenu. Reakce je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Poté fotometricky stanovujeme absorbanci výsledného produktu, která odpovídá množství přítomného antigenu.

Stanovení koncentrací IGF 1

Reagencie

- Mikrotitrační destičky s navázanou myší monoklonální protilátkou proti IGF-1

- Kalibrační roztok (rekombinantní lidská IGF-1 v definovaných koncentracích), lyofilizovaný
- Kontrolní roztok (lidské sérum)
- IGF-1 konjugát (obsahuje biotinylovanou protilátku proti lidskému IGF-I)
- HRP (horseradich peroxidase) konjugát (streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou)
- Substrátové činidlo – stabilizovaný tetramethylbenzidin
- Zastavovací roztok (0,2 M kyselina sírová)
- Koncentrovaný promývací pufr
- Ředící roztok

Pracovní postup:

1. Se všemi reagensy pracujeme při pokojové teplotě
2. 50 ml koncentrovaného promývacího pufru naředíme s 950 ml destilované vody
3. Kontrolní roztok smícháme s 500 μ l ředícího pufru a ponecháme 15 minut při pokojové teplotě
4. Kalibrační roztoky A- E vytvoříme rozpuštěním lyofilizovaného standardu o definované koncentraci (A: 2 ng/ml, B: 5 ng/ml, C: 15 ng/ml, D: 30 ng/ml, E: 50 ng/ml) v 500 μ l ředícího roztoku,
5. Napipetujeme 80 μ l IGF-1 konjugátu do všech jamek mikrotitrační destičky
6. Přidáme 20 μ l kalibračních roztoků naředěných v poměru 1:21 ředícím roztokem, respektive 20 μ l vzorků či kontrol ve stejném ředění 1:21
7. Inkubujeme 1 hod na třepačce (350 otáček za minutu) při pokojové teplotě
8. 5x promyjeme promývacím roztokem
9. Do všech jamek přidáme 100 μ l HRP konjugátu
10. Inkubujeme 30 min při pokojové teplotě na třepačce (350 otáček za minutu)
11. Destičku 5x promyjeme promývacím roztokem

12. Do všech jamek přidáme 100 µl substrátového roztoku
13. Inkubujeme 15 minut ve tmě při pokojové teplotě
14. Do všech jamek přidáme zastavovací roztok
15. Do 30 minut měříme absorbanční při 450 nm s korekcí na 590 nm (fotometr Tecan Infinite M200, Tecan, Švýcarsko)

Koncentrace vzorku odečítáme z kalibrační křivky.

Pro stanovení koncentrací IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 byla použita stejná metoda od stejného výrobce s analogickými postupy.

7.2.2. Stanovení koncentrace osteopontinu, TIMP-1, MCP-1, HSP-27, MMP-9 a ICAM-1

Koncentrace osteopontinu, TIMP-1, MCP-1, HSP-27, MMP-9 a ICAM-1 byly stanoveny pomocí ELISA kitů firmy eBioscience (nyní Invitrogen). Dále popisujeme metodu stanovení sérových koncentrací osteopontinu:

Princip metody

Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickou protilátkou proti lidskému osteopontinu. Osteopontin obsažený ve standardních roztocích případně v analyzovaných vzorcích se během inkubace naváže na protilátky v jamkách. Po promytí jamek mikrotitrační destičky (odstranění dalšího biologického materiálu) je do jamek přidán roztok obsahující protilátky proti osteopontinu konjugované s biotinem. Tyto protilátky se během inkubace opět naváží na přítomný osteopontin. Po dalším promytí (odstranění přebytečných protilátek) je do jamek přidán streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou, který se naváže na komplex osteopontinu s konjugátem biotinu a protilátky proti osteopontinu. Po dalším promytí je přidán substrátový roztok. Enzymatickou reakcí mezi substrátem a křenovou peroxidázou vzniká barevný produkt. Reakce je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Fotometricky stanovujeme absorbanční při 450nm.

Reagencie:

- Mikrotitrační destičky pokryté specifickou protilátkou proti lidskému osteopontinu
- Biotin konjugát-roztok monoklonální protilátky proti osteopontinu konjugované s biotinem
- Ředící roztok (assay buffer)
- HRP konjugát (streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou)
- Lyofilizovaný standardní roztok osteopontinu S1-S7
- Koncentrovaný promývací pufr
- Substrátový roztok (tetrametylbenzidin)
- Zastavovací roztok (1M kyselina fosforečná)

Pracovní postup:

1. Všechny reagencie necháme při pokojové teplotě
2. 50 ml promývacího pufru naředíme destilovanou vodou do výsledného objemu 1000 ml
3. Biotin konjugát smícháme s ředícím roztokem v poměru 1:100
4. Streptavidin-konjugát smícháme s ředícím roztokem v poměru 1:100
5. Lyofilizovaný standardní roztok osteopontinu rozpustíme přidáním destilované vody k dosažení koncentrace 60 ng/ml.
6. Jamky mikrotitrační destičky opatrně promyjeme 2x promývacím roztokem a poté mikrotitrační destičku položíme dnem vzhůru na savý materiál
7. Do všech jamek mikrotitrační destičky určených pro standard pipetujeme 100 μ l ředícího roztoku
8. 100 μ l připraveného standardního roztoku rozpipetujeme do dvou řad mikrotitrační destičky tak, že do první jamky pipetujeme 100 μ l standardního roztoku, z této jamky odebereme 100 μ l vzniklé směsi standardu a ředícího roztoku a pipetujeme do další jamky. Postup opakujeme 5x k dosažení gradientu koncentrací 30-0,47 ng/ml.
9. Do jamek určených pro zkoumaný vzorek pipetujeme 80 μ l ředícího roztoku a 20 μ l vzorku
10. Inkubujeme 15-20 minut při pokojové teplotě na třepačce
11. Mikrotitrační destičku promyjeme promývacím roztokem

12. Do všech jamek přidáme 100 µl biotin konjugátu.
13. Inkubujeme hodinu na třepačce při pokojové teplotě
14. 6x promyjeme destičku a přidáme 100 µl HRP roztok do všech jamek
15. Opakujeme bod 14 a poté bod 15
16. Do všech jamek přidáme 100 µl substrátového roztoku
17. Inkubujeme 30 minut za pokojové teploty bez přístupu světla
18. Dosáhne-li standard s nejvyšší koncentrací osteopontinu tmavě modré barvy přidáme zastavovací roztok (100 µl)
19. Ihned odečítáme absorbanci barevného produktu ve vlnové délce 450 nm (referenční vlnová délka 620 nm, fotometr Tecan Infinite M200, Tecan, Švýcarsko).

Princip a postup stanovení TIMP-1, MCP-1, HSP-27, MMP-9, Protein S100P a ICAM-1 kity stejného výrobce je analogický ke stanovení osteopontinu.

7.2.4. Stanovení koncentrací HSP60 a HSP70

Koncentrace HSP60, HSP70 byly stanovovány metodou ELISA kity firmy StressMarq, Kanada). Dále popisujeme stanovení koncentrací HSP70.

Princip metody

Princip metody ELISA je v tomto případě je analogický k výše popsaným metodám.

Reagencie

- Mikrotitrační destička s protilátkami proti HSP70
- Standardní roztok rekombinantního HSP70
- Ředící roztok
- Promývací roztok
- Biotin konjugát s protilátkami proti HSP70
- Streptavidin-HRP konjugát
- Substrátový roztok
- Zastavovací roztok

Pracovní postup:

1. Rekonstituujeme standardní roztok s 500 μ l ředícího roztoku k dosažení koncentrace 100 ng/ml
2. Připravíme 7 zkumavek pro jednotlivé koncentrace standardní křivky (50 ng/ml, 25ng/ml, 12,5ng/ml, 6,25ng/ml, 3,125ng/ml, 1,563ng/ml a 0 ng/ml)
3. Do každé zkumavky přidáme 250 μ l ředícího roztoku
4. Standardní roztok o koncentraci 100 ng/ml naředíme ředícím roztokem 1:1 . Poté 250 μ l tohoto roztoku smícháme s 250 μ l ředícího roztoku. Postup opakujeme k dosažení koncentrace 1,563ng/ml.
5. Ředící roztok použijeme jako nulový standard.
6. Do mikrotitrační destičky napipetujeme na zvolená místa standardní roztoky a vzorky.
7. Inkubujeme při 37 °C 2 hodiny
8. 4x promyjeme promývacím roztokem
9. Do jamek přidáme 100 μ l biotin-konjugátu a opakujeme bod 7 a poté bod 8
10. Do každé jamky přidáme 100 μ l HRP roztoku
11. Inkubujeme 30 min při pokojové teplotě a opakujeme bod 8
12. Do každé jamky přidáme 100 μ l substrátového roztoku. Inkubujeme při pokojové teplotě ve tmě za vzniku barevného produktu²²⁰
13. Reakci zastavíme po 30 minutách přidáním zastavovacího roztoku
14. Absorbanci vzniklého barevného produktu měříme při 450 nm (fotometr Tecan Infinite M200, Tecan, Švýcarsko).

Analýza koncentrací HSP60 je analogická k výše uvedenému postupu.

7.2.5. Stanovení koncentrace MMP-7

Pro stanovení koncentrací proteinu MMP-7 jsme použili metodu ELISA firmy R&D Systems, USA.

Princip metody

Princip metody ELISA je v tomto případě je analogický k výše popsaným metodám. Povrch jamek mikrotitrační destičky je potažen monoklonální protilátkou proti lidské MMP7. Po přidání standardu a vzorků se MMP7 naváže na tuto imobilizovanou protilátku. Po promytí destičky je do jamek mikrotitrační destičky přidána polyklonální protilátka proti

MMP7 s navázaným enzymem, který po přidání enzymového substrátu dává za vzniknout barevnému produktu, který je stanovován fotometricky.

Reagencie:

- Mikrotitrační destička s navázanou monoklonální protilátkou proti MMP7
- Polyklonální protilátka proti MMP7 konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP konjugát)
- Standardní roztok
- Ředící roztok
- Promývací roztok
- Kalibrační ředící roztok (zvířecí sérum)
- Substrátový roztok A+B
- Zastavovací roztok

Postup:

1. Se všemi reagenty pracujeme při pokojové teplotě.
2. Koncentrát ředícího roztoku rozpustíme v 480 ml destilované vody za vzniku 500 ml roztoku.
3. Substrátový roztok získáme smícháním složky A (peroxid vodíku) a B (tetrametylbenzidin). Vzniklý roztok uchovááme ve tmě.
4. Řadu standardních roztoků získáme rozpuštěním lyofilizovaného standardu v destilované vodě k získání koncentrace 100 ng/ml. Do sedmi zkumavek přidáme vždy 200 µl ředícího kalibračního roztoku. Poté do první zkumavky přidáme 40 µg standardu, ze vzniklé směsi odebereme 40 µg a napipetujeme do další zkumavky – takto postupně získáme řadu standardů o koncentracích 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,313 ng/ml a 0,156 ng/ml.
5. Ředící kalibrační roztok slouží jako nulový standard
6. Do jamek mikrotitrační destičky napipetujeme 100 µl ředícího roztoku
7. Do jamek napipetujeme 50 µl standardu/vzorku
8. Inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě na třepačce při 500 otáčkách /min
9. Promyjeme promývacím roztokem a osušíme na savém podkladu
10. Přidáme 200 µl MMP7 konjugátu do každé jamky, inkubujeme 2 hodiny na třepačce

11. Opakujeme bod 9.
12. Do každé jamky přidáme 200 µl substrátu a inkubujeme (bez použití třepačky a ve tmě) za pokojové teploty 30 minut
13. Do každé jamky přidáme 50 µl zastavovacího roztoku – barva roztoku v jamkách se změní z modré na žlutou
14. Během 30 minut fotometricky stanovujeme absorbanci při 450 nm s korekcí na 570 nm (fotometr Tecan Infinite M200, Tecan, Švýcarsko)

7.2.6. Stanovení koncentrace CEACAM-1, DJ-1 a ALCAM

Koncentrace DJ-1, ALCAM, CEACAM-1 jsme měřili pomocí metody ELISA kity Abnova, Taiwan. Stanovování probíhalo dle postupů udávaných těmito výrobci. Princip i postup metody je analogický k předešlým postupům.

Stanovení koncentrací CEACAM-1

Princip metody

Princip metody ELISA je v tomto případě obdobný jako u IGF-1 .

Reagencie

- Mikrotitrační destička s navázanou protilátkou proti lidskému CEACAM-1
- Promývací pufr (roztok)
- Standardní roztok
- Ředící roztok (koncentrát)
- Roztok biotinylované protilátky proti CEACAM1
- Substrátové činidlo A (HRP-streptavidin konjugát)
- Substrátové činidlo B (tetrametylbenzidin)
- Zastavovací roztok (0,2 M kyselina sírová)

Postup

1. Se všemi reagensii pracujeme při pokojové teplotě (18-25°C).

2. 400 μ l ředícího roztoku smícháme se standardním roztokem k dosažení koncentrace 50 ng/ml
3. Napipetujeme 150 μ l tohoto roztoku do zkumavky se 350 μ l ředícího roztoku. Takto získáme roztok o koncentraci 15000 pg/ml.
4. Připravíme si zkumavky se 400 μ l ředícího roztoku
5. Do první zkumavky přidáme 200 μ l roztoku vniklého v bodě tři. Takto vzniklý roztok pipetujeme do další zkumavky. Takto pokračujeme k dosažení řady standardních koncentrací 15000 pg/ml, 5000 pg/ml, 1667 pg/ml, 555,6 pg/ml, 185,2 pg/ml, 61,73 pg/ml a 20,58 pg/ml. Ředící roztok slouží jako nulový standard
6. Do každé jamky pipetujeme 100 μ l standardu/vzorku
7. Inkubujeme 2,5 hodiny za pokojové teploty na třepačce
8. Promyjeme promývacím roztokem a osušíme na savé podložce
9. Do jamek přidáme 100 μ l biotinylované protilátky a inkubujeme 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě
10. Přidáme 100 μ l substrátové činidlo A (HRP-streptavidin), inkubujeme 45minut na třepačce při pokojové teplotě
11. Promyjeme promývacím roztokem a osušíme na savé podložce
12. Přidáme 100 μ l substrátového činidla B, inkubujeme 30 minut na třepačce při pokojové teplotě a ve tmě
13. Přidáme 50 μ l zastavovacího roztoku a ihned odečítáme absorbanci fotometrem při 450 nm (fotometr Tecan Infinite M200, Tecan, Švýcarsko).

Princip stanovení hladin DJ-1, ALCAM kity stejného výrobce je analogický k výše uvedenému.

7.2.7. Další laboratorní parametry

Parametry adiponektin, sRAGE, MIC-1, Reg 1 α , midkine, leptin, OPG, TFF1, S100A6, REG3A, S100A11 a PANDER byly stanovovány metodou ELISA v laboratořích Biovender (Biovender Laboratorní medicína, s.r.o., Česká republika).

Parametry, které byly součástí běžných vyšetření, byly stanoveny automatickými analyzátory v Centrální biochemické laboratoři ÚLBLD 1. LF UK a VFN. Základní biochemické parametry byly změřeny analyzátozem Modular Roche (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim, Německo). Koncentrace CEA, CA19-9 byly stanovovány pomocí chemiluminescence automatickým analyzátozem Architekt, Abbott, USA. Parametry CA 72-4, insulin, C-peptid byly měřeny pomocí chemiluminescence analyzátozem Modular, Roche, Německo; AFP bylo stanoveno pomocí chemiluminescence na analyzátozu Centaur, Siemens, Německo;

7.2.8. Stanovení sérových hladin ATRA a retinolu

Ke stanovení hladin ATRA a retinolu byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography – HPLC) s UV detekcí.

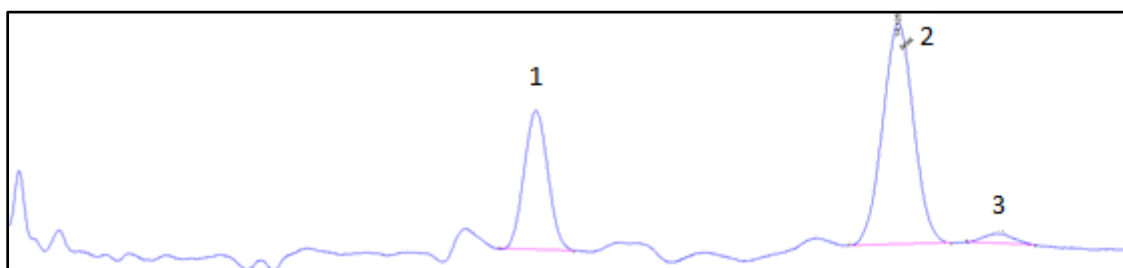
HPLC je nejrozšířenější fyzikálně-chemická technika, která je využívána k identifikaci a kvantifikaci bioanalytů. Principem této metody je rozdílná distribuce látek mezi dvě nemísitelné fáze, nepohyblivou (stacionární) zakotvenou na nosiči (koloně) a pohyblivou (mobilní), kterou představuje kapalina. Vzorek je unášen mobilní fází za pomoci vysokotlakého čerpadla do kolony, kde dochází k separaci složek vzorku, které jsou následně unášeny do detektoru. Výsledkem je chromatografický záznam, který je interpretován pomocí příslušného softwaru.

Kalibrace ATRA byla provedena metodou vnitřního standardu (ISTD) pomocí přidavku standardního roztoku kyseliny retinové na 5 koncentračních hladinách od 0,78 – 25 ng/ml. Výsledná koncentrace ATRA v lidském séru v ng/ml byla vypočítána z příslušné kalibrační křivky. Výsledná koncentrace vitamínu A v séru v mg/l byla vypočtena ze známé koncentrace kalibrátoru (Clnical Serum Calibrator od firmy Recipe) a ploch příslušných píků.

Standardní roztok byl připraven rozpuštěním 1 mg ATRA v 1 ml dimethyl-sulfoxidu (DMSO). Tento roztok byl dále ředěn metanolem na výslednou koncentraci 1000 ng/ml. Jako vnitřní standard byl použit 1 mg acitretinu (kyselina (9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoová), který byl rozpuštěn v 1 ml DMSO a naředěný metanolem na výslednou koncentraci 1000 ng/ml. Tyto roztoky byly kvůli stabilitě skladovány při -20°C.

Vzorek séra 450 μ l s 50 μ l ISTD byl deproteinován 500 μ l acetonitrilu. Po promíchání a následném stočení byla k supernatantu přidána směs 1,5 ml hexan:ethylacetát (1:1). Extrakt byl zakoncentrován dusíkem a rozpuštěn v 50 μ l methanolu.

Při měření ATRA a retinolu byl použit přístroj Hewlett Packard 1100 (Waldbronn Germany). K HPLC analýze bylo použito 35 μ l vzorku, které bylo isokraticky separováno na koloně Agilent Eclipse XDB-C18/5 μ m 4.6*150 mm (Agilent, Santa Clara, USA) při 37°C. Jako mobilní fáze byla použita směs 83% metanolu a 17% 0,2% kyseliny octové, její průtok byl 1ml/min. Diodový detektor DAD byl nastaven na vlnovou délku 355 nm. K analýze získaného chromatogramu byl použit software HP Chemstation version A.07.01(682) (Agilent). Výsledný chromatografický záznam je zobrazen níže. (Obr. 3)



Obrázek 3: Chromatografická křivka

1: vnitřní standard acitretin

2: vitamín A

3: ATRA

7.3. Statistické zpracování

7.3.1. Statistická analýza Studie I – Biomarkery u karcinomu pankreatu

Vzhledem k širokému spektru a množství sledovaných parametrů, jejichž statistická analýza vyžadovala pokročilé statistické metody, a vzhledem k faktu, že získané rozložení neumožňovalo vždy vytvořit statisticky korektní model za užití klasických parametrických i non-parametrických metod, byla k analýze získaných dat použita metoda strojového učení.

Ke zhodnocení koncentrací jednotlivých analytů byly použity standardní popisné statistické metody (průměr, směrodatná odchylka, medián). K porovnání koncentrací jednotlivých analytů mezi skupinami byla použita jednocestná analýza rozptylu (ANOVA), následována Tukeyho testem. Za statisticky významné rozdíly byly považovány ty s $p < 0,05$.

Ke základnímu zhodnocení souboru byla použita kroková metoda lineární regrese, do níž byly zařazeny biomarkery s $p < 0,05$.

Vzhledem k tomu, že charakter souboru nesplňoval všechny podmínky normality, a multikolinearity, použili jsme k detailnější analýze souboru metodu „náhodného lesa“ (Random forrest - RF). Tato metoda je kombinovanou učící metodou užívanou pro klasifikaci a regresi. Patří mezi základní metody strojového učení se supervizí. Algoritmus RF pro klasifikaci a regresi vytváří množství jednotlivých rozhodovacích „stromů“. Výsledkem rozhodovacích stromů jsou jednotlivé parametry. Cílem této metody je vytvořit model, který dokáže odlišit cílové skupiny na základě jejich odlišných vlastností. V našem případě rozumíme cílovými skupinami zkoumané skupiny (ChP, T2DM, zdravé kontroly a PDAC), a vlastnostmi analyzované biomarkery. K vytvoření tohoto modelu je využita část dat coby tréninkový dataset. Na zbývajících probandech je model testován. V našem případě byla každá skupina (T2DM, ChP, PDAC a zdravé kontroly) náhodně rozdělena na dvě části v poměru 80%:20%. K minimalizaci rizika korelací, které by v tomto případě mohly komplikovat interpretaci výsledků (umělým nadhodnocením některých parametrů), byly tyto korelace eliminovány využitím dendrogramu vytvořeném pomocí shlukové analýzy Wardovou metodou na základě stanovení Spearmanova koeficientu korelace.

K zajištění vyrovnanosti všech skupin, které se navzájem lišily počtem probandů, bylo nastavení RF upraveno-poměrná váha každé proměnné byla nastavena nepřímo úměrně jejímu zastoupení v jednotlivých skupinách.

V případě logistické regrese byla využita metoda tzv. „downsamplingu“, kdy model vybírá z větší skupiny n -hodnot, kdy n je velikost menší skupiny.

K získání modelu byla využita v případě RF i LR větší část dat analyzovaných skupin, Výkonnost modelu byla testována na menší podskupině a hodnocena stanovením senzitivity, specificity, přesnosti, úplnosti a AUC. Navzájem byly porovnávány skupiny takto : PDAC vs T2DM, PDAC vs. ChP, PDAC vs zdravé kontroly, PDAC vs T2DM + ChP + zdravé kontroly.

Všechny modely a analýzy byly provedeny v programovacím jazyku Python , pomocí volně dostupného (freeware) softwaru Spyder (licencován MIT , <https://www.spyder-ide.org/>).

7.3.2. Statistické zpracování Studie II -: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM

K základnímu zpracování získaných dat jsme použili Kruskal-Wallisův test. Ke stanovení významnosti rozdílů koncentrací ATRA a retinolu mezi jednotlivými skupinami byl použit Mann-Whitneyův test. Za hladinu statistické významnosti jsme považovali $p < 0,05$.

Vzhledem k omezenému počtu probandů v časných stádiích PDAC jsem se rozhodli sloučit pacienty ve stadiu I a II do jedné skupiny. Vycházeli jsem z předpokladu, že obě skupiny sdílí podobné klinické charakteristiky, zejména resektabilitu (nepřítomnost metastáz či postižení arteria mesenterica superior či truncus coeliacus). K zhodnocení korelací mezi biomarkery analyzovanými ve studii I, retinolem a ATRA jsme stanovili Spearmanův koeficient (r_s). U části probandů byly hodnoty ATRA natolik nízké, že je nebylo možno kvantifikovat. Abychom mohli tyto probandy zařadit, použili jsme metodu „robust regression on order“ (ROS). Jedná se o semiparametrickou metodu založenou na modelu lineární regrese, která pomocí výpočtu logaritmicke-normálního rozdělení založeném na analýze dostupných kvantifikovaných dat umožňuje původně nekvantifikovatelná data tak, aby nedošlo ke zkreslení.

Hladiny ATRA a retinolu byly korelovány s CA19-9, základními nutričními parametry a parametry zánětu. Statistická analýza byla provedena v open-source programu Jupyter software Jupyter Notebook: License. Open-source tool, version 5.1. Copyright (c) 2017) a programu Spyder (licence MIT, freeware, <https://www.spyder-ide.org/>) za použití programovacího jazyka Python.

8. Výsledky

8.1. Výsledky Studie I: biomarkery u karcinomu pankreatu

Naměřené koncentrace jednotlivých parametrů uvádíme v tabulce 4. Na základě zjištěných rozdílů mezi jednotlivými skupinami byly pomocí dvou statistických metod (logistické regrese a metody strojového učení „náhodný les“) definovány panely, pomocí kterých lze odlišit PDAC od ostatních skupin.

	<i>PDAC, STADIUM I-III</i>	<i>T2DM</i>	<i>CHP</i>	<i>ZDRAVÉ KONTROLY</i>	<i>P HODNOTY (ANOVA, TUKEYHO TEST)</i>
	průměr±SD	průměr±SD	průměr±SD	průměr±SD	
<i>AAT (g/l)</i>	2±0,5	1,5±0,3	1,7±0,4	1,4±0,2	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>ADIPONEKTIN (ng/ml)</i>	23602,5±14 223,1	18033,8±75 09,3	21072,3±121 93,2	17303,1±778 3	*,%
<i>ALBUMIN (g/l)</i>	40,1±4,2	45,1±3,7	45,1±4,6	45±2,2	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>ALCAM (pg/ml)</i>	214,6±65,8	199,6±86,5	196,2±76	171,7±62,2	
<i>ALP (μkat/l)</i>	2,5±3,6	1±0,3	1,8±2	1±0,2	***, &&&, %%%
<i>ALT (μkat/l)</i>	0,9±0,8	0,6±0,3	0,6±0,5	0,5±0,2	***, &&, %%%
<i>AMS-P (μkat/l)</i>	1,1±3	0,4±0,2	0,7±0,8	0,4±0,2	
<i>APO-B (g/l)</i>	1±0,2	1±0,3	1±0,3	1,2±0,3	**
<i>AST (μkat/l)</i>	0,8±0,7	0,5±0,2	0,5±0,3	0,4±0,1	***, \$, &&&, %%%
<i>CA19-9 (kU/l)</i>	1108,6±297 9,4	14,2±10,4	22,8±57,8	9,4±6,1	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>CA72-4 (kU/l)</i>	6,7±14,9	2,2±2,2	2,1±2,8	1,9±1,9	** ,\$\$, &&, %%

CEA (µg/l)	3,3±3,6	1,7±1,2	2±1,5	1±0,6	***, \$, &&&, %%%
CEACAM (NG/ML)	89,3±95,3	47,2±48,1	75,6±75,8	46,9±11,9	** , &&, %%
CHOL (mmol/l)	4,8±1,1	4,7±1,1	4,8±1,2	5,7±1,1	***, %%
C-PEPTID (nmol/l)	0,8±0,5	1,1±0,4	0,7±0,3	0,8±0,2	***, &
CRP (mg/ml)	22,2±44,5	4,3±5,2	9,4±19,5	3±4	***, &&&, %%%
DJ-1 (ng/ml)	52,3±85,1	18,1±11,1	38,4±35,6	38,2±39,9	** , &&
FERITIN (µg/l)	358,7±371,1	211,4±229,9	207,6±197,5	124,5±119,6	***, %%%
GGT (µkat/l)	4,4±10,5	0,7±0,7	2,6±8,6	0,5±0,3	*, &, %
HBA1C (mmol/mol)	45,5±11,6	49,5±29,3	42,6±12,9	34,8±5,5	**
FRUKTOSAMIN (µmol/l)	247,1±44,6	261,4±59,2	245±37,9	229,8±17	**
GLYKÉMIE (mmol/l)	6,8±2,4	7,5±2,3	6,1±2,8	4,9±0,6	***, %%%
HDL-CHOL (mmol/l)	1,2±0,4	1,3±0,3	1,4±0,6	1,5±0,4	** , %
HSP27 (pg/ml)	2485,6±1400,4	1499,4±834,4	1712,6±634,5	1838,3±1059,5	***, \$\$, &&&, %
HSP60 (mg/ml)	4963,7±1383,1	4226,7±1426,6	4639,2±1440,1	5157±1749,1	*
HSP70 (ng/ml)	32,8±33,2	19,3±30,4	27,6±25,8	24,7±26,6	
IGF-1 (ng/ml)	124,6±51,1	162,4±56,7	170,2±82,5	184,7±46,1	***, \$\$, &, %%%
IGF-2 (ng/ml)	535,8±183,6	743,1±236,5	646,6±200,7	744,7±127,6	***, &&&, %%%
IGFBP-1 (ng/ml)	11,8±8,1	5,5±4,6	12,9±11,9	6,7±6,6	***, &&&, %
IGFBP-2 (ng/ml)	597±295,9	299,6±198,9	575,6±272,2	330,7±143	***, &&&, %%%
IGFBP-3 (ng/ml)	2427,3±552,8	2622±686,3	2483,8±587,5	2695,8±411,3	
INZULIN (U/ml)	9,2±7,5	14,4±8,5	8,6±8	8,7±3,8	***, &

LEPTIN (ng/ml)	12,3±11,3	19,4±14,3	6,4±8,3	13,5±12,4	***
MCP-1 (pg/ml)	897,6±785,2	690,3±537,7	786,4±595,1	812,9±823,4	
MIC-1 (pg/ml)	3715,9±2336,1	3351,8±2022,2	2789±1953,2	1257±733,7	***, %%%
MIDKINE (ng/ml)	0±0	0±0,1	0,4±2,3	0±0,1	
MMP-7 (ng/ml)	2,3±1,1	1,5±0,7	1,5±1	0,9±0,5	***, \$\$\$, &&&, %%%
MMP-9 (ng/ml)	202±179,7	197±180,5	197,7±173	140,7±124,9	
OPG (pmol/l)	8±3	6,4±2	7,2±5	4,8±1,5	***, %%%
PANDER (ng/ml)	9,3±20,8	10,5±22,7	4,6±15,3	5,5±15,1	
PCT (µg/l)	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	*, &
PREALBUMIN (g/l)	0,2±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	***, \$\$\$, &&&, %%
REG1A (ng/ml)	264,1±203,3	171,8±107,4	175,6±116,9	89,8±42,8	*** \$\$ &&& %%%
REG3A (U/ml)	685,4±555,8	315±287,4	469,9±513,8	173,9±90,9	***, &&&, %%%
S100A11 (ng/ml)	7,2±6,1	5±6,6	3,7±2,1	3,6±2,5	** , \$\$, %%
S100A6 (ng/ml)	99,2±105,9	46±25,1	75,7±34,6	68,9±37,9	***, &&&
S100P-PLAZMA (ng/ml)	13,6±17,8	5,5±4,9	4,3±3,6	4,5±4	***, \$\$\$, &&&, %%%
S100P-SÉRUM (ng/ml)	17±13,4	8,9±4,3	14,2±6,7	11,9±6,8	***, &&&, %
SAA (mg/ml)	28,8±58,2	10,7±26,2	26,4±62,6	5,5±3,2	*
SATURACE TRANSFERRINU (%)	24±12,3	26,3±10,7	32,4±11,7	26,6±12,1	
SLCAM-1 (ng/ml)	577±209,9	405,2±104	510,5±202,7	377,1±75,9	***, &&&, %%%
SRAGE (pg/ml)	550,5±213	530±175,1	614,8±234,4	543±221,4	

TAG (mmol/l)	1,4±0,7	1,8±1	1,4±1,1	1,4±1	
TFF1 (ng/ml)	3,6±3	3,5±3,9	3±3	1,4±1	***, %%
TIMP-1 (ng/ml)	655,9±290	619,1±748,6	556,7±252,2	458,1±126,6	
CB (g/l)	66±7,8	70,8±5,1	71,4±6,1	71,1±4,8	***, \$\$\$, &&&, %%%
TRANSFERRIN (g/l)	2,4±0,4	2,9±0,6	2,7±0,5	2,9±0,5	***, &&&, %%%
VITAMIN B12 (pmol/l)	472,9±218,2	409,4±161,5	456,2±274,3	410,1±114,1	

Tabulka 4: Koncentrace měřených parametrů u jednotlivých sledovaných skupin.

p -hodnoty ANOVA testu a Tukeyho testu:

*: $p < 0.05$ ANOVA; **: $p < 0.01$ ANOVA; ***: $p < 0.001$ ANOVA

\$: $p < 0.05$ PDAC vs ChP; \$\$ $p < 0.01$ PDAC vs ChP; \$\$\$ $p < 0.001$ PDAC vs ChP

&: $p < 0.05$ PDAC vs T2DM; && $p < 0.01$ PDAC vs T2DM; &&& $p < 0.001$ PDAC vs T2DM

?: $p < 0.05$ PDAC vs zdravé kontroly; %% $p < 0.01$ PDAC vs zdravé kontroly; %%% $p < 0.001$ PDAC vs zdravé kontroly

Zkratky: PDAC - karcinom pankreatu, T2DM – diabetes mellitu 2. typu, ChP – chronická pankreatitida, RF – random forest; LR - logistická regrese; AAT – alfa-1-antitrypsin; ALCAM -aktivovaná adhezní molekula leukocytů; ALP : alkalická fosfatáza; ALT: alaninaminotransferáza; AMS-P – pankreatická amyláza; ApoB – apolipoprotein B; AST aspartátaminotransferáza; CA19-9 – karbohydrát antigen 19-9; CA72-4 – karbohydrát antigen 72-4; CB- celková bílkovina; CEA - karcinoembryonální antigen; CEACAM - carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules; CRP C-reaktivní protein; DJ-1 (ng/ml) protein deglykláza DJ-1; GGT - γ -glutamyltransferáza; HbA1c: glykovaný hemoglobin, HDL-chol: lipoprotein o vysoké hustotě; HSP - protein teplotního šoku; Chol – cholesterol; IGF – insulin bodobný růstový

faktor; IGFBP - IGF vazebný protejn; INS – inzulin; MCP-1- monocyte chemoattractant protein -1; MIC-1 – inhibiční cytokine makrofágů; MMP—matrixová metaloproteináza ; OPG - osteoprotegerin; PCT – prokalcitonin; Prealb – prealbumin; Reg - regenerating protein; SAA – sérový amyloid A; sICAM – solubilní mezibuněčná adhezni molekula; sRAGE – solubilní receptor konečných produktů pokročilé glykace; TAG – triacylglycerol; TFF1 – trefoil factor 1; TIMP-1 (ng/ml) tkáňový inhibitor metaloproteináz 1. PANDER – z pankreatu odvozený factor (PANcreatic DERived factor)

Výsledky logistické regresní (LR) analýzy

Panel „prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, Ca72-4“ získaný LR analýzou byl získán analýzou skupiny 70 pacientů, testován na souboru 18 pacientů. Tento panel odlišil pacienty s PDAC od T2DM se senzitivitou 0,64 a specificitou 0,81; AUC 0,8.

Panel „IGF-1, S100A11, Reg1 α “ získaný analýzou 60 pacientů byl testován na 15 pacientech. Tento panel odlišil PDAC od ChP se senzitivitou 0,86 a specificitou 0,38; AUC 0,76.

Panel „IGF-2, S100A11, Reg3A“ odlišil pacienty s PDAC od zdravých kontrol se senzitivitou 0,86 a specificitou 0,76; AUC 0,95. Testován byl na 16 probandech, získán byl analýzou 63 pacientů.

Panel „albumin, AAT, S100P-sérum, CRP, CA19-9, TFF1, MMP-7“ odlišil PDAC od ostatních skupin (ChP, T2DM, zdravé kontroly) se senzitivitou 0,71 a specificitou 0,9; AUC 0,89. Získán byl analýzou 138 subjektů a testován na 38 probandech.

Všechny uvedené panely a jejich parametry splňují kritérium $p < 0,05$.

Výsledky metody „náhodný les“ (random forest)

Touto metodou jsme stanovili panely biomarkerů, které zlepšují efektivitu markeru CA19-9 v identifikaci PDAC. Biomarkery v jednotlivých panelech jsou řazeny postupně dle významu pro jednotlivé predikce.

Panel „CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3a, HSP27“ získaný analýzou 70 probandů (testován na 18 subjektech) detekoval PDAC mezi T2DM lépe nežli CA19-9 se

senzitivitou 0,89 (vs 0,71), specificitou 0,89 (vs 0,83), AUC 0,92 (vs 0,82). Nejvyšší predikční hodnotu měl v tomto panelu marker CA19-9.

Panel „S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3a“ získaný na souboru 60 pacientů a testovaný na 15 probandech odlišil PDAC od ChP lépe nežli CA19-9 se senzitivitou 0,80 (vs 0,57), specificitou 0,70 (vs 0,94), AUC 0,90 (vs 0,75). V tomto panelu měl nejvyšší prediktivní úlohu marker CA19-9.

Panel „MMP-7, Reg3a, sICAM1, OPG, CB, feritin“ získaný analýzou markerů 63 jedinců a testovaný na 16 probandech dokázal PDAC odlišit od zdravých jedinců lépe než CA19-9 se senzitivitou 1,0 vs 0,71 , specificitou 0,85 vs 0,84 a AUC 0,89 vs 0,78. V tomto panelu měl největší přínos marker MMP-7.

Panel „CA19-9, S100P-plasma, AAT, albumin, adiponektin, IGF-1, MMP7, S100A11“ získaný analýzou 148 probandů a testovaný na 38 pacientech odlišil PDAC lépe od ostatních skupin nežli samotný CA19-9 se senzitivitou 0,86 vs 0,71, specificitou 0,87 vs 0,89 a AUC 0,91 vs 0,80). Zde byl nevýznamnějším markerem CA19-9.

Vzhledem k tomu, že CA19-9 je dobře známý marker PDAC. Rozhodli jsme se provést další analýzu bez CA19-9, abychom ověřili, zda i po jeho vyřazení ze sledovaných parametrů lze vytvořit srovnatelně efektivní panel biomarkerů. Počet biomarkerů v každém panelu jsme omezili na osm – tak aby jejich počet nepřevážil počet markerů v panelech definovaných analýzou všech biomarkerů včetně CA19-9. Naším záměrem bylo vytvořit takový panel, jehož efektivita by předčila výkonnost CA19-9. Efektivita takto definovaných panelů tak byla porovnávána s výkonností CA19-9.

Za těchto podmínek jsme dosáhli následujících výsledků:

Panel „HSP27, prealbumin, INS, IGF-2, SAA, DJ-1, CB, CEA“ neprokázal ve srovnání s CA19-9 vyšší účinnost v odlišení PDAC od pacientů s T2DM při senzitivě 0,67 vs 0,71 , specificitě 0,83 vs 0,93 a AUC 0,75 vs 0,82

Panel „SAA, leptin, CB, prealbumin, HSP60, DJ-1, TAG“ dosáhl horší efektivity ve srovnání s CA19-9 v identifikaci pacientů s PDAC mezi pacienty s chronickou pankreatitidou (senzitivita 0,50 vs 0,57, specificita 0,56 vs 0,94, AUC 0,53 vs 0,75)

Panel „CEA, HbA1c, AST, HDL-chol, prealbumin, SAA, IGF-2, CB“ je efektivnější nežli CA19-9 v odlišení PDAC mezi zdravými kontrolami při senzitivitě 0,83 vs 0,71, specificitě 0,90 vs 0,84 a AUC 0,87 vs 0,78.

Panel „SAA, prealbumin, HSP27, CB, adiponektin, CEA, IGF-2, AMS-P“ je srovnatelný s CA 19-9 v odlišení PDAC od ostatních skupin (senzitivita 0,67 vs 0,71 , specificita 0,91 vs 0,89 , AUC 0,79 vs 0,89). Logistický regresní model by při vyloučení CA19-9 nebyl statisticky korektní, a proto jsme tuto analýzu neprováděli. Výsledky pro jednotlivé panely shrnuje tabulka (Tabulka 5).

	AUC				SPECIFICITA				SENZITIVITA			
	RF	LR	CA19-9	RF bez CA19-9	RF	LR	CA19-9	RF bez CA19-9	RF	LR	CA19-9	RF bez CA19-9
PDAC VS T2DM	0.92	0.80	0.82	0.75	0.89	0.81	0.93	0.83	0.89	0.64	0.71	0,67
PDAC VS CHP	0.90	0.76	0.75	0.53	0.70	0.38	0.94	0.56	0.80	0.86	0.57	0.50
PDAC VS KONTROLY	0.89	0.95	0.78	0.87	0.85	0.76	0.84	0.90	1.00	0.86	0.71	0.83
PDAC VS DM,CH,KON	0.91	0.89	0.80	0.79	0.87	0.90	0.89	0.91	0.86	0.71	0.71	0.67

Tabulka 5. Efektivita panelů získaných logistickou regresí i metodou random forest v odlišení PDAC od ostatních skupin ve srovnání s CA19-9

Nejvyšší hodnoty jsou vyznačeny tučně

Srovnávané panely:

RF – random forest:

PDAC vs T2DM: CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3A, HSP27

PDAC vs ChP: S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3Aa

PDAC vs kontroly: MMP-7, Reg3A, sICAM1, OPG, CB, feritin

PDAC vs T2DM, ChP, kontroly: CA19-9, S100P, AAT, albumin, adiponektin, IGF-1, MMP-7, S100A11

LR – logistická regrese:

PDAC vs T2DM: prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, CA72-4

PDAC vs ChP: IGF-1, S100A11, Reg1alfa

PDAC vs kontroly: IGF-2, S100A11, Reg3A

PDAC vs T2DM, ChP, kontroly: albumin, AAT, S100P, CRP, CA19-9, TFF1 a MMP-7

RF s vyloučením CA19-9

PDAC vs T2DM: HSP27, prealbumin, inzulin, IGF-2, SAA, DJ-1, CB, CEA

PDAC vs ChP: SAA, Leptin, CB, Prealbumin, HSP60, DJ-1, TAG

PDAC vs kontroly: CEA, HbA1c, AST, HDL-chol, Prealbumin, SAA, IGF-2, CB

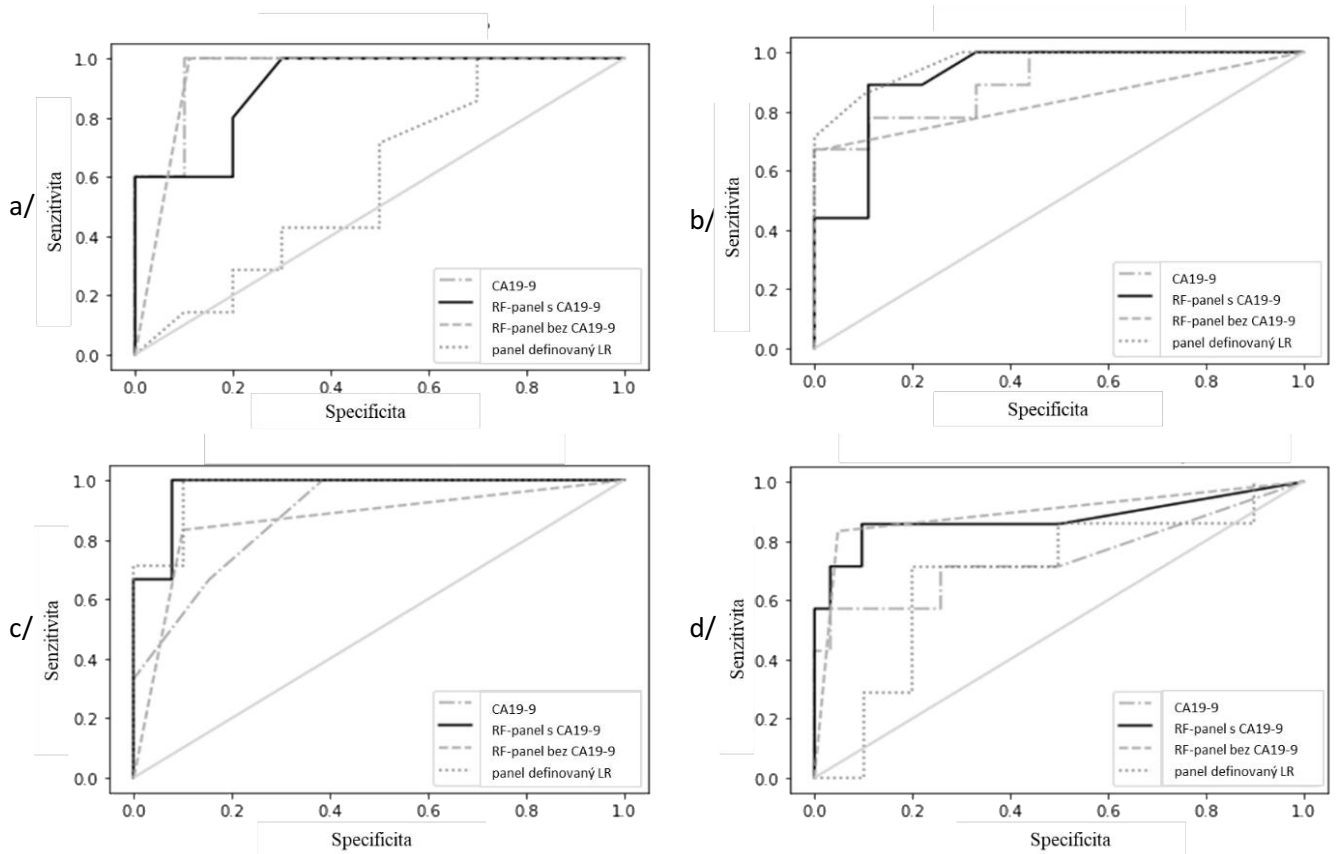
PDAC vs T2DM, ChP, kontroly: SAA, prealbumin, HSP27, CB, adiponektin, CEA, IGF-2, AMS-P

Zkratky:

AAT – alfa-1-antitrypsin; ALP : alkalická fosfatáza; AMS-P – pankreatická amyláza; AST : aspartátaminotransferáza; AUC – plocha pod křivkou, CA19-9 – karbohydrát antigen 19-9; CA72-4 – karbohydrát antigen 72-4; CB: celková bílkovina, CEA: karcinoembryonální antigen; ChP – chronická pankreatitida. HDL-chol – lipoprotein o vysoké hustotě; DJ-1 protein deglykláza DJ-1; HbA1c – glykovaný hemoglobin; HSP –protein teplotního šoku, IGF – inzulinu podobný růstový faktor; IGFBP - protein vázající IGF; INS- inzulin, KON- kontroly LR – logistická regrese.. MIC-1 – makrofágy inhibující cytokin -4; MMP—

matrixová metaloproteináza; OPG - osteoprotegerin; PDAC – karcinom pankreatu Reg - regenerační protein; RF – random forest; SAA – sérový amyloid A; sICAM – soluble Intercellular Adhesion Molecule; TAG – triacylglycerol; TFF1 – trefoil factor 1; TIMP: tkáňový inhibitor metaloproteináz, T2DM – diabetes mellitus 2. typu.

ROC křivky pro jednotlivé panely jsou prezentovány v obrázku 6.



Obrázek 6: ROC křivky pro jednotlivé panely a CA19-9 u jednotlivých skupin

a/ PDAC vs ChP

RF: S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3A

LR: IGF-1, S100A11, Reg1alfa

RF s vyloučením CA19-9: SAA, Leptin, CB, Prealbumin, HSP60, DJ-1, TAG

b/ PDAC vs T2DM

RF: CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3A, HSP27

LR: prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, CA72-4

RF s vyloučením CA19-9: HSP27, prealbumin, INS, IGF-2, SAA, DJ-1, CB, CEA

c/ PDAC vs kontroly

RF: MMP-7, Reg3A, sICAM1, OPG, CB, feritin

LR: IGF-2, S100A11, Reg3A

RF s vyloučením CA19-9: CEA, Glyk.HbA1c, AST, HDL-chol, Prealb, SAA, IGF-2, CB

d/ PDAC vs T2DM, ChP, kontroly

RF: CA19-9, S100P-plasma, AAT, albumin, adiponektin, IGF-1, MMP7, S100A11

LR: albumin, AAT, S100P, CRP, CA19-9, TFF1, MMP-7

RF bez CA19-9: SAA, prealbumin, HSP27, CB, adiponektin, CEA, IGF-2, AMS-P

Zkratky:

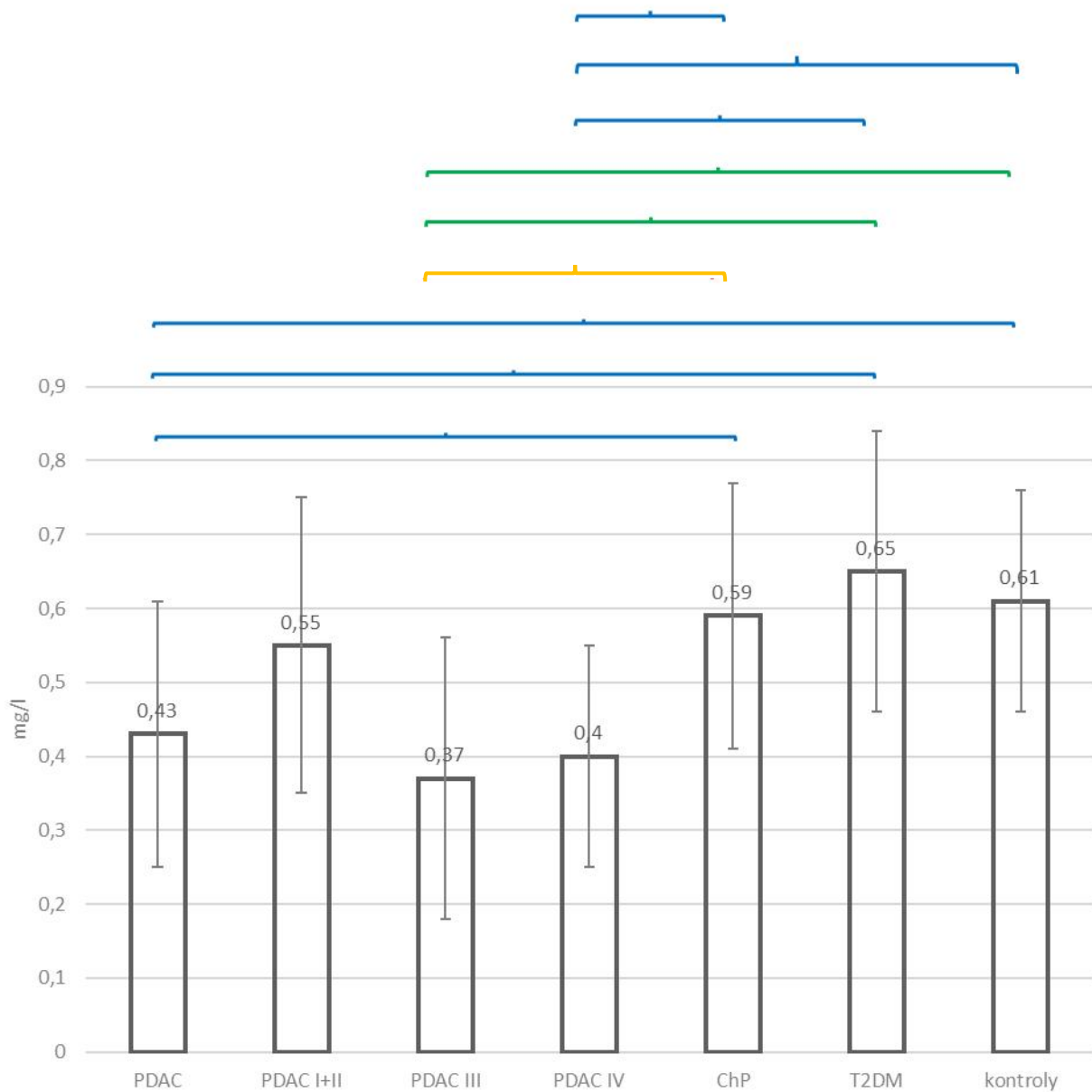
AAT – alfa-1-antitrypsin; ALP : alkalická fosfatáza; AMS-P – pankreatická amyláza; AST : aspartátaminotransferáza; AUC – plocha pod křivkou, CA19-9 – karbohydrát antigen 19-9; CA72-4 – karbohydrát antigen 72-4; CB: celková bílkovina, CEA: karcinoembryonální antigen; ChP – chronická pankreatitida. HDL-chol – lipoprotein o vysoké hustotě; DJ-1 protein deglykláza DJ-1; HbA1c – glykovaný hemoglobin; HSP –protein teplotního šoku, IGF – inzulínu podobný růstový faktor; IGFBP - protein vázající IGF; INS- inzulín, LR – logistická regrese.. MIC-1 – makrofágy inhibující cytokin -4; MMP—matrixová metaloproteináza; OPG - osteoprotegerin; PDAC – karcinom pankreatu Reg - regenerační protein; RF – random forest; SAA – sérový amyloid A; sICAM – solubilní mezibuněčná adhezní molekula 1; TAG – triacylglycerol; TFF1 – trefoil factor 1; TIMP: tkáňový inhibitor metaloproteináz, T2DM – diabetes mellitus 2. typu.

8.2. Výsledky Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM

Zjištěné koncentrace retinolu se pohybovaly v rozmezí 0,11 -1,6 mg/l. Koncentrace ATRA nabývaly hodnot mezi 0,37 -3,15 µg/l.

Hladiny retinolu byly významně nižší (vyjádřeno jako průměr \pm směrodatná odchylka) u PDAC: ($0,44 \pm 0,18 \text{ mg/l}$) ve srovnání s T2DM ($0,65 \pm 0,19 \text{ mg/l}$, $p < 0,001$), ChP ($0,60 \pm 0,18 \text{ mg/l}$, $p < 0,001$) and zdravými kontrolami ($0,61 \pm 0,15 \text{ mg/l}$, $p < 0,001$).

Rozdíly mezi jednotlivými „nekarzinomovými“ skupinami nebyly statisticky významné, nicméně byl zde patrný trend postupného poklesu hladin retinolu od nejvyšších koncentrací u zdravých kontrol, následovaných T2DM, ChP a konče PDAC (Obrázek 6+7).



Obrázek 7: Koncentrace retinolu v séru u pacientů s PDAC ,ChP, T2DM a zdravých kontrol

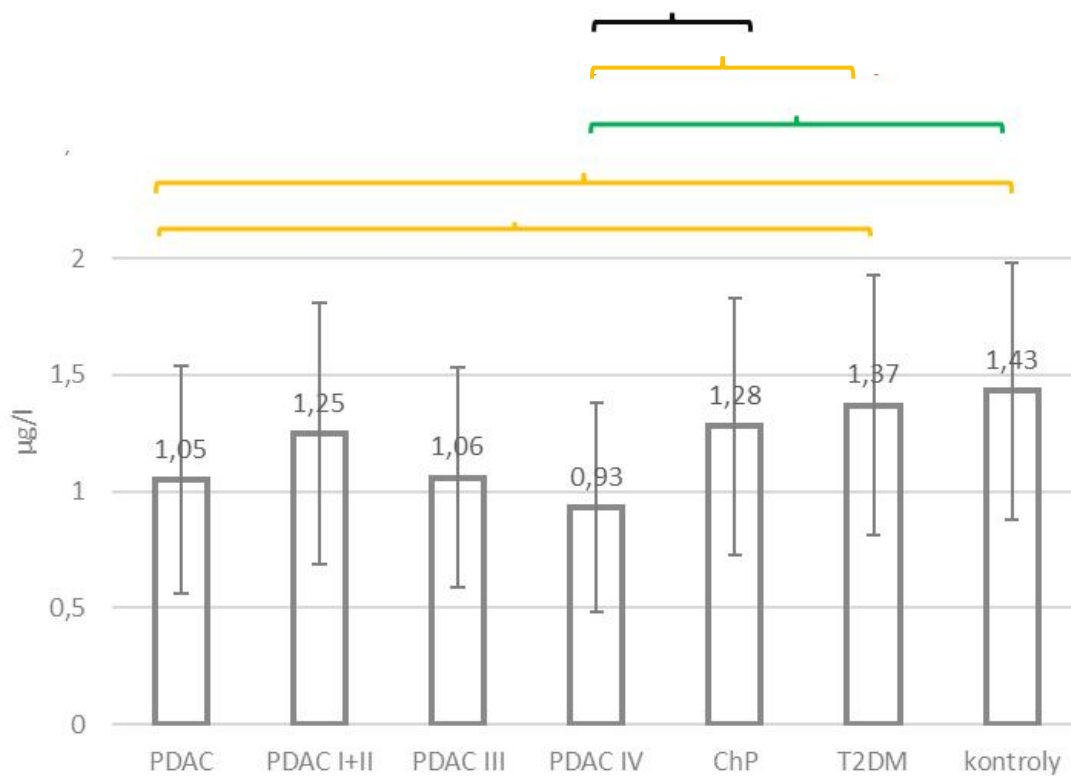
Hladiny významnosti dle výsledků Mann-Whitney testu jsou znázorněny barevně,

Žlutá: $p < 0,01$

Zelená $p < 0,001$

Modrá $p < 0,0001$

Zkratky : PDAC : karcinom pankreatu, ChP: chronická pankreatitida, T2DM: diabetes mellitus 2. typu



Obrázek 7: Koncentrace ATRA v séru u pacientů s PDAC, ChP, T2DM a zdravých kontrol

Hladiny významnosti dle výsledků Mann-Whitney testu jsou znázorněny barevně,

Žlutá: $p < 0,01$

Zelená $p < 0,001$

Černá $p < 0,05$

Zkratky: ATRA: *all trans retinová kyselina*, PDAC : *karcinom pankreatu*, ChP: *chronická pankreatitida*, T2DM: *diabetes mellitus 2. typu*

Koncentrace all-trans-retinové kyseliny byly u PDAC signifikantně sníženy ve srovnání s T2DM ($1,14 \pm 0,49 \mu\text{g/l}$ vs $1,37 \pm 0,56 \mu\text{g/l}$, $p < 0,001$) a zdravými kontrolami ($1,14 \pm 0,49 \mu\text{g/l}$ vs $1,43 \pm 0,55 \mu\text{g/l}$, $p < 0,001$). Rozdíly mezi PDAC a ChP nebyly statisticky významné.

Dále jsme analyzovali hladiny retinol a ATRA napříč jednotlivými stadii PDAC.

Hladiny obou látek u pacientů ve III, a IV, stadiu PDAC byly statisticky významně nižší nežli u zdravých kontrol, T2DM i ChP.

Stadium III PDAC (ATRA: $1,08 \pm 0,47 \mu\text{g/l}$; retinol: $0,42 \pm 0,19 \text{ mg/l}$) a IV PDAC (ATRA: $1,07 \pm 0,45 \mu\text{g/l}$, retinol: $0,40 \pm 0,15 \text{ mg/l}$) vs zdravé kontroly (ATRA: $1,43 \pm 0,55 \mu\text{g/l}$, retinol: $0,61 \pm 0,15 \text{ mg/l}$) a T2DM (ATRA: $1,37 \pm 0,56 \mu\text{g/l}$, retinol: $0,65 \pm 0,19 \text{ mg/l}$).

Rozdíl mezi PDAC v I. a II. stadiu a mezi non-PDAC skupinami nebyl statisticky významný.

Dále byly prokázány korelace mezi retinolem a prealbuminem ((PDAC r_s : 0,75, $p < 0,001$; CHP: 0,69, $p < 0,001$; T2DM: 0,60, $p < 0,001$ a zdravé kontroly r_s : 0,83, $p < 0,001$).

U pacientů s T2DM byla prokázána negativní korelace mezi IGFBP -2 a ATRA (r_s : -0,63, $p < 0,001$).

Statisticky významné korelace však nebyly prokázány ani mezi CA 19-9 , lipidy, celkovou bílkovinou CRP či albuminem. Výsledky potvrzují zatím nezastupitelnou úlohu CA19-9 mezi biomarkery karcinomu pankreatu. Zároveň se však podařilo nalézt řadu parametrů, které efektivitu CA 19-9 zvyšují. Rovněž se nám podařilo definovat panely biomarkerů, které se co do efektivitu CA 19-9 vyrovnají nebo jej i předčí.

Hladiny ATRA a retinolu se u pacientů s PDAC signifikantně liší od zdravých kontrol i diabetiků druhého typu. Naopak, rozdíl mezi pacienty s chronickou pankreatitidou a PDAC nebyl významný. V časných stadiích PDAC nejsou hladiny ATRA ani retinolu statisticky významně odlišné od ostatních skupin.

9. Diskuse:

Karcinom pankreatu je onemocnění s velmi špatnou prognózou, zejména, je-li diagnostikováno v pokročilých stádiích. Jedinou kurativní terapií je v současnosti chirurgické odstranění nádoru s dostatečným lemlem zdravé tkáně, které je však možná jen u cca 20 % pacientů s PDAC. Patogeneze PDAC je v principu podobná jiným malignitám – tj. jde rovněž o postupnou kumulaci somatických mutací, jejichž obrazem jsou morfologicky definované premaligní a posléze maligní léze. Na rozdíl od například kolorektálního karcinomu zde však chybí možnost tyto prekancerózní léze v klinické praxi detekovat. Dále nelze pominout poměrně rychlý přechod od časných stadií PDAC do stadií pokročilých, který se pohybuje pravděpodobně kolem 12 měsíců, a absenci vhodného biomarkeru, který by dokázal s jistotou odhalit buďto premaligní high-risk léze nebo časný PDAC. (Yu J. et al., 2015)

Cílem naší první práce bylo identifikovat analýzou řady biochemických parametrů u zdravých jedinců a pacientů s PDAC, T2DM či ChP takové ukazatele, které by zlepšily efektivitu nejužívanějšího biomarkeru – CA19-9 – v diagnostice PDAC nebo tento marker případně zcela nahradily.

Získané výsledky jsou, co se týče významu CA19-9 v diagnostice PDAC, v souladu s obecně známými fakty. Zároveň se ukazuje, že přidání dalších biomarkerů k CA19-9 je možnou cestou zvýšení efektivity tohoto markeru zejména v odlišení PDAC od zdravých jedinců. Naproti tomu, aby byla zachována dostatečná efektivita diagnostických panelů i po vyřazení CA19-9, bylo mnohdy nutné navýšit počet stanovovaných markerů.

Ukázalo se rovněž, že strojové učení bylo v našem případě, kdy jsme sledovali větší množství parametrů, výhodnější statistickou metodou než klasické regresní metody. Nicméně při dostatečném navýšení počtu probandů lze předpokládat, že by efektivita regresních metod byla srovnatelná

V našem souboru se dále ukázalo jako výhodnější stanovit pro odlišení PDAC od každé z ostatních zkoumaných skupin (zdravé kontroly, ChP, T2DM) specifický panel biomarkerů. To může být způsobeno tím, že některé patologické procesy probíhající u pacientů v rizikových skupinách (ChP a T2DM), jsou přítomné i u pacientů s PDAC. Naopak, mechanismy vedoucí k rozvoji PDAC se u jednotlivých rizikových skupin a zdravých jedinců mohou lišit. V případě chronické pankreatitidy se PDAC rozvíjí v terénu chronického zánětu. Zánětlivá odpověď na různé vnitřní i vnější noxy vede k excesivní a protražované expozici

pankreatické tkáně prozánětlivým cytokinům. To následně vede k poškození tkáně, oxidativnímu stresu, aktivaci PSC, reaktivní proliferaci pankreatických buněk a EMT. (Kandikattu HK. et al., 2020)

T2DM je naproti tomu onemocněním charakteristické přítomností insulinové rezistence s doprovodnou hyperinzulinémií, chronickou hyperglykemií, zvýšenou tvorbou růstových faktorů, přítomností prozánětlivého ladění organismu. Tyto faktory společně přispívají rozvoji PDAC. (Rahn S. et al., 2018, Salvatore T. et al., 2015)

Jednotlivé skupiny pacientů se tedy fenotypově liší (v našem souboru je například patrný rozdíl v průměrném BMI u pacientů s T2DM a ChP), což se může odrážet i v rozdílných koncentracích jednotlivých zkoumaných parametrů. Nevyřešenou otázkou ovšem je, zdali rozdílná skladba diagnostických panelů pro jednotlivé skupiny nějakým způsobem reflektuje případné odlišné patofyziologické pozadí PDAC, případně jeho samotný fenotyp.

V první studii byla v diagnostických panelech identifikována skupina biomarkerů, jejichž skladba je velmi heterogenní. Zhruba lze (při vědomí možného překryvu jednotlivých skupin) tyto markery rozdělit na látky, které se přímo podílejí na rozvoji maligního procesu (DJ-1, HSP27, IGF 1-2, IGFBP, MIC1, MMP7, Reg3A, S100A11, S100P, sICAM1, TFF1), biomarkery nutričně/metabolického stavu organismu (ferritin, albumin, prealbumin, celková bílkovina) a markery odrážející přítomnost zánětlivé aktivity (CRP, adiponektin, AAT, OPG, SAA). Efektivitu CA19-9 se podařilo v některých případech zvýšit pomocí rutinně stanovovaných parametrů (celková bílkovina, albumin, prealbumin, HDL, AST, ALT, triacylglycerol). Tyto parametry mohou zčásti odrážet malnutriční stav a přítomnost zánětlivých změn u PDAC či ChP.

S rozvojem a dostupností výpočetní techniky je využití rutinních markerů v diagnostice PDAC nebo stratifikaci rizika u sledovaných skupin jednou z cest, jak ekonomicky dostupným způsobem identifikovat jedince vhodné k dalšímu vyšetřování. (Ferri MJ. et al., 2016, Khan S. et al., 2021) Elevace markerů zánětů je považována za negativní prognostický faktor PDAC, zejména je-li doprovázena sarkopénií či kachexií. (Dell'Aquila E. et al., 2020)

Výsledky iniciální studie poukazují na významnou roli pankreatického stroma. U řady biomarkerů obsažených v definovaných panelech – MMP-7, TTF- 1, ICAM-1, OPG, IGF1-2, IGFBP2 byla v minulosti prokázána souvislost s metabolismem pankreatických stelátních buněk i PDAC, přičemž ICAM-1 v naší studii byl, na rozdíl od studie Gruppa et al., prokázán

jako potenciální biomarker PDAC. (Grupp K. et al., 2018) Ačkoli je dysbalance mezi matrixovými metaloproteinázami a jejich inhibitory (TIMP) jednou z charakteristik PDAC, paradoxně jsme neprokázali význam TIMP coby biomarkerů karcinomu pankreatu.

REG proteiny jsou úzce svázány s pankreatem již svou historií – objeveny byly roku 1979 v pankreatické šťávě a kalcifikacích – odtud i původní názem „pancreatic stone protein“. (Caro AD. et al., 1979) Význam REG proteinů v patogenezi PDAC byl popsán, nicméně jejich role coby biomarkeru není zcela jednoznačná. (Wang L. et al., 2022) V této práci však REG3A prokázal svou roli v odlišení PDAC od ostatních skupin (ChP, T2DM, zdravé kontroly).

Midkine je růstový faktor, jehož role v patogenezi PDAC je dobře známa, ale jehož prognostický či diagnostický význam u PDAC nebyl dosud prokázán. (Grupp K. et al., 2018) Midkine byl v naší práci, pokud je nám známo, poprvé testován jako diagnostický marker PDAC. Jeho schopnost podílet se na diagnostice PDAC jsme však rovněž neprokázali.

Zdá se, že významnou úlohu v odlišení PDAC od T2DM a ChP – dvou rizikových skupin PDAC mohou hrát S100 proteiny (S100p a S100A11) obsažené v panelech získané jak regresním modelem, tak pomocí metody strojového učení. Tyto proteiny se účastní regulace transkripce, diferenciaci a proliferaci buněk PDAC. Protein S100p je svázán se signálními drahami RAGE, které jsou v tkáni PDAC vysoce exprimovány.

Zjištěné biomarkery rovněž sdílejí řadu společných signálních drah, které ovlivňují. Například DJ-1, S100A11, HSP-27, IGFBP-2, MIC 1 a IGF shodně ovlivňují PI3K/AKT /mTOR dráhu, což z ní činí zajímavý potenciální terapeutický cíl. (Stanciu S. et al., 2022)

Otázkou jistě zůstává, zdali některé ze zjištěných markerů neodrážejí spíše rizikové prostředí vzniku PDAC nežli důsledek jeho přítomnosti. Údaje jednotlivých autorů se však pro různé parametry poměrně výrazně liší. Například vysoké hodnoty adiponektinu byly v rozsáhlé metaanalýze z r 2015 hodnoceny jako protektivní faktor rozvoje PDAC. (Maisonneuve P. et al., 2015) Naproti tomu, někteří autoři dávají adiponektin do souvislosti s jeho schopností aktivace dráhy AMPK/Sirt1/PGC-1 α a tedy progresí PDAC.

Naše výsledky ukazují, že hladiny adiponektinu byly u zdravých kontrol vůbec nejnižší ze všech porovnávaných skupin. Korespondují tak spíše s recentními zjištěními, kdy jsou zvýšené hladiny adiponektinu jedním z faktorů, které odlišují T3cDM od T2DM. (Oldfield L. et al., 2022)

Spojujícím článkem mezi buňkami PDAC a nádorovým stroma jsou pankreatické stelátní buňky. Tyto buňky se zároveň účastní zánětlivých procesů v pankreatické tkáni a svým působením facilitují onkogenezi. Jejich aktivace je úzce svázána s metabolismem retinolu.

Hladiny tohoto vitamínu, stejně jako jeho aktivního metabolitu byly (s výjimkou ATRA u ChP vs PDAC) u pacientů s PDAC statisticky významně nižší nežli v ostatních skupinách. Vzhledem k nižšímu počtu pacientů zachycených v časném stadiu PDAC může být interpretace těchto zjištění obtížná, nicméně lze říci, že je PDAC charakterizován nízkými hladinami retinolu i ATRA. To platí zejména pro retinol, jehož hladiny byly významně nižší i u nemestastatických stadií PDAC.

Jednoznačný je v naší práci pokles koncentrací retinolu i ATRA u generalizovaného PDAC (IV stadium), což z těchto látek činí potenciální biomarker pokročilého / neresekabilního onemocnění.

Nízké hladiny ATRA a retinolu vzhledem ke svému působení na buněčný metabolismus nejsou nejspíše jen odrazem alterovaného nutričního stavu pacientů s ChP a PDAC, ale dále se podílejí na progresi těchto onemocnění.

Mechanismy těchto účinků lze stručně nastínit jako:

a/ ATRA řízené signální dráhy jsou aktivovány v případě poškození pankreatické tkáně. To vede reaktivně k řadě procesů, z nichž jedním je tzv. acinární-duktální metaplázie. Proces, při kterém dochází k přeměně acinárních buněk směrem k méně diferencovaným formám s fenotypem bližším duktálnímu. Tento proces bývá v současnosti zmiňován při zkoumání pankreatitidy jako rizikového faktoru PDAC. (Becker AE. et al., 2014) Tento proces může být spouštěn za přítomnosti *KRAS^{G12D}* mutace (Shi G. et al., 2012) a prostřednictvím drah, které jsou ovlivňovány mj. právě ATRA a v prostředí PDAC jsou alterovány. (Colvin EK. et al., 2011, Marstrand-Daucé et al., 2023)

b/ PSC, důležití aktéři v dialogu mezi nádorovým stroma a buňkami PDAC jsou jediné buňky pankreatu, ve kterých je skladován retinol. Po své aktivaci – doprovázené ztrátou vakuol s retinolem – produkují složky extracelulární matrix, které jsou podstatnou (jak funkčně, tak morfologicky) součástí PDAC. Aktivaci PSC inhibuje ATRA. (Chronopoulos A. et al., 2016, Froeling FE. et al., 2011)

ATRA se prostřednictvím svých signálních drah podílí na stabilizaci PSC a jejich udržování v klidovém stavu. Porušení této signalizace vede k narušení acinární struktury pankreatické tkáně. (Carmona R. et al., 2019) ATRA rovněž svým nepřímým inhibičním vlivem na aktivitu CAF prostřednictvím IL-6 snižuje schopnost nádorových buněk migrovat. (Guan J. et al., 2014)

c/ V naší práci jsme prokázali negativní korelaci mezi ATRA a IGFBP2 u pacientů s T2DM. Vztah mezi IGF/IGFBP-2 a ATRA byl prokázán řadou autorů. (Fu Z. et al., 2001, Ferraz IS. et al., 2022, Mutgan AC. et al., 2018)

Regulace IGF zprostředkovaných signálních drah může být jedním z faktorů, kterým ATRA ovlivňuje růst nádorových buněk

Změny v koncentrací retinolu – důležitého mikronutrientu – lze ovšem u malnutričních pacientů se závažnou malignitou očekávat. V naší práci klesaly hodnoty retinolu u pokročilých stadií PDAC. Nadto, hladiny prealbuminu, korelující s koncentrací retinolu mohou svědčit o malnutrici těchto pacientů. Prealbumin, znám též jako transthyretin, slouží jako transportní protein pro retinol, se kterým za účasti retinol vázajícího proteinu vytváří komplexy. Nízké hodnoty prealbuminu tedy mohou vést k nízkým sérovým hladinám retinolu.

Na druhou stranu jsme neprokázali korelaci jiných důležitých markerů malnutrice (BMI, albumin, celková bílkovina) s retinolem či ATRA. V úvahu je nutno vzít i fakt, že jen cca 33% cirkulujícího retinolu odráží příjem jeho prekurzorů v potravě. Je to dáno tím, že většina retinolu v organismu je skladována v játrech a uvolňována dle potřeb organismu. (Li Y. et al., 2014) Ani snížený příjem vitamínu A nemá zjevně vliv na celkové riziko PDAC, jak prokázala metaanalýza 18 studií z r 2016. (Huang X. et al., 2016)

Lze tedy uvažovat o tom, že na poklesu sérových hladin retinolu se podílí i jiné faktory nežli malnutrice. Sérové koncentrace ATRA a retinolu tak jsou potenciálními biomarkery pokročilosti PDAC. Horší prognóza PDAC při nízkých hladinách retinoidů v pankreatické tkáni již byla dokumentována. (Bleul T. et al., 2015) Vyšší exprese RAR receptorů, jejichž ligandem je ATRA, vede k redukci maligního fenotypu buněk PDAC. (Huang X. et al., 2016)

Úspěšné využití ATRA jako terapeutické modalit v léčbě některých zhoubných onemocnění (např. promyelocytární leukemie) a její těsný vztah k PSC a PDAC z ní činí zajímavý bod zájmu výzkumu terapie PDAC. (Lo-Coco F. et al., 2013)

Jistým limitem zde může být značná nestabilita a hydrofobní charakter ATRA. Tyto vlastnosti znesnadňují její transport do cílové tkáně. Tento problém se v některých in-vitro studiích dařilo překonat transportem ATRA v nano-částicích. (Wang K. et al., 2019, Kakwere H. et al., 2020)

Výsledky fáze I studie STARPAC ukazuje že podání ATRA s gemcitabin-nab-paclitaxelem je bezpečně a dobře tolerované. Samotný efekt terapie probíhá hodnocením ve fázi IIb této randomizované studie. (Kocher HM. et al., 2020)

Retinol, ATRA a chronická pankreatitida

Mechanismus zmírnění rozvoje ChP prostřednictvím ATRA modulované Wnt/ β -Cateninové signální dráhy byl popsán na myších modelech. (Xiao W. et al., 2015) Stejně tak je znám její efekt na průběh akutní pankreatitidy. (Tsai CY. et al., 2023)

Studie, zabývající se hladinami retinoidů u ChP nám ovšem dávají mnohdy protichůdné informace. Dugganova studie z roku 2014 prokázala u pacientů s ChP vyšší míru nefyziologických hladin vitamínu A. Nicméně překvapivě v obou směrech – tedy deficienci i nadbytek tohoto vitamínu ve srovnání s kontrolami (19,4 % vs 14,5 %). (Duggan SN. et al., 2014) Tento nadbytek dle autorů ale nebyl způsoben suplementací. Autoři popisují korelaci BMI a hladin retinolu, ale tato nebyla jinými autory (ani v naší práci) popsána.

V dostupných pracích se prevalence deficitu retinolu u ChP pohybuje v rozmezí 3-15,9 %. (Sikkens EC. et al., 2013, Martínez-Moneo E. et al., 2016) U našeho souboru pacientů jsme deficit retinolu ($c < 0,15 \text{ mg/l}$) prokázali u 2,08 % pacientů.

Nízké hladiny retinolu u ChP mohou mít několik příčin. Předně, u pacientů, u nichž je ChP způsobena alkoholem, může být negativně ovlivněno vstřebávání živin, včetně karotenoidů, z trávicího traktu. Deficit retinolu může být též způsoben sníženou schopností vstřebávat vitamíny rozpustné v tucích při rozvinuté exokrinní insuficienci. Chronická bolest doprovázející ChP může vést k narušení/snížení příjmu potravy a tedy malnutrici.

Navzdory výše zmíněnému se hladiny retinolu či ATRA v našem souboru významně nelišily od T2DM či zdravých kontrol. Domníváme se tedy, že snížené hladiny retinolu u pacientů s ChP by mohly být jistým „varovným znamením“ vedoucím k bližšímu vyšetřování příčiny tohoto poklesu, neboť je nelze vysvětlit pouhou přítomností ChP.

Retinol a ATRA u T2DM

Podobně jako u ChP i u T2DM jsou výsledky studií hodnotících hladiny retinoidů nejednotné potažmo protichůdné. (Krempf. et al., 1991, Taneera J. et al., 2021)

Naše znalosti mechanismu skladování a zejména uvolňování retinolu pankreatickými hvězdicovitými buňkami jsou stále omezené. Stejně tak nejsou jednoznačné závěry studií zabývajících se koncentracemi retinoidů u různých onemocnění. Naše práce tedy alespoň částečně přispívá do skládky patofyziologie metabolismu retinoidů u T2DM, PDAC a ChP. Zdali popsané snížení hladin ATRA a retinolu u PDAC a ChP – chorob charakteristických aktivací stelátních buněk a tvorbou ECM – odráží zvýšenou aktivitu PSC může být předmětem dalšího výzkumu. Rovněž lze přepokládat, že snížené hladiny ATRA v pokročilých stádiích PDAC nejsou jen odrazem nutričního stavu pacientů, neboť nekorelují s některými dalšími známými markery malnutrice (BMI, celková bílkovina). Za fyziologických okolností jsou hladiny retinolu a ATRA udržovány uvolňováním jaterních zásob a pankreatické stelátní buňky pravděpodobně hrají v této regulaci jen minimální úlohu. Mechanismus, který stojí za poklesem sérového retinolu a ATRA je rovněž potenciálním cílem dalšího výzkumu. Otázkou také zůstává, zdali jsou nízké koncentrace ATRA a retinolu u PDAC doprovodným fenoménem nebo se podílí i na další progresi tohoto onemocnění. Navzdory práci Hana et al., popisující změny hladin ATRA a retinolu jako doprovodnou známku rozvoje T2DM, i navzdory tomu, že ATRA i retinol jsou pravděpodobně důležitými faktory podílejícími se na vývoji a správné funkci pankreatických ostrůvků, jsme na našem souboru neprokázali u T2DM statisticky významné změny hladin obou látek ve srovnání se zdravými kontrolami. (Han Y. et al., 2021)

10. Závěr

Analýzou širokého spektra parametrů jsme prokázali statisticky významné rozdíly mezi PDAC, T2DM, chronickou pankreatitidou a zdravými kontrolami. Těchto odlišností jsme využili k definování diagnostických panelů PDAC a zhodnocení významu ATRA a retinolu pro diagnostiku PDAC.

Studie I: Biomarkery u karcinomu pankreatu

a/ v rámci Studie I – „Biomarkery u karcinomu pankreatu“ jsme mezi skupinami probandů s PDAC, chronickou pankreatitidou, T2DM a zdravými kontrolami prokázali signifikantní ($p < 0,05$) rozdíly v koncentracích celé řady parametrů: AAT, adiponektin, albumin, ALP, ALT, AST, CA19-9, CA72-4, CEA, CEACAM, cholesterol, C-peptid, CRP, DJ-1, feritin, GGT, glykémie, HDL cholesterol, HSP27, IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, inzulin, MIC-1, MMP-7, osteoprotegerin, prokalcitonin, prealbumin, REG1A, REG3A, S100A11, S100A6, S100P, ICAM-1, triacylglycerol, TFF1, celková bílkovina a transferin.

b/ Na základě těchto rozdílů jsme vytvořili řadu panelů, které zlepšily efektivitu CA19-9 v diagnostice nemetastazujícího karcinomu pankreatu nebo jej zcela nahradily.

Panel „CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3a, HSP27“ odliší PDAC od pacientů s T2DM. Panel „S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3a“ identifikuje PDAC mezi pacienty s chronickou pankreatitidou. Panel „MMP-7, Reg3a, sICAM1, OPG, CB, feritin“ odliší karcinom pankreatu od zdravých kontrol a panel „CA19-9, S100P-plasma, AAT, albumin, adiponektin, IGF-1, MMP7, S100A11“ odliší PDAC od ostatních skupin. Všechny uvedené panely biomarkerů dosahují vyšší efektivity nežli solitární CA19-9.

Definovali jsme také některé panely, které, ačkoli jejich součástí nebyl CA19-9, dosahovaly srovnatelné nebo vyšší efektivity v identifikaci PDAC mezi probandy s ChP, T2DM či zdravými kontrolami. Panel „CEA, HbA1c, AST, HDL-chol, prealbumin, SAA, IGF-2, CB“ je efektivnější nežli CA19-9 v odlišení PDAC od zdravých kontrol a panel „SAA, prealbumin, HSP27, CB, adiponektin, CEA, IGF-2, AMS-P“ je srovnatelný s CA19-9 v odlišení PDAC od ostatních skupin.

Midkine byl jako potenciální diagnostický marker PDAC hodnocen dle dostupné literatury poprvé, nicméně jeho schopnost coby biomarkeru PDAC jsme neprokázali. Reg3A a DJ-1 a ICAM-1 jsme v naší práci poprvé identifikovali jako potenciální cirkulující markery PDAC. Tyto výsledky bude ale vhodné ověřit na úžeji definovaných a zejména rozsáhlejších souborech pacientů.

Studie II: Hladiny retinolu a ATRA u karcinomu pankreatu, chronické pankreatitidy a T2DM

a/ Prokázali jsme signifikantní pokles hladin retinolu a ATRA u pacientů s karcinomem pankreatu. Zároveň popisujeme tendenci k poklesu koncentrací ATRA i retinolu u patologií pankreatické tkáně (jakkoli v případě T2DM a ChP se nejedná o statisticky signifikantní pokles).

b/ Výsledky naší práce nepotvrzují ATRA ani retinol jako diagnostické markery časného karcinomu pankreatu, neboť jej nedokáží odlišit od pacientů s ChP, T2DM ani od zdravých kontrol.

c/ Analýzou korelací mezi ATRA, retinolem a ostatními měřenými parametry jsme prokázali korelaci mezi retinolem a prealbuminem - jeho transportním proteinem. Dále jsme prokázali u pacientů s T2DM negativní korelaci mezi IGFBP2 a ATRA, což naznačuje možný vztah mezi IGF- zprostředkovanými signálními drahami a metabolismem ATRA u tohoto onemocnění.

Výsledky naší práce tak svědčí o vlivu interakce nádorového stroma s nádorovými buňkami na rozvoj PDAC a potvrzují tuto interakci jako potenciální diagnostický i terapeutický cíl.

11. Seznam literatury

Abbruzzese JL, Andersen DK, Borrebaeck CAK, Chari ST, Costello E, Cruz-Monserrate Z, Eibl G, Engleman EG, Fisher WE, Habtezion A, Kim SK, Korc M, Logsdon C, Lyssiotis CA, Pandol SJ, Rustgi A, Wolfe BM, Zheng L, Powers AC. The Interface of Pancreatic Cancer With Diabetes, Obesity, and Inflammation: Research Gaps and Opportunities: Summary of a National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Workshop. *Pancreas*. 2018 May/Jun;47(5):516-525.

Aggarwal G, Kamada P, Chari ST. Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers. *Pancreas* 2013;42:198–201

Ahn YH, Kim JY, Yoo JS. Quantitative mass spectrometric analysis of glycoproteins combined with enrichment methods. *Mass Spectrom Rev*. 2015;34(2):148-165.

Aksoy-Altinboga A, Baglan T, Umudum H, Ceyhan K. Diagnostic Value of S100p, IMP3, Maspin, and pVHL in the Differential Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Normal/Chronic Pancreatitis in Fine Needle Aspiration Biopsy. *J Cytology* (2018) 35:247–51.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010 Jan;33 Suppl 1(Suppl 1):S62-9.

Ankeny JS, Court CM, Hou S, Li Q, Song M, Wu D, Chen JF, Lee T, Lin M, Sho S, Rochefort MM, Girgis MD, Yao J, Wainberg ZA, Muthusamy VR, Watson RR, Donahue TR, Hines OJ, Reber HA, Graeber TG, Tseng HR, Tomlinson JS. Circulating tumour cells as a biomarker for diagnosis and staging in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2016 Jun 14;114(12):1367-75

Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*. 43: 128-133, 1998

Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000 Apr;118(4):780-94

Aridome K, Tsutsui J, Takao S, Kadomatsu K, Ozawa M, Aikou T, Muramatsu T. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1995 Jul;86(7):655-61.

Aronsson L, Andersson R, Bauden M, Andersson B, Bygott T, Ansari D. High-density and targeted glycoproteomic profiling of serum proteins in pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasm. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53(12):1597-603.

Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE JR, Sucom HM, Tsukamoto H: Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 49: 998-1011, 2009

Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Nov;293(5):G972-8.

Aziz MH, Sideras K, Aziz NA, Mauff K, Haen R, Roos D, Saida L, Suker M, van der Harst E, Mieog JS, Bonsing BA, Klaver Y, Koerkamp BG, van Eijck CH. The Systemic-immune-inflammation Index Independently Predicts Survival and Recurrence in Resectable Pancreatic Cancer and its Prognostic Value Depends on Bilirubin Levels: A Retrospective Multicenter Cohort Study. *Ann Surg.* 2019 Jul;270(1):139-146.

Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol.* 2012 Jun;3(2):105-19.

Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1773-1808. doi:10.1194/jlr.r100015-jlr200

Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 28;20(32):11182-98.

Blaner WS. Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol Ther.* 2019;197:153-178.

Bleul T, Rühl R, Bulashevskaya S, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival. *Mol Carcinog.* 2015;54(9):870-879.

Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007 May 2;297(17):1901-8.

Bluth, M., Mueller, C. M., Pierre, J., Callender, G., Kandil, E., Viterbo, D., Fu, S. L., Sugawara, A., Okamoto, H., & Zenilman, M. E. (2008). Pancreatic regenerating protein I in chronic pancreatitis and aging: implications for new therapeutic approaches to diabetes. *Pancreas*, 37(4), 386–395.

Bojková M, Dítě P, Kunovský L, Blaho M, Kianička B, Novotný I, Uvírová M, Dvořáčková J, Dolina J, Přecechtělová M, Mašková H, Prochazka V, Janeček P, Motyka O, Martínek A. The role of metabolic syndrome in the induction of chronic pancreatitis after a first attack of acute pancreatitis - multicenter trial. *Vnitr Lek*. 2020 Winter;66(8):12-16.

Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014;15:786–801.

Brand RE, Nolen BM, Zeh HJ, Allen PJ, Eloubeidi MA, Goldberg M, Elton E, Arnoletti JP, Christein JD, Vickers SM, Langmead CJ, Landsittel DP, Whitcomb DC, Grizzle WE, Lokshin AE. Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 15;17(4):805-16

Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 Proteins in Cancer. *Nat Rev Cancer* (2015) 15:96–109.

Brun PJ, Wongsiriroj N, Blaner WS. Retinoids in the pancreas. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016;5(1):1-14.

Cao W, Zeng Z, He Z, Lei S. Hypoxic pancreatic stellate cell-derived exosomal mirnas promote proliferation and invasion of pancreatic cancer through the PTEN/AKT pathway. *Aging (Albany NY)*. 2021 Feb 26;13(5):7120-7132.

Carter EP, Coetzee AS, Tomas Bort E, Wang Q, Kocher HM, Grose RP. Dissecting FGF Signalling to Target Cellular Crosstalk in Pancreatic Cancer. *Cells*. 2021 Apr 8;10(4):847.

Rieser CJ, Zenati M, Hamad A, Al Abbas AI, Bahary N, Zureikat AH, Zeh HJ 3rd, Hogg ME. CA19-9 on Postoperative Surveillance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Predicting

Recurrence and Changing Prognosis over Time. *Ann Surg Oncol*. 2018 Nov;25(12):3483-3491

Calle, E., Kaaks, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4, 579–591 (2004).

Carmona R, Barrena S, Muñoz-Chápuli R. Retinoids in Stellate Cells: Development, Repair, and Regeneration. *J Dev Biol*. 2019 May 24;7(2):10.

Caro AD, Lohse J, Sarles H. Characterization of a protein isolated from pancreatic calculi of men suffering from chronic calcifying pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;87:1176–1182.

Catalano, M., Roviello, G., Aprile, G., Ramello, M., Conca, R., Petrioli, R., Perrone, G., Ianza, A., & Mini, E. Prognostic value of alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase in patients with metastatic pancreatic cancer. *Future oncology (London, England)*, 19(13), 937–946. (2023).

Cave DD, Di Guida M, Costa V, Sevillano M, Ferrante L, Heeschen C, Corona M, Cucciardi A, Lonardo E. TGF- β 1 secreted by pancreatic stellate cells promotes stemness and tumorigenicity in pancreatic cancer cells through L1CAM downregulation. *Oncogene*. 2020 May;39(21):4271-4285.

Chen WC, Boursi B, Mantani R, Yang YX. Total Serum Cholesterol and Pancreatic Cancer: A Nested Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(2):363-369.

Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Allen PJ, Schattner M, Brand RE, Singhi AD, Petersen GM, Hong SM, Kim SC, Falconi M, Doglioni C, Weiss MJ, Ahuja N, He J, Makary MA, Maitra A, Hanash SM, Dal Molin M, Wang Y, Li L, Ptak J, Dobbyn L, Schaefer J, Silliman N, Popoli M, Goggins MG, Hruban RH, Wolfgang CL, Klein AP, Tomasetti C, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Lennon AM. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Sep 19;114(38):10202-10207.

Cohen SM, Kent TS. Etiology, Diagnosis, and Modern Management of Chronic Pancreatitis: A Systematic Review. *JAMA Surg*. 2023;158(6):652–661.

Colvin EK, Susanto JM, Kench JG, Ong VN, Mawson A, Pinese M, Chang DK, Rooman I, O'Toole SA, Segara D, Musgrove EA, Sutherland RL, Apte MV, Scarlett CJ, Biankin AV. Retinoid signaling in pancreatic cancer, injury and regeneration. *PLoS One*. 2011;6(12):e29075.

Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, Leach SD. (2002) Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest* [Internet]. 109, 1437–1444.)

Cros J, Raffenne J, Couvelard A, Poté N. Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):64-71

Dahlem C, Barghash A, Puchas P, Haybaeck J, Kessler SM. The Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein IMP2/IGF2BP2 is Overexpressed and Correlates with Poor Survival in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(13): 3204.

Dalin S, Sullivan MR, Lau AN, Grauman-Boss B, Mueller HS, Kreidl E, Fenoglio S, Luengo A, Lees JA, Vander Heiden MG, Lauffenburger DA, Hemann MT. Deoxycytidine Release from Pancreatic Stellate Cells Promotes Gemcitabine Resistance. *Cancer Res*. 2019 Nov 15;79(22):5723-5733.

Daoud AZ, Mulholland EJ, Cole G, McCarthy HO. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMC Cancer*. 2019 Nov 21;19(1):1130.

Dardare J, Witz A, Merlin JL, Bochnakian A, Toussaint P, Gilson P, Harlé A. Epithelial to Mesenchymal Transition in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: State-of-the-Art and Therapeutic Opportunities. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jul 29;14(8):740.

Dell'Aquila E, Fulgenzi CAM, Minelli A, Citarella F, Stellato M, Pantano F, Russano M, Cursano MC, Napolitano A, Zeppola T, Vincenzi B, Tonini G, Santini D. Prognostic and predictive factors in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2020 Mar 10;11(10):924-941.

Di Federico A, Mosca M, Pagani R, Carloni R, Frega G, De Giglio A, Rizzo A, Ricci D, Tavolari S, Di Marco M, Palloni A, Brandi G. Immunotherapy in Pancreatic Cancer: Why Do We Keep Failing? A Focus on Tumor Immune Microenvironment, Predictive Biomarkers and Treatment Outcomes. *Cancers (Basel)*. 2022 May 14;14(10):2429.

Distler M, Kersting S, Niedergethmann M, Aust DE, Franz M, Rückert F, Eehalt F, Pilarsky C, Post S, Saeger HD, Grützmann R. Pathohistological subtype predicts survival in patients

with intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Ann Surg.* 2013 Aug;258(2):324-30

Dítě P, Starý K, Novotný I, a kol. Incidence of chronic pan-creatitis in Czech Republic. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001; 13(6): 749–750

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb;11(2):98-107

Du C, da Silva A, Morales-Oyarvide V, Dias Costa A, Kozak MM, Dunne RF, Rubinson DA, Perez K, Masugi Y, Hamada T, Brais LK, Yuan C, Babic A, Ducar MD, Thorner AR, Aguirre A, Kulke MH, Ng K, Clancy TE, Findeis-Hosey JJ, Chang DT, Hornick JL, Fuchs CS, Ogino S, Koong AC, Hezel AF, Wolpin BM, Nowak JA. Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Expression and Disease Recurrence and Survival in Patients with Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020 Aug;29(8):1586-1595.

Duggan SN, Smyth ND, Murphy A, Macnaughton D, O'Keefe SJ, Conlon KC. High prevalence of osteoporosis in patients with chronic pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014 Feb;12(2):219-28

Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2024-3-06]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

Ebert MP, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P. Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut.* 1999 Jul;45(1):105-11.

El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer.* 2001 Jun 15;84(12):1656-63

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 1998 Jun 5;273(23):14363-7

European Study Group on Cystic Tumours of the Pancreas. European evidence-based guidelines on pancreatic cystic neoplasms. *Gut.* 2018 May;67(5):789-804. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316027. Epub 2018 Mar 24. PMID: 29574408; PMCID: PMC5890653.

- Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1995;273:1605–1609
- Ewald N, Kaufmann C, Raspe A, Kloer HU, Bretzel RG, Hardt PD. Prevalence of diabetes mellit. us secondary to pancreatic diseases (type 3c) *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28:338–42).
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26 Suppl 1:S5-S20.
- Farran B, Nagaraju GP. The dynamic interactions between the stroma, pancreatic stellate cells and pancreatic tumor development: Novel therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019 Aug;48:11-23.
- Ferraz IS, Vieira DMC, Ciampo LAD Jr, Ued FDV, Almeida ACF, Jordão AA Jr, Aragon DC, Martinez EZ, Martinelli CE Jr, Nogueira-de-Almeida CA. Vitamin A deficiency and association between serum retinol and IGF-1 concentrations in Brazilian children with Down syndrome. *J Pediatr (Rio J).* 2022 Jan-Feb;98(1):76-83.
- Ferri MJ, Saez M, Figueras J, Fort E, Sabat M, López-Ben S, de Llorens R, Aleixandre RN, Peracaula R. Improved Pancreatic Adenocarcinoma Diagnosis in Jaundiced and Non-Jaundiced Pancreatic Adenocarcinoma Patients through the Combination of Routine Clinical Markers Associated to Pancreatic Adenocarcinoma Pathophysiology. *PLoS One.* 2016 Jan 25;11(1):
- Fitzner B, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Involvement of AP-1 proteins in pancreatic stellate cell activation in vitro. *Int J Colorectal Dis.* 2004 Sep;19(5):414-20.
- Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR, Kocher HM. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology.* 2011 Oct;141(4):1486-97, 1497.e1-14.
- Fu Z, Noguchi T, Kato H. Differential regulation of IGFBP-2 and IGFBP-5 gene expression by vitamin A status in Japanese quail. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(1):E138-E146.

Fukuda A, Wang SC, Morris JP 4th, Folias AE, Liou A, Kim GE, Akira S, Boucher KM, Firpo MA, Mulvihill SJ, Hebrok M. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell*. 2011 Apr 12;19(4):441-55.

Furukawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Kobayashi M, Ohike N, Morohoshi T, Egawa S, Unno M, Takao S, Osako M, Yonezawa S, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Yamaguchi H, Ban S, Shimizu M. Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut*. 2011 Apr;60(4):509-16.

Guo M, Luo G, Lu R, Shi W, Cheng H, Lu Y, Jin K, Yang C, Wang Z, Long J, Xu J, Ni Q, Liu C, Yu X. Distribution of Lewis and Secretor polymorphisms and corresponding CA19-9 antigen expression in a Chinese population. *FEBS Open Bio*. 2017 Oct 4;7(11):1660-1671.

Girodon E, Rebours V, Chen JM, Pagin A, Levy P, Ferec C, Bienvenu T. Clinical interpretation of PRSS1 variants in patients with pancreatitis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021 Jan;45(1):101497.

Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122:467-481.)

Gong Y, Zhang B, Liao Y, Tang Y, Mai C, Chen T, Tang H. Serum Insulin-Like Growth Factor Axis and the Risk of Pancreatic Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2017 Apr 18;9(4):394.

Gress T, Muller - Pillasch F, Elsasser HP, Bachem M, Ferrara C, Weidebach H, Lerch M, Adler G. Enhancement of transforming growth factor beta 1 expression in the rat pancreas during regeneration from caerulein-induced pancreatitis. *Eur J Clin Invest*. 1994 Oct;24(10):679-85.

Grote VA, The associations of advanced glycation end products and its soluble receptor with pancreatic cancer risk: a case control study within the prospective EPIC cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:619-28).

Grupp K, Melling N, Bogoevska V, Reeh M, Uzunoglu FG, El Gammal AT, Nentwich MF, Izbicki JR, Bogoevski D. Expression of ICAM-1, E-cadherin, periostin and midkine in metastases of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Exp Mol Pathol*. 2018 Apr;104(2):109-113.

Gryshchenko O, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OH. Ca²⁺ signals mediated by bradykinin type 2 receptors in normal pancreatic stellate cells can be inhibited by specific Ca²⁺ channel blockade. *J Physiol*. 2016 Jan 15;594(2):281-93.

Gu YL, Lan C, Pei H, Yang SN, Liu YF, Xiao LL. Applicative value of serum CA19-9, CEA, CA125 and CA242 in diagnosis and prognosis for patients with pancreatic cancer treated by concurrent chemoradiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(15):6569-73.

Guan J, Zhang H, Wen Z, Gu Y, Cheng Y, Sun Y, Zhang T, Jia C, Lu Z, Chen J. Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Lett*. 2014 Apr 1;345(1):132-9.

Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*. 1979 Nov;5(6):957-71.

Han L, Ma J, Duan W, Zhang L, Yu S, Xu Q, Lei J, Li X, Wang Z, Wu Z, Huang JH, Wu E, Ma Q, Ma Z. Pancreatic stellate cells contribute pancreatic cancer pain via activation of sHH signaling pathway. *Oncotarget*. 2016 Apr 5;7(14):18146-58.

Haglund C. Tumour marker antigen CA125 in pancreatic cancer: a comparison with CA19-9 and CEA. *Br J Cancer*. 1986;54:897-901.

Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M, Maitra A. Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*. 2023 Apr 13;186(8):1729-1754.

Han Y, Yang Y, Kim M, Jee SH, Yoo HJ, Lee JH. Serum Retinal and Retinoic Acid Predict the Development of Type 2 Diabetes Mellitus in Korean Subjects with Impaired Fasting Glucose from the KCPS-II Cohort. *Metabolites*. 2021;11(8):510.

Hansen SEJ, Langsted A, Varbo A, Madsen CM, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. Low and high pancreatic amylase is associated with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Eur J Epidemiol*. 2021;36(9):975-984.

Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, Balakrishnan L, Dwivedi SB, Telikicherla D, Selvan LD, Goel R, Mathivanan S, Marimuthu A, Kashyap M, Vizza RF, Mayer RJ, Decaprio JA, Srivastava S, Hanash SM, Hruban RH, Pandey A. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med*. 2009 Apr 7;6(4): e1000046

Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, Goodarzi MO, Habtezion A, Korc M, Kudva YC, Pandol SJ, Yadav D, Chari ST; Consortium for the Study of Chronic Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer(CPDPC). Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016 Nov;1(3):226-237

Hart PA, Kamada P, Rabe KG, Srinivasan S, Basu A, Aggarwal G, Chari ST. Weight loss precedes cancer-specific symptoms in pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Pancreas*. 2011 Jul;40(5):768-72

Hartwig W, Strobel O, Hinz U, Fritz S, Hackert T, Roth C, Büchler MW, Werner J. CA19-9 in potentially resectable pancreatic cancer: perspective to adjust surgical and perioperative therapy. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jul;20(7):2188-96

Hrabak P, Kalousová M, Krechler T, Zima T. Pancreatic stellate cells - rising stars in pancreatic pathologies. *Physiol Res*. 2021;70(Suppl4):S597-S616.

Hrabak P, Soupal J, Kalousova M, Krechler T, Vocka M, Hanus T, Petruzelka L, Svacina S, Zak A, Zima T. Novel biochemical markers for non-invasive detection of pancreatic cancer. *Neoplasma*. 2022 Mar;69(2):474-483.

Hrabak P, Zelenkova M, Krechler T, Soupal J, Vocka M, Hanus T, Petruzelka L, Svacina S, Zak A, Zima T, Kalousova M. Levels of retinol and retinoic acid in pancreatic cancer, type-2 diabetes and chronic pancreatitis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2023 Dec 6

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2004 Aug;28(8):977-87.

Hu F, Lou N, Jiao J, Guo F, Xiang H, Shang D. Macrophages in pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential. *Biomed Pharmacother*. 2020 Nov;131:110693

Huang C, Li Y, Guo Y, Zhang Z, Lian G, Chen Y, Li J, Su Y, Li J, Yang K, Chen S, Su H, Huang K, Zeng L. MMP1/PAR1/SP/NK1R paracrine loop modulates early perineural invasion of pancreatic cancer cells. *Theranostics*. 2018 Apr 30;8(11):3074-3086.

Huang S, Zheng J, Huang Y, Song L, Yin Y, Ou D, He S, Chen X, Ouyang X. Impact of S100A4 Expression on Clinicopathological Characteristics and Prognosis in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2016;2016:8137378

Huang X, Gao Y, Zhi X, Ta N, Jiang H, Zheng J. Association between vitamin A, retinol and carotenoid intake and pancreatic cancer risk: Evidence from epidemiologic studies. *Sci Rep*. 2016;6:38936.

Huang X, Lu Z, Zhang K. et al., Prognostic impact of the ratio of preoperative CA19-9 to liver enzyme levels in pancreatic cancer patients with jaundice (predictability of combined CA19-9/AST and CA19-9/ γ -GGT for jaundiced PDAC patients). *Pancreatology*. Published online May 26, 2021

Humeau M, Torrisani J, Cordelier P. MiRNA in clinical practice: Pancreatic cancer. *Clin Biochem*. 2013;46(10–11):933–936

Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*. 2005;129:504–11

Charkhchi P, Cybulski C, Gronwald J, Wong FO, Narod SA, Akbari MR. CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 11;12(12):3730.

Chi F, Wu R, Zeng YC, Xing R, Liu Y. Circulation insulin-like growth factor peptides and colorectal cancer risk: an updated systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013 May;40(5):3583-90.

Chronopoulos A, Robinson B, Sarper M, Cortes E, Auernheimer V, Lachowski D, Attwood S, García R, Ghassemi S, Fabry B, Del Río Hernández A. ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion. *Nat Commun*. 2016 Sep 7;7:12630.

Jahan R, Ganguly K, Smith LM, Atri P, Carmicheal J, Sheinin Y, Rachagani S, Natarajan G, Brand RE, Macha MA, Grandgenett PM, Kaur S, Batra SK. Trefoil factor(s) and CA19.9: A promising panel for early detection of pancreatic cancer. *EBioMedicine*. 2019 Apr;42:375-385.

Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Koga Y, Miyazaki K. Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer

cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *Int J Cancer*. 2006 Dec 15;119(12):2750-9.

Isaji S, Mizuno S, Windsor JA, Bassi C, Fernández-Del Castillo C, Hackert T, Hayasaki A, Katz MHG, Kim SW, Kishiwada M, Kitagawa H, Michalski CW, Wolfgang CL. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology*. 2018 Jan;18(1):2-11.

Jin G, Hong W, Guo Y, Bai Y, Chen B. Molecular Mechanism of Pancreatic Stellate Cells Activation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *J Cancer*. 2020 Jan 14;11(6):1505-1515. doi: 10.7150/jca.38616.

Kaiser A, Herbst H, Fisher G, Koenigsmann M, Berdel WE, Riecken EO, Rosewicz S. Retinoic acid receptor β regulates growth and differentiation in human pancreatic carcinoma cells. *Gastroenterology* 1997;113:920–9.

Kakwere H, Ingham ES, Tumbale SK, Ferrara KW. Gemcitabine-retinoid prodrug loaded nanoparticles display in vitro antitumor efficacy towards drug-resilient human PANC-1 pancreatic cancer cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;117:111251.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786.

Kandikattu HK, Venkateshaiah SU, Mishra A. Chronic Pancreatitis and the Development of Pancreatic Cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020; 20(8): 1182-1210.

Kang H, Kim SS, Sung MJ, Jo JH, Lee HS, Chung MJ, Park JY, Park SW, Song SY, Park MS, Bang S. Evaluation of the 8th Edition AJCC Staging System for the Clinical Staging of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 26;14(19):4672.

Kang X, Lin Z, Xu M, Pan J, Wang ZW. Deciphering role of FGFR signalling pathway in pancreatic cancer. *Cell Prolif*. 2019 May;52(3):e12605.

Kanno A, Masamune A, Hanada K, Maguchi H, Shimizu Y, Ueki T, Hasebe O, Ohtsuka T, Nakamura M, Takenaka M, Kitano M, Kikuyama M, Gabata T, Yoshida K, Sasaki T, Serikawa M, Furukawa T, Yanagisawa A, Shimosegawa T; Japan Study Group on the Early Detection of Pancreatic Cancer (JEDPAC). Multicenter study of early pancreatic cancer in Japan. *Pancreatology*. 2018 Jan;18(1):61-67.

Kaoutari AE, Fraunhoffer NA, Hoare O, Teyssedou C, Soubeyran P, Gayet O, Roques J, Lomberk G, Urrutia R, Dusetti N, Iovanna J. Metabolomic profiling of pancreatic adenocarcinoma reveals key features driving clinical outcome and drug resistance. *EBioMedicine*. 2021 Apr;66:103332.

Karnevi E, Rosendahl AH, Hilmersson KS, Saleem MA, Andersson R. Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro. *Exp Cell Res*. 2016 Aug 15;346(2):206-15.

Kendrick ZW, Firpo MA, Repko RC, Scaife CL, Adler DG, Boucher KM, Mulvihill SJ. Serum IGFBP2 and MSLN as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2014 Jul;16(7):670-6.

Khan S, Safarudin RF, Kupec JT. Validation of the ENDPAC model: Identifying new-onset diabetics at risk of pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2021 Apr;21(3):550-555.

Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Dec 17;403(3-4):380-4.

Kirkegard J, Mortensen FV, Cronin-Fenton D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2017;112:1366–1372.

Kiss K, Baghy K, Spisák S, Szanyi S, Tulassay Z, Zalatnai A, Löhr JM, Jesenofsky R, Kovalszky I, Firneisz G. Chronic hyperglycemia induces trans-differentiation of human pancreatic stellate cells and enhances the malignant molecular communication with human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5): e0128059.

Knapinska AM, Estrada CA, Fields GB. The Roles of Matrix Metalloproteinases in Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;148:339-354. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.004. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28662827.

Kocher HM, Basu B, Froeling FEM, Sarker D, Slater S, Carlin D, deSouza NM, De Paepe KN, Goulart MR, Hughes C, Imrali A, Roberts R, Pawula M, Houghton R, Lawrence C, Yogeswaran Y, Mousa K, Coetzee C, Sasieni P, Prendergast A, Propper DJ. Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2020 Sep 24;11(1):4841.

Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Endo S, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M. Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 2018 Jul 1;425:65-77.

Kolb A, Kleeff J, Guweidhi A, Esposito I, Giese NA, Adwan H, Giese T, Büchler MW, Berger MR, Friess H. Osteopontin influences the invasiveness of pancreatic cancer cells and is increased in neoplastic and inflammatory conditions. *Cancer Biol Ther.* 2005 Jul;4(7):740-6.

Komar HM, Hart PA, Cruz-Monserrate Z, Conwell DL, Lesinski GB. Local and Systemic Expression of Immunomodulatory Factors in Chronic Pancreatitis. *Pancreas.* 2017 Sep;46(8):986-993.

Krempf M, Ranganathan S, Ritz P, Morin M, Charbonnel B. Plasma vitamin A and E in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) adult diabetic patients. *Int J Vitam Nutr Res.* 1991;61(1):38-42.

Kuhlmann KF, van Till JW, Boermeester MA, de Reuver PR, Tzvetanova ID, Offerhaus GJ, Ten Kate FJ, Busch OR, van Gulik TM, Gouma DJ, Crawford HC. Evaluation of matrix metalloproteinase 7 in plasma and pancreatic juice as a biomarker for pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 May;16(5):886-91.

Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, Larsson M, Storm G, Östman A, Sandström P, Prakash J. MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget.* 2016 Mar 29;7(13):16396-408.

Kunovský L, Dítě P, Blaho M, Dvořáčková J, Uvírová M, Přecechtělová M, Jabandžiev P, Mašková H, Kianička B, Janeček P, Eid M, Martínek A. Is autoimmune pancreatitis a risk factor for pancreatic adenocarcinoma? *Vnitr Lek.* 2021 Winter;67(1):9-13.

Laklai H, Miroshnikova YA, Pickup MW, Collisson EA, Kim GE, Barrett AS, Hill RC, Lakins JN, Schlaepfer DD, Mouw JK, LeBleu VS, Roy N, Novitskiy SV, Johansen JS, Poli V, Kalluri R, Iacobuzio-Donahue CA, Wood LD, Hebrok M, Hansen K, Moses HL, Weaver VM. Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat Med.* 2016 May;22(5):497-505.

Lang J, Kunovský L, Kala Z, Trna J. Risk factors of pancreatic cancer and their possible uses in diagnostics. *Neoplasma*. 2021 Mar;68(2):227-239.

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(12):1525-9.

Lee AT, Xu Z, Pothula SP, Patel MB, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Alcohol and cigarette smoke components activate human pancreatic stellate cells: implications for the progression of chronic pancreatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Nov;39(11):2123-33.

Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 28;103(9):3444-9.

Lee H, Lim C, Lee J, Kim N, Bang S, Lee H, Min B, Park G, Noda M, Stetler-Stevenson WG, Oh J. TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem*. 2008 Jun 1;104(3):1065-74.

Legoffic, A., Calvo, E., Cano, C., Folch-Puy, E., Barthet, M., and Delpero, J. R. (2009). The reg4 gene, amplified in the early stages of pancreatic cancer development, is a promising therapeutic target. *PLoS One* 4:e7495.

Leslie K. Ferrarelli, In PDAC, “bad” cholesterol is good. *Sci. Signal*.13,eabf 5642(2020).

Li KY, Yuan JL, Trafton D, Wang JX, Niu N, Yuan CH, Liu XB, Zheng L. Pancreatic ductal adenocarcinoma immune microenvironment and immunotherapy prospects. *Chronic Dis Transl Med*. 2020 Feb 11;6(1):6-17.

Li Q, Wang H, Zogopoulos G, Shao Q, Dong K, Lv F, Nwilati K, Gui XY, Cuggia A, Liu JL, Gao ZH. Reg proteins promote acinar-to-ductal metaplasia and act as novel diagnostic and prognostic markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Nov 22;7(47):77838-77853.

Li Y, Wongsiriroj N, Blaner WS. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(3):126-139. doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04

- Lin H, Dong B, Qi L, Wei Y, Zhang Y, Cai X, Zhang Q, Li J, Li L. Inhibitory Smads suppress pancreatic stellate cell activation through negative feedback in chronic pancreatitis. *Ann Transl Med.* 2021 Mar;9(5):384
- Lin Y, Tamakoshi A, Kikuchi S, Yagyu K, Obata Y, Ishibashi T, Kawamura T, Inaba Y, Kurosawa M, Motohashi Y, Ohno Y. Serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and the risk of pancreatic cancer death. *Int J Cancer.* 2004 Jul 1;110(4):584-8.
- Liou GY, Döppler H, Necela B, Edenfield B, Zhang L, Dawson DW, Storz P. Mutant KRAS-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions. *Cancer Discov.* 2015 Jan;5(1):52-63.
- Liu D, Steins A, Klaassen R, van der Zalm AP, Bennink RJ, van Tienhoven G, Besselink MG, Bijlsma MF, van Laarhoven HWM. Soluble Compounds Released by Hypoxic Stroma Confer Invasive Properties to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomedicines.* 2020 Oct 22;8(11):444
- Liu L, Xu H, Wang W, Wu C, Chen Y, Yang J, Cen P, Xu J, Liu C, Long J, Guha S, Fu D, Ni Q, Jatoi A, Chari S, McCleary-Wheeler AL, Fernandez-Zapico ME, Li M, Yu X. A preoperative serum signature of CEA+/CA125+/CA19-9 \geq 1000 U/mL indicates poor outcome to pancreatectomy for pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2015 May 1;136(9):2216-27.
- Liu X, Liu L, Ji Y, Li C, Wei T, Yang X, Zhang Y, Cai X, Gao Y, Xu W, Rao S, Jin D, Lou W, Qiu Z, Wang X. Enrichment of short mutant cell-free DNA fragments enhanced detection of pancreatic cancer. *EBioMedicine.* 2019 Mar;41:345-356.
- Liu Y, Wang C, Wang R, Wu Y, Zhang L, Liu BF, Cheng L, Liu X. Isomer-specific profiling of N-glycans derived from human serum for potential biomarker discovery in pancreatic cancer. *J Proteomics.* 2018 Jun 15;181:160-169.
- Liu Z, Kuang W, Zhou Q, Zhang Y. TGF- β 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int J Mol Med.* 2018 Dec;42(6):3395-3403
- Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, Ferrara F, Fazi P, Cicconi L, Di Bona E, Specchia G, Sica S, Divona M, Levis A, Fiedler W, Cerqui E, Breccia M, Fioritoni G, Salih HR, Cazzola M, Melillo L, Carella AM, Brandts CH, Morra E, von

Lilienfeld-Toal M, Hertenstein B, Wattad M, Lübbert M, Hänel M, Schmitz N, Link H, Kropp MG, Rambaldi A, La Nasa G, Luppi M, Ciceri F, Finizio O, Venditti A, Fabbiano F, Döhner K, Sauer M, Ganser A, Amadori S, Mandelli F, Döhner H, Ehninger G, Schlenk RF, Platzbecker U; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group; Study Alliance Leukemia. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013 Jul 11;369(2):111-21.

Longo V, Brunetti O, Gnoni A, Cascinu S, Gasparini G, Lorusso V, Ribatti D, Silvestris N. Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: A controversial issue. *Oncotarget.* 2016 Sep 6;7(36):58649-58658.

Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, Bosetti C, Li D, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Gao YT, Negri E, Hassan M, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Boffetta P, Duell EJ. Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol.* 2012 Feb;23(2):374-82.

Luo G, Jin K, Deng S, Cheng H, Fan Z, Gong Y, Qian Y, Huang Q, Ni Q, Liu C, Yu X. Roles of CA19-9 in pancreatic cancer: Biomarker, predictor and promoter. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021 Apr;1875(2):188409.

Luo J, Zhu Y, Yang G, Gong L, Wang B, Liu H. Loss of Reprimo and S100A2 Expression in Human Gastric Adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol (2011)* 39:752-7.

Luttenberger T, Schmid-Kostsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grunert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest.* 2000 Jan;80(1):47-55

Ma Q, Wu H, Xiao Y, Liang Z, Liu T. Upregulation of exosomal microRNA-21 in pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration and enhances Ras/ERK pathway activity. *Int J Oncol.* 2020 Apr;56(4):1025-1033.

Macinga P, Bajer L, Del Chiaro M, Chari ST, Dite P, Frulloni L, Ikeura T, Kamisawa T, Kubota K, Naitoh I, Okazaki K, Pezzilli R, Vujasinovic M, Spicak J, Hucl T, Löhr M.

Pancreatic cancer in patients with autoimmune pancreatitis: A scoping review. *Pancreatology*. 2021 Aug;21(5):928-937.

Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol*. 2015 Feb;44(1):186-98.

Malka D, Hammel P, Sauvanet A, Rufat P, O'Toole D, Bardet P, Belghiti J, Bernades P, Ruzsniwski P, Lévy P. Risk factors for diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2000 Nov;119(5):1324-32

Marstrand-Daucé L, Lorenzo D, Chassac A, Nicole P, Couvelard A, Haumaitre C. Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 9;24(12):9946

Martínez-Moneo E, Stigliano S, Hedström A, Kaczka A, Malvik M, Waldthaler A, Maisonneuve P, Simon P, Capurso G. Deficiency of fat-soluble vitamins in chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Pancreatology*. 2016 Nov-Dec;16(6):988-994.

Masamune A, Sakai Y, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. Activated rat pancreatic stellate cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Pancreas*. 2002 Jul;25(1):78-85.

McCarrol JA, Phillips PA, Park S, Doherty E, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? *Pancreas*. 2003 Aug;27(2):150-60

Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Xu W, Ji S, Zhang B, Ni Q, Xu J, Yu X. Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2017 Sep 15;10:4591-4598.

Miyamoto H., Murakami T., Tsuchida K., Sugino H., Miyake H., Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: Acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*. 2004;28:38–44.

Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2020 Jun 27;395(10242):2008-2020.

Moorman HR, Poschel D, Klement JD, Lu C, Redd PS, Liu K. Osteopontin: A Key Regulator of Tumor Progression and Immunomodulation. *Cancers*. 2020; 12(11):3379.

Munigala S, Kanwal F, Xian H, Scherrer JF, Agarwal B. Increased risk of pancreatic adenocarcinoma after acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jul;12(7):1143-1150.e1.

Mutgan AC, Besikcioglu HE, Wang S, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE. Insulin/IGF-driven cancer cell-stroma crosstalk as a novel therapeutic target in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):66.

Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Hayashi A, Miyasaka Y, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. S100P is a novel marker to identify intraductal papillary mucinous neoplasms. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):824-31.

National Collaborating Centre for Cancer (UK). Suspected Cancer: Recognition and Referral. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); NICE Guideline, No. 12.) June 2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304993/>

Naudin S, Sampson JN, Moore SC, Albanes D, Freedman ND, Weinstein SJ, Stolzenberg-Solomon R. Lipidomics and pancreatic cancer risk in two prospective studies. *Eur J Epidemiol*. 2023 Jul;38(7):783-793.

Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, Erkan M, Kleeff J, Wilson J, Apte M, Tosolini M, Wilson AS, Delvecchio FR, Bousquet C, Paradis V, Hammel P, Sadanandam A, Kocher HM. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*. 2019 May;248(1):51-65.

Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014;13:668–677.

Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 1):111-118.

Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2019 Jun 15;11(3):45-63.

Ohlund D., Franklin O., Lundberg E., Lundin C., Sund M. Type iv collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer*. 2013;13:154.

Ohuchida K, Mizumoto K, Miyasaka Y, Yu J, Cui L, Yamaguchi H, Toma H, Takahata S, Sato N, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Over-expression of S100A2 in pancreatic cancer correlates with progression and poor prognosis. *J Pathol*. 2007 Nov;213(3):275-82

Oldfield L, Evans A, Rao RG, Jenkinson C, Purewal T, Psarelli EE, Menon U, Timms JF, Pereira SP, Ghaneh P, Greenhalf W, Halloran C, Costello E. Blood levels of adiponectin and IL-1Ra distinguish type 3c from type 2 diabetes: Implications for earlier pancreatic cancer detection in new-onset diabetes. *EBioMedicine*. 2022 Jan;75:103802

Olivares O, Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, Lac S, Roques J, Lavaut MN, Berthezène P, Rubis M, Secq V, Garcia S, Moutardier V, Lombardo D, Iovanna JL, Tomasini R, Guillaumond F, Vander Heiden MG, Vasseur S. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun*. 2017 Jul 7;8:16031.

O'Neill RS, Stoita A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 14;27(26):4045-4087

Vaněk P, Andrašina T, Bitnerová V, Ehrmann J., Falt P., Havlík R., Heřman M., Hucl T., Janíková M., Kala Z., Kiss I., Kloss D., Kovář R., Křivinka J., Kunovsky L., Kurfúrstová D., Loveček M., Mačinga P., Melichar B., Mohelníková Duchoňová B., Petruželka L., Procházka M., Repák R., Skalický P., Skanderová D., Slodička P., Suchánek Š., Šembera Š., Švébišová H., Tachecí I., Tesaříková J., Tichý T., Vrtěl R., Vítek P., Zavoral M., Zoundjiekpon V., Urban O. *Gastroent Hepatol* 2023; 77(6): 529–538.

Pan S., Brentnall T.A., Chen R. Glycoproteins and glycoproteomics in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol*. 2016;22:9288–9299.

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

Patel MB, Pothula SP, Xu Z, Lee AK, Goldstein D, Pirola RC, Apte MV, Wilson JS. The role of the hepatocyte growth factor/c-MET pathway in pancreatic stellate cell-endothelial cell interactions: antiangiogenic implications in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2014 Aug;35(8):1891-900

Perry JK., Kannan N., Grandison PM., Mitchell MD., Lobie PE. Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(2):74–81.

Pereira SP, Oldfield L, Ney A, Hart PA, Keane MG, Pandol SJ, Li D, Greenhalf W, Jeon CY, Koay EJ, Almario CV, Halloran C, Lennon AM, Costello E. Early detection of pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jul;5(7):698-710.

Petruzzelli M., Wagner E.F. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes Dev*. 2016;30:489–501.

Prinz C, Fehring L, Frese R. MicroRNAs as Indicators of Malignancy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) and Cystic Pancreatic Lesions. *Cells*. 2022 Aug 2;11(15):2374.

Prokopchuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, Kornmann M. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):921-8.

Qi ZH, Xu HX, Zhang SR, Xu JZ, Li S, Gao HL, Jin W, Wang WQ, Wu CT, Ni QX, Yu XJ, Liu L. RIPK4/PEBP1 axis promotes pancreatic cancer cell migration and invasion by activating RAF1/MEK/ERK signaling. *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1105-1116.

Radon TP, Massat NJ, Jones R, Alrawashdeh W, Dumartin L, Ennis D, Duffy SW, Kocher HM, Pereira SP, Guarner posthumous L, Murta-Nascimento C, Real FX, Malats N, Neoptolemos J, Costello E, Greenhalf W, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T. Identification of a Three-Biomarker Panel in Urine for Early Detection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015 Aug 1;21(15):3512-21

Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open*. 2021;4(4):e214708.

Rahn S, Zimmermann V, Viol F, Knaack H, Stemmer K, Peters L, Lenk L, Ungefroren H, Saur D, Schäfer H, Helm O, Sebens S. Diabetes as risk factor for pancreatic cancer:

Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett.* 2018 Feb 28;415:129-150.

Rajbhandari N, Lin WC, Wehde BL, Triplett AA, Wagner KU. Autocrine IGF1 Signaling Mediates Pancreatic Tumor Cell Dormancy in the Absence of Oncogenic Drivers. *Cell Rep.* 2017 Feb 28;18(9):2243-2255.

Rasch S, Valantiene I, Mickevicius A, Beer S, Rosendahl J, Charnley RM, Robinson SM. Chronic pancreatitis: Do serum biomarkers provide an association with an inflammaging phenotype? *Pancreatology.* 2016 Sep-Oct;16(5):708-14.

Rawnaq T, Dietrich L, Wolters-Eisfeld G, Uzunoglu FG, Vashist YK, Bachmann K, Simon R, Izbicki JR, Bockhorn M, Güngör C. The multifunctional growth factor midkine promotes proliferation and migration in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res.* 2014 May;12(5):670-80.

Robinson SM, Rasch S, Beer S, Valantiene I, Mickevicius A, Schlaipfer E, Mann J, Maisonneuve P, Charnley RM, Rosendahl J. Systemic inflammation contributes to impairment of quality of life in chronic pancreatitis. *Sci Rep.* 2019 May 13;9(1):7318.

Ronald M. Krauss; Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2 Diabetes . *Diabetes Care* 1 June 2004; 27 (6): 1496–1504.

Rychlíková J, Vecka M, Jáchymová M, Macášek J, Hrabák P, Zeman M, Vávrová L, Šoupal J, Krechler T, Žák A. Osteopontin as a discriminating marker for pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Cancer Biomark.* 2016 Jun 7;17(1):55-65.

Sah RP, Sharma A, Nagpal S, Patlolla SH, Sharma A, Kandlakunta H, Anani V, Angom RS, Kamboj AK, Ahmed N, Mohapatra S, Vivekanandhan S, Philbrick KA, Weston A, Takahashi N, Kirkland J, Javeed N, Matveyenko A, Levy MJ, Mukhopadhyay D, Chari ST. Phases of Metabolic and Soft Tissue Changes in Months Preceding a Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 2019 May;156(6):1742-1752.

Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E. et al., A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):174-186.

Salvatore T, Marfella R, Rizzo MR, Sasso FC. Pancreatic cancer and diabetes: A two-way relationship in the perspective of diabetologist. *Int J Surg.* 2015; 21 Suppl 1: S72-7.

Sarper M, Cortes E, Lieberthaler TJ, Del Río Hernández A. ATRA modulates mechanical activation of TGF- β by pancreatic stellate cells. *Sci Rep*. 2016 Jul 4;6:27639

Scarà S., Bottoni P., Scatena R. (2015) CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. In: Scatena R. (eds) *Advances in Cancer Biomarkers. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Dordrecht vol 867. p 247–60. ISBN: 978-94-024-0420-3

Seifert AM, List J, Heiduk M, Decker R, von Renesse J, Meinecke AC, Aust DE, Welsch T, Weitz J, Seifert L. Gamma-delta T cells stimulate IL-6 production by pancreatic stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Dec;146(12):3233-3240.

Shao F, Cai M, Fan FF, Huang M, Tao Y, Wang C, Meng FT, Huang Q. Overexpression of circRNA chr7:154954255-154998784+ in cancer-associated pancreatic stellate cells promotes the growth and metastasis of pancreatic cancer by targeting the miR-4459/KIAA0513 axis. *Am J Transl Res*. 2020 Sep 15;12(9):5048-5063

Sharma A, Kandlakunta H, Nagpal SJS, Feng Z, Hoos W, Petersen GM, Chari ST. Model to Determine Risk of Pancreatic Cancer in Patients With New-Onset Diabetes. *Gastroenterology*. 2018 Sep;155(3):730-739.e3.

Shek FW, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SL, Williams EJ, Johnson PA, Johnson CD, Bateman AC, Fine DR, Iredale JP. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol*. 2002 May;160(5):1787-98.

Shi G, DiRenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF. Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene*. 2013 Apr 11;32(15):1950-8.

Schneider A, Löhr JM, Singer MV. The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol*. 2007 Feb;42(2):101-19

Sikkens EC, Cahen DL, Koch AD, Braat H, Poley JW, Kuipers EJ, Bruno MJ. The prevalence of fat-soluble vitamin deficiencies and a decreased bone mass in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2013 May-Jun;13(3):238-42.

Slapak EJ, Duitman J, Tekin C, Bijlsma MF, Spek CA. Matrix Metalloproteases in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Key Drivers of Disease Progression? *Biology (Basel)*. 2020 Apr 18;9(4):80

Soška V Nuclear receptors PPAR α *Vnitř Lék* 2006; 52(6): 628-631

Sperb N, Tsesmelis M, Wirth T. Crosstalk between Tumor and Stromal Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 31;21(15):5486.

Stanciu S, Ionita-Radu F, Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Greabu M, Ripszky Totan A, Jinga M. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Pancreatic Cancer: From Molecular to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 4;23(17):10132.

Suetsugu A, Snyder CS, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. Imaging the Interaction of Pancreatic Cancer and Stellate Cells in the Tumor Microenvironment during Metastasis. *Anticancer Res*. 2015 May;35(5):2545-51

Škrha P, Hajer J, Anděl M, Hořínek A, Korabečná M. miRNA jako nový ukazatel u diabetes mellitus a u rozvoje karcinomu pankreatu [miRNA as a new marker of diabetes mellitus and pancreatic carcinoma progression]. *Cas Lek Cesk*. 2015;154(3):122-6.

Taherian M, Wang H, Wang H. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Molecular Pathology and Predictive Biomarkers. *Cells*. 2022 Sep 29;11(19):3068

Takehara, A., Eguchi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Kasugai, T., and Hosokawa, M. (2006). Novel tumor marker REG4 detected in serum of patients with resectable pancreatic cancer and feasibility for antibody therapy targeting REG4. *Cancer Sci*. 97, 1191–1197.

Tan PS, Garriga C, Clift A, Liao W, Patone M, Coupland C, Bashford-Rogers R, Sivakumar S, Hippisley-Cox J. Temporality of body mass index, blood tests, comorbidities and medication use as early markers for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a nested case-control study. *Gut*. 2023 Mar;72(3):512-521.

Taneera J, Awadallah S, Khader Mohammed A, Unnikannan H, Sulaiman N. Vitamin A levels are decreased but not influenced by glucose- or lipid-lowering medications in subjects with type 2 diabetes. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(1):572-577.

Tesarova P, Kalousova M, Zima T, Tesar V. HMGB1, S100 proteins and other RAGE ligands in cancer - markers, mediators and putative therapeutic targets. *Biomed Pap Med Fac Univ*

Palacky Olomouc Czech Repub. 2016 Mar;160(1):1-10. doi: 10.5507/bp.2016.003. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26847418.

Treadwell JR, Zafar HM, Mitchell MD, Tipton K, Teitelbaum U, Jue J. (2016) Imaging tests for the diagnosis and staging of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *Pancreas* 45:789–795

Tsai CY, Saito T, Sarangdhar M, Abu-El-Haija M, Wen L, Lee B, Yu M, Lipata DA, Manohar M, Barakat MT, Contrepolis K, Tran TH, Theoret Y, Bo N, Ding Y, Stevenson K, Ladas EJ, Silverman LB, Quadro L, Anthony TG, Jegga AG, Husain SZ. A systems approach points to a therapeutic role for retinoids in asparaginase-associated pancreatitis. *Sci Transl Med.* 2023 Mar 15;15(687):eabn2110.

Van Doren SR. MMP-7 marks severe pancreatic cancer and alters tumor cell signaling by proteolytic release of ectodomains. *Biochem Soc Trans.* 2022 Apr 29;50(2):839-851.

Vazquez Arreola E, Knowler WC, Hanson RL. Weight Loss, Lifestyle Intervention, and Metformin Affect Longitudinal Relationship of Insulin Secretion and Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 Nov 23;107(11):3086-3099.

Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, Apte MV. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology.* 2007 Oct;133(4):1293-303

von Lintig J, Moon J, Lee J, Ramkumar S. Carotenoid metabolism at the intestinal barrier. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(11):158580.

Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, Quinn MC, Robertson AJ, Fadlullah MZ, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wani S, Wilson PJ, Markham E, Cloonan N, Anderson MJ, Fink JL, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Newell F, Poudel B, Song S, Taylor D, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Lee HC, Jones MD, Nagrial AM, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Steinmann AM, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Pettitt JA, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, Graham JS, Niclou SP, Bjerkvig R, Grützmann R, Aust D, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C,

Falconi M, Zamboni G, Tortora G, Tempero MA; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; Gill AJ, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Pearson JV, Biankin AV, Grimmond SM. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):495-501.

Wake K. Hepatic Stellate Cells. In: Tanikawa K., Ueno T: (eds) *Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells*. Springer, Tokyo, 1999 p56-65

Wang J, Wang WJ, Zhai L, Zhang DF. Association of cholesterol with risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(12):3711-3719.

Wang K, Baldwin GS, Nikfarjam M, He H. Antitumor effects of all-trans retinoic acid and its synergism with gemcitabine are associated with downregulation of p21-activated kinases in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019;316(5):G632-G640.

Wang L, Quan Y, Zhu Y, Xie X, Wang Z, Wang L, Wei X, Che F. The regenerating protein 3A: a crucial molecular with dual roles in cancer. *Mol Biol Rep*. 2022 Feb;49(2):1491-1500.

Wang M, Zhu J, Lubman DM, Gao C. Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(4):407-416.

Wang QL, Khil J, Hong S, Lee DH, Ha KH, Keum N, Kim HC, Giovannucci EL. Temporal Association of Total Serum Cholesterol and Pancreatic Cancer Incidence. *Nutrients*. 2022 Nov 21;14(22):4938

Wang X, Luo G, Zhang K, Cao J, Huang C, Jiang T, Liu B, Su L, Qiu Z. Hypoxic Tumor-Derived Exosomal miR-301a Mediates M2 Macrophage Polarization via PTEN/PI3K γ to Promote Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Res*. 2018 Aug 15;78(16):4586-4598

Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1982;58:837-858

Wen Z, Liu Q, Wu J, Xu B, Wang J, Liang L, Guo Y, Peng M, Zhao Y, Liao Q. Fibroblast activation protein α -positive pancreatic stellate cells promote the migration and invasion of pancreatic cancer by CXCL1-mediated Akt phosphorylation. *Ann Transl Med*. 2019 Oct;7(20):532.

Weniger M, Honselmann KC, Liss AS. The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship. *Cancers (Basel)*. 2018 Sep 6;10(9):316. doi: 10.3390/cancers10090316. PMID: 30200666; PMCID: PMC6162452.

Whatcott C.J., Diep C.H., Jiang P., Watanabe A., LoBello J., Sima C., Hostetter G., Shepard H.M., Von Hoff D.D., Han H. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 2015;21:3561–3568.

Włodarczyk B, Borkowska A, Włodarczyk P, Małecka-Panas E, Gąsiorowska A. Insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein 2 serum levels as potential biomarkers in differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma in reference to pancreatic diabetes. *Prz Gastroenterol.* 2021;16(1):36-42.

Wolrab D, Jirásko R, Cífková E, Höring M, Mei D, Chocholoušková M, Peterka O, Idkowiak J, Hrnčiarová T, Kuchař L, Ahrends R, Brumarová R, Friedecký D, Vivo-Truyols G, Škrha P, Škrha J, Kučera R, Melichar B, Liebisch G, Burkhardt R, Wenk MR, Cazenave-Gassiot A, Karásek P, Novotný I, Greplová K, Hrstka R, Holčapek M. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. *Nat Commun.* 2022 Jan 10;13(1):124.

Wu Y, Zhou Q, Guo F, Chen M, Tao X, Dong D. S100 Proteins in Pancreatic Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Oncol.* 2021 Aug 30;11:711180.

Wu YS, Chung I, Wong WF, Masamune A, Sim MS, Looi CY. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017 Feb;1861(2):296-306

Xiao W, Jiang W, Shen J, Yin G, Fan Y, Wu D, Qiu L, Yu G, Xing M, Hu G, Wang X, Wan R. Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis via Suppressing the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *PLoS One.* 2015 Nov 10;10(11):e0141462.

Xie ZB, Yao L, Jin C, Fu DL. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: efficacy in diagnosis and value in prognosis. *Discov Med.* 2016;22(120):121-8.

Xing H, Wang J, Wang Y, Tong M, Hu H, Huang C, Li D. Diagnostic Value of CA 19-9 and Carcinoembryonic Antigen for Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 2018 Nov 21;2018:8704751.

Xu XF, Liu F, Xin JQ, Fan JW, Wu N, Zhu LJ, Duan LF, Li YY, Zhang H. Respective roles of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members in pancreatic stellate cell activation induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun 22;501(2):365-373. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.176. PMID: 29705706.

Xue J, Zhao Q, Sharma V, Nguyen LP, Lee YN, Pham KL, Edderkaoui M, Pandol SJ, Park W, Habtezion A. Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Cigarette Smoke Induce Production of Interleukin-22 to Promote Pancreatic Fibrosis in Models of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2016 Dec;151(6):1206-1217.

Yang J, Xu R, Wang C, Qiu J, Ren B, You L. Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun (Lond)*. 2021 Dec;41(12):1257-1274.

Yu J, Blackford AL, Dal Molin M, Wolfgang CL, Goggins M. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. *Gut*. 2015; 64(11): 1783-1789.

Zhou Y, Zhou J, Sun B, Xu W, Zhong M, Li Y, He C, Chen Y, Wang X, Jones PM, Sun Z. Vitamin A deficiency causes islet dysfunction by inducing islet stellate cell activation via cellular retinol binding protein 1. *Int J Biol Sci*. 2020 Jan 30;16(6):947-956.

12. Seznam publikací autora

12.1. Publikace, které jsou podkladem disertační práce

Hrabák P, Šoupal J, Kalousová M. et al., Novel biochemical markers for non-invasive detection of pancreatic cancer. *Neoplasma*. **2022**;69(2):474-483.

doi:10.4149/neo_2022_210730N1075

IF 3,0 (2022) Q3

Hrabak P, Zelenkova M, Krechler T. et al., Levels of retinol and retinoic acid in pancreatic cancer, type-2 diabetes and chronic pancreatitis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Published online December 6, **2023**. doi:10.5507/bp.2023.049

IF 0,7 (2023), Q4

Hrabák P, Kalousová M, Krechler T, Zima T. Pancreatic stellate cells - rising stars in pancreatic pathologies. *Physiol Res*. **2021**;70(Suppl4):S597-S616.

doi:10.33549/physiolres.934783

IF 2,14 (2021) Q4

12.2. Publikace, které nejsou podkladem disertační práce

P. Hrabák, K. Benešová, D. Záhoráková, R. Brůha, Porphyria cutanea tarda in the settings of Hepatitis E, Přijato k publikaci / ahead of print in *Bratislava Medical Journal*, 125, 2024. (IF 1,564 Q3)

Březina J., Bajer L., Wohl P., Ďuricová D., **Hrabák Pavel**, Novotný A., Koželuhová J., Lukáš M., Mrázek J., Olša Fliegerová K., Kvasnová S., Chahrazed M., Mareš J., Špičák J., Drastich P.: Fecal Microbial Transplantation versus Mesalamine Enema for Treatment of Active Left-Sided Ulcerative Colitis-Results of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Medicine* 2021; 10(13), 2753 (13 str.).

IF = 4.242, Q1

Bielčíková Z., Ulrich J., Frýba V., **Hrabák P.** et al., Multimodální přístup v léčbě generalizovaných malignit gastrointestinálního traktu, *Gastroent Hepatol* 2022; 76(5): 409–417. doi:10.48095/ccgh2022409. , dostupné online

na <https://www.csgh.info/cs/clanek/multimodalni-pristup-v-lecbe-generalizovanych-malignit-gastrointestinalniho-traktu-11382>

Hrabák P, Šoupal J, Kalousová M, Krechler T, Vočka M, Hanuš T, Petruželka L, Svačina Š, Žák A, Zima T. Využití strojového učení v analýze biomarkerů karcinomu pankreatu. *Gastroent Hepatol* 2022; 76(6): 538–554. <https://www.csgh.info/cs/clanek/17-vzdelavaci-a-diskuzni-gastroenterologicke-dny-1-3-prosinec-2022-hotel-thermal-karlovy-vary-11408> (Poster)

13. Přílohy

Hrabák P, Šoupal J, Kalousová M. et al., Novel biochemical markers for non-invasive detection of pancreatic cancer. *Neoplasma*. **2022**;69(2):474-483.

doi:10.4149/neo_2022_210730N1075

Hrabák P, Kalousová M, Krechler T, Zima T. Pancreatic stellate cells - rising stars in pancreatic pathologies. *Physiol Res*. **2021**;70(Suppl4):S597-S616.

doi:10.33549/physiolres.934783

Hrabak P, Zelenkova M, Krechler T. et al., Levels of retinol and retinoic acid in pancreatic cancer, type-2 diabetes and chronic pancreatitis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Published online December 6, **2023**. doi:10.5507/bp.2023.049

Novel biochemical markers for non-invasive detection of pancreatic cancer

Pavel HRABÁK¹, Jan ŠOUPAL², Marta KALOUSOVÁ³, Tomáš KRECHLER¹, Michal VOČKA⁴, Tomáš HANUŠ⁵, Luboš PETRUŽELKA⁴, Štěpán SVACINA², Aleš ŽÁK¹, Tomáš ZIMA³

¹4th Department of Medicine-Department of Gastroenterology and Hepatology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; ²3rd Department of Medicine-Department of Endocrinology and Metabolism, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; ³Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; ⁴Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; ⁵Department of Urology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

*Correspondence: marta.kalousova@lf1.cuni.cz

Received July 30, 2021 / Accepted January 11, 2022

To identify non-invasive biomarkers of non-metastatic pancreatic cancer (PC), the blood from 186 patients (PC n=28; DM-diabetes mellitus n=60; ChP-chronic pancreatitis n=47; healthy controls n=51) was analyzed for 58 candidate biomarkers. Their effectiveness to identify PC was compared with CA19-9. Panel defined by Random-forest (RF) analysis (CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3A, HSP27) outperforms CA19-9 in discrimination of PC from DM (AUC 0.92 vs. 0.82). Panel (S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3A) is better in discrimination PC from ChP than CA19-9 (AUC 0.90 vs. 0.75). Panel (MMP-7, Reg3A, sICAM1, OPG, CB, ferritin) is better in discrimination PC from healthy controls than CA19-9 (AUC 0.89 vs. 0.78). Panel (CA19-9, S100P-pl, AAT, albumin, adiponectin, IGF-1, MMP7, S100A11) identifies PC among other groups better than CA19-9 (AUC 0.91 vs. 0.80). Panel defined by logistic regression analysis (prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, CA72-4) discriminates PC from DM worse than CA19-9 (AUC 0.80 vs. 0.82). Panel (IGF-1, S100A11, Reg1alfa) outperforms CA19-9 in discrimination PC from ChP (AUC 0.76 vs. 0.75). Panel (IGF-2, S100A11, Reg3A) outperforms CA19-9 in discrimination PC from healthy controls (AUC 0.95 vs. 0.78). Panel (albumin, AAT, S100P-serum, CRP, CA19-9, TFF1, MMP-7) outperforms CA19-9 in identification PC among other groups (AUC 0.89 vs. 0.8). The combination of biomarkers identifies PC better than CA19-9 in most cases. S100A11, Reg3A, DJ-1 were to our knowledge identified for the first time as possible serum biomarkers of PC.

Key words: serum biomarker; pancreatic cancer; non-invasive diagnosis; panel of biomarkers; S100 proteins family

Pancreatic cancer (PC) belongs to the most severe diseases of the gastrointestinal tract. It's the 8th most common cause of death from malignancy [1]. Its incidence is growing in developed countries. The only curable method of PC is surgery, but just a minority of patients are diagnosed in the early stage of the disease. Identification of biomarkers, which could detect patients in the early stage of PC could be the key factor of successful treatment.

Many previous studies failed while looking for the solitary biomarker of early PC [2]. As the gold standard CA19-9 is still widely used, despite its false negativity in fucosyltransferase-deficient individuals, false positivity in several situations (e.g., acute, or chronic pancreatitis, cholangitis, liver

cirrhosis, and obstructive jaundice), and low sensitivity for detecting small (<3 cm) pancreatic tumors [3].

The purpose of this study was to identify a set of markers that can help us to differentiate patients with pancreatic cancer from the other groups (DM-type 2 diabetes mellitus, ChP-chronic pancreatitis, healthy controls). In this study, 58 markers were studied (Table 1). We studied not only „new biomarkers”, which were chosen as candidate markers based on relevant articles and results of published studies but also markers routinely measured in clinical praxis. We presume, that mechanism of carcinogenesis in PC is different in each risk group (DM, ChP) and thus represented by different biomarkers. Panels of biomarkers identified in this study

were compared with 'the gold standard' CA19-9 – a widely used but nonspecific biomarker.

Patients and methods

Study design. In this study, 4 groups were compared: patients with PC with the rest of probands and PC with other groups (newly/<3years/diagnosed DM, ChP, healthy controls) separately.

Patients with histologically confirmed ductal adenocarcinoma were included in the study after staging (inclusion criterion – stage I–III of American Joint Committee on Cancer classification (AJCC)). In the DM group, patients treated in the 3rd Department of Medicine of the General University Hospital in Prague with newly (<3 years) diagnosed type 2 diabetes mellitus were included. For the chronic pancreatitis group, patients were included in the study according to the Mannheim criteria [4].

186 patients were in total included in the study. 60 patients with DM, 47 patients with ChP, 28 with PC in stage 1–3 according to AJCC (non-metastatic), and 51 healthy controls. The basic characteristics of experimental groups are summarized in Table 2.

The study was approved by the local Institutional Ethical Committee (No.: 336/11 S–IV) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects have given informed consent with participation in the study.

Laboratory analysis. Blood samples were obtained in the General University Hospital in Prague. Blood from each individual was collected through puncture of the cubital vein into tubes containing ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant (to obtain plasma) and into tubes without an anticoagulant agent (for obtaining serum).

Samples were centrifuged for 10 min at 1450×g and serum and plasma aliquots were stored according to the study protocol at –80 °C until analysis was performed.

Laboratory analysis was performed by using the following methods (serum analysis, if not written otherwise):

CEA, CA19-9: chemiluminescence assay (CLIA), Architect, Abbott, USA; CA72-4, insulin, C-peptide: electrochemiluminescence assay (ECLIA), Modular, Roche, Germany; AFP: CLIA, Centaur, Siemens, Germany; AAT: nephelometry, Immage, Beckman Coulter, USA; Protein S100P (serum and plasma): ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), MBL International, USA; MMP 7: ELISA, R&D Systems, USA; DJ-1, ALCAM, CEACAM-1: ELISA, Abnova, Taiwan; IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3: ELISA Mediagnost, Germany; Osteopontin, TIMP-1, MCP-1, HSP-27, sICAM-1, MMP-9 (plasma): ELISA, eBioscience, USA; HSP60 (plasma), HSP70: ELISA, StressMarq, Canada; Adiponectin, sRAGE, MIC-1, Reg1α, Midkine, Leptin, OPG, TFF1, S100A6, REG3A, S100A11, PANDER: ELISA, Biovondor Laboratorní medicína, s.r.o., Czech Republic.

Routine biochemical parameters were analyzed by standard methods by automatic analyzers.

Statistical analysis. Standard descriptive statistics measures were used for concentrations of all studied parameters (mean, standard deviation, min, max, median). To compare biomarker levels in all groups, ANOVA analysis, followed by Tukey's test was performed (p-values obtained for these analyses are summarized in Table 1).

The logistic regression model has been built as a basic model for analysis, the biomarkers were included in the model by using forward and backward stepwise regression analysis, where p-value (p<0.05) from ANOVA analysis was the inclusion criteria.

Table 1. Concentrations of analyzed biomarkers in the studied group (for each subgroup separately) and p - values for ANOVA and post-hoc test (Tukey's test).

	Pancreatic cancer group		Diabetes Mellitus group		Chronic pancreatitis group		Healthy controls		p-values for ANOVA+Tukey's test
	mean±SD	med	mean±SD	med	mean±SD	med	mean±SD	med	
AAT (g/l)	2±0.5	2.0	1.5±0.3	1.5	1.7±0.4	1.7	1.4±0.2	1.4	***, \$\$\$, &&&, %%%
Adiponectin (ng/ml)	23602.5±14223.1	21195.0	18033.8±7509.3	18630.0	21072.3±12193.2	18840.0	17303.1±7783	16440.0	*, %
Albumin (g/l)	40.1±4.2	40.6	45.1±3.7	45.3	45.1±4.6	45.7	45±2.2	45.4	***, \$\$\$, &&&, %%%
ALCAM (pg/ml)	214.6±65.8	200.5	199.6±86.5	186.0	196.2±76	187.0	171.7±62.2	166.0	
ALP (ukat/l)	2.5±3.6	1.6	1±0.3	0.9	1.8±2	1.2	1±0.2	1.0	***, &&&, %%%
ALT (ukat/l)	0.9±0.8	0.5	0.6±0.3	0.4	0.6±0.5	0.5	0.5±0.2	0.4	***, &&, %%%
AMS-P (ukat/l)	1.1±3	0.4	0.4±0.2	0.4	0.7±0.8	0.4	0.4±0.2	0.4	
ApoB (g/l)	1±0.2	1.0	1±0.3	0.9	1±0.3	1.0	1.2±0.3	1.2	**
AST (ukat/l)	0.8±0.7	0.5	0.5±0.2	0.4	0.5±0.3	0.5	0.4±0.1	0.4	***, \$, &&&, %%%

Table 1. Continued ...

	Pancreatic cancer group		Diabetes Mellitus group		Chronic pancreatitis group		Healthy controls		p-values for ANOVA+Tukey's test
	mean±SD	med	mean±SD	med	mean±SD	med	mean±SD	med	
CA19-9 (KU/l)	1108.6±2979.4	215.2	14.2±10.4	12.4	22.8±57.8	10.5	9.4±6.1	8.4	***, \$\$\$, &&&, %%%
CA72-4 (KU/l)	6.7±14.9	2.1	2.2±2.2	1.4	2.1±2.8	1.3	1.9±1.9	1.3	** , \$\$, &&, %%
CEA (ug/l)	3.3±3.6	2.4	1.7±1.2	1.5	2±1.5	1.7	1±0.6	0.7	***, \$, &&&, %%%
CEACAM (ng/ml)	89.3±95.3	61.1	47.2±48.1	38.8	75.6±75.8	51.4	46.9±11.9	44.6	** , &&, %%
Chol (mmol/l)	4.8±1.1	4.8	4.7±1.1	4.4	4.8±1.2	4.7	5.7±1.1	5.7	***, %%
Cpeptid (nmol/l)	0.8±0.5	0.7	1.1±0.4	1.0	0.7±0.3	0.6	0.8±0.2	0.8	***, &
CRP (mg/ml)	22.2±44.5	5.3	4.3±5.2	2.7	9.4±19.5	1.5	3±4	1.7	***, &&&, %%%
DJ-1 (ng/ml)	52.3±85.1	31.4	18.1±11.1	15.0	38.4±35.6	30.5	38.2±39.9	24.7	** , &&
Ferritin (ug/l)	358.7±371.1	266.7	211.4±229.9	117.6	207.6±197.5	138.0	124.5±119.6	85.6	***, %%%
GGT (ukat/l)	4.4±10.5	1.0	0.7±0.7	0.5	2.6±8.6	0.6	0.5±0.3	0.4	* , &, %
Glyk.HbA1c (mmol/mol)	45.5±11.6	45.0	49.5±29.3	50.0	42.6±12.9	39.5	34.8±5.5	35.0	**
Glyk.prot (umol/l)	247.1±44.6	237.5	261.4±59.2	247.0	245±37.9	238.0	229.8±17	230.0	**
Glykemie (mmol/l)	6.8±2.4	6.3	7.5±2.3	6.8	6.1±2.8	5.0	4.9±0.6	4.9	***, %%%
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.2±0.4	1.3	1.3±0.3	1.2	1.4±0.6	1.3	1.5±0.4	1.6	** , %
HSP27 (pg/ml)	2485.6±1400.4	2106.1	1499.4±834.4	1 280.2	1712.6±634.5	1 687.7	1838.3±1059.5	1 443.2	***, \$\$, &&&, %
HSP60 plasma (mg/ml)	4963.7±1383.1	5017.5	4226.7±1426.6	3 985.5	4639.2±1440.1	4 432.0	5157±1749.1	5 053.0	*
HSP70 (ng/ml)	32.8±33.2	21.9	19.3±30.4	14.6	27.6±25.8	22.8	24.7±26.6	18.6	
IGF-1 (ng/ml)	124.6±51.1	122.5	162.4±56.7	153.1	170.2±82.5	154.8	184.7±46.1	181.5	***, \$\$, &, %%%
IGF-2 (ng/ml)	535.8±183.6	563.0	743.1±236.5	701.3	646.6±200.7	649.2	744.7±127.6	721.2	***, &&&, %%%
IGFBP-1 (ng/ml)	11.8±8.1	8.5	5.5±4.6	4.1	12.9±11.9	10.9	6.7±6.6	4.8	***, &&&, %
IGFBP-2 (ng/ml)	597±295.9	553.0	299.6±198.9	255.7	575.6±272.2	511.4	330.7±143	315.3	***, &&&, %%%
IGFBP-3 (ng/ml)	2427.3±552.8	2370.6	2622±686.3	2 645.3	2483.8±587.5	2 483.4	2695.8±411.3	2 723.3	
INS (U/ml)	9.2±7.5	7.9	14.4±8.5	12.4	8.6±8	6.4	8.7±3.8	7.7	***, &
Leptin (ng/ml)	12.3±11.3	9.6	19.4±14.3	16.2	6.4±8.3	3.7	13.5±12.4	9.4	***
MCP-1 (pg/ml)	897.6±785.2	703.4	690.3±537.7	543.8	786.4±595.1	565.8	812.9±823.4	580.7	
MIC-1 (pg/ml)	3715.9±2336.1	2896.5	3351.8±2022.2	2 646.0	2789±1953.2	2 149.0	1257±733.7	1 099.0	***, %%%
Midkine (ng/ml)	0±0	0.0	0±0.1	0.0	0.4±2.3	0.0	0±0.1	0.0	
MMP-7 (ng/ml)	2.3±1.1	2.0	1.5±0.7	1.4	1.5±1	1.4	0.9±0.5	0.9	***, \$\$\$, &&&, %%%

Table 1. Continued ...

	Pancreatic cancer group		Diabetes Mellitus group		Chronic pancreatitis group		Healthy controls		p-values for ANOVA+Tukey's test
	mean±SD	med	mean±SD	med	mean±SD	med	mean±SD	med	
MMP-9 (ng/ml)	202±179.7	137.6	197±180.5	156.6	197.7±173	158.5	140.7±124.9	110.8	
OPG (pmol/l)	8±3	7.2	6.4±2	6.2	7.2±5	6.2	4.8±1.5	4.5	***, %%%
PANDER (ng/ml)	9.3±20.8	1.5	10.5±22.7	0.4	4.6±15.3	0.1	5.5±15.1	0.1	
PCT (ug/l)	0.2±0.1	0.2	0.2±0.1	0.3	0.2±0.1	0.2	0.2±0.1	0.2	*, &
Prealb (g/l)	0.2±0.1	0.2	0.3±0.1	0.3	0.3±0.1	0.3	0.3±0.1	0.3	***, \$\$\$, &&&, %%
Reg1A (ng/ml)	264.1±203.3	213.1	171.8±107.4	134.1	175.6±116.9	133.8	89.8±42.8	80.3	*** \$\$ &&& %%%
REG3A (U/ml)	685.4±555.8	505.5	315±287.4	221.0	469.9±513.8	299.0	173.9±90.9	147.0	***, &&&, %%%
S100A11 (ng/ml)	7.2±6.1	4.6	5±6.6	3.3	3.7±2.1	3.1	3.6±2.5	3.0	**\$, \$%, %
S100A6 (ng/ml)	99.2±105.9	58.8	46±25.1	40.0	75.7±34.6	68.9	68.9±37.9	60.9	***, &&&
S100P-plasma (ng/ml)	13.6±17.8	4.4	5.5±4.9	3.7	4.3±3.6	2.9	4.5±4	2.9	***, \$\$\$, &&&, %%%
S100P-serum (ng/ml)	17±13.4	14.2	8.9±4.3	8.7	14.2±6.7	13.4	11.9±6.8	10.6	***, &&&, %
SAA (mg/ml)	28.8±58.2	8.2	10.7±26.2	4.9	26.4±62.6	3.8	5.5±3.2	4.6	*
Saturation of transferrin (%)	24±12.3	22.4	26.3±10.7	24.5	32.4±11.7	34.5	26.6±12.1	23.5	
sICAM-1 (ng/ml)	577±209.9	531.3	405.2±104	383.4	510.5±202.7	493.7	377.1±75.9	375.3	***, &&&, %%%
sRAGE (pg/ml)	550.5±213	496.0	530±175.1	517.0	614.8±234.4	589.0	543±221.4	543.0	
TAG (mmol/l)	1.4±0.7	1.3	1.8±1	1.5	1.4±1.1	1.2	1.4±1	1.2	
TFF1 (ng/ml)	3.6±3	2.3	3.5±3.9	2.1	3±3	1.8	1.4±1	1.2	***, %%
TIMP-1 (ng/ml)	655.9±290	529.6	619.1±748.6	478.6	556.7±252.2	546.6	458.1±126.6	417.7	
TP (g/l)	66±7.8	67.7	70.8±5.1	70.5	71.4±6.1	71.3	71.1±4.8	70.6	***, \$\$\$, &&&, %%%
Transferrin (g/l)	2.4±0.4	2.3	2.9±0.6	2.8	2.7±0.5	2.7	2.9±0.5	2.8	***, &&&, %%%
Vitamin B12 (pmol/l)	472.9 ^{±218.2}	422.0	409.4 ^{±161.5}	389.0	456.2 ^{±274.3}	416.0	410.1 ^{±114.1}	393.0	

Notes: *p<0.05 ANOVA; **p<0.01 ANOVA; ***p<0.001 ANOVA; \$p<0.05 PC vs. ChP; \$\$p<0.01 PC vs. ChP; \$\$\$p<0.001 PC vs. ChP &p<0.05 PC vs. DM; &&p<0.01 PC vs. DM; &&&p<0.001 PC vs. DM; %p<0.05 PC vs. healthy controls; %%p<0.01 PC vs. healthy controls; %%%p<0.001 PC vs. healthy controls; Abbreviations: PC-pancreatic cancer; DM-T2 diabetes mellitus; ChP-Chronic pancreatitis; RF-random forest analysis; LR-logistic regression; AAT - alpha-1-antitrypsin; ALCAM-activated leukocyte cell adhesion molecule; ALP-alkaline phosphatase; ALT-alanine aminotransferase; AMS-P-pancreatic amylase; ApoB-apolipoprotein B; AST-aspartate aminotransferase; CA19-9-carbohydrate antigen 19-9; CA72-4-carbohydrate antigen 72-4; TP-total protein; CEA-carcinoembryonic antigen; CEACAM-carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules; CRP-C-reactive protein; DJ-1-(ng/ml) protein deglycase DJ-1; GGT-Gama glutamyl transferase; Glyk.HbA1c-glycated hemoglobin A1c; Glyc.prot.-glycated protein (fructosamine); HDL-cholesterol; high density lipoprotein; HSP-heat shock protein; Chol-cholesterol; IGF-insulin like growth factor; IGF1-IGF1-like growth factor binding protein; INS-insulin; MCP-1-monocyte chemoattractant protein-1; MIC-1-macrophage inhibitory cytokine-1; MMP-matrix metalloproteinase; OPG-osteoprotegerin; PCT-procalcitonin; Prealb-prealbumin; Reg-regenerating protein; SAA-serum amyloid A; sICAM-soluble intercellular adhesion molecule; sRAGE-soluble receptor for advanced glycation end-products; TAG-triacylglycerol; TFF1-trefoil factor 1; TIMP-1-(ng/ml) tissue inhibitor of metalloproteinases 1; PANDER-serum pancreatic derived factor

For deeper analysis statistical method 'random forest' has been used because not all requirements and assumptions have been met in terms of normality, multicollinearity, etc.

Random forest (RF) is an ensemble learning method for classification and regression belonging to supervised machine learning algorithms. RF consists of many individual decision trees that operate as an ensemble. Each individual tree in the RF spits out a class prediction and the class with the most votes (modus) becomes the model's prediction.

The goal of this method is to create a model that predicts the value of a target variable by learning simple decision rules inferred from the data features.

By target variable is meant one of four groups of patients (DM; PC; ChP; Healthy controls) and by features are meant biomarkers present in the dataset.

Decision rules are inferred from the data in the training dataset that is created as a subset from the original dataset. Then, the validity of these rules is tested on a testing dataset, which consists of the remaining data in the original dataset. Technically, in our work, each analyzed group of patients (PC vs. DM; PC vs. ChP; PC vs. Healthy controls; PC vs. DM+ChP+Healthy controls) was divided into two subsets in the ratio 80% : 20%. To minimize the risk of correlation among parameters, which can complicate interpretability of RF results (mainly features importance is biased) – the number of features was reduced by using a dendrogram created by Hierarchical Ward-linkage clustering based on the Spearman correlation. Because of the difference in the number of patients included in each subgroup, and the possibility that the dataset could not be well balanced, we ran RF modeling with the appropriate settings – weights of each class were automatically adjusted to be inversely proportional to the class frequencies in the input data. In the case of LR analysis, we balanced the dataset by using the down-sampling method. This method takes random n -values from a bigger dataset, where n is the size of a smaller dataset.

Models obtained by both LR and RF were based on analysis of a larger subgroup (training dataset).

The precision of the predictions tested on a smaller subset of each group was evaluated by metrics like specificity, sensitivity, recall, accuracy, and AUC. Results obtained by the logistic regression and by random forest were compared and evaluated.

All models and analysis were performed in the Python programming language using Spyder software (licensed under MIT, freeware, <https://www.spyder-ide.org/>).

Results

Results for logistic regression analysis. A panel of markers (prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, Ca72-4) obtained by LR analysis of a group of 70 patients was tested on a set of 18 patients. This panel shows good efficiency in discriminating patients with PC from DM (sensitivity 0.64, specificity 0.81, AUC 0.80) but seems to be less effective

Table 2. Basic characteristics of experimental groups.

	Number of probands	Age mean/SD	BMI mean/SD	Sex M/F
Chronic pancreatitis	47	55/12	23.9/4.22	32/15
Type 2 DM	60	62/8	35.3/30.34	32/28
Healthy controls	51	54/9	25.8/4.28	21/30
Pancreatic cancer group	28	66/6	26.1/3.30	14/14

Abbreviations: DM-diabetes mellitus, SD-standard deviation, BMI-body mass index, M-male, F-female

when compared with random forest model based only on CA19-9 (sensitivity: 0.64 vs. 0.71, specificity: 0.81 vs. 0.93, AUC 0.80 vs. 0.82).

A panel of markers (IGF-1, S100A11, Reg1alfa) obtained by LR analysis of 60 patients was tested on a set of 15 patients to evaluate its effectiveness in discriminating CP from ChP. This panel has a similar AUC (0.76 vs. 0.75), better sensitivity (0.86 vs. 0.57), and worse specificity (0.38 vs. 0.94) when compared with the random forest model based only on CA19-9.

A panel of markers (IGF-2, S100A11, Reg3A) obtained by LR analysis of 63 patients was tested on a set of 16 individuals. This model is more effective than CA19-9-based random forest model – (sensitivity: 0.86 vs. 0.71, specificity: 0.76 vs. 0.84, AUC 0.95 vs. 0.78) in discriminating PC from Healthy controls.

A panel of markers (albumin, AAT, S100P-serum, CRP, CA19-9, TFF1, and MMP-7) used for discriminating PC from other groups (ChP, DM, Healthy controls) was obtained by LR analysis of 148 patients and tested on 38 individuals. The panel has similar sensitivity and specificity, and a better AUC than RF model based only on CA19-9 (sensitivity: 0.71 vs. 0.71; specificity 0.9 vs. 0.89; AUC 0.89 vs. 0.8).

All mentioned logistic regression models and their parameters meet the criteria of $p < 0.05$. Unfortunately, we were not able to build a statistically correct logistic regression model only with CA19-9 and after exclusion of CA19-9 as well, therefore for creating a panel based only on CA19-9 and for creating a comparative panel of biomarkers without CA19-9 only results for RF analysis are presented.

Result for RF analysis. By using RF analysis, sets of markers that outperform solitary CA19-9 in identifying PC among other groups were identified. All panels are sorted according to the importance of used markers.

A panel (CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3A, HSP27) obtained by analysis of 70 patients was tested on a set of 18 individuals and is better in discrimination PC from the DM group than CA19-9 (sensitivity 0.89 vs. 0.71; specificity 0.89 vs. 0.83; AUC 0.92 vs. 0.82). CA19-9 has the highest predictive value.

A panel (S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, CB, MMP-7, S100P-s, Reg3A) obtained by RF analysis of a set of 60 patients, was tested on 15 individuals and is better in discrimination

PC from the ChP group than CA19-9 (sensitivity 0.80 vs. 0.57; specificity 0.70 vs. 0.94; AUC 0.90 vs. 0.75). CA19-9 has the highest predictive role in this panel.

A panel (MMP-7, Reg3A, SICAM1, OPG, TP, ferritin) obtained by analysis of a set consisting of 63 individuals, was tested on 16 patients and is better in discrimination PC from healthy controls than CA19-9 (sensitivity 1.0 vs. 0.71; specificity 0.85 vs. 0.84; AUC 0.89 vs. 0.78). Biomarker MMP-7 was evaluated as the most valuable biomarker for prediction.

A panel (CA19-9, S100P-plasma, AAT, albumin, adiponectin, IGF-1, MMP7, S100A11) obtained by analysis of a set of 148 individuals, was tested on 38 patients and is better in discrimination PC from all the other groups (DM+ChP+Healthy controls) than CA19-9 (sensitivity 0.86 vs. 0.71; specificity 0.87 vs. 0.89; AUC 0.91 vs. 0.80), whereas CA19-9 is the most important predictor.

As CA19-9 is a routinely used marker of PC, separate RF analysis of biomarkers after exclusion of CA19-9 was performed to evaluate the effectiveness of potential biomarkers. By RF analysis multiple panels of biomarkers were defined. For this case, we limited the number of markers used in each panel to 8, in order not to exceed the maximum number of biomarkers selected by RF in the analysis of all markers.

A panel (HSP27, prealbumin, INS, IGF-2, SAA, DJ-1, TP, CEA) does not outperform CA19-9 in detection of PC among DM patients (sensitivity 0.67 vs. 0.71; specificity 0.83 vs. 0.93; AUC 0.75 vs. 0.82).

A panel (SAA, Leptin, TP, prealbumin, HSP60, DJ-1, TAG) performs worse than CA19-9 in identifying patients with PC among patients with ChP (sensitivity 0.50 vs. 0.57; specificity 0.56 vs. 0.94; AUC 0.53 vs. 0.75).

A panel (CEA, Glyk.HbA1c, AST, HDL-cholesterol, prealbumin, SAA, IGF-2, TP) outperforms CA19-9 in identifying patients with PC among healthy individuals (sensitivity 0.83 vs. 0.71; specificity 0.90 vs. 0.84; AUC 0.87 vs. 0.78).

A panel (SAA, prealbumin, HSP27, TP, adiponectin, CEA, IGF-2, AMS-P) has similar effectiveness as CA19-9 in identifying PC among all studied groups (sensitivity 0.67 vs. 0.71; specificity 0.91 vs. 0.89; AUC 0.79 vs. 0.89).

The logistic regression analysis of biomarkers without CA19-9 does not fulfill the criteria for a statistically correct model.

Obtained results are summarized in Table 3. Figure 1 presents ROC curves for all the above-mentioned panels.

Summary of results. The results confirm that CA19-9 has a strong predictive role for the presence of PC but adding other markers to the model improved its efficiency in most

Table 3. Discrimination of pancreatic cancer from other diagnoses using the specific groups of biomarkers.

	AUC				Specificity				Sensitivity			
	RF	LR	CA19-9	RF w/o CA19-9	RF	LR	CA19-9	RF w/o CA19-9	RF	LR	CA19-9	RF w/o CA19-9
PC vs. DM	0.92	0.80	0.82	0.75	0.89	0.81	0.93	0.83	0.89	0.64	0.71	0.67
PC vs. CHP	0.90	0.76	0.75	0.53	0.70	0.38	0.94	0.56	0.80	0.86	0.57	0.50
PC vs. Healthy controls	0.89	0.95	0.78	0.87	0.85	0.76	0.84	0.90	1.00	0.86	0.71	0.83
PC vs. DM, CHP, Healthy controls	0.91	0.89	0.80	0.79	0.87	0.90	0.89	0.91	0.86	0.71	0.71	0.67

Compared models:

RF - random forest method:

PC vs. DM: CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3A, HSP27

PC vs. CHP: S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, TP, MMP-7, S100P-s, Reg3Aa

PC vs. Healthy controls: MMP-7, Reg3A, sICAM1, OPG, TP, ferritin

PC vs. DM, CHP, healthy controls: CA19-9, S100P-plasma, AAT, albumin, adiponectin, IGF-1, MMP7, S100A11

LR - logistic regression method:

PC vs. DM: prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, CA72-4

PC vs. CHP: IGF-1, S100A11, Reg1alfa

PC vs. healthy controls: IGF-2, S100A11, Reg3A

PC vs. DM, CHP, healthy controls: albumin, AAT, S100P, CRP, CA19-9, TFF1 a MMP-7

RF without CA19-9 - random forest method after exclusion of CA19-9

PC vs. DM: HSP27, prealbumin, INS, IGF-2, SAA, DJ-1, TP, CEA

PC vs. CHP: SAA, Leptin, TP, Prealbumin, HSP60, DJ-1, TAG

PC vs. healthy controls: CEA, Glyk.HbA1c, AST, HDL-cholesterol, Prealb, SAA, IGF-2, TP

PC vs. DM, CHP, healthy controls: SAA, prealbumin, HSP27, TP, Adiponectin, CEA, IGF-2, AMS-P

Abbreviations: RF-random forest; LR-logistic regression analysis; PC-pancreatic cancer group; DM-Type 2 diabetes mellitus group; ChP-chronic pancreatitis group; AUC-area under the curve; AAT-alpha-1-antitrypsin; ALP-alkaline phosphatase; AMS-P-pancreatic amylase; AST-aspartate transaminase; CA19-9-carbohydrate antigen 19-9; CA72-4-carbohydrate antigen 72-4; CEA-carcinoembryonic antigen; HDL-cholesterol-high density lipoprotein; DJ-1-protein deglycase DJ-1; Glyk.HbA1c-glycated hemoglobin; HSP-heat shock protein, IGF-insulin like growth factor; IGFBP-insulin like growth factor binding protein; INS-insulin; MIC-1-macrophage inhibitory cytokine -4; MMP-matrix metalloproteinase; OPG-osteoprotegerin; Reg- regenerating protein; SAA-serum amyloid A; sICAM-soluble Intercellular Adhesion Molecule; TAG-triacetyl glycerol; TFF1-trefoil factor 1; TIMP-tissue inhibitor of metalloproteinases; TP-total protein

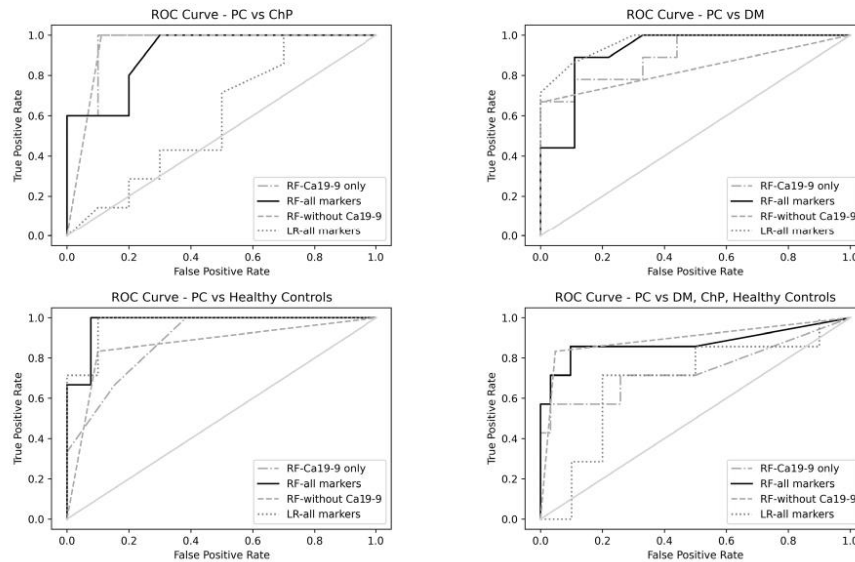


Figure 1. ROC curves for discrimination of pancreatic cancer from other diagnoses using the specific groups of biomarkers. Notes: **PC vs. ChP:** RF: *S100A11, CA72-4, AAT, CA19-9, TP, MMP-7, S100P-s, Reg3A*; LR: *IGF-1, S100A11, Reg1alpha*, RF without CA19-9: *SAA, Leptin, TP, Prealbumin, HSP60, DJ-1, TAG*; **PC vs. DM:** RF: *CA19-9, AAT, IGFBP2, albumin, ALP, Reg3A, HSP27*; LR: *prealbumin, IGFBP-2, DJ-1, MIC-1, CA72-4*; RF without CA19-9: *HSP27, prealbumin, INS, IGF-2, SAA, DJ-1, TP, CEA*; **PC vs. Healthy controls:** RF: *MMP-7, Reg3A, sICAM1, OPG, TP, ferritin*; LR: *IGF-2, S100A11, Reg3A*; RF without CA19-9: *CEA, Glyk.HbA1c, AST, HDL-cholesterol, Prealb, SAA, IGF-2, TP*; **PC vs. DM, ChP, Healthy controls:** RF: *CA19-9, S100P-plasma, AAT, albumin, adiponectin, IGF-1, MMP7, S100A11*; LR: *albumin, AAT, S100P, CRP, CA19-9, TFF1, MMP-7*; RF without CA19-9: *SAA, prealbumin, HSP27, TP, adiponectin, CEA, IGF-2, AMS-P*; Abbreviations: RF-random forest; LR-logistic regression analysis; PC-pancreatic cancer group; DM-Type 2 diabetes mellitus group; ChP-chronic pancreatitis group; AUC-area under the curve; AAT-alpha-1-antitrypsin; ALP-alkaline phosphatase; AMS-P-pancreatic amylase; AST-aspartate transaminase; CA19-9-carbohydrate antigen 19-9; CA72-4-carbohydrate antigen 72-4; CEA-carcinoembryonic antigen; Glyk.HbA1c-glycated hemoglobin A1c; HDL-cholesterol-high density lipoprotein; TP-total protein; DJ-1 (ng/ml)-protein deglycase DJ-1; HSP-heat shock protein; IGF-insulin like growth factor; IGFBP-insulin like growth factor binding protein; INS-insulin; MIC-1-macrophage inhibitory cytokine-4; MMP-matrix metalloproteinase; OPG-osteoprotegerin; Reg-regenerating protein; SAA-serum amyloid A; sICAM-soluble InterCellular Adhesion Molecule; TAG-triacylglycerol; TFF1-trefoil factor 1; TIMP-tissue inhibitor of metalloproteinases

cases, especially in detecting patients with PC among the healthy population. On the contrary, after the exclusion of CA19-9 from the analyzed biomarkers, it was in some cases necessary to increase the number of biomarkers used in the panels to maintain sufficient effectiveness. Logistic regression analysis seems to have worse outcomes than random forest analysis. The results obtained by logistic regression could be improved by extension of the set of probands, while logistic regression usually performs better under this condition.

Discussion

Pancreatic cancer is a disease with an extremely poor prognosis especially when diagnosed in the advanced stages. The period of progression from the early to the advanced stage seems to be rapid [5]. Patients after appropriate surgical therapy in the early stage of the disease have better outcomes. A reliable non-invasive biomarker that can be used for

identifying early pancreatic cancer in common and/or risk populations still does not exist.

The purpose of this study was to identify biomarkers that could improve the detection of early pancreatic cancer. In the current study, we measured levels of 58 biomarkers in healthy individuals and patients with PC, DM2, and ChP. Besides a standard statistical method, machine learning analysis was used to identify possible markers of early PC. To increase the performance of selected biomarkers, several panels were defined. Their effectiveness was compared to CA19-9.

Our results show that it is advantageous to use different panels of biomarkers for each risk group (e.g., DM, ChP). This suggests that processes leading to PC development can presumably differ among different patient groups. In ChP it is supposed that inflammatory response to various extrinsic or intrinsic factors leads to an excessive and prolonged exposition of pancreatic tissue to chemokines and cytokines. This results in pancreatic cells destruction, proliferation,

and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [6]. In DM2, insulin resistance, increased production of growth factors, mild chronic systemic inflammation, and prolonged hyperglycemia contribute to developing PC [7, 8]. These differences in tumor development and differences in patient's phenotypes (represented by e.g., significantly higher BMI in DM vs. ChP probands in this study as depicted in Table 2) are presumably reflected in different panels of suitable biomarkers identified in this work. Whether the identified biomarkers directly reflect different pathways of tumorigenesis in each group or not is to be elucidated.

A broad spectrum of measured biomarkers can be divided into several groups: biomarkers that directly contribute to carcinogenesis (DJ-1, HSP27, IGF 1-2, IGFBP, MIC1, MMP7, Reg3A, S100A11, S100P, sICAM1, TFF1), biomarkers which correspond mainly with nutritional status of the individual (e.g., ferritin, albumin, prealbumin, TP), or reflect the presence of systemic inflammation (e.g., CRP, adiponectin, AAT, OPG, SAA).

Interestingly, some routinely measured parameters increased the effectiveness of PC diagnosing (TP, albumin, prealbumin, HDL, AST, ALT, TAG). Differences in nutritional parameters (albumin, prealbumin) presumably correspond with impaired nutritional status and systemic inflammatory changes in PC patients. Similar findings were presented by Ferri et al. [9]. Albumin and ferritin were identified as markers of worse prognosis in PC [10].

In recent years many studies proved a key role of pancreatic stellate cells (PSCs) in PC. Disruption of MMPs and TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) homeostasis due to PSCs activation is a key factor of excessive extracellular matrix production in PC tissue. In this work, we have confirmed that MMP-7, a member of the matrix metalloproteinase family, can improve diagnostic accuracy in discriminating PC from healthy controls or ChP. Several studies examined MMP-7 as a potential diagnostic or prognostic marker of PC [11]. We did not confirm that levels of TIMP play a role in the identification of PC.

Growth and proliferation of PSCs are stimulated besides other molecules by TTF1 (Trefol factor 1). Expression of TTF1 was observed in most PC cell lines and its role in the development of ChP was well described [12]. As a candidate biomarker of PC, TTF1 was assessed in several studies [13, 14]. In our work, it was confirmed as a potential biomarker of PC.

ICAM-1, also produced by activated PSCs and pancreatic acinar cells expressing KRAS mutation, serves as an important signaling molecule for TAM (tumor-associated macrophage) [15, 16]. ICAM-1 has been assessed as a potential marker in several studies, but its ability to detect the early PC has not been proven yet [17]. In our work sICAM helped to distinguish between PC and healthy controls.

PSCs are also involved in the regulation of the IGF/IGF-binding proteins (IGFBP) ratio. The increase of IGF or decrease of IGFBP leads to higher levels of free IGF. IGF

stimulates the growth and invasion of PC cells. IGFBP I-VI, which have a strong affinity to IGF, are highly expressed in the PC cell membrane and contribute to the regulation of angiogenesis, growth, and invasion of tumor cells. A higher level of IGFBP-2 was confirmed in serum of patients with both PC and ChP [18, 19] as well as in its precursor lesions (Pan-IN) [20]. IGF/IGFBP-2 axis plays a role in PSCs proliferation and migration [21]. In our work IGFBP-2, IGF-1, and 2 were identified as potential markers of early PC.

Osteoprotegerin (OPG) is a receptor of TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand). Inhibition of TRAIL by binding to OPG leads to resistance of tumor cells to apoptotic signals [22]. OPG is also synthesized by activated PSCs [23]. Our study proved the ability of OPG (as well as Brand et al. [24]) to contribute to the discrimination of PC from healthy controls.

Intracellular S100 proteins take part in the regulation of transcription, protein phosphorylation, proliferation, and differentiation of cells. The relationship between the group of S100 proteins and pancreatic cancer was recently reviewed by Wu et al. [25].

Some of S100 proteins are ligands for RAGE (receptor for advanced glycation products). Activation of RAGE, which is highly expressed in PC tissue, induces chronic inflammation, activates KRAS, and increases tumor progression. This is similar to the situation of chronic hyperglycemia in DM2, where concentrations of advanced glycation products (AGEs), other ligands of RAGE, are increased [26].

In our work, we show that S100P, a ligand of RAGE, has a role as a potential circulating biomarker of the early PC. S100A11 produced by PC cells stimulates through RAGE the growth of stromal fibroblasts. Higher levels of S100A11 seem to be associated with increased mobility of PC cells [27]. In our study, S100A11 helps to discriminate PC from healthy controls and ChP significantly better than solitary CA19-9.

Higher levels of regenerating islet-derived protein 3A (Reg3A) were reported in PC and Pan-IN [28]. In our study, the panels of biomarkers containing Reg3A have shown to be more effective in distinguishing PC among other groups (ChP, DM, healthy controls) than solitary CA19-9. It is to our best knowledge for the first time, when the effectivity of plasmatic levels of Reg3A as a biomarker of non-metastatic PC was evaluated.

Midkine (neurite promoting growth factor 2) belongs to growth factors taking part in angiogenesis, fibrogenesis, cell migration, and proliferation in the PC environment [29, 30]. Grupp et al. did not prove that midkine levels have a relationship either to metastasizing or prognosis of PC [17]. In our work, which is to our best knowledge the first one to assess midkine as a possible diagnostic biomarker of PC, we confirmed the above-mentioned observation.

In conclusion, our finding supports existing evidence of the crucial role of PSCs/PC crosstalk in PC development and progression while some of the identified biomarkers are directly linked to PSCs activity.

Signaling pathways involved in PC development and progression are an interesting therapeutic target. Thus, it is crucial to describe key signaling cascades in PC. Biomarkers identified in this study are involved in several signaling cascades. DJ-1, S100A11, HSP-27, IGFBP-2, and MIC-1 are involved in the PI3K/AKT cascade [31–35]. IGFBP 2, IGF1, and IGF-2 are involved in the IGF-related pathways. OPG plays a role in the TRAIL/TRAIL-receptor cascade [36]. These findings suggest an important role of these pathways in the early stages of PC.

This work confirmed CA19-9 as the most reliable marker in the detection of PC with known limitations (low sensitivity and specificity – 0.71 and 0.89 in our work). None of the analyzed markers outperformed CA19-9 in diagnostic performance and excluding CA19-9 from analysis led to a significant decrease in the effectiveness of diagnostic panels in most cases. On the other hand, combinations of the markers improved the effectiveness of CA19-9 and in some cases, panels without CA19-9 were even more effective than CA19-9 alone or in combination. The significant decrease of effectivity of panels of biomarkers after exclusion of CA19-9 confirms the rationale of using CA19-9 as a routine marker of PC.

The main advantage of our study is a broad panel of assessed biomarkers. Midkine was to our knowledge, assessed for the first time as a possible biomarker but we did not prove its ability to detect the early PC. Reg3A and DJ-1 were to our knowledge identified for the first time, as potential blood biomarkers of the early PC. Another advantage is the use of machine learning methods for analysis. Results of our study should be confirmed on larger and more precisely defined patient cohorts.

Acknowledgments: The authors are thankful to nurses from clinical departments, to laboratory staff for technical assistance, and to data scientist Jan Hrabák for the statistical analysis. This study was supported by the project TIP ČR FR-TI3/666 given to First Faculty of Medicine, Charles University, and the company Biovendor, and by research projects Progres Q25, DRO VFN64165, SVV 260524-2021, and BBMRI-CZ LM2018125.

Conflict of interest disclosure: All above-mentioned authors declare no financial/personal conflict of interest. The company Biovendor, manufacturer of some ELISA tests, participated in the project TIP ČR FR-TI3/666 including some laboratory analyses of coded samples but had no influence on the evaluation and interpretation of the data in a relationship with clinical characteristics of the patients and writing of the manuscript.

References

- [1] FITZMAURICE C, AKINYEMIJU TF, ALLAMI FH, ALAM T, ALIZADEH-NAVAEI R et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 2018; 4: 1553–1568. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>
- [2] ZHANG X, SHI S, ZHANG B, NI Q, YU X et al. Circulating biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: facts and hopes. *Am J Cancer Res* 2018; 8: 332–353.
- [3] SCARÀ S, BOTTONI P, SCATENA RCA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. In: Scatena R. (eds) *Advances in Cancer Biomarkers. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Dordrecht 2015, p. 247–260. ISBN: 978-94-024-0420-3 https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_15
- [4] SCHNEIDER A, LÖHR JM, SINGER MV. The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 101–119. <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1945-4>
- [5] YU J, BLACKFORD AL, DAL MOLIN M, WOLFGANG CL, GOGGINS M. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. *Gut* 2015; 64: 1783–1789. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308653>
- [6] KANDIKATTU HK, VENKATESHAIAH SU, MISHRA A. Chronic Pancreatitis and the Development of Pancreatic Cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020; 20: 1182–1210. <https://doi.org/10.2174/187153032066200423095700>
- [7] RAHNS S, ZIMMERMANN V, VIOLF, KNAACK H, STEMMER K et al. Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett* 2018; 415: 129–150. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.004>
- [8] SALVATORE T, MARFELLA R, RIZZO MR, SASSO FC. Pancreatic cancer and diabetes: A two-way relationship in the perspective of diabetologist. *Int J Surg* 2015; 21: S72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2015.06.063>
- [9] FERRI MJ, SAEZ M, FIGUERAS J, FORT E, SABAT M et al. Improved Pancreatic Adenocarcinoma Diagnosis in Jaundiced and Non-Jaundiced Pancreatic Adenocarcinoma Patients through the Combination of Routine Clinical Markers Associated to Pancreatic Adenocarcinoma Pathophysiology. *PLoS One* 2016; 11: e0147214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147214>
- [10] KALOUSOVÁ M, KRECHLER T, JÁCHYMOVÁ M, KUBĚNA AA, ŽÁK A et al. Ferritin as an independent mortality predictor in patients with pancreas cancer. Results of a pilot study. *Tumour Biol* 2012; 33: 1695–1700. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0426-z>
- [11] KUHLMANN KF, VAN TILL JW, BOERMEESTER MA, DE REUVER PR, TZVETANOVA ID et al. Evaluation of matrix metalloproteinase 7 in plasma and pancreatic juice as a biomarker for pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 886–891. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0779>
- [12] EBERT MP, HOFFMANN J, HAECKEL C, RUTKOWSKI K, SCHMID RM et al. Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 1999; 45: 105–111. <https://doi.org/10.1136/gut.45.1.105>
- [13] JAHAN R, GANGULY K, SMITH LM, ATRI P, CARMICHEAL J et al. Trefoil factor(s) and CA19.9: A promising panel for early detection of pancreatic cancer. *EBioMedicine* 2019; 42: 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.056>

- [14] RADON TP, MASSAT NJ, JONES R, ALRAWASHDEH W, DUMARTIN L et al. Identification of a Three-Biomarker Panel in Urine for Early Detection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 3512–3521. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2467>
- [15] MASAMUNE A, SAKAI Y, KIKUTA K, SATOH M, SATOH A et al. Activated rat pancreatic stellate cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Pancreas* 2002; 25: 78–85. <https://doi.org/10.1097/00006676-200207000-00018>
- [16] Liou GY, Döppler H, Necela B, Edenfield B, Zhang L et al. Mutant KRAS-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions. *Cancer Discov* 2015; 5: 52–63. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0474>
- [17] Grupp K, Melling N, Bogoevska V, Reeh M, Uzunoglu FG, et al. Expression of ICAM-1, E-cadherin, periostin and midkine in metastases of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Exp Mol Pathol* 2018; 104: 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.01.005>
- [18] WŁODARCZYK B, BORKOWSKA A, WŁODARCZYK P, MAŁECKA-PANAS E, GAŚTOROWSKA A. Insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein 2 serum levels as potential biomarkers in differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma in reference to pancreatic diabetes. *Prz Gastroenterol* 2021; 16: 36–42. <https://doi.org/10.5114/pg.2020.95091>
- [19] KENDRICK ZW, FIRPO MA, REPKO RC, SCAIFE CL, ADLER DG et al. Serum IGFBP2 and MSLN as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic cancer. *HPB (Oxford)* 2014; 16: 670–676. <https://doi.org/10.1111/hpb.12199>
- [20] DAHLEM C, BARGHASH A, PUCHAS P, HAYBAECK J, KESSLER SM. The Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein IMP2/IGF2BP2 is Overexpressed and Correlates with Poor Survival in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3204. <https://doi.org/10.3390/ijms20133204>
- [21] ROSENDAHL AH, GUNDEWAR C, SAID HILMERS-SON K, NI L, SALEEM MA et al. Conditionally immortalized human pancreatic stellate cell lines demonstrate enhanced proliferation and migration in response to IGF-I. *Exp Cell Res* 2015; 330: 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.033>
- [22] EMERY JG, MCDONNELL P, BURKE MB, DEEN KC, LYN S et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273: 14363–14367. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14363>
- [23] WEN Z, LIU Q, WU J, XU B, WANG J et al. Fibroblast activation protein α -positive pancreatic stellate cells promote the migration and invasion of pancreatic cancer by CXCL1-mediated Akt phosphorylation. *Ann Transl Med* 2019; 7: 532. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.164>
- [24] BRAND RE, NOLEN BM, ZEH HJ, ALLEN PJ, ELOUBEIDI MA et al. Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 805–816. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0248>
- [25] Wu Y, Zhou Q, Guo F, Chen M, Tao X, et al. S100 Proteins in Pancreatic Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Oncol* 2021; 11: 711180. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.711180>
- [26] ABBRUZZESE JL, ANDERSEN DK, BORREBAECK CAK, CHARI ST, COSTELLO E et al. The Interface of Pancreatic Cancer with Diabetes, Obesity, and Inflammation: Research Gaps and Opportunities: Summary of a National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Workshop. *Pancreas* 2018; 47: 516–525. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001037>
- [27] MITSUI Y, TOMONOBUN, WATANABE M, KINOSHITA R, SUMARDIKA IW et al. Upregulation of Mobility in Pancreatic Cancer Cells by Secreted S100A11 Through Activation of Surrounding Fibroblasts. *Oncol Res* 2019; 27: 945–956. <https://doi.org/10.3727/096504019X15555408784978>
- [28] LI Q, WANG H, ZOGOPOULOS G, SHAO Q, DONG K et al. Reg proteins promote acinar-to-ductal metaplasia and act as novel diagnostic and prognostic markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7: 77838–77853. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12834>
- [29] FILIPPOU PS, KARAGIANNIS GS, CONSTANTINIDOU A. Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target. *Oncogene* 2020; 39: 2040–2054. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1124-8>
- [30] OHHASHI S, OHUCHIDA K, MIZUMOTO K, EGAMI T, YU J et al. Midkine mRNA is overexpressed in pancreatic cancer. *Digestive Diseases and Sciences* 2009; 54: 811–815. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0434-4>
- [31] XIAO M, LI T, JI Y, JIANG F, NI W et al. S100A11 promotes human pancreatic cancer PANC-1 cell proliferation and is involved in the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett* 2018; 15: 175–182. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7295>
- [32] KALLI M, MINIA A, PLIACA V, FOTIS C, ALEXOPOULOS LG et al. Solid stress-induced migration is mediated by GDF15 through Akt pathway activation in pancreatic cancer cells. *Sci Rep* 2019; 9: 978. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37425-6>
- [33] OH SE, MOURADIAN MM. Regulation of Signal Transduction by DJ-1. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1037: 97–131. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_8
- [34] Deng W, Zhang Y, Gu L, Cui J, Duan B et al. Heat shock protein 27 downstream of P38-PI3K/Akt signaling antagonizes melatonin-induced apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells. *Cancer Cell Int* 2016; 16: 5. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0283-8>
- [35] MEHRAN-SHAI R, CHEN CD, SHI T, HORVATH S, NELSON SF et al. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5563–5568. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609139104>
- [36] KRETZ AL, VON KARSTEDT S, HILLENBRAND A, HENNE-BRUNS D, KNIPPSCHILD U et al. Should We Keep Walking along the Trail for Pancreatic Cancer Treatment? Revisiting TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand for Anticancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2018; 10: 77. <https://doi.org/10.3390/cancers10030077>

Levels of retinol and retinoic acid in pancreatic cancer, type-2 diabetes and chronic pancreatitis

Pavel Hrabak¹, Miroslava Zelenkova², Tomas Krechler¹, Jan Soupal³, Michal Vocka⁴, Tomas Hanus⁵, Lubos Petruzelka⁴,
Stepan Svacina³, Ales Zak¹, Tomas Zima², Marta Kalousova²

Aims. Retinoids participate in multiple key processes in the human body e.g., vision, cell differentiation and embryonic development. There is growing evidence of the relationship between retinol, its active metabolite - all-trans retinoic acid (ATRA) – and several pancreatic disorders. Although low levels of ATRA in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissue have been reported, data on serum levels of ATRA in PDAC is still limited.

The aim of our work was to determine serum concentrations of retinol and ATRA in patients with PDAC, type-2 diabetes mellitus (T2DM), chronic pancreatitis (CHP) and healthy controls.

Methods. High performance liquid chromatography with UV detection (HPLC) was used to measure serum levels of retinol and ATRA in 246 patients with different stages of PDAC, T2DM, CHP and healthy controls.

Results. We found a significant decrease in the retinol concentration in PDAC ($0.44^{+/-0.18}$ mg/L) compared to T2DM ($0.65^{+/-0.19}$ mg/L, $P<0.001$), CHP ($0.60^{+/-0.18}$ mg/L, $P<0.001$) and healthy controls ($0.61^{+/-0.15}$ mg/L, $P<0.001$), significant decrease of ATRA levels in PDAC ($1.14^{+/-0.49}$ ug/L) compared to T2DM ($1.37^{+/-0.56}$ ug/L, $P<0.001$) and healthy controls ($1.43^{+/-0.55}$ ug/L, $P<0.001$). Differences between early stages (I+II) of PDAC and non-carcinoma groups were not significant. We describe correlations between retinol, prealbumin and transferrin, and correlation of ATRA and IGFBP-2.

Conclusion. Significant decrease in retinol and ATRA levels in PDAC compared to T2DM, healthy individuals and/or CHP supports existing evidence of the role of retinoids in PDAC. However, neither ATRA nor retinol are suitable for detection of early PDAC. Correlation of ATRA levels and IGFBP-2 provides new information about a possible IGF and retinol relationship.

Key words: all-trans-retinoic-acid, chronic pancreatitis, pancreatic ductal adenocarcinoma, type-2 diabetes mellitus, vitamin A

Received: October 3, 2023; Revised: November 17, 2023; Accepted: November 23, 2023; Available online: December 6, 2023

<https://doi.org/10.5507/bp.2023.049>

© 2024 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

¹Fourth Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

²Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic

³3rd Department of Medicine — Department of Endocrinology and Metabolism, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁴Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁵Department of Urology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Corresponding author: Marta Kalousova, e-mail: marta.kalousova@lf1.cuni.cz

INTRODUCTION

Retinol and its derivatives (also known as retinoids) are obtained from the diet directly or as provitamin - carotenoids. Carotenoids form micelles with other hydrophobic molecules (e.g., bile salts, cholesterol...) and after absorption in the small intestine they are converted to retinol. Most of the retinol is transported by chylomicrons after esterification with long chain fatty acids. A minor percentage of unesterified retinol is transported directly to the liver in the blood. Up to 80% of whole-body retinol is stored in the form of retinyl-esters in hepatic stellate cells.

Retinol is a fat-soluble vitamin; thus, it can only be transported via the bloodstream in lipid droplets or bound to specific transporting proteins (e.g., retinol binding protein 4 (RBP4) in complex with prealbumin). Absorbed

and internalized retinol may be either stored as retinyl esters in e.g., HSCs or PSCs or further metabolized by specific aldehyde dehydrogenase to all trans retinoic acid (ATRA) (ref.^{1,2}).

Retinol has several important roles in the human organism. Well-known is its importance in vision, cell differentiation, cell proliferation and in the regulation of transcription. The last is involved primarily through its active metabolite ATRA via interaction with specific retinoic acid receptors³.

Through the interaction with its receptors (retinoic acid receptors - RAR, retinoic X receptors - RXR) ATRA has impact on the expression of various (up to 500) genes involved in tissue differentiation, cell maturation, apoptosis and/or cell proliferation.

There is growing evidence for a relationship between

retinol, ATRA and certain pancreas-related pathologies. Published data suggest the importance of retinoids for beta-islet maintenance and function⁴. Retinol contributes to the embryonic development of pancreatic tissue and to pancreatic cell differentiation. Some authors have described the relationship of retinol and its derivatives to pancreatic cancerogenesis and reduced blood levels of retinol in PDAC or lower levels of ATRA and/or its receptors in PDAC tissue have been reported^{5,6}. It also appears that ATRA as a ligand of the peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR) gamma, plays a role in regulating energy balance and increases insulin sensitivity⁷. ATRA signalling appears to be essential for maintaining beta-islet cell homeostasis^{8,9}. Several studies have described the relationship between retinol and the insulin-like growth factor/IGF-binding protein (IGF/IGFBP) axis as a possible link to the relationship between retinol and cancerogenesis¹⁰.

Another important link to pancreatic pathologies is the relationship between retinol, ATRA and pancreatic stellate cells (PSCs). PSCs are the only retinol storing cells in the pancreas. Retinol storing ability and typical fluorescence at 325 nm due to retinol containing droplets are the "signature" feature of these cells, which are thought to be key players in certain pancreatic pathologies e.g., PDAC, CHP and DM2).

These facts make retinol and its main metabolite ATRA (together with their signalling and metabolic pathways) promising diagnostic and therapeutic targets. The goal of this study was to measure serum concentrations of retinol and ATRA in patients with T2DM, CHP, distinct stages of PDAC, compared to healthy controls.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

220 patients (M/F-124/96) in total were included in the study. Of these there were 59 patients with T2DM, 46 with CHP fulfilling the M-ANNHEIM criteria¹¹ 64 with PDAC (5 were stage I, 8 in stage II, 14 stage III, 37 stage IV according to AJCC (ref.¹²)) and 51 matched healthy controls. Blood samples obtained from patients enrolled to our previous study¹³ were analysed. Patients with stage IV PDAC were added to the set of probands. All were diagnosed at the General University Hospital in Prague. The

DM2 patients were diagnosed more than 3 years prior to entering the study. None of the participants had taken retinol or beta-carotene supplementation.

Basic characteristics of the groups are summarised in Table 1. Laboratory data are presented in Table 2. The study was approved by the local Institutional Ethics Committee (1814/15 S-IV, 24.9.2015) and was conducted in accordance with the latest Declaration of Helsinki. All subjects had given informed consent to participation in the study.

Laboratory analysis

Blood samples were collected at the General University Hospital in Prague. All samples were obtained through puncture of the cubital vein into anticoagulant-agent-free tubes (for obtaining serum). They were then centrifuged for 10 min at 1450 x g and serum aliquots were stored at -80°C until analysis was performed.

The laboratory analysis of retinol and ATRA in serum was performed by high performance liquid chromatography with UV detection (HP 1100 Series HPLC system, Agilent, Waldbronn, Germany) and acitretin as an internal standard. For obtaining the results, the samples were deproteinated with acetonitrile and extracted by ethyl acetate/hexane mixture. After evaporation and dissolution in methanol, ATRA was detected together with retinol after separation on a C18 column. For ATRA, the lower limit of quantification was 0.7 µg/L, for retinol 0.06 mg/L. A description of the method was published in detail in Zelenková et al.¹⁴.

Measurement of CA19-9, nutritional and inflammatory parameters characterizing the studied groups and used for correlations with ATRA and retinol was described previously¹³.

Statistical analysis

The Kruskal Wallis and Mann-Whitney tests were used to test the differences in ATRA/retinol concentrations in the groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Because of the small number of probands in early stages of PDAC, we combined PDAC stages I and II into one group as they share similar characteristics, mainly resectability (i.e., no distant metastases or involvement of the superior mesenteric artery and coeliac axis). We used Spearman's rank correlation (r_s) to evaluate the re-

Table 1. Basic characteristic of the studied groups.

	n	Age (mean [±] SD)	BMI (kg/m ² , mean [±] SD)	Sex M/F
PDAC all	64	63 [±] 8.86	25 [±] 6.41	54/23
PDAC st I+II	13	66 [±] 7.7	27 [±] 2.8	6/7
PDAC st III	14	66 [±] 4.5	26 [±] 4	11/3
PDAC st IV	37	61 [±] 10	25 [±] 7.6	30/7
DM2	59	63 [±] 8.23	31 [±] 5.82	31/28
ChP	46	55 [±] 12.28	24 [±] 4.27	31/15
Healthy controls	51	54 [±] 8.68	26 [±] 6.2	21/30

BMI, body mass index; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; DM2, type 2 diabetes mellitus; ChP, chronic pancreatitis; SD standard deviation.

relationship between ATRA, retinol and other variables. To estimate the left-censored (below quantification limit) values of ATRA and retinol, we used the method “Robust regression on order statistics” (ROS) (ref.¹⁵).

ROS is semi-parametric method based on a simple linear regression model using ordered detected values and distributional quantiles to estimate the concentration of the censored values. ROS is a regression procedure that uses the estimate parameters of a linear regression model of uncensored observed values vs their log normal quantile to impute the censored data.

ATRA and retinol levels were correlated with serum levels of CA19-9 and basic nutritional and inflammatory parameters. Statistical analysis was performed in the Python programming language using Spyder software (licensed under MIT, freeware, <https://www.spyder-ide.org/>) and Jupyter notebook (Jupyter Notebook: License. Open-source tool, version 5.1. Copyright (c) 2017).

RESULTS

The detected concentration levels of retinol and ATRA are presented in Fig. 1. Levels of retinol ranged between 0.11-1.16 mg/L. Levels of ATRA ranged between 0.37-3.15 ug/L. The concentrations of retinol and ATRA were significantly different among the groups ($P<0.001$ and $P<0.01$ respectively for Kruskal Wallis test).

Retinol concentration was significantly lower (mean +/- standard deviation) in PDAC (0.44^{+/-0.18} mg/L) compared to T2DM (0.65^{+/-0.19} mg/L, $P<0.001$), CHP (0.60^{+/-0.18} mg/L, $P<0.001$) and healthy controls (0.61^{+/-0.15} mg/L, $P<0.001$). The levels of retinol decreased stepwise with the highest levels observed in healthy controls and lowest in the PDAC group. (Healthy controls → DM2 → CHP → PDAC). However, differences between individual “non-PDAC” groups were not statistically significant.

Concentrations of ATRA were significantly lower in PDAC (1.14^{+/-0.49} ug/L) compared to T2DM (1.37^{+/-0.56} ug/L, $P<0.001$) and healthy controls (1.43^{+/-0.55} ug/L, $P<0.001$). Interestingly, differences between ATRA levels in PDAC and CHP were not significant. After splitting the PDAC group to subgroups according to staging it was clear that both ATRA and retinol levels were significantly lower in stage III (ATRA: 1.08^{+/-0.47}, retinol: 0.42^{+/-0.19}) and IV (ATRA: 1.07^{+/-0.45}, retinol: 0.40^{+/-0.15}) of PDAC compared to healthy controls (ATRA: 1.43^{+/-0.55}, retinol: 0.61^{+/-0.15}) and DM2 (ATRA: 1.37^{+/-0.56}, retinol: 0.65^{+/-0.19}). There was no significant difference between the stage I+II subgroup and non-PDAC groups.

In each group, retinol and prealbumin levels correlated (PDAC r_s : 0.75, $P<0.001$; CHP: 0.69, $P<0.001$; T2DM: 0.60, $P<0.001$ and healthy controls r_s :0.83, $P<0.001$). In T2DM, ATRA levels negatively correlated to IGFBP-2 (r_s :-0.63, $P<0.001$). In CHP, retinol levels positively correlated with transferrin (r_s :0.60, $P<0.01$). We found no significant correlations between CRP, CA 19-9, serum lipids, total protein or albumin and retinol and/or ATRA. For significant correlations see Table 2.

The results show a significant decrease of retinol and

Table 2. Laboratory characteristics of the studied groups.

	PDAC		T2DM ^a		CHP GROUP ^b		Healthy controls ^c		KW	Signif. correlation (rs)
	mean ^{+/-SD}	med	mean ^{+/-SD}	med	mean ^{+/-SD}	med	mean ^{+/-SD}	med		
CA19-9 (kU/L)	2470.8 ^{+/-3497}	307	14.2 ^{+/-0.4}	12.4	22.8 ^{+/-27.8}	10.5	9.4 ^{+/-6.1}	8.4	***	ATRA
ALBUMIN (g/L)	40.2 ^{+/-4.6}	41.1	45.1 ^{+/-6.7}	45.3	45.1 ^{+/-4.6}	45.7	45 ^{+/-2.2}	45.4	***	
PREALB (g/L)	0.178 ^{+/-0.1}	0.175	0.3 ^{+/-0.1}	0.3	0.3 ^{+/-0.1}	0.3	0.3 ^{+/-0.1}	0.3	***	
TP (g/L)	67 ^{+/-6.9}	67.2	70.8 ^{+/-5.1}	70.5	71.4 ^{+/-6.1}	71.3	71.1 ^{+/-4.8}	70.6	**	retinol
TRANSF. (g/L)	2.36 ^{+/-0.46}	2.3	2.9 ^{+/-0.6}	2.8	2.7 ^{+/-0.5}	2.7	2.9 ^{+/-0.5}	2.8	***	
CHOL (mmol/L)	5.04 ^{+/-2.09}	4.65	4.7 ^{+/-1.1}	4.4	4.8 ^{+/-1.2}	4.7	5.7 ^{+/-1.1}	5.7	***	
TAG (mmol/L)	1.46 ^{+/-0.84}	1.25	1.8 ^{+/-1}	1.5	1.4 ^{+/-1.1}	1.2	1.4 ^{+/-1}	1.2	NS	
HDL-CHOL (mmol/L)	1.22 ^{+/-0.49}	1.22	1.3 ^{+/-0.3}	1.2	1.4 ^{+/-0.6}	1.3	1.5 ^{+/-0.4}	1.6	***	
CRP (mg/mL)	30.22 ^{+/-4.34}	12.15	4.3 ^{+/-5.2}	2.7	9.4 ^{+/-9.5}	1.5	3 ^{+/-4}	1.7	***	
IGFBP-2 (ng/mL)	756.75 ^{+/-345}	722.60	299.6 ^{+/-188.9}	255.7	575.6 ^{+/-272.2}	511.4	330.7 ^{+/-143}	315.3	***	T2DM (rs: -0.63, $P<0.001$)

Significant correlations of analytes with ATRA and retinol are included. PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; ATRA, all-trans retinoic acid; T2DM, type 2 diabetes mellitus; CHP, chronic pancreatitis; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; KW, Kruskal Wallis, NS, non-significant; Chol, cholesterol; Prealb., prealbumin; TAG, triacylglycerol; TP, total protein; Transf., transferrin. *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ for Kruskal-Wallis test. ^athese groups are the same as in (13).

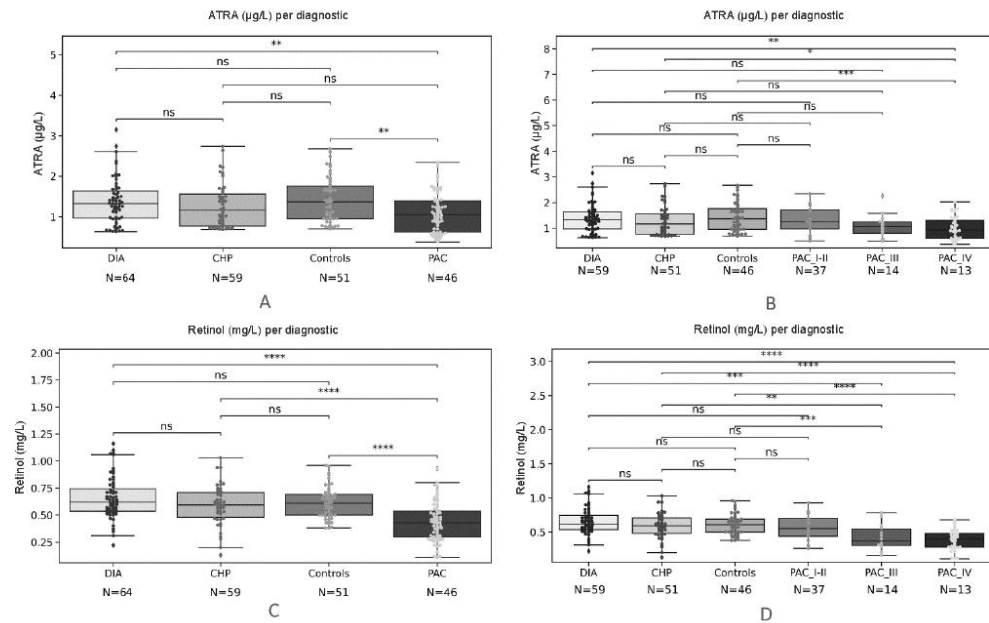


Fig. 1.A-D. Comparison of mean ATRA and retinol concentrations in studied groups. A. ATRA levels in studied groups. B. ATRA levels in studied groups and PAC according to stages. C. retinol levels in studied groups. D. retinol levels in studied groups and PAC according to stages.

Results for Mann-Whitney test. Level of significance marked with asterisk: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns: non-significant.

ATRA (ug/L) mean \pm SD/median: PDAC: 1.14 \pm 0.49/ 1.05 (PDAC I+II: 1.33 \pm 0.56 / 1.25; PDAC III: 1.08 \pm 0.47 / 1.06; PDAC IV: 1.07 \pm 0.45 / 0.93); DIA 1.37 \pm 0.56 / 1.37; ChP 1.28 \pm 0.55 / 1.28; Controls: 1.43 \pm 0.55 / 1.43.

Retinol (mg/L) mean \pm SD/median: PDAC: 0.44 \pm 0.18 / 1.05 (PDAC I+II: 0.57 \pm 0.2 / 0.55; PDAC III: 0.42 \pm 0.19 / 0.37, PDAC IV: 0.40 \pm 0.15 / 0.40); DIA: 0.65 \pm 0.19 / 0.65; ChP: 0.60 \pm 0.18 / 0.59; Controls: 0.61 \pm 0.15 / 0.61.

PAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; ATRA, all-trans retinoic acid; DIA, type 2 diabetes mellitus; ChP, chronic pancreatitis; CON, healthy controls.

ATRA levels in PDAC compared to T2DM, healthy individuals and/or CHP as well as correlation of retinol with prealbumin and transferrin and a correlation of ATRA and IGFBP-2.

DISCUSSION

Retinol and ATRA in PDAC

The levels of retinol and ATRA (except for ATRA in PDAC vs CHP) in PDAC were significantly lower compared to other groups. Although the interpretation of retinol and ATRA levels in early stages of PDAC is difficult due to the small sample number, it is clear that PDAC is characterised by lower levels of retinol and ATRA. Lower levels of retinol (but not ATRA) are present even in non-metastatic stages of PDAC, which are often asymptomatic or present with mild symptoms. The low concentrations of retinol and ATRA in PDAC are even more evident in stage IV of the disease. Patients in stage I and II have

comparable retinol levels to the rest of the probands. This suggests that ATRA and retinol are related to advanced PDAC or disease progression but fail to be useful markers of early (stage I+II) PDAC.

The question remains whether the low levels of retinol and ATRA in advanced stages of PDAC just reflect the overall poor nutritional status of these patients and metabolic changes driven by malignancy or whether they contribute to development and progression of the disease. The last point is discussed in some publications and possible mechanisms of retinoid influence on the development and progression of PDAC can be proposed:

a) One of the key points in PDAC development is acinar-to-ductal metaplasia (ADM). This is the process where acinar cells after injury (caused e.g., by an acute pancreatitis event) dedifferentiate to progenitor cells with expression of ductal markers¹⁶. This process is tightly connected to activation of *K-RAS* oncogene and inflammatory signalling. ATRA is a known actor in differentiating pancreatic acinar and ductal cells and ATRA signalling is

activated during pancreatic injury. This suggests a possible important role of ATRA in ADM (ref.^{17,19}).

b) Pancreatic stellate cells (PSCs) – the retinol storing mesenchymal-like cells – have been described as an important part of the PDAC stroma interplay. During activation, PSCs release retinol and their phenotype rapidly changes from a quiescent to a myofibroblast-like form. While activated, PSCs produce excessive amounts of extracellular matrix, which is an important compound of PDAC stroma. This process of transition can be reversed by ATRA (ref.^{6,20}). Stability and quiescence of PSCs are key factors for maintaining the homeostasis of pancreatic tissue. Damage to ATRA signalling leads to impairment of the organisation of pancreatic acinar architecture²¹. PDAC-stroma interplay is essential for the migration of malignant cells. This could be indirectly hindered by ATRA via IL-6 downregulation of cancer-associated fibroblasts (CAF) (ref.²²).

c) regulating certain signalling pathways. In our study we found inverse correlation between ATRA and IGFBP-2 in T2DM patients. This relationship confirms the fact, that IGF/IGFBP axis could be influenced by ATRA (ref.^{23,25}). The relationship between *K-RAS* mutation, IGF mediated growth and ATRA is a possible factor influencing PDAC development.

Changes in concentration of retinol – an important micronutrient could be expected in malnourished patients with severe malignancy. Additionally, strong correlation between retinol and prealbumin concentrations suggests the impact of nutritional status on retinol levels. In the case of PDAC, retinol and prealbumin levels seem to reflect the stage of the disease. The simple mechanistic explanation for the decrease in retinol and its correlation with prealbumin levels is that prealbumin, also known as transthyretin, binds retinol in complex with retinol binding protein (RBP) and lower levels of prealbumin in PDAC necessarily lead to reduced levels of serum retinol. Surprisingly, other strong markers of nutritional status such as BMI, albumin or total protein did not correlate with retinol/ATRA levels. It is also known, that only about 33% of blood retinol levels are dependent on actual intake of retinol precursors. In healthy individuals, sufficient levels of retinol and its metabolites are regulated by release of retinol from the main storage organ – the liver²⁶. This aside, metaanalysis of eighteen studies failed to find any correlation between retinol intake and PDAC risk²⁷.

These facts show that other factors other than malnutrition possibly contribute to decrease of retinol in PDAC and make retinol and ATRA potential sensitive biomarkers of advanced PDAC.

Further research should be focused on the relationship between serum retinoid levels and prognosis of patients with PDAC as it has been reported that reduced levels of retinoids in PDAC tissue are associated with poor prognosis⁵ and increased pancreatic cancer risk^{9,28}. In contrast, upregulation of RAR receptors leads to a reduction in malignant phenotype of PDAC cells²⁷.

These facts and the reported influence of ATRA – the active metabolite of retinol on several malignancies (e.g.,

acute promyelocytic leukaemia) make ATRA, a promising therapeutic modality in PDAC (ref.²⁹). Although the use of ATRA is limited by its hydrophobicity and instability, studies conducted with ATRA in nanoparticles show promising results in *in-vitro* studies^{30,31}.

Results from phase IIb of a clinical trial with ATRA in PDAC show that the decrease in plasma retinol levels during the treatment with ATRA + gemcitabine-nab-paclitaxel is associated with a poor CA19-9 response to the treatment³².

Retinol and ATRA in CHP

The influence of ATRA on the pathogenesis of CHP has been reported³³. Nevertheless, published studies on retinoid levels in CHP offer contradictory findings of retinol levels in CHP. Duggan et al. (2014) described a higher prevalence of retinol deficiency in CHP than in matched controls, but interestingly there were more CHP patients with excess of retinol than deficiency (19.4% vs 14.5%) and this result, according to the authors, could not be explained by excessive supplementation³⁴. The authors further describe a relationship between BMI and retinol levels, but this observation was not confirmed in our study.

Sikkens et al. (2014) reported just 3% prevalence of retinol deficiency in CHP (ref.³⁵). Finally, a metaanalysis of Martinez-Moneo (2016) reports 15.9% prevalence of retinol deficiency in CHP (ref.³⁶). In our work, the prevalence of retinol deficiency (levels below 0.15 mg/L) was 2.08%. Retinol also exhibits an anti-inflammatory effect in pharmacologically induced acute pancreatitis³⁷.

Lower levels of retinol in CHP may be due to several mechanisms. The most common aetiology of CHP is excessive use of alcohol which is associated with impaired intake of nutrients including retinol or carotenoids. In chronic pancreatitis, the exocrine portion of the gland is damaged, and this leads to decreased secretion of enzymes important for fat and fat-soluble vitamins (A, D, E, K) absorption. Besides that, chronic pain associated with food intake in CHP can lead to reduced food intake and malnutrition. Despite these facts, we found no significant reduction of serum retinol or ATRA in CHP compared to T2DM or controls. Thus, lower retinol levels in CHP could be one of the possible 'red flags' leading to more detailed examination to exclude PDAC in such patients.

Retinol and ATRA in T2DM

In T2DM, the results of published studies are controversial, with both increased and decreased levels of retinol reported^{38,39}. In a study on Korean population, the levels of retinoic acid and retinol appear to be a valid marker of T2DM development in patients with impaired fasting glucose and the fact, that sufficient levels of retinol and ATRA are likely essential for maintaining glucose homeostasis mainly by involving the insulin secretion and beta cell maintenance, we found no significant difference between retinol and ATRA levels in T2DM group compared to healthy controls or CHP (ref.^{4,40}).

CONCLUSION

Our knowledge of the storage and release of retinol via PSCs as well as its role in certain pancreatic pathologies, is still limited. Thus, our data provide fresh insight into retinoids in PDAC, T2DM and CHP. Whether the low levels of ATRA and retinol in PDAC and CHP patients reflect increased activity of PSCs, as both PDAC and CHP are characterised by excessive production of ECM by these cells, needs to be proven by further research. In this study we demonstrate that advanced, but not early, stages of PDAC are accompanied by significant decrease in retinol and ATRA levels compared to other non-carcinoma groups. Thus, serum ATRA and retinol unfortunately do not seem to be useful for detection of early PDAC either in normal populations or in patients with increased risk of PDAC development. The correlation between retinol and prealbumin levels with no significant correlation to total protein, BMI or albumin suggests that retinol levels reflect more the metabolic than nutritional status of the patient. A question worthy of further research is whether the lower plasma levels of retinol and ATRA are results of PDAC or an independent risk factor.

ABBREVIATIONS

ADM, acinar-to-ductal metaplasia; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ATRA, all-trans retinoic acid; BMI, body mass index; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; CHP, chronic pancreatitis; HPLC, high performance liquid chromatography; HSC, hepatic stellate cell; IGF, insulin like growth factor; IGFBP, insulin like growth factor binding protein; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PSC, pancreatic stellate cell; RAR, retinoic acid receptor; RBP4, retinol binding protein 4; RXR, retinoic X receptor, T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Acknowledgements: The study was supported by research projects: Cooperatio DIAG, Cooperatio INDI, BMMRI.cz LM2023033, MH CZ-DRO-VFN64165 and SVV260630. The authors are thankful to nurses from clinical departments, laboratory staff for technical assistance, Nina Pichová for language correction and to data scientist Jan Hrabák for the statistical analysis.

Author contributions: PH: participated in study design, co-analysed the data, was involved in data interpretation and wrote the manuscript; MZ: performed laboratory analyses, contributed to manuscript writing; MK: designed the study, was involved in laboratory analyses, contributed to interpretation of the results and manuscript writing; JS, MV: were involved in the clinical part of the study, collected samples and data; TK: contributed to the study design, collected samples and data, contributed to the interpretation of the results; TH: supervised the clinical part of the study; LP, SS, AZ: were involved in the clinical part of the study, supervised samples' and data collection; TZ: supervised laboratory analyses, and interpretation of the results. All authors discussed the results, contributed

to the manuscript and read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest statement: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Ethic approval and consent to participate: This study was performed in adherence to the principles of the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee of The General University Hospital in Prague. All subjects gave their informed consent with participation in the study.

REFERENCES

- Blaner WS. Vitamin A signalling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol Ther* 2019;197:153-78. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.01.006
- von Lintig J, Moon J, Lee J, Ramkumar S. Carotenoid metabolism at the intestinal barrier. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2020;1865(11):158580. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.158580
- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002;43(11):1773-808. doi: 10.1194/jlr.r100015-jlr200
- Brun PJ, Wongsiriroj N, Blaner WS. Retinoids in the pancreas. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2016;5(1):1-14. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2015.09.03
- Bleul T, Rühl R, Bulashevskaya S, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival. *Mol Carcinog* 2015;54(9):870-9. doi: 10.1002/mc.22158
- Chronopoulos A, Robinson B, Sarper M, Cortes E, Auernheimer V, Lachowski D, Attwood S, García R, Ghassemi S, Fabry B, Del Río Hernández A. ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion. *Nat Commun* 2016;7:12630. doi: 10.1038/ncomms12630
- Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(9):3444-9. doi: 10.1073/pnas.0511253103
- Brun PJ, Grijalva A, Rausch R, Watson E, Yuen JJ, Das BC, Shudo K, Kagechika H, Leibel RL, Blaner WS. Retinoic acid receptor signaling is required to maintain glucose-stimulated insulin secretion and β -cell mass. *FASEB J* 2015;29(2):671-83. doi: 10.1096/fj.14-256743
- Davis-Yadley AH, Malafa MP. Vitamins in pancreatic cancer: a review of underlying mechanisms and future applications. *Adv Nutr* 2015;6(6):774-802. doi: 10.3945/an.115.009456
- Suzuki K, Ito Y, Hashimoto S, Kawado M, Inoue T, Ando M, Watanabe Y, Inaba Y, Tajima K, Nakachi K, Tamakoshi A. Association of serum retinol and carotenoids with insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding protein-3 among control subjects of a nested case-control study in the Japan Collaborative Cohort Study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009;10 Suppl:29-35.
- Schneider A, Löhner JM, Singer MV. The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol* 2007;42(2):101-19. doi: 10.1007/s00535-006-1945-4
- Nagaraja TS, Wang H. Modification of the 8th AJCC staging system of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2020;9(1):95-7. doi: 10.21037/hbsn.2019.08.01
- Hrabák P, Šoupal J, Kalousová M, Krechler T, Vočka M, Hanuš T, Petruželka L, Svačina S, Žák A, Zima T. Novel biochemical markers for non-invasive detection of pancreatic cancer. *Neoplasma* 2022;69(2):474-83. doi: 10.4149/neo_2022_210730N1075
- Zelenková M, Zima T, Kalousová M. Determination of retinoic acid in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography. *Monatshfte fuer Chemie* 2019;150(10):1731-5. doi: 10.1007/s00706-019-02489-1
- Helsel, DR *Nondetects and Data Analysis: Statistics for censored environmental data*. John Wiley and Sons. 2005; SA, NJ. ISBN 0-471-67173-8

16. Storz P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14(5):296-304. doi: 10.1038/nrgastro.2017.12
17. Mere Del Aguila E, Tang XH, Gudas LJ. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: New Insights into the Actions of Vitamin A. *Oncol Res Treat* 2022;45(5):291-8. doi: 10.1159/000522425
18. Shi G, DiRenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF. Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* 2013;32(15):1950-8. doi: 10.1038/onc.2012.210
19. Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Kami K, Fujimoto K, Imamura M. All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 2003;52(1):76-84. doi: 10.2337/diabetes.52.1.76
20. Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR, Kocher HM. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 2011;141(4):1486-97. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.047
21. Carmona R, Barrena S, Muñoz-Chápuli R. Retinoids in Stellate Cells: Development, Repair, and Regeneration. *J Dev Biol* 2019;7(2):10. doi: 10.3390/jdb7020010
22. Guan J, Zhang H, Wen Z, Gu Y, Cheng Y, Sun Y, Zhang T, Jia C, Lu Z, Chen J. Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Lett* 2014;345(1):132-9. doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.006
23. Fu Z, Noguchi T, Kato H. Differential regulation of IGFBP-2 and IGFBP-5 gene expression by vitamin A status in Japanese quail. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281(1):E138-E146. doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.1.E138
24. Ferraz IS, Vieira DMC, Ciampo LAD Jr, Ued FDV, Almeida ACF, Jordão AA Jr, Aragon DC, Martinez EZ, Martinelli CE Jr, Nogueira-de-Almeida CA. Vitamin A deficiency and association between serum retinol and IGF-1 concentrations in Brazilian children with Down syndrome. *J Pediatr (Rio J)* 2022;98(1):76-83. doi: 10.1016/j.jpeds.2021.04.003
25. Mutgan AC, Besikioglu HE, Wang S, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE. Insulin/IGF-driven cancer cell-stroma crosstalk as a novel therapeutic target in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2018;17(1):66. doi: 10.1186/s12943-018-0806-0
26. Li Y, Wongsiriroj N, Blaner WS. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3(3):126-39. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04
27. Huang X, Gao Y, Zhi X, Ta N, Jiang H, Zheng J. Association between vitamin A, retinol and carotenoid intake and pancreatic cancer risk: Evidence from epidemiologic studies. *Sci Rep* 2016;6:38936. doi: 10.1038/srep38936
28. Jeurnink SM, Ros MM, Leenders M, van Duijnhoven FJ, Siersema PD, Jansen EH, van Gils CH, Bakker MF, Overvad K, Roswall N, Tjønneland A, Boutron-Ruault MC, Racine A, Cadeau C, Grote V, Kaaks R, Aleksandrova K, Boeing H, Trichopoulos A, Benetou V, Valanou E, Palli D, Krogh V, Vineis P, Tumino R, Mattiello A, Weiderpass E, Skeie G, Castaño JM, Duell EJ, Barricarte A, Molina-Montes E, Argüelles M, Dorronsoro M, Johansen D, Lindkvist B, Sund M, Crowe FL, Khaw KT, Jenab M, Fedirko V, Riboli E, Bueno-de-Mesquita HB. Plasma carotenoids, vitamin C, retinol and tocopherols levels and pancreatic cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: a nested case-control study: plasma micronutrients and pancreatic cancer risk. *Int J Cancer* 2015;136(6):E665-E676. doi: 10.1002/ijc.29175
29. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, Ferrara F, Fazi P, Cicconi L, Di Bona E, Specchia G, Sica S, Divona M, Levis A, Fiedler W, Cerqui E, Breccia M, Fioritoni G, Salih HR, Cazzola M, Melillo L, Carella AM, Brandts CH, Morra E, von Lilienfeld-Toal M, Hertenstein B, Wattad M, Lübbert M, Hänel M, Schmitz N, Link H, Kropp MG, Rambaldi A, La Nasa G, Luppi M, Ciceri F, Finizio O, Venditti A, Fabbiano F, Döhner K, Sauer M, Ganser A, Amadori S, Mandelli F, Döhner H, Ehninger G, Schlenk RF, Platzbecker U; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group; Study Alliance Leukemia. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013;369(2):111-21. doi: 10.1056/NEJMoa1300874
30. Wang K, Baldwin GS, Nikfarjam M, He H. Antitumor effects of all-trans retinoic acid and its synergism with gemcitabine are associated with downregulation of p21-activated kinases in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019;316(5):G632-G640. doi: 10.1152/ajpgi.00344.2018
31. Kakwere H, Ingham ES, Tumbale SK, Ferrara KW. Gemcitabine-retinoid prodrug loaded nanoparticles display in vitro antitumor efficacy towards drug-resistant human PANC-1 pancreatic cancer cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020;117:111251. doi: 10.1016/j.msec.2020.111251
32. Kocher HM, Basu B, Froeling FEM, Sarker D, Slater S, Carlin D, deSouza NM, De Paepe KN, Goulart MR, Hughes C, Imrali A, Roberts R, Pawula M, Houghton R, Lawrence C, Yogeswaran Y, Mousa K, Coetzee C, Sasieni P, Prendergast A, Propper DJ. Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun* 2020;11(1):4841. doi: 10.1038/s41467-020-18636-w
33. Xiao W, Jiang W, Shen J, Yin G, Fan Y, Wu D, Qiu L, Yu G, Xing M, Hu G, Wang X, Wan R. Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis via Suppressing the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *PLoS One* 2015;10(11):e0141462. doi: 10.1371/journal.pone.0141462
34. Duggan SN, Smyth ND, O'Sullivan M, Feehan S, Ridgway PF, Conlon KC. The prevalence of malnutrition and fat-soluble vitamin deficiencies in chronic pancreatitis. *Nutr Clin Pract* 2014;29(3):348-54. doi: 10.1177/0884533614528361
35. Sikkens EC, Cahen DL, Koch AD, Braat H, Poley JW, Kuipers EJ, Bruno MJ. The prevalence of fat-soluble vitamin deficiencies and a decreased bone mass in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2013;13(3):238-42. doi: 10.1016/j.pan.2013.02.008
36. Martínez-Moneo E, Stigliano S, Hedström A, Kaczka A, Malvik M, Waldthaler A, Maisonneuve P, Simon P, Capurso G. Deficiency of fat-soluble vitamins in chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Pancreatology* 2016;16(6):988-94. doi: 10.1016/j.pan.2016.09.008
37. Tsai CY, Saito T, Sarangdhar M, Abu-El-Hajja M, Wen L, Lee B, Yu M, Lipata DA, Manohar M, Barakat MT, Contrepois K, Tran TH, Theoret Y, Bo N, Ding Y, Stevenson K, Ladas EJ, Silverman LB, Quadro L, Anthony TG, Jegga AG, Husain SZ. A systems approach points to a therapeutic role for retinoids in asparaginase-associated pancreatitis. *Sci Transl Med* 2023;15(687):eabn2110. doi: 10.1126/scitranslmed.abn2110
38. Krempf M, Ranganathan S, Ritz P, Morin M, Charbonnel B. Plasma vitamin A and E in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) adult diabetic patients. *Int J Vitam Nutr Res* 1991;61(1):38-42.
39. Taneera J, Awadallah S, Khader Mohammed A, Unnikannan H, Sulaiman N. Vitamin A levels are decreased but not influenced by glucose- or lipid-lowering medications in subjects with type 2 diabetes. *Saudi J Biol Sci* 2021;28(1):572-77. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.044
40. Han Y, Yang Y, Kim M, Jee SH, Yoo HJ, Lee JH. Serum Retinal and Retinoic Acid Predict the Development of Type 2 Diabetes Mellitus in Korean Subjects with Impaired Fasting Glucose from the KCPS-II Cohort. *Metabolites* 2021;11(8):510. doi: 10.3390/metabo11080510

REVIEW

This paper is dedicated to the 70th anniversary of the founding of Physiologia Bohemoslovaca (currently Physiological Research)

Pancreatic Stellate Cells – Rising Stars in Pancreatic Pathologies

Pavel HRABÁK¹, Marta KALOUSOVÁ², Tomáš KRECHLER¹, Tomáš ZIMA²

¹4th Department of Medicine – Department of Gastroenterology and Hepatology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic, ²Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic

Received September 29, 2021

Accepted November 2, 2021

Summary

Pluripotent pancreatic stellate cells (PSCs) receive growing interest in past decades. Two types of PSCs are recognized – vitamin A accumulating quiescent PSCs and activated PSCs – the main producers of extracellular matrix in pancreatic tissue. PSCs plays important role in pathogenesis of pancreatic fibrosis in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. PSCs are intensively studied as potential therapeutical target because of their important role in developing desmoplastic stroma in pancreatic cancer. There also exists evidence that PSC are involved in other pathologies like type-2 diabetes mellitus. This article brings brief characteristics of PSCs and recent advances in research of these cells.

Key words

Pancreatic stellate cells • Pancreatic cancer • Diabetes mellitus • Chronic pancreatitis • Tumor microenvironment

Corresponding author

Marta Kalousová, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Kateřinská 32, 121 08 Prague 2, Czech Republic. E-mail: marta.kalousova@lf1.cuni.cz

Introduction

Stellate cells in humans were for the first time described by the great German pathologist von Kupffer in 1876. Kupffer described black stained “Sternzellen” in his letter to a famous German anatomist Wilhelm

Waldeyer as the star-shaped cells localized in perisinusoidal spaces in the liver tissue revealed by gold chloride method. At that time, von Kupffer (1876) (who formerly described resident macrophages in liver (recently known as Kupffer cells) was uncertain about the role of hepatic stellate cells and considered them to be liver macrophages. After several decades Ito *et al.* (1952) proved vitamin A storing ability of these perisinusoidally localised cells and later Wake *et al.* (1999) described differences between Ito’s stellate cells and Kupffer cells in the liver. These findings were followed by increased interest in hepatic stellate cell’s (HSC’s) functions and further characterisation of these cells. Nowadays it is clarified that HSC have a crucial role e.g., in liver regeneration, tissue repair, production of extracellular matrix and immunomodulation.

Surprisingly, not the same attention was aimed at pancreatic stellate cells (PSCs). Unlike other pancreatic cells e.g. pancreatic islet cells, acinar or ductal cells, existence of PSCs was unrecognized until 1982 (106 years after Kupffer’s discovery of HSC), when Watari *et al.* (1982) found vitamin A accumulating cells in pancreatic tissue. In 1998 PSCs were successfully isolated from rat and human pancreas, which enabled further research of PSCs physiology in vitro. Apte *et al.* (1998) developed a technique for isolation of PSC based on lower density of PSCs caused by high amount of lipid vacuoles. It is supposed that it is possible to use density gradient based centrifugation of pancreatic cells suspension to isolate PSC. Since that time PSC received growing interest of researchers focused on pancreas and

their research enabled deeper insight into PSCs role in pancreatic (patho)physiology. In this brief review, we would like to introduce recent knowledge about the relationship between PSCs and distinct pancreatic pathologies.

Biology of PSC

Origin of PSCs

Pancreatic stellate cells comprise about 7 % of pancreatic cells and are found both in exocrine and exocrine parts of the pancreatic tissue. The origin of PSCs remains unclear. Despite the expression of neuroendocrine tissue specific markers, PSCs are supposed to be of mesenchymal origin as demonstrated by Asahina *et al.* (2009).

Existing evidence suggests that PSCs originate from mesenchymal cells, bone marrow cells (Sparmann *et al.* 2010) and certain type (CCR2⁺) of monocytes (Ino *et al.* 2014).

Characteristics of PSCs

PSCs surround small pancreatic ducts and blood vessels and are mostly present in the basolateral part of pancreatic acinar cells. They can be identified by using immunohistochemical analysis because PSCs present some specific markers such as vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), neural growth factor (NGF), neural cell adhesion molecule (NCAM), synemin and nestin (Apte *et al.* 1998).

Presence of various intracellular filaments shows a broad spectrum of possible functions of PSCs (Uyama *et al.* 2006, Omary *et al.* 2004).

PSCs typically exhibit blue-green fluorescence based on vitamin-A accumulation in intracellular lipid vacuoles when exposed to 328nm UV light (Watari *et al.* 1999).

Features of PSC varies depending on their location and state. Recent systematic work of Zha *et al.* (2014) revealed that PSC are present in pancreatic islets as well. These cells are characterized by lower concentration of vit. A containing droplets and are rapidly activated in comparison to parenchymal PSC. After activation, islet-localized- PSCs produce lower amount of activation specific protein SMA-alfa compared to PSC in pancreatic parenchyma. After activation, islet PSCs exhibit lower proliferative and migrative potential. Recently, several works were published, where the authors propose islet PSCs as possible stem cells of beta

cells of Langerhans's islets (Zhou *et al.* 2019, Zha *et al.* 2014).

PSCs and vitamin A

The ability of PSCs to store retinoids seems to be important for pancreatic tissue homeostasis as retinoids are vital for differentiation of pancreatic duct cells and regulating cells death in pancreatic tissue. (Tulachan *et al.* 2003)

The presence of vitamin A molecules – retinoids containing lipid droplets seems to be the main characteristic of quiescent PSC. The PSCs are the only vitamin-A storing cells in pancreatic tissue, but play just a minor role in retinoid storing system of the human organism, as quiescent hepatic stellate cells contain 50-80 % of total body vitamin A. (Blaner *et al.* 2009) Retinoids, especially ATRA (all-trans-retinoic acid) are involved in regulation of gene transcription, where ATRA controls expression of hundreds of genes (Balmer *et al.* 2002). Mechanism of their accumulation in quiescent phase and loss during activation of PSCs remains unclear, but it seems that retinoids stored in lipid rich droplets are important for maintaining quiescent phase of PSCs e.g. by their possible interaction with peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) (Berry *et al.* 2009).

Bleul *et al.* reported markedly reduced levels of all-trans-retinoic acid and all-trans-retinol in PDAC tissue obtained from human and mouse pancreata. This suggests, together with work of Colvin, the importance of retinoid signalling in PDAC pathophysiology (Bleul *et al.* 2015, Colvin *et al.* 2011).

The relationship of vitamin A and pancreas was recently reviewed in detail by Zhou *et al.* (2021).

Phenotypes of PSCs: Activated vs. quiescent PSCs

Quiescent PSCs

There exist basically two phenotypes of PSC based on the presence of various features (Table 1). Relatively little is known about quiescent PSCs (qPSCs). In healthy pancreas, qPSCs contain abundant vitamin A containing lipid droplets, characteristically express desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) - which is specific for pancreatic stellate cells (Ding *et al.* 2008), nestin and vimentin. These quiescent PSC are "resting" cells. Their ability to proliferate, migrate or produce

Table 1. Main differences between quiescent and activated PSCs

Quiescent PSCs	Activated PSCs
Rich in vitamin A droplets	Loss of vitamin A containing droplets
Alpha SMA negativity	Alpha SMA positivity
Low ability to proliferate and migrate	High migration and proliferation activity
Balanced ECM turnover (low MMP, higher TIMPs)	High ECM production (high MMP, low TIMPs)

Abbreviations: PSCs – pancreatic stellate cells; SMA – smooth muscle actin; ECM – extracellular matrix; MMP – matrix metalloproteinases, TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases. Modified from: Wu Y *et al.* (2021) and Jin G *et al.* (2020).

extracellular matrix is rather limited compared to activated PSC.

qPSCs create a network adjacent to capillary and ductal structures of pancreas, but are present in pancreatic islets as well (Zha *et al.* 2014). In quiescent state PSCs produce limited amount of MMP and TIMPs to maintain homeostasis of the extracellular matrix (Phillips *et al.* 2003).

Activated PSCs

After activation the appearance of PSCs changes dramatically into myofibroblast like phenotype. Activated PSCs express various proteins such desmin and α -SMA (which differentiates them from fibroblasts), collagen I and III, various metalloproteinases and their inhibitors, fibronectin, ICAM – 1 (Masamune *et al.* 2002), cadherin 11 (Row *et al.* 2016) and lose vitamin A containing lipid droplets.

Activated spindle-shaped PSCs exhibit several functions which are involved in pancreatic tissue repair. This is done mainly by production of ECM, which replaces destroyed parenchymal cells. This process is under normal circumstances limited to damaged area. Under pathological circumstances e.g. chronic pancreatitis or pancreatic cancer this process continues and results in pancreatic fibrosis with loss of endocrine and exocrine pancreatic function. Activated PSCs also produce a variety of cytokines, which further serve as an auto-activators of PSC.

There exists evidence of the role of activated PSCs in phagocytosis in inflamed areas of pancreas (Shimizu *et al.* 2005).

Molecular mechanism of PSCs activation

Activation of PSCs seems to be one of the key points of generating pathological microenvironment leading to progression of such deteriorating conditions as

chronic pancreatitis and pancreatic cancer. This microenvironment, characterized by excessive production of fibrous extracellular matrix, is responsible for chemoresistance of PDAC, promotes tumor growth and metastasing. The activation can be provided by both autocrine and paracrine mechanisms. There exist several mechanisms of extracellular signalling involved in activation of PSCs, such as cytokines, non-coding RNAs, oxidative stress, hyperglycemia and ion channels signalling (Jin *et al.* 2020).

PSCs activation and cytokines

Most of the cytokines are produced by activated PSCs as well, which fact emphasises the crucial role of vicious circle of PSCs autoactivation while once stimulated. This process is a possible mechanism of fibrogenesis in certain pancreatic pathologies – mainly chronic pancreatitis.

Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is a strong fibrosis inducing agent in pancreatic tissue. It activates MAPK pathway (Xu *et al.* 2018), which leads to change of PSCs phenotype by increased mRNA expression of extracellular signal-regulated kinases (ERK) and C-Jun amino terminal kinase (JNK) (Fitzner *et al.* 2004). It has been proved that PSCs produce TGF- β 1, which suggests, that this “auto-activation” by TGF- β 1 followed by increased production of ECM by PSCs is one of the possible mechanisms of excessive fibrosis in chronic pancreatitis. This production of TGF- β 1 by PSC can be hampered by ATRA. ATRA prevent PSCs to mechanically release TGF- β 1 via downregulation of organizing of inactive complex with latent TGF- β binding protein and thus liberating TGF- β 1. (Sarper *et al.* 2016). TGF- β 1 induced hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) deficiency inhibits activation of PSCs in CP model as well as iSMAD interferes with TGF- β signalling pathway, which emphasises the role of TGF- β /SMAD pathway in PSCs activation

(Lin *et al.* 2021).

Recent findings emphasise the role of interplay between various cytokines – mainly PDGF, TGF- β 1 and Yes-associated protein 1 (YAP). YAP modulates cell proliferation and development as well as apoptosis in various tissues. YAP is also involved in cancer cell growth. Besides other pathways, YAP interacts with SMAD pathway, and plays a role in sustaining of activated state of PSCs, partially by interacting with PDGF. (Hu *et al.* 2019)

The main source of PDGF in pancreatic tissue are macrophages and cancer cells. While activated, PCSs are another important source of PDGF. PDGF was shown to be a potent mitogen and co-cultivation of PSC and PDGF led to increased production of ECM by those cells. (Luttenberger *et al.* 2000) PDGF is also overexpressed in chronic pancreatitis (Ebert *et al.* 1998).

Another source of PDGF and TGF- β 1 in pancreas could be platelets. In pancreatitis event, as demonstrated by Gress *et al.* (1994), platelets accumulating in inflamed areas of pancreatic tissue are source of PDGF, which further stimulates fibrogenesis by activating PSC (Luttenberger *et al.* 2000).

PSCs activation and hypoxia

Hypoxia is another factor leading to PSCs activation (Estarras *et al.* 2020). Increased fibrogenesis by PSCs is often accompanied by hypoxemic environment, which results in increased proliferation of PSC. Hypoxia-inducible factor-1 (which level rises in hypoxic condition e.g. in cancer stroma) influences the fibrogenesis by PSCs via upregulating hepatoma-derived growth factor (HDGF) (Ide *et al.* 2006).

Besides impairment of pancreatic exocrine function, hypoxia mediated activation of PCSs leads to death of beta cells of pancreatic islets (Kim *et al.* 2020).

Inflammation of pancreatic tissue accompanied by oedema of adjacent structures as well as obstruction of pancreatic duct are conditions which increase pressure in pancreatic parenchyma. A study of Asaumi *et al.* (2007) showed that externally applied pressure increase reactive oxygen species (ROS) synthesis as well as synthesis of ECM by PSCs. This finding supports routine praxis of reducing of intraductal pressure in pancreatic parenchyma by drainage, stone removal, or surgery.

PSCs activation and miRNA

ncRNA accounts for about 70 % of human genetic information and as such is involved in many

biological processes. (Storz G 2002). ncRNA is usually divided into following groups: small interfering RNA, microRNA and long ncRNA.

MicroRNAs (miRNA) are relatively small RNA molecules which have important role in regulating many cell functions - like differentiation, proliferation, or carcinogenesis.

There have been described various changes of miRNA profile in conditions such as PDAC and chronic pancreatitis (Chhatriya *et al.* 2019, Xin *et al.* 2017). miRNA can have both inhibitory and promoting function on PSCs.

PSCs's miRNA has different profile before and after activation of PSCs This study revealed that some of more expressed miRNAs interact with signalling pathways, cellular development and cell activation, e.g. upregulated miR-31 (Masamune *et al.* 2014).

Histone deacetylase inhibitors reduce acetylation in histones, which is followed by increased expression of miR-15 and miR-16 which further leads to repression of TGF- β 1/SMAD pathway. This results in reduction of fibrogenesis by PSCs and increased apoptosis of PSCs in chronic pancreatitis (Ji *et al.* 2020).

Other structures involved in activation of PSCs are exosomes – the carriers of miRNA. Exosomal miR-130a-3p participates on PSCs activation by affecting the cellular peroxisome proliferator-activated receptor gamma PPAR- γ (Wang *et al.* 2021).

MiRNA is also important in PCSs and tumor cells crosstalk: Recent study revealed that hypoxia-induced activated PSCs are source of exosomes which via phosphatase and tensin homolog (PTEN) activate protein kinase B pathway in PDAC cells which increase proliferation and invasion of these cells (Cao *et al.* 2021). The role of PSCs derived exosomes in PDAC cells proliferation was observed in several studies (Masamune *et al.* 2017).

Long ncRNA has length about 200 to 100,000 bp. These molecules involved in regulating of gene expressions were studied in connection with pancreatic cancer (Zhou *et al.* 2020), but little is known about their role in pancreatic fibrosis. Wang et al shows that certain lncRNAs e.g., STX12 lncRNA involves through miR-130b and miR-148a target mRNAs (SMAD5 and IL6ST) and have promoting effect of PSCs activation (Wang *et al.* 2016). On the contrary expression of miRNA 200a inhibits PSCs activation (Xu *et al.* 2017).

MiRNA let-7d through inhibiting expression of

thrombospondin 1 reduces activation of PSCs and reduced miRNA let-7d is a potential serum biomarker of PDAC (Suzuki *et al.* 2017).

PSCs activation and oxidative stress

Oxidative stress leading to production of ROS (e.g., nitric oxide) is associated with pancreatitis. There exists a well described link between calcium mediated activation of pancreatic enzymes and oxidative stress which is one of the mechanisms of acute pancreatitis onset (Petersen *et al.* 2006).

There has been proved (in rat PSCs) activity of nitric oxide synthase-2 (NOS2) following exposition of PSCs to pathogen associated molecular pattern (PAMP) (Jakubowska *et al.* 2016).

Coenzyme Q10 as potent antioxidant ameliorates pancreatic fibrosis and activation of PSCs via PI3K/AKT/mTOR signalling pathway (Xue *et al.* 2019).

Activation of PSCs and alcohol and smoking

Alcohol-induced chronic pancreatitis is a burden for healthcare system in last decades and as a chronic inflammatory condition bears an increased risk of PDAC development. Alcohol activates PSCs by several mechanisms mainly due to its metabolism to acetaldehyde (PSCs exhibit alcoholdehydrogenase) and generating oxidative stress by inducing inflammatory changes in pancreas. (Apte *et al.* 2000) Endotoxin lipopolysaccharide has been recognised as a trigger of alcoholic chronic pancreatitis. TGF beta1 -SMAD 2,3 pathway is the main axis of activation of PSCs in alcoholic chronic pancreatitis (Sun *et al.* 2018). There were observed increased levels of IL-6 in alcohol-induced-chronic pancreatitis (Pedersen *et al.* 2004). IL-6 promotes TGF -beta1 secretion by PSCs and via ERK pathway directly activates PSCs (Aoki *et al.* 2006).

MAPK kinase pathway is activated during exposure of PSCs to ethanol and acetaldehyde (McCarroll *et al.* 2003).

The relationship between PSC and alcohol intake seems to be even more complex, since alcohol increases gut permeability which can lead to release of endotoxins and lipopolysaccharides which activates PSCs probably via Toll-like receptor 4 (TLR-4) and CD-14 (Vomlaufen *et al.* 2007).

There seems to be links between environmental factors as alcohol and high caloric intake resulting in obesity which have impact on PSCs metabolism and thus increasing risk of pancreatic cancer. Obesity associated

type 2 diabetes mellitus is associated with increased levels of lipopolysaccharides and TNF alpha (adipose tissue derived) which have effect on PSCs activation (Pandol *et al.* 2012).

Calcium signalling is a universal mechanism of regulating many biological processes. In pancreatic tissue, calcium signalling pathways contribute to regulation of secretion of pancreatic enzymes. Besides acinar cells, Ca²⁺ signalling is an important signalling pathway in PSCs.

Unlike pancreatic acinar cells, PSCs do not respond to acetylcholine or cholecystokinin stimuli by Ca²⁺ increase in cytosole. On the contrary bradykinin elicits Ca signals from PSCs (Gryshenko *et al.* 2016).

As a consequence of alcohol-induced pancreatic injury inflammatory mediators e.g., kallikrein, are released, which increases levels of bradykinin. Bradykinin is involved in Ca²⁺ signalling playing an important role in activation of PSCs as PSCs express bradykinin receptor type 2 (Apte *et al.* 2003).

Ion channels in general seem to be crucial in PSCs metabolism regulation. One study revealed that inhibition of KCa3.1 is followed by reduced migration and chemotaxis of PSCs (Storck *et al.* 2017).

Smoking is another important environmental factor contributing to PSC activation via nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which are expressed by PSCs (Lee *et al.* 2015) and by upregulation of IL-22 (Li *et al.* 2020).

PSCs in pancreatic pathologies

PSC and DM2

It is widely recognized, that DM2 is a risk factor of pancreatic cancer (De Souza *et al.* 2016). PSCs respond to glucose levels as they express glucose transporters GLUT 1-3 (Kiss *et al.* 2015).

DM 2 is a condition accompanied by chronic hyperglycemia, which leads to activation and proliferation of PSCs (Hong *et al.* 2007).

The relationship between PSCs and type 2 diabetes mellitus seems to be bilateral. Firstly, in diabetes, hyperglycemia can induce PSCs activation via renin-angiotensin system (RAS) system, promoting fibrosis in pancreatic islets (Ko *et al.* 2006). Hyperglycemia stimulates via RAS TGF beta synthesis which is one of key mediators of PSCs activation. Moreover, in pancreatic islets unlike in rest of pancreatic tissue, PSCs are in case of DM 2 exposed to high levels

of glucose and insulin. Combination of these two factors, initializing through ERK1/2 phosphorylation activation and proliferation of PSCs can cause islet specific fibrosis, which was observed on mouse models. Especially involvement of RAS system can be a promising therapeutic target in DM 2 therapy (Yang *et al.* 2020).

Chronic hyperglycemia leads to differentiation into myofibroblast-like phenotype of PSCs via p38 pathway. In chronic hyperglycemic condition PSCs produce more mRNA CXCL12, which can have influence on PDAC cells proliferation (Kiss *et al.* 2015). GLP-1 - an enzyme involved in glucose homeostasis possibly involves activation of PSC (Yand Y *et al.* 2013).

Hypoxia can occur within pancreatic islets - probably due to high oxygen consumption by insulin producing beta cells. (Sato *et al.* 2011). Hypoxia in pancreatic islets can activate PSCs resulting in islet fibrosis and further damage of beta cells (Kim *et al.* 2008).

Interestingly, vitamin A deficiency leads to activation of PSCs and islet fibrosis which is followed by dysfunction of pancreatic islet. This can be reversed by vitamin A supplementation (Zhou *et al.* 2020). The relationship between PSCs and DM2 is summarized in Fig. 1.

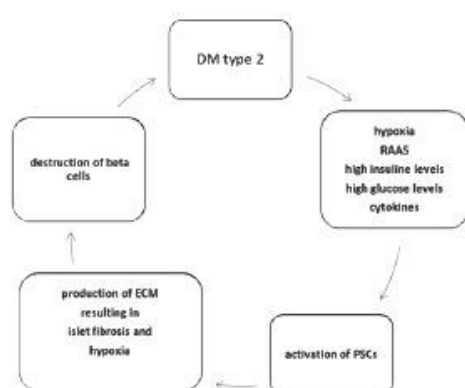


Fig. 1. Relationship between DM2 and PSCs. DM2 is a condition accompanied by environment rich in insulin and glucose within the pancreatic islets. High oxygen consumption by insulin producing beta cells results in hypoxia and oxidative stress. This, in combination with activation of angiotensin II pathway, leads to activation of PSCs. PSCs produce ECM and cytokines which results both directly and indirectly due to islet fibrosis in beta cells destruction. DM type 2 - Type 2 diabetes mellitus, PSCs - pancreatic stellate cells; RAAS - renin- angiotensin- aldosterone system; ECM - extracellular matrix. Modified from Kim *et al.* (2008).

PSC and PDAC

Pancreatic stellate cells comprise about 5 % of normal pancreas but they form about 50 % of desmoplastic stroma of PDAC, which comprise about 90 % of tumor mass (Farran *et al.* 2019). PDAC is characteristic by massive desmoplastic reaction, where multiple cells, including stellate cells, are involved. Research in last few decades shows emerging role of PSCs in modulation of PDAC microenvironment. Understanding PDAC cells and PSCs crosstalk is important for searching for therapeutical target of pancreatic cancer.

Interactions between tumor cells and PSCs were studied both in vivo and in vitro. Activated PSCs involve many processes within tumor stroma e.g., angiogenesis, ECM production, tumor growth, invasion, and proliferation as well as drug resistance. PSCs potentiate migration, proliferation, and differentiation of PDAC cells, and *vice versa* PDAC cells promote activation of PSC and their migration and proliferation as well as production of ECM.

PDAC cells influence production of ECM, activation and proliferation of PSCs. Both PDAC cells and PSCs produce cocktail of various cytokines, which stimulate activity and proliferation of both cell lines. Activation of PSCs is stimulated by cytokines like IL-1, IL-6, colony-stimulating factor 1 (CSF1), platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB), TGF- β 1, fibroblast-growth factor (FGF) (Carter *et al.* 2021). FGF, located in several tissues, is part of signalling cascade regulating cell proliferation and differentiation (Kang *et al.* 2019). FGF-1 and -2 are present in PDAC in higher amount than in healthy pancreas and their levels are possibly linked to oxidative stress accompanying PDAC microenvironment. On the contrary, some studies show positive effect of FGF 1 and 2 to cell adhesion and differentiation in PDAC (El-Hariry *et al.* 2001).

FGF released by PSCs stimulates production of TGF- β 1 by PDAC cells, which reversely stimulates further proliferation of PSCs. TGF- β 1, secreted by PSCs as well, downregulates levels of L1 cell adhesion molecule L1CAM which promotes aggressive stem-like phenotype of PDAC cells (Cave *et al.* 2020).

Surprisingly, it seems, that the role of TGF- β 1 is rather conflicting as in early stages of PDAC TGF-beta plays inhibitory role, but in advanced stages of PDAC it is involved in epithelial- mesenchymal transformation of PDAC cells (Morrison *et al.* 2013).

Besides TGF beta1/SMAD axis, other pathways

are linked to regulation of PDAC cells invasion e.g., stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis or c-Met/PI3K/Akt signalling pathway (Xu *et al.* 2020, Gao

et al. 2010). Galectin-1 / NF- κ B axis promotes PDAC metastasing (Erkan *et al.* 2009). Interplay between PSCs and PDAC cells is depicted in Fig. 2.

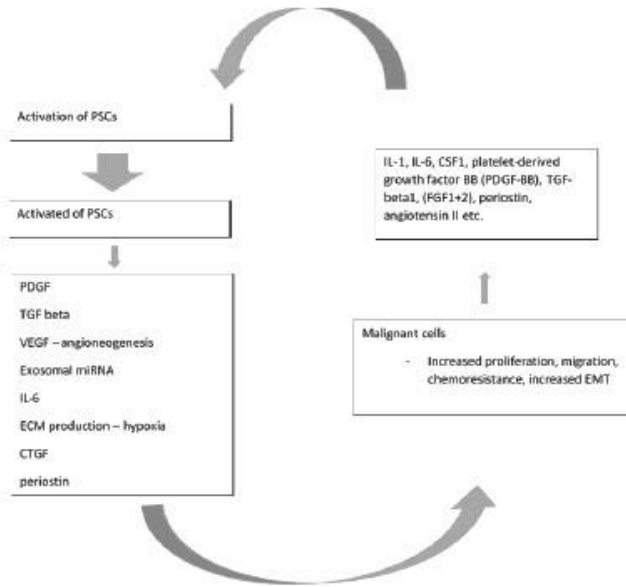


Fig. 2. Paracrine signalling *via* cytokines produced by malignant cells leads to PSCs activation. While activated, PSCs secrete factors, which increase ability of malignant cells to proliferate and migrate, increase metastatic potential and resistance to chemotherapeutics. Both malignant cells and activated PSCs produce factors which further activate PSCs. PDGF : platelet derived growth factor, VEGF – vascular endothelial growth factor, TGF – tumor growth factor; miRNA – microRNA; ECM - extracellular matrix; CTGF – connective tissue growth factor; EMT – epithelial-mesenchymal transformation; CSF1 – colony-stimulating factor 1; FGF – fibroblast growth factor. Modified from: Carter *et al.* (2021)

MiRNA pathways are also involved in PDAC PSCs crosstalk. Exosomal miRNA is utilized by PDAC cells and contributes to migration and proliferation of PDAC cells. Exosomal PSCs derived miRNA 21 is internalized by PDAC cells and high levels of this miRNA result in increased PDAC cells migration and EMT. (Ma *et al.* 2020) MiR-4459/KIAA0513 axis involving pancreatic cancer growth and metastasing was described by Shao *et al.* (2020) Exosomes are also involved in chemoresistance of PDAC treated by gemcitabine (Richards *et al.* 2017).

In vitro studies shows that co-cultivation of PSCs – and PDAC leads to transition of PDAC cells into fibroblast-like phenotype, reduction of e-cadherin and membrane associated beta catenin expression as well as increase of migration of co-cultured PDAC in comparison with monocultured PDAC cells (Kikuta *et al.* 2010). PDAC cells co-cultivated with activated PSCs seem to have decreased apoptotic response to gemcitabine treatment (Liu *et al.* 2018).

Epithelial-mesenchymal transformation (EMT), a process of cellular changes resulting in transition of

polarised epithelial cells to mesenchymal-like cellular phenotype characterized by increased proliferative and migration potential as well as invasiveness and increased resistance to apoptosis (Kalluri *et al.* 2010) is an important process in development of PDAC and is also influenced by activated PSCs.

Enhanced changes of PDAC cells typical for EMT transition were described in an in-vitro study where they were co-cultivated with PSCs. Interestingly, these changes were markedly more evident in the presence of high glucose environment (Karnevi *et al.* 2016) which emphasises the role of type-two diabetes as risk factor of PDAC development. Wu *et al.* (2017) reported promoting EMT of PDAC cells by IL-6 secreted by PSCs and involving Stat3/Nrf2 pathway. Production of IL-6 by PSCs is also induced by interaction with distinct immune cells. Gamma-delta T-cells promote secretion of IL-6 by PSCs. IL-6 levels correlate with tumor size and moreover has a role in PanIN \rightarrow PDAC transition (Seifert *et al.* 2020). Another cytokine- IL-13 – produced by mastocytes increases proliferation of PSCs (Ma *et al.* 2013).

ECM produced by PSCs is essential for PDAC cells survival and metabolism. For example, collagen produced by activated PSCs as the main component of ECM, serves as nutrient reservoir for cancer cells (Olivares *et al.* 2017) which is important even more as collagen seems to have suppressive effect on neovascularization in PDAC stroma (Berchtold *et al.* 2014). PSCs play a role in PDAC metabolism also by regulating branched-chain amino acid metabolism (Jiang *et al.* 2021).

Hypoxia usually accompanying hypovascular PDAC stroma activates PSCs, which produce metalloproteinases. Among these, MMP-10 and MMP-3 seem to promote invasive growth of PDAC (Liu *et al.* 2020). Under hypoxic condition PSCs secrete connective tissue growth factor (CTGF) which enhances PDAC cells invasion. (Eguchi *et al.* 2013) Excessive production of ECM further promotes hypoxic microenvironment which is followed by further activation of PSCs. Hypoxic condition leads to expression PSCs derived exosomal miRNA (miR-4465 and miR-616-3p), which promotes PDAC cells proliferation by influencing the PTEN/AKT pathway (Cao *et al.* 2021).

Moreover, some product released by activated PSCs – e.g. periostin-increase resistance of PDAC cells to hypoxia (Liu *et al.* 2015). The overall effect of periostin on PDAC invasiveness is probably multiple and perhaps concentration-dependent (Kanno *et al.* 2008).

Angiogenesis is essential for tumor nutrition and growth. Cancer cells use several factors, like vascular endothelial growth factor (VEGF), to induce angiogenesis in tumor stroma to obtain adequate supply of oxygen and nutrients (Yancopoulos *et al.* 2000). It was well described that PSC produce many proangiogenic molecules such as basic fibroblast growth factor, periostin and PDGF. As potential therapeutical target miRNA-199a-3p and miRNA-214-3p were described as these miRNAs regulate formation of capillary tubes induced by activated PSCs. (Kuminty *et al.* 2016) In vitro study of Patel *et al.* showed that PSCs enhance *via* HGF/c-MET pathway formation of neovessels by human microvascular endothelial cells (Patel *et al.* 2014).

It is probably the excessive production of ECM, which – despite strong proangiogenic potential of some products of PSCs – leads to compression of neovessels and hypoxia. It is also worth to mention the reactive defensive regression of neovessels as part of host response on tumor growth (Yancopoulos *et al.* 2000).

Interesting crosstalk between PSCs and PDAC

was described *in vitro* by Erkan *et al.* (2009). Although PSCs are under hypoxic condition producers of endothelial growth stimulating VEGF, they stimulate PDAC cells to produce endostatin, which on the contrary suppresses angiogenesis. PSCs are also stimulated by PDAC cells to produce metalloproteinases, which cleave endostatin (produced by PDAC) from its precursor.

Perineural invasion, another vicious feature of PDAC is also influenced by PSCs. Nerve growth factor (NGF) was proven to be involved in PDAC growth, perineural invasion and proliferation of PDAC cells. NGF and its receptor TrkA,B,C were found in PDAC tissues (Miknyoczki *et al.* 1999).

PI3K/AKT pathway was activated by NGF/TrkA which promoted invasion and proliferation in PDAC cells in co-culture with PSCs (Jiang *et al.* 2020).

Nan *et al.* showed that HGF/c-Met is essential for perineural invasion of PDAC – it increased production of NGF and MMP – 9 (cellular marker of EMT) and promoted invasion of PDAC in dorsal root ganglia in in-vitro study (Nan *et al.* 2019).

Interesting is the role of PSCs and PDAC cellular interaction in modulating pancreatic pain which usually accompanies pancreatic cancer. Sonic hedgehog (sHH) secreted by PDAC cells triggers sHH pathway in PSCs. PSCs in reaction secrete several neurotropic factors which are involved in generating pain in pancreatic tissue (Han *et al.* 2016).

PSCs are able to co-migrate with PDAC cells to distant organs where they can create microenvironment suitable for further growth and spreading of metastatic process. (Suetsugu *et al.* 2015) PSCs exhibit the ability to in/extravasate cross the endothelial barrier and stimulate angiogenesis in mouse models (Xu *et al.* 2010).

PSCs seem to be partially responsible for chemoresistance of PDAC. There exist several mechanisms of protecting PDAC cells from effect of chemotherapeutic agents. Massive production of ECM by activated stellate cells generates hypoxic microenvironment of PDAC further facilitating PDAC growth and resulting in worse outcome of chemotherapy. Besides that, PSCs are able to produce molecules which directly promote chemoresistance of PDAC cells e.g., deoxycytidine – deoxynucleoside produced by PSCs reduce effect of nucleoside analogue gemcitabine (Dalin *et al.* 2019). PSCs also seems to be unaffected by certain regimens of PDAC targeted therapy (Carbera *et al.* 2014). PSCs / PDAC crosstalk is briefly summarized in Fig. 3.

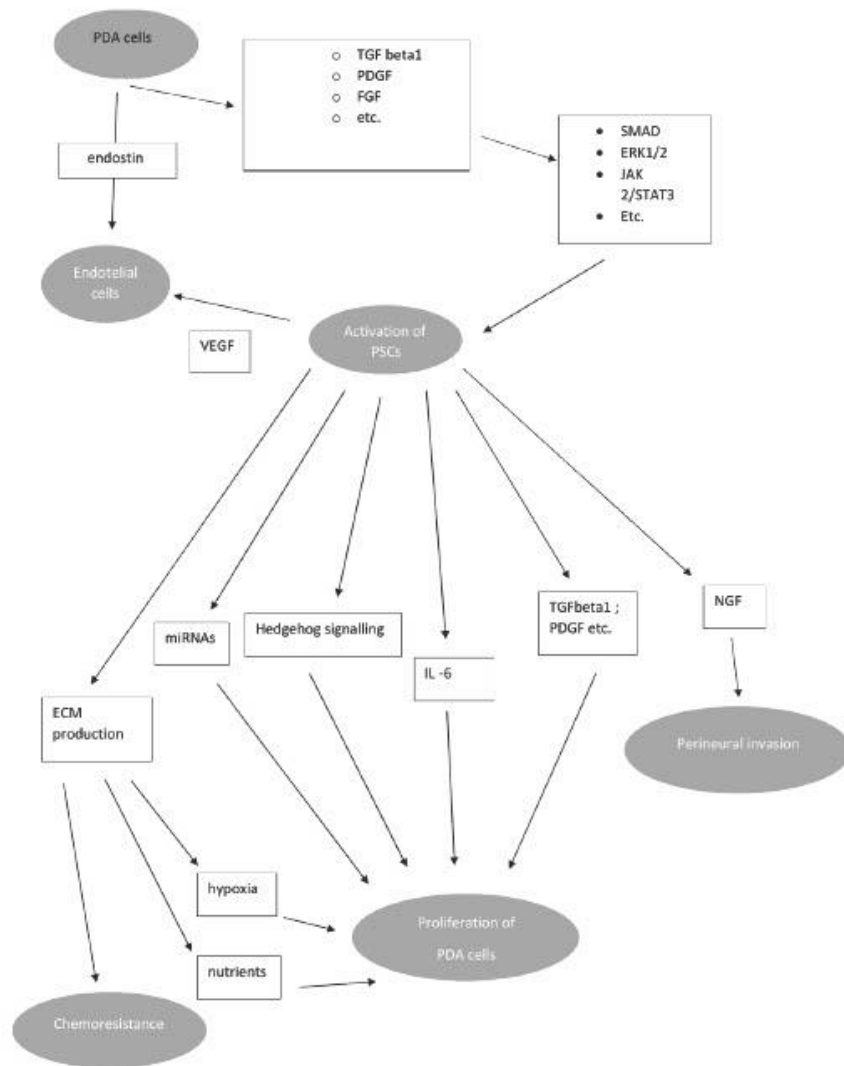


Fig. 3. Crosstalk between malignant cells and PSCs. Factors produced by PSCs increase via several signalling pathways proliferation of malignant cells, perineural invasion, metastasing and chemoresistance. Both PSCs and malignant cells regulates angiogenesis. Proliferation of malignant cells and hypoxia due to low blood supply increases activation of PSCs. Abbreviations: PDGF : platelet derived growth factor, VEGF – vascular endothelial growth factor, TGF – tumour growth factor; miRNA – microRNA; ECM – extracellular matrix; FGF – fibroblast growth factor; NGF – nerve growth factor; ERK extracellular signal-regulated kinases; JAK- Janus kinase; PDA – pancreatic ductal adenocarcinoma. Modified from: Bynigeri *et al.* (2017)

PSCs and chronic pancreatitis

Chronic pancreatitis (CP) is a chronic disease characterised by replacement of functional parenchyma of pancreas by fibrous tissue which in advanced stages results in exocrine and endocrine pancreatic insufficiency. CP is a condition leading to increased risk

of pancreatic cancer (Kirkegård *et al.* 2017). Excessive and persistent activation of PSCs as a result of repeated injury and/or autocrine signalization is the key point of remodelling pancreatic tissue in CP (Jin *et al.* 2020).

Activation of PSCs is a process accompanying inflammatory reaction in pancreatic tissue and is

responsible for production of fibrotic stroma typical for PC. There exist several mechanism of PSCs activation in CP. Alcohol – a common cause of CP in western countries- was proved to activate MAPK pathway in PSCs. (McCarroll *et al.* 2003) Upregulated connective tissue growth factor (CCN2) - exosomal miRNA21 levels forming positive feedback loop responsible for transition of PSCs into myofibroblast-like phenotype was described in mouse models of alcoholic chronic pancreatitis (Charrier *et al.* 2014).

Smoking was proved as a potential activator of PSCs as PSCs exprime nACh receptors and respond to nicotine-derived nitrosamine ketone – content of cigarette smoke. Cigarette smoke also stimulate T-lymphocytes via aryl-hydrocarbon receptor, which leads to increased levels of IL-22. This cytokine activates PSCs via IL22RA1 (Lee *et al.* 2015, Xue *et al.* 2016). The damaged pancreatic acinar cells release various cytokines enhancing activation of PSCs, oxidative stress activates PSCs as well.

In CP, M2 macrophages (unlike in the acute pancreatitis where M1 macrophages dominates (Hu *et al.* 2020)), play a pivotal role in the pathogenesis of inflammation. The crosstalk between PSCs and macrophages seems to be a crucial mechanism of fibrogenesis in CP. Liu *et al.* revealed in his work – where he studied interaction between co-cultivated PSCs and macrophages - that M2 macrophages produce various cytokines, which have the ability to enhance activation of PSCs e.g., TGF beta 1 and PDGFbeta (Liu *et al.* 2018). TGF beta 1 also increased procollagen I gene transcription on PSCs and TGF beta signalling in activated PSCs induced a mechanism which inhibits protease-inhibitory function of RECK - membrane-anchored MMP inhibitor (Lee *et al.* 2008).

PSCs are source of IL-4 which in autocrine ways further activates PSCs and macrophages. Besides that, IL-4 works as a potent growth factor for PDAC cells (Prokopchuk *et al.* 2005). As mentioned previously, activated PSCs produce metalloproteinases and their inhibitors e.g. TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, MT1-MMP, which have direct impact on collagen turnover in ECM (Shek *et al.* 2002).

NF- κ B, depending on the site of production, has impact on the progression of CP associated fibrosis. NF- κ B pathway seems to be activated via TGF beta 1 in PSCs. NF- κ B pathway activation in PSCs leads to an imbalance between MMP and TIMPs (in favor of TIMPs) resulting in fibrogenesis. This pathway also increase

secretion of MCP -1 with attracts macrophages to the damaged region. This possibly contributes to the vicious circle of persistent fibrogenesis in CP (Prokopchuk *et al.* 2005).

Conclusion and future directions

The progress of knowledge about tight relationship between pathologies of pancreas and PSCs and lack of efficient therapy of such debilitating diseases like PDAC and CP necessarily lead to increased interest into PSCs as potent therapeutic target. Commonly used therapy with nab-paclitaxel or FOLFIRINOX does not offer satisfying effectivity. The crosstalk between PDAC and PSCs reveals promising therapeutical targets. In recent years some promising therapeutical strategies were tested, mainly as combination with standard chemotherapy. Targeting pathways involved in PDAC/PSCs crosstalk offer promising strategy of influencing both cancer cells and the stromal component of PDAC mass. The therapy can be focused on reprogramming PSCs to maintain their quiescence, targeting PDAC crosstalk or directly influence production of ECM.

Several studies were focused on influencing different PSCs-associated signalling pathways.

PSCs associated hepatocyte growth factor pathway HGF/c-MET seems to be a promising target of therapy as well as targeting FGF signalling by selective tyrosine-kinase inhibitor (Pothula *et al.* 2017).

Pancreatic fibrosis, a typical feature of chronic pancreatitis, can be ameliorated by coenzyme Q10, a potent antioxidant, via inhibition PI3K/AKT/mTOR signalling pathway (Xue *et al.* 2019, Xue *et al.* 2017).

IL-6 produced in PDAC stroma mainly by PSCs is essential for progression of PDAC (Zhang *et al.* 2013). Blockade of this cytokine in combination with blockade of programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) leads to decreased tumor progression in murine model of pancreatic cancer (Mace *et al.* 2018). Similar effect was achieved by the use of HSP-90 inhibitor (Zhang *et al.* 2021).

In *in-vitro* model, metformin reduces viability and activation of PSCs via angiotensin-II receptor 1 (AT1)/TGF-beta /STAT3 signalling pathway. Furthermore, metformin seems to reduce MMP-9 levels which has beneficial effect on ECM (Incio *et al.* 2015). Reducing of angiotensin signalling by losartan also reduces the activation of PSCs and combination of losartan with chemotherapy increased survival of mouse

models of PDAC in comparison with chemotherapy alone (Cauhan *et al.* 2013). Angiotensin II induced by hyperglycemia increases TGF beta levels, so using renin-angiotensin blockers seems to have beneficial effect for patients with DM 2 (Yang *et al.* 2020).

ATRA is a promising molecule in PDAC involvement as it targets PSCs. It restores mechanical quiescence of PSC *via* retinoic acid receptor beta (RAR- β)/ actomyosin (MLC-2) pathway. Downregulation of MLC-2 contractility reduces mechanosensing-dependent ECM remodelling which has an effect on cancer cells invasion (Chronopoulos *et al.* 2016).

It was proved in *in-vitro* cultures of PSCs by Jaster *et al.* (2003) that cultures treated by ATRA showed lower proliferation rate and produced less collagen. McCarrroll *et al.* (2005) extended these findings by revealing that cultures of ATRA-treated rat PSCs decreased expression of alpha smooth muscle actin (alpha-SMA) and fibronectin (typical for activated stellate cells) and decreased activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) signalling pathways.

Froeling *et al.* (2011) proved that retinoic acids reduced motility and activation of PSCs and led to increased apoptosis of adjacent cancer cells.

Delivery of ATRA and heat shock protein 47 targeting siRNA by gold-coated nanoparticles which can cross the barrier of ECM induced PSCs quiescence (Han *et al.* 2018). Combination of gemcitabine and ATRA in *in-vitro* model shows better effect than gemcitabine alone (Carapuça *et al.* 2016). Unlike most of other agents, which were tested mainly *in-vitro*, ATRA as a stromal targeting drug in combination with gemcitabine-nab-

paclitaxel was recently tested in phase Ib of clinical trial performed by Kocher *et al.* (2020). Antidiabetics can also have effect on PSCs, while suppression of activation of PSCs can be achieved by combination of N-acetyl cysteine and pioglitazone (Feng *et al.* 2021).

Because of high expression of vit D receptors (VDR) in PSCs, targeting those receptors by VDR ligand calcipotriol leads to reduced inflammation and fibrosis in murine pancreatitis model (Sherman *et al.* 2014).

These findings show the importance of ECM for proper delivery of chemotherapeutics to PDAC cells. Complex stroma-PDAC interaction highlights the need of sophisticated *in vitro* models e.g., tumor organoids and 3D models (Norberg *et al.* 2020). Another goal would be novel strategies of drug delivery to target cells (Huang *et al.* 2019). In summary, combination therapy targeting both stromal and cancer cells would be optimal strategy to achieve better outcome.

Nevertheless, despite advances in understanding the complex relationship between PSCs and the rest of pancreatic tissue, many studies mentioned were performed on animal models or *in-vitro* cultures. Thus, further research aimed on *in-vivo* studies in human pancreas is urgently needed.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by DRO GUH64165, Progres Q25 and SVV 260524-2021.

References

- AOKI H, OHNISHI H, HAMA K, SHINOZAKI S, KITA H, YAMAMOTO H, OSAWA H, SATO K, TAMADA K, SUGANO K: Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 99: 221-228, 2006. <https://doi.org/10.1002/jcb.20906>
- APTE MV, HABER PS, APPLGATE TL, NORTON ID, MCCAUGHAN GW, KORSTEN MA, PIROLA RC, WILSON JS: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*. 43: 128-133, 1998. <https://doi.org/10.1136/gut.43.1.128>
- APTE MV, PHILLIPS PA, FAHMY RG, DARBY SJ, RODGERS SC, MCCAUGHAN GW, KORSTEN MA, PIROLA RC, NAIDOO D, WILSON JS: Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 118: 780-794, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(00\)70148-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(00)70148-x)
- APTE MV, WILSON JS: Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 27: 316-320, 2003. <https://doi.org/10.1097/00006676-200311000-00008>
- ASAHINA K, TSAI SY, LI P, ISHII M, MAXSON RE JR, SUCOV HM, TSUKAMOTO H: Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 49: 998-1011, 2009. <https://doi.org/10.1002/hep.22721>

- ASAUMI H, WATANABE S, TAGUCHI M, TASHIRO M, OTSUKI M: Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G972-978, 2007. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00018.2007>
- BALMER JE, BLOMHOFF R: Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43: 1773-1808, 2002. <https://doi.org/10.1194/jlr.r100015-jlr200>
- BERCHTOLD S, GRÜNWARD B, KRÜGER A, REITHMEIER A, HÄHL T, CHENG T, FEUCHTINGER A, BORN D, ERKAN M, KLEEFF J, ESPOSITO I: Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett* 28: 721-732, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.10.020>
- BERRY DC, NOY N: All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 29: 3286-96, 2009. <https://doi.org/10.1128/MCB.01742-08>
- BLANER WS, O'BYRNE SM, WONGSIRIROJ N, KLUWE J, D'AMBROSIO DM, JIANG H, SCHWABE RF, HILLMAN EM, PIANTEDOSI R, LIBIEN J: Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 1791: 467-473, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2008.11.001>
- BLEUL T, RÜHL R, BULASHEVSKA S, KARAKHANOVA S, WERNER J, BAZHIN AV: Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival. *Mol Carcinog* 54: 870-879, 2015. <https://doi.org/10.1002/mc.22158>
- BYNIGERI RR, JAKKAMPUDI A, JANGALA R, SUBRAMANYAM C, SASIKALA M, RAO GV, REDDY DN, TALUKDAR R: Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol* 21:23: 382-405, 2017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i3.382>
- CABRERA MC, TILAHUN E, NAKLES R, DIAZ-CRUZ ES, CHARABATY A, SUY S, JACKSON P, LEY L, SLACK R, JHA R, COLLINS SP, HADDAD N, KALLAKURY BV, SCHROEDER T, PISHVAIAN MJ, FURTH PA: Human Pancreatic Cancer-Associated Stellate Cells Remain Activated after in vivo Chemoradiation. *Front Oncol* May 9;4: 102, 2014. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00102>
- CAO W, ZENG Z, HE Z, LEI S: Hypoxic pancreatic stellate cell-derived exosomal miRNAs promote proliferation and invasion of pancreatic cancer through the PTEN/AKT pathway. *Aging (Albany NY)* 13: 7120-7132, 2021. <https://doi.org/10.18632/aging.202569>
- CARAPUÇA EF, GEMENETZIDIS E, FEIG C, BAPIRO TE, WILLIAMS MD, WILSON AS, DELVECCHIO FR, ARUMUGAM P, GROSE RP, LEMOINE NR, RICHARDS FM, KOCHER HM: Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol* 239: 286-296, 2016. <https://doi.org/10.1002/path.4727>
- CARTER EP, COETZEE AS, TOMAS BORT E, WANG Q, KOCHER HM, GROSE RP: Dissecting FGF signalling to target cellular crosstalk in pancreatic cancer. *Cells* 10: 847, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10040847>
- CAVE DD, DI GUIDA M, COSTA V, SEVILLANO M, FERRANTE L, HEESCHEN C, CORONA M, CUCCIARDI A, LONARDO E: TGF- β 1 secreted by pancreatic stellate cells promotes stemness and tumorigenicity in pancreatic cancer cells through LICAM downregulation. *Oncogene* 39: 4271-4285, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1289-1>
- CHARRIER A, CHEN R, CHEN L, KEMPER S, HATTORI T, TAKIGAWA M, BRIGSTOCK DR: Connective tissue growth factor (CCN2) and microRNA-21 are components of a positive feedback loop in pancreatic stellate cells (PSC) during chronic pancreatitis and are exported in PSC-derived exosomes. *J Cell Commun Signal* 8: 147-156, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12079-014-0220-3>
- CHAUHAN VP, MARTIN JD, LIU H, LACORRE DA, JAIN SR, KOZIN SV, STYLIANOPOULOS T, MOUSA AS, HAN X, ADSTAMONGKONKUL P, POPOVIĆ Z, HUANG P, BAWENDI MG, BOUCHER Y, JAIN RK: Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumor blood vessels. *Nat Commun* 4: 2516, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3516>
- CHHATRIYA B, MUKHERJEE M, RAY S, SARKAR P, CHATTERJEE S, NATH D, DAS K, GOSWAMI S: Comparison of tumor and serum specific microRNA changes dissecting their role in pancreatic ductal adenocarcinoma: a meta-analysis. *BMC Cancer* 19: 1175, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6380-z>

- CHRONOPOULOS A, ROBINSON B, SARPER M, CORTES E, AUERNHEIMER V, LACHOWSKI D, ATTWOOD S, GARCÍA R, GHASSEMI S, FABRY B, DEL RÍO HERNÁNDEZ A: ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion. *Nat Commun* 7: 12630, 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms12630>
- COLVIN EK, SUSANTO JM, KENCH JG, ONG VN, MAWSON A, PINESE M, CHANG DK, ROOMAN I, O'TOOLE SA, SEGARA D, MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL, APTE MV, SCARLETT CJ, BIANKIN AV: Retinoid signaling in pancreatic cancer, injury and regeneration. *PLoS One* 6: e29075, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029075>
- DALIN S, SULLIVAN MR, LAU AN, GRAUMAN-BOSS B, MUELLER HS, KREIDL E, FENOGLIO S, LUENGO A, LEES JA, VANDER HEIDEN MG, LAUFFENBURGER DA, HEMANN MT: Deoxycytidine release from pancreatic stellate cells promotes gemcitabine resistance. *Cancer Res* 79: 5723-5733, 2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0960>
- DE SOUZA A, IRFAN K, MASUD F, SAIF MW. Diabetes Type 2 and pancreatic cancer: a history unfolding. *JOP* 17: 144-148, 2016.
- DING Z, MAUBACH G, MASAMUNE A, ZHUO L: Glial fibrillary acidic protein promoter targets pancreatic stellate cells. *Dig Liver Dis* 41: 229-236, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.05.001>
- EBERT M, KASPER HU, HERNBERG S, FRIESS H, BÜCHLER MW, ROESSNER A, KORC M, MALFERTHEINER P: Overexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and type beta PDGF receptor in human chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 43: 567-574, 1998. <https://doi.org/10.1023/a:1018867209170>
- EGUCHI D, IKENAGA N, OHUCHIDA K, KOZONO S, CUI L, FUJIWARA K, FUJINO M, OHTSUKA T, MIZUMOTO K, TANAKA M: Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor. *J Surg Res* 181: 225-233, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.06.051>
- EL-HARIRY I, PIGNATELLI M, LEMOINE NR: FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 84: 1656-1663, 2001. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1813>
- ERKAN M, REISER-ERKAN C, MICHALSKI CW, DEUCKER S, SAULIUNAITIS D, STREIT S, ESPOSITO I, FRIESS H, KLEEFF J: Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia* 11: 497-508, 2009. <https://doi.org/10.1593/neo.81618>
- ESTARAS M, MARTINEZ-MORCILLO S, GARCÍA A, MARTINEZ R, ESTEVEZ M, PEREZ-LOPEZ M, MIGUEZ MP, FERNANDEZ-BERMEJO M, MATEOS JM, VARA D, BLANCO G, LOPEZ D, RONCERO V, SALIDO GM, GONZALEZ A: Pancreatic stellate cells exhibit adaptation to oxidative stress evoked by hypoxia. *Biol Cell* 112: 280-299, 2020. <https://doi.org/10.1111/boc.202000020>
- FARRAN B, NAGARAJU GP: The dynamic interactions between the stroma, pancreatic stellate cells and pancreatic tumor development: Novel therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 48: 11-23, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.07.001>
- FENG H, MORIYAMA T, OHUCHIDA K, SHENG N, IWAMOTO C, SHINDO K, SHIRAHANE K, IKENAGA N, NAGAI S, NAKATA K, MIZUMOTO K, NAKAMURA M: N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions. *J Exp Clin Cancer Res* 40: 133, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01939-1>
- FITZNER B, SPARMANN G, EMMRICH J, LIEBE S, JASTER R: Involvement of AP-1 proteins in pancreatic stellate cell activation in vitro. *Int J Colorectal Dis* 19: 414-420, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00384-003-0565>
- FROELING FE, FEIG C, CHELALA C, DOBSON R, MEIN CE, TUVESON DA, CLEVERS H, HART IR, KOCHER HM: Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 141: 1486-1497, 1497.e1-14, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.047>
- GAO Z, WANG X, WU K, ZHAO Y, HU G: Pancreatic stellate cells increase the invasion of human pancreatic cancer cells through the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis. *Pancreatology* 10: 186-193, 2010. <https://doi.org/10.1159/000236012>

- GRESS T, MÜLLER-PILLASCH F, ELSÄSSER HP, BACHEM M, FERRARA C, WEIDENBACH H, LERCH M, ADLER G: Enhancement of transforming growth factor beta 1 expression in the rat pancreas during regeneration from caerulein-induced pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 24: 679-685, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb01060>
- GRYSHCHENKO O, GERASIMENKO JV, GERASIMENKO OV, PETERSEN OH: Calcium signalling in pancreatic stellate cells: Mechanisms and potential roles. *Cell Calcium* 59: 140-144, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.003>
- HAN L, MA J, DUAN W, ZHANG L, YU S, XU Q, LEI J, LI X, WANG Z, WU Z, HUANG JH, WU E, MA Q, MA Z: Pancreatic stellate cells contribute pancreatic cancer pain via activation of sHH signaling pathway. *Oncotarget* 5: 18146-18158, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7776>
- HAN X, LI Y, XU Y, ZHAO X, ZHANG Y, YANG X, WANG Y, ZHAO R, ANDERSON GJ, ZHAO Y, NIE: Reversal of pancreatic desmoplasia by re-educating stellate cells with a tumor microenvironment-activated nanosystem. *Nat Commun* 23: 3390, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05906-x>
- HONG OK, LEE SH, RHEE M, KO SH, CHO JH, CHOI YH, SONG KH, SON HY, YOON KH: Hyperglycemia and hyperinsulinemia have additive effects on activation and proliferation of pancreatic stellate cells: possible explanation of islet-specific fibrosis in type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 1;101: 665-675, 2007. <https://doi.org/10.1002/jcb.21222>
- HU C, YANG J, SU HY, WALDRON RT, ZHI M, LI L, XIA Q, PANDOL SJ, LUGEA A: Yes-associated protein 1 plays major roles in pancreatic stellate cell activation and fibroinflammatory responses. *Front Physiol* Dec 3: 1467, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01467>
- HU F, LOU N, JIAO J, GUO F, XIANG H, SHANG D: Macrophages in pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential. *Biomed Pharmacother* 131: 110693, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110693>
- HUANG H, BREKKE RA: The Next Wave of Stroma-Targeting Therapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 15: 328-330, 2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3751>
- IDE T, KITAJIMA Y, MIYOSHI A, OHTSUKA T, MITSUNO M, OHTAKA K, KOGA Y, MIYAZAKI K: Tumorstromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *Int J Cancer* 15: 2750-2759, 2006. <https://doi.org/10.1002/ijc.22178>
- INCIO J, SUBOJ P, CHIN SM, VARDAM-KAUR T, LIU H, HATO T, BABYKUTTY S, CHEN I, DESHPANDE V, JAIN RK, FUKUMURA D: Metformin reduces desmoplasia in pancreatic cancer by reprogramming stellate cells and tumor-associated macrophages. *PLoS One* 7: e0141392, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141392>
- INO K, MASUYA M, TAWARA I, MIYATA E, ODA K, NAKAMORI Y, SUZUKI K, OHISHI K, KATAYAMA N: Monocytes infiltrate the pancreas via the MCP-1/CCR2 pathway and differentiate into stellate cells. *PLoS One* 8: e84889, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084889>
- JAKUBOWSKA MA, FERDEK PE, GERASIMENKO OV, GERASIMENKO JV, PETERSEN OH: Nitric oxide signals are interlinked with calcium signals in normal pancreatic stellate cells upon oxidative stress and inflammation. *Open Biol* 6: 160149, 2016. <https://doi.org/10.1098/rsob.160149>
- JASTER R, HILGENDORF I, FITZNER B, BROCK P, SPARMANN G, EMMRICH J, LIEBE S: Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol* 15;66: 633-41, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00390-3](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00390-3)
- JI T, FENG W, ZHANG X, ZANG K, ZHU X, SHANG F: HDAC inhibitors promote pancreatic stellate cell apoptosis and relieve pancreatic fibrosis by upregulating miR-15/16 in chronic pancreatitis. *Hum Cell* 33: 1006-1016, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00387-x>
- JIANG J, BAI J, QIN T, WANG Z, HAN L: NGF from pancreatic stellate cells induces pancreatic cancer proliferation and invasion by PI3K/AKT/GSK signal pathway. *J Cell Mol Med* 24: 5901-5910, 2020. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15265>
- JIANG W, QIAO L, HAN Y, ZHANG A, AN H, XIAO J, REN L: Pancreatic stellate cells regulate branched-chain amino acid metabolism in pancreatic cancer. *Ann Transl Med* 9: 417, 2021. <https://doi.org/10.21037/atm-21-761>

- JIN G, HONG W, GUO Y, BAI Y, CHEN B: Molecular Mechanism of Pancreatic Stellate Cells Activation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *J Cancer* 14: 1505-1515, 2020. <https://doi.org/10.7150/jca.38616>
- KALLURI R, WEINBERG RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition [published correction appears in *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786]. *J Clin Invest* 119: 1420-1428, 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- KANG X, LIN Z, XU M, PAN J, WANG ZW: Deciphering role of FGFR signalling pathway in pancreatic cancer. *Cell Prolif* 52: e12605, 2019. <https://doi.org/10.1111/cpr.12605>
- KANNO A, SATOH K, MASAMUNE A, HIROTA M, KIMURA K, UMINO J, HAMADA S, SATOH A, EGAWA S, MOTOI F, UNNO M, SHIMOSEGAWA T: Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 122: 2707-2718, 2008. <https://doi.org/10.1002/ijc.23332>
- KARNEVI E, ROSENDAHL AH, HILMERSSON KS, SALEEM MA, ANDERSSON R: Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro. *Exp Cell Res* 346: 206-15, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.07.017>
- KIKUTA K, MASAMUNE A, WATANABE T, ARIGA H, ITOH H, HAMADA S, SATOH K, EGAWA S, UNNO M, SHIMOSEGAWA T: Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 380-384, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.040>
- KIM JJ, LEE E, RYU GR, KO SH, AHN YB, SONG KH: Hypoxia Increases β -Cell Death by Activating Pancreatic Stellate Cells within the Islet. *Diabetes Metab J* 44: 919-927, 2020. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0181>
- KIM JW, KO SH, CHO JH, SUN C, HONG OK, LEE SH, KIM JH, LEE KW, KWON HS, LEE JM, SONG KH, SON HY, YOON KH: Loss of beta-cells with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci* 13: 6022-6033, 2008. <https://doi.org/10.2741/3133>
- KIRKEGÅRD J, MORTENSEN FV, CRONIN-FENTON D: Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 112: 1366-1372, 2017. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.218>
- KISS K, BAGHY K, SPISÁK S, SZANYI S, TULASSAY Z, ZALATNAI A, LÖHR JM, JESENOFSKY R, KOVALSZKY I, FIRNEISZ G: Chronic hyperglycemia induces trans-differentiation of human pancreatic stellate cells and enhances the malignant molecular communication with human pancreatic cancer cells. *PLoS One* 10: e0128059, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128059>
- KO SH, HONG OK, KIM JW, AHN YB, SONG KH, CHA BY, SON HY, KIM MJ, JEONG IK, YOON KH: High glucose increases extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 98: 343-355, 2006. <https://doi.org/10.1002/jcb.20797>
- KOCHER HM, BASU B, FROELING FEM, SARKER D, SLATER S, CARLIN D, DESOUZA NM, DE PAEPE KN, GOULART MR, HUGHES C, IMRALI A, ROBERTS R, PAWULA M, HOUGHTON R, LAWRENCE C, YOGESWARAN Y, MOUSA K, COETZEE C, SASIENI P, PRENDERGAST A, PROPPER DJ: Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun* 11: 4841, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18636-w>
- KUNINTY PR, BOJMAR L, TJOMSLAND V, LARSSON M, STORM G, ÖSTMAN A, SANDSTRÖM P, PRAKASH J: MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget* 7: 16396-16408, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7651>
- LEE AT, XU Z, POTHULA SP, PATEL MB, PIROLA RC, WILSON JS, APTE MV: Alcohol and cigarette smoke components activate human pancreatic stellate cells: implications for the progression of chronic pancreatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 39: 2123-2133, 2015. <https://doi.org/10.1111/acer.12882>
- LEE H, LIM C, LEE J, KIM N, BANG S, LEE H, MIN B, PARK G, NODA M, STETLER-STEVENSON WG, OH J: TGF- β signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 104: 1065-1074, 2008. <https://doi.org/10.1002/jcb.21692>
- LI Z, ZHANG X, JIN T, HAO J: Nicotine promotes activation of human pancreatic stellate cells through inducing autophagy via $\alpha 7$ nAChR-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *Life Sci* 243: 117301, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117301>

- LIN H, DONG B, QI L, WEI Y, ZHANG Y, CAI X, ZHANG Q, LI J, LI L: Inhibitory Smads suppress pancreatic stellate cell activation through negative feedback in chronic pancreatitis. *Ann Transl* 9: 384, 2021. <https://doi.org/10.21037/atm-20-4282>
- LIU D, STEINS A, KLAASSEN R, VAN DER ZALM AP, BENNINK RJ, VAN TIENHOVEN G, BESSELINK MG, BIJLSMA MF, VAN LAARHOVEN HWM: Soluble compounds released by hypoxic stroma confer invasive properties to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomedicines* 8: 444, 2020. <https://doi.org/10.3390/biomedicines811044>
- LIU SL, CAO SG, LI Y, SUN B, CHEN D, WANG DS, ZHOU YB: Pancreatic stellate cells facilitate pancreatic cancer cell viability and invasion. *Oncol Lett* 17: 2057-2062, 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9816>
- LIU Y, DU L: Role of pancreatic stellate cells and periostin in pancreatic cancer progression. *Tumor Biol* 36: 3171-3177, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3386-2>
- LIU Z, KUANG W, ZHOU Q, ZHANG Y: TGF- β 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int J Mol* 42: 3395-3403, 2018. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3923>
- LUTTENBERGER T, SCHMID-KOTSAS A, MENKE A, SIECH M, BEGER H, ADLER G, GRÜNERT A, BACHEM MG: Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 80: 47-55, 2000. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780007>
- MA Q, WU H, XIAO Y, LIANG Z, LIU T: Upregulation of exosomal microRNA-21 in pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration and enhances Ras/ERK pathway activity. *Int J Oncol* 56: 1025-1033, 2020. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.4986>
- MA Y, HWANG RF, LOGSDON CD, ULLRICH SE: Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer. *Cancer Res* 73: 3927-3937, 2013. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4479>
- MACE TA, SHAKYA R, PITARRESI JR, SWANSON B, McQUINN CW, LOFTUS S, NORDQUIST E, CRUZ-MONSERRATE Z, YU L, YOUNG G, ZHONG X, ZIMMERS TA, OSTROWSKI MC, LUDWIG T, BLOOMSTON M, BEKAI-SAAB T, LESINSKI GB: IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumor progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut* 67: 320-332, 2018. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311585>
- MASAMUNE A, NAKANO E, HAMADA S, TAKIKAWA T, YOSHIDA N, SHIMOSEGAWA T: Alteration of the microRNA expression profile during the activation of pancreatic stellate cells. *Scand J Gastroenterol* 49: 323-331, 2014. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.876447>
- MASAMUNE A, SAKAI Y, KIKUTA K, SATOH M, SATOH A, SHIMOSEGAWA T: Activated rat pancreatic stellate cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Pancreas* 25: 78-85, 2002. <https://doi.org/10.1097/00006676-200207000-00018>
- MASAMUNE A, YOSHIDA N, HAMADA S, TAKIKAWA T, NABESHIMA T, SHIMOSEGAWA T: Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce activation and profibrogenic activities in pancreatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 495: 71-77, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.141>
- MCCARROLL JA, PHILLIPS PA, PARK S, DOHERTY E, PIROLA RC, WILSON JS, APTE MV: Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? *Pancreas* 27: 150-160, 2003. <https://doi.org/10.1097/00006676-200308000-00008>
- MCCARROLL JA, PHILLIPS PA, SANTUCCI N, PIROLA RC, WILSON JS, APTE MV: Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 55: 79-89, 2006. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.064543>
- MIKNYOCZKI SJ, LANG D, HUANG L, KLEIN-SZANTO AJ, DIONNE CA, RUGGERI BA: Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int J Cancer* 81: 417-427, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990505\)81:3<417::aid-ijc16>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990505)81:3<417::aid-ijc16>3.0.co;2-6)
- MORRISON CD, PARVANI JG, SCHIEMANN WP: The relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET programs. *Cancer Lett* 341: 30-40, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.048>

- NAN L, QIN T, XIAO Y, QIAN W, LI J, WANG Z, MA J, MA Q, WU Z: Pancreatic Stellate Cells Facilitate Perineural Invasion of Pancreatic Cancer via HGF/c-Met Pathway. *Cell Transplant* 28: 1289-1298, 2019. <https://doi.org/10.1177/0963689719851772>
- NORBERG KJ, LIU X, FERNÁNDEZ MORO C, STRELL C, NANIA S, BLÜMEL M, BALBONI A, BOZÓKY, HEUCHEL RL, LÖHR JM: A novel pancreatic tumor and stellate cell 3D co-culture spheroid model. *BMC Cancer* 20: 475, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06867-5>
- OLIVARES O, MAYERS JR, GOUIRAND V, TORRENCE ME, GICQUEL T, BERGE L, LAC S, ROQUES J, LAVAUT MN, BERTHEZÈNE P, RUBIS M, SECQ V, GARCIA S, MOUTARDIER V, LOMBARDO D, IOVANNA JL, TOMASINI R, GUILLAUMOND F, VANDER HEIDEN MG, VASSEUR S: Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun* 8: 16031, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms16031>
- OMARY MB, COULOMBE PA, MCLEAN WH: Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351: 2087-2100, 2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040319>
- PANDOL S, GUKOVSKAYA A, EDDERKAOUI M, DAWSON D, EIBL G, LUGEA A: Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell [published correction appears in *J Gastroenterol Hepatol* 27: 990, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07013.x>
- PATEL MB, POTHULA SP, XU Z, LEE AK, GOLDSTEIN D, PIROLA RC, APTE MV, WILSON JS: The role of the hepatocyte growth factor/c-MET pathway in pancreatic stellate cell-endothelial cell interactions: antiangiogenic implications in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 35: 1891-1900, 2014. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu122>
- PEDERSEN N, LARSEN S, SEIDELIN JB, NIELSEN OH: Alcohol modulates circulating levels of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 in chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 39: 277-282, 2004. <https://doi.org/10.1080/00365520310008296>
- PETERSEN OH, SUTTON R: Ca²⁺ signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci* 27: 113-120, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.006>
- PHILLIPS PA, MCCARROLL JA, PARK S, WU MJ, PIROLA R, KORSTEN M, WILSON JS, APTE MV: Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52: 275-282, 2003. <https://doi.org/10.1136/gut.52.2.275>
- POTHULA SP, XU Z, GOLDSTEIN D, MERRETT N, PIROLA RC, WILSON JS, APTE MV: Targeting the HGF/c-MET pathway: stromal remodelling in pancreatic cancer. *Oncotarget* 8: 76722-76739, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20822>
- PROKOPCHUK O, LIU Y, HENNE-BRUNS D, KORNMANN M: Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br J Cancer* 92: 921-928, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602416>
- RICHARDS KE, ZELENIK AE, FISHEL ML, WU J, LITTLEPAGE LE, HILL R: Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 36: 1770-1778, 2017. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.353>
- ROW S, LIU Y, ALIMPERTI S, AGARWAL SK, ANDREADIS ST: Cadherin-11 is a novel regulator of extracellular matrix synthesis and tissue mechanics. *J Cell Sci* 129: 2950-2961, 2016. <https://doi.org/10.1242/jcs.183772>
- SARPER M, CORTES E, LIEBERTHAL TJ, DEL RÍO HERNÁNDEZ A: ATRA modulates mechanical activation of TGF- β by pancreatic stellate cells. *Sci Rep* 6:27639, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep27639>
- SATO Y, ENDO H, OKUYAMA H, TAKEDA T, IWAHASHI H, IMAGAWA A, YAMAGATA K, SHIMOMURA I, INOUE M: Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro. *J Biol Chem* 286: 12524-12532, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194738>
- SEIFERT AM, LIST J, HEIDUK M, ET AL: Gamma-delta T cells stimulate IL-6 production by pancreatic stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 146: 3233-3240, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03367-8>
- SHAO F, CAI M, FAN FF, HUANG M, TAO Y, WANG C, MENG FT, HUANG Q: Overexpression of circRNA chr7:154954255-154998784+ in cancer-associated pancreatic stellate cells promotes the growth and metastasis of pancreatic cancer by targeting the miR-4459/KIAA0513 axis. *Am J Transl Res* 12: 5048-5063, 2020.

- SHEK FW, BENYON RC, WALKER FM, MCCRUDDEN PR, PENDER SL, WILLIAMS EJ, JOHNSON PA, JOHNSON CD, BATEMAN AC, FINE DR, IREDALE JP: Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 160: 1787-1798, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)61125-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)61125-x)
- SHERMAN MH, YU RT, ENGLE DD, DING N, ATKINS AR, TIRIAC H, COLLISSEON EA, CONNOR F, VAN DYKE T, KOZLOV S, MARTIN P, TSENG TW, DAWSON DW, DONAHUE TR, MASAMUNE A, SHIMOSEGAWA T, APTE MV, WILSON JS, NG B, LAU SL, GUNTON JE, WAHL GM, HUNTER T, DREBIN JA, O'DWYER PJ, LIDDLE C, TUVESON DA, DOWNES M, EVANS RM: Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* 159: 80-93, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.007>
- SHIMIZU K, KOBAYASHI M, TAHARA J, SHIRATORI K: Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 128: 2105-2118, 2005. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.025>
- SPARMANN G, KRUSE ML, HOFMEISTER-MIELKE N, KOCZAN D, JASTER R, LIEBE S, WOLFF D, EMMRICH J: BONE marrow-derived pancreatic stellate cells in rats. *Cell Res* 20: 288-298, 2010. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.10>
- STORCK H, HILD B, SCHIMMELPFENNIG S, SARGIN S, NIELSEN N, ZACCAGNINO A, BUDE T, NOVAK I, KALTHOFF H, SCHWAB A: Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration. *Oncotarget* 8: 769-784, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13647>
- STORZ G: An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* 296: 1260-1263, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1072249>
- SUETSUGU A, SNYDER CS, MORIWAKI H, SAJI S, BOUVET M, HOFFMAN RM: Imaging the Interaction of Pancreatic Cancer and Stellate Cells in the Tumor Microenvironment during Metastasis. *Anticancer Res* 35: 2545-2551, 2015.
- SUN L, XIU M, WANG S, BRIGSTOCK DR, LI H, QU L, GAO R: Lipopolysaccharide enhances TGF-β1 signalling pathway and rat pancreatic fibrosis. *J Cell Mol Med* 22: 2346-2356, 2018. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13526>
- SUZUKI R, ASAMA H, WARAGAI Y, TAKAGI T, HIKICHI T, SUGIMOTO M, KONNO N, WATANABE K, NAKAMURA J, KIKUCHI H, SATO Y, MARUBASHI S, MASAMUNE A, OHIRA H: Fibrosis-related miRNAs as serum biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 9: 4451-4460, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23377>
- TULACHAN SS, DOI R, KAWAGUCHI Y, TSUJI S, NAKAJIMA S, MASUI T, KOIZUMI M, TOYODA E, MORI T, ITO D, KAMI K, FUJIMOTO K, IMAMURA M: All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 52: 76-84, 2003. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.76>
- UYAMA N, ZHAO L, VAN ROSSEN E, HIRAKO Y, REYNAERT H, ADAMS DH, XUE Z, LI Z, ROBSON R, PEKNY M, GEERTS A: Hepatic stellate cells express synemin, a protein bridging intermediate filaments to focal adhesions. *Gut* 55: 1276-1289, 2006. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.078865>
- VAN ROSSEN E, LIU Z, BLIJWEERT D, EYSACKERS N, MANNAERTS I, SCHROYEN B, EL TAGHDOUNI A, EDWARDS B, DAVIES KE, SOKAL E, NAJIMI M, REYNAERT H, VAN GRUNSVEN LA: Syncoilin is an intermediate filament protein in activated hepatic stellate cells. *Histochem Cell Biol* 141: 85-99, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1142-5>
- VON KUPFFER C: Ueber Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Prof. Waldyer. *Arch mikr Anat* 12: 353-358, 1876.
- VONLAUFEN A, XU Z, DANIEL B, KUMAR RK, PIROLA R, WILSON J, APTE MV: Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology* 133: 1293-1303, 2007. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.062>
- WAKE K. Hepatic Stellate Cells. In: Tanikawa K., Ueno T: (eds) *Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells*. Springer, Tokyo, 1999. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67935-6_3

- WANG H, JIANG Y, LU M, SUN B, QIAO X, XUE D, ZHANG W: STX12 lncRNA/miR-148a/SMAD5 participate in the regulation of pancreatic stellate cell activation through a mechanism involving competing endogenous RNA. *Pancreatology* 17: 237-246, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.01.010>
- WANG Q, WANG H, JING Q, YANG Y, XUE D, HAO C, ZHANG W: Regulation of Pancreatic Fibrosis by Acinar Cell-Derived Exosomal miR-130a-3p via Targeting of Stellate Cell PPAR- γ . *J Inflamm Res* 14: 461-477, 2021. <https://doi.org/10.2147/JIR.S299298>
- WATARI N, HOTTA Y, MABUCHI Y: Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 58: 837-58, 1982. <https://doi.org/10.2535/ofaj1936.58.4-6.837>
- WU N, XU XF, XIN JQ, FAN JW, WEI YY, PENG QX, DUAN LF, WANG W, ZHANG H: The effects of nuclear factor-kappa B in pancreatic stellate cells on inflammation and fibrosis of chronic pancreatitis. *J Cell Mol Med* 25: 2213-2227, 2021. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16213>
- WU Y, ZHANG C, JIANG K, WERNER J, BAZHIN AV, D'HAESE JG: The role of stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting perspectives. *Front Oncol* 10: 621937, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.621937>
- WU YS, CHUNG I, WONG WF, MASAMUNE A, SIM MS, LOOI CY: Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861: 296-306, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.006>
- XIN L, GAO J, WANG D, LIN JH, LIAO Z, JI JT, DU TT, JIANG F, HU LH, LI ZS: Novel blood-based microRNA biomarker panel for early diagnosis of chronic pancreatitis. *Sci Rep* 7: 40019, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep40019>
- XU J, LIU S, YANG X, CAO S, ZHOU Y: Paracrine HGF promotes EMT and mediates the effects of PSC on chemoresistance by activating c-Met/PI3K/Akt signaling in pancreatic cancer in vitro. *Life Sci* 263: 118523, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118523>
- XU M, WANG G, ZHOU H, CAI J, LI P, ZHOU M, LU Y, JIANG X, HUANG H, ZHANG Y, GONG A: TGF- β 1-miR-200a-PTEN induces epithelial-mesenchymal transition and fibrosis of pancreatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 431: 161-168, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-2988-y>
- XU XF, LIU F, XIN JQ, FAN JW, WU N, ZHU LJ, DUAN LF, LI YY, ZHANG H: Respective roles of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members in pancreatic stellate cell activation induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *Biochem Biophys Res Commun* 501: 365-373, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.176>
- XU Z, VONLAUFEN A, PHILLIPS PA, FIALA-BEER E, ZHANG X, YANG L, BIANKIN AV, GOLDSTEIN D, PIROLA RC, WILSON JS, APTE MV: Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 177: 2585-2596, 2010. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090899>
- XUE J, ZHAO Q, SHARMA V, NGUYEN LP, LEE YN, PHAM KL, EDDERKAOUI M, PANDOL SJ, PARK W, HABTEZION A: Aryl hydrocarbon receptor ligands in cigarette smoke induce production of Interleukin-22 to promote pancreatic fibrosis in models of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 151: 1206-1217, 2016. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.064>
- XUE R, WANG J, YANG L, LIU X, GAO Y, PANG Y, WANG Y, HAO J: Coenzyme Q10 Ameliorates Pancreatic Fibrosis via the ROS-Triggered mTOR Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 8039694, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8039694>
- XUE R, YANG J, WU J, MENG Q, HAO J: Coenzyme Q10 inhibits the activation of pancreatic stellate cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncotarget* 8: 92300-92311, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21247>
- YAN Z, OHUCHIDA K, FEI S, ZHENG B, GUAN W, FENG H, KIBE S, ANDO Y, KOIKAWA K, ABE T, IWAMOTO C, SHINDO K, MORIYAMA T, NAKATA K, MIYASAKA Y, OHTSUKA T, MIZUMOTO K, HASHIZUME M, NAKAMURA M: Inhibition of ERK1/2 in cancer-associated pancreatic stellate cells suppresses cancer-stromal interaction and metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 38: 221, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1226-8>

- YANCOPOULOS GD, DAVIS S, GALE NW, RUDGE JS, WIEGAND SJ, HOLASH J: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000. <https://doi.org/10.1038/35025215>
- YANG Y, KIM JW, PARK HS, LEE EY, YOON KH: Pancreatic stellate cells in the islets as a novel target to preserve the pancreatic β -cell mass and function. *J Diabetes Investig* 11: 268-280, 2020. <https://doi.org/10.1111/jdi.13202>
- YANG Y, YU X, HUANG L, YU C: GLP-1R agonist may activate pancreatic stellate cells to induce rat pancreatic tissue lesion. *Pancreatol* 13: 498-501, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2013.07.281>
- ZHA M, LI F, XU W, CHEN B, SUN Z: Isolation and characterization of islet stellate cells in rat. *Islets* 6: e28701, 2014. <https://doi.org/10.4161/isl.28701>
- ZHANG Y, WARE MB, ZAIDI MY, RUGGIERI AN, OLSON BM, KOMAR H, FARREN MR, NAGARAJU GP, ZHANG C, CHEN Z, SARMIENTO JM, AHMED R, MAITHEL SK, EL-RAYES BF, LESINSKI GB: Heat Shock Protein-90 Inhibition Alters Activation of Pancreatic Stellate Cells and Enhances the Efficacy of PD-1 Blockade in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther* 20: 150-160, 2021. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0911>
- ZHANG Y, YAN W, COLLINS MA, BEDNAR F, RAKSHIT S, ZETTER BR, STANGER BZ, CHUNG I, RHIM AD, DI MAGLIANO MP: Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Res* 73: 6359-6374, 2013. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1558-T>
- ZHOU W, CHEN L, LI C, HUANG R, GUO M, NING S, JI J, GUO X, LOU G, JIA X, ZHAO J, LUO F, LI C, QU Z, YU S, TAI S: The multifaceted roles of long noncoding RNAs in pancreatic cancer: an update on what we know. *Cancer Cell Int* 20: 41, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1126-1>
- ZHOU Y, SUN B, LI W, ZHOU J, GAO F, WANG X, CAI M, SUN Z: Pancreatic stellate cells: a rising translational physiology star as a potential stem cell type for beta cell neogenesis. *Front Physiol* 10: 218, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00218>
- ZHOU Y, WANG H, ZHOU J, QIU S, CAI T, LI H, SHEN Z, HU Y, DING B, LUO M, HUANG R, YAN R, XU W, HE C, ZHANG Y, LI F, SUN Z, MA J: Vitamin A and its multi-effects on pancreas: recent advances and prospects. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 620941, 2021. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.620941>
- ZHOU Y, ZHOU J, SUN B, XU W, ZHONG M, LI Y, HE C, CHEN Y, WANG X, JONES PM, SUN Z: Vitamin A deficiency causes islet dysfunction by inducing islet stellate cell activation via cellular retinol binding protein 1. *Int J Biol Sci* 16: 947-956, 2020. <https://doi.org/10.7150/ijbs.37861>