

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**I. LÉKAŘSKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

MUDr. Pavel Hrabák

Biomarkery u karcinomu pankreatu

Biomarkers in pancreatic cancer

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

Konzultant: doc. MUDr. Tomáš Krechler, CSc.

Praha, 30.6. 2024

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

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

1. LF UK v Praze

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

Konzultant: doc. MUDr. Tomáš Krechler, CSc.

Obsah

1. Abstrakt.....	4
2. Abstract.....	5
3. Úvod.....	7
4. Hypotézy a cíle práce	7
5. Materiál a metodika.....	9
6. Výsledky.....	10
6.1. Výsledky studie I.....	10
6.2. Výsledky studie II	16
7. Diskuse.....	17
8. Závěry.....	22
9. Použitá literatura.....	25
10. Seznam publikací	28
10.1. Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace.....	28
10.1.1. Publikace s impact faktorem....	28
10.2. Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace.....	28
10.2.1. Publikace s IF.....	28
10.2.2. Publikace bez IF.....	29

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, ferritin odliší PDAC od zdravých jedinců, panel „CA19-9, S100P-plazma, AAT, albumin, adiponectin, 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.

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 than CA 19-9. After exclusion of CA19-9 from the panels, set of markers „CEA, HbA1c, AST, HDL-cholesterol, 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.

3. Úvod

Karcinom pankreatu (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) patří mezi nezávažnější onemocnění trávicí soustavy. Je 8. 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. 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) 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.

4. Hypotézy a cíle práce

Chronická pankreatitida, PDAC a T2DM jsou onemocnění s komplexními dopady na organismus. Domníváme se, že analýzou širokého spektra

parametrů lze identifikovat specifické biomarkery nebo jejich skupiny, které umožní časnou diagnostiku karcinomu pankreatu i mezi rizikovými skupinami pacientů. Potenciálním zdrojem nových biomarkerů může být i vztah mezi buňkami nádorového stroma, zejména pankreatickými stelátními buňkami, a buňkami nádorovými. Vzhledem k vlivu PSC, retinolu a ATRA na fyziologii pankreatu se domníváme, že změny v koncentracích ATRA a retinolu mohou korespondovat s rozvojem patologických stavů pankreatické tkáně, případně sloužit jako biomarker PDAC.

Konkrétní cíle práce, jejímž základem jsou dvě studie:

Studie I : Biomarkery u karcinomu pankreatu

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 pacientů s PDAC, ChP, T2DM a zdravých kontrol

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

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

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

5. Materiál a metodika

Do **studie I (Biomarkery u karcinomu pankreatu)** 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

Do **studie II (Hladiny retinolu a ATRA u pacientů s PDAC , ChP, T2DM a zdravých kontrol)** 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.

Vzorky žilní krve byly získávány odběrem do zkumavek bez přidání antikoagulancií k získání séra. K získání plazmy byly vzorky odebírány do zkumavek s EDTA. Základní biochemické parametry byly stanovovány v rámci běžných vyšetření krve. Vzorky krve k analýze speciálních parametrů byly centrifugovány při rychlosti 1450 ot./min 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.

Sérové hladiny IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 byly stanovovány pomocí kitů ELISA firmy Mediagnost, Německo. Koncentrace osteopontinu, TIMP-1, MCP-1, HSP-27, MMP-9 a ICAM-1 byly stanoveny pomocí ELISA kitů firmy eBioscience (nyní Invitrogen). Koncentrace HSP60,

HSP70 byly stanovovány metodou ELISA kity firmy StressMarq, Kanada). Pro stanovení koncentrací proteinu MMP-7 jsme použili metodu ELISA firmy R&D Systems, USA. Koncentrace DJ-1, ALCAM, CEACAM-1 jsme měřili pomocí metody ELISA kity Abnova, Taiwan. 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;

6. Výsledky

6.1. Výsledky Studie I: biomarkery u karcinomu pankreatu

Naměřené koncentrace jednotlivých parametrů uvádíme v **tabulce 1**. 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. (**tabulka 2**)

	<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±1219 3,2	17303,1±7783	*, %
<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 (ukat/l)</i>	2,5±3,6	1±0,3	1,8±2	1±0,2	***, &&&, %%%
<i>ALT (ukat/l)</i>	0,9±0,8	0,6±0,3	0,6±0,5	0,5±0,2	***, &&, %%%
<i>AMS-P (ukat/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 (ukat/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	** , \$\$, &&, %%
<i>CEA (μg/l)</i>	3,3±3,6	1,7±1,2	2±1,5	1±0,6	***, \$, &&&, %%%
<i>CEACAM (NG/ML)</i>	89,3±95,3	47,2±48,1	75,6±75,8	46,9±11,9	** , &&, %%
<i>CHOL (mmol/l)</i>	4,8±1,1	4,7±1,1	4,8±1,2	5,7±1,1	***, %%
<i>C-PEPTID (nmol/l)</i>	0,8±0,5	1,1±0,4	0,7±0,3	0,8±0,2	***, &
<i>CRP (mg/ml)</i>	22,2±44,5	4,3±5,2	9,4±19,5	3±4	***, &&&, %%%

<i>DJ-1 (ng/ml)</i>	52,3±85,1	18,1±11,1	38,4±35,6	38,2±39,9	**, &&
<i>FERRITIN (µg/l)</i>	358,7±371,1	211,4±229,9	207,6±197,5	124,5±119,6	***, %%%
<i>GGT (µkat/l)</i>	4,4±10,5	0,7±0,7	2,6±8,6	0,5±0,3	*, &, %
<i>HBA1C (mmol/mol)</i>	45,5±11,6	49,5±29,3	42,6±12,9	34,8±5,5	**
<i>FRUKTOSAMIN (µmol/l)</i>	247,1±44,6	261,4±59,2	245±37,9	229,8±17	**
<i>GLYKÉMIE (mmol/l)</i>	6,8±2,4	7,5±2,3	6,1±2,8	4,9±0,6	***, %%%
<i>HDL-CHOL (mmol/l)</i>	1,2±0,4	1,3±0,3	1,4±0,6	1,5±0,4	**, %
<i>HSP27 (pg/ml)</i>	2485,6±140 0,4	1499,4±834, 4	1712,6±634,5	1838,3±1059, 5	***, \$\$, &&&, %
<i>HSP60 (mg/ml)</i>	4963,7±138 3,1	4226,7±142 6,6	4639,2±1440, 1	5157±1749,1	*
<i>HSP70 (ng/ml)</i>	32,8±33,2	19,3±30,4	27,6±25,8	24,7±26,6	
<i>IGF-1 (ng/ml)</i>	124,6±51,1	162,4±56,7	170,2±82,5	184,7±46,1	***, \$\$, &, %%%
<i>IGF-2 (ng/ml)</i>	535,8±183,6	743,1±236,5	646,6±200,7	744,7±127,6	***, &&&, %%%
<i>IGFBP-1 (ng/ml)</i>	11,8±8,1	5,5±4,6	12,9±11,9	6,7±6,6	***, &&&, %
<i>IGFBP-2 (ng/ml)</i>	597±295,9	299,6±198,9	575,6±272,2	330,7±143	***, &&&, %%%
<i>IGFBP-3 (ng/ml)</i>	2427,3±552, 8	2622±686,3	2483,8±587,5	2695,8±411,3	
<i>INZULIN (U/ml)</i>	9,2±7,5	14,4±8,5	8,6±8	8,7±3,8	***, &
<i>LEPTIN (ng/ml)</i>	12,3±11,3	19,4±14,3	6,4±8,3	13,5±12,4	***
<i>MCP-1 (pg/ml)</i>	897,6±785,2	690,3±537,7	786,4±595,1	812,9±823,4	
<i>MIC-1 (pg/ml)</i>	3715,9±233 6,1	3351,8±202 2,2	2789±1953,2	1257±733,7	***, %%%
<i>MIDKINE (ng/ml)</i>	0±0	0±0,1	0,4±2,3	0±0,1	

<i>MMP-7 (ng/ml)</i>	2,3±1,1	1,5±0,7	1,5±1	0,9±0,5	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>MMP-9 (ng/ml)</i>	202±179,7	197±180,5	197,7±173	140,7±124,9	
<i>OPG (pmol/l)</i>	8±3	6,4±2	7,2±5	4,8±1,5	***, %%%
<i>PANDER (ng/ml)</i>	9,3±20,8	10,5±22,7	4,6±15,3	5,5±15,1	
<i>PCT (µg/l)</i>	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	*, &
<i>PREALBUMIN (g/l)</i>	0,2±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>REGIA (ng/ml)</i>	264,1±203,3	171,8±107,4	175,6±116,9	89,8±42,8	*** \$\$ &&& %%%
<i>REG3A (U/ml)</i>	685,4±555,8	315±287,4	469,9±513,8	173,9±90,9	***, &&&, %%%
<i>S100A11 (ng/ml)</i>	7,2±6,1	5±6,6	3,7±2,1	3,6±2,5	**\$, \$\$, %%
<i>S100A6 (ng/ml)</i>	99,2±105,9	46±25,1	75,7±34,6	68,9±37,9	***, &&&
<i>S100P-PLAZMA (ng/ml)</i>	13,6±17,8	5,5±4,9	4,3±3,6	4,5±4	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>S100P-SÉRUM (ng/ml)</i>	17±13,4	8,9±4,3	14,2±6,7	11,9±6,8	***, &&&, %
<i>SAA (mg/ml)</i>	28,8±58,2	10,7±26,2	26,4±62,6	5,5±3,2	*
<i>SATURACE TRANSFERRINU (%)</i>	24±12,3	26,3±10,7	32,4±11,7	26,6±12,1	
<i>SLCAM-1 (ng/ml)</i>	577±209,9	405,2±104	510,5±202,7	377,1±75,9	***, &&&, %%%
<i>SRAGE (pg/ml)</i>	550,5±213	530±175,1	614,8±234,4	543±221,4	
<i>TAG (mmol/l)</i>	1,4±0,7	1,8±1	1,4±1,1	1,4±1	
<i>TFF1 (ng/ml)</i>	3,6±3	3,5±3,9	3±3	1,4±1	***, %%
<i>TIMP-1 (ng/ml)</i>	655,9±290	619,1±748,6	556,7±252,2	458,1±126,6	
<i>CB (g/l)</i>	66±7,8	70,8±5,1	71,4±6,1	71,1±4,8	***, \$\$\$, &&&, %%%
<i>TRANSFERRIN (g/l)</i>	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 1: **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 adhezni 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 podobný 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 – procalcitonin; 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 faktor (PANcreatic DERived facto

	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, ChP, KONTROLY	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 2: 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

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, ferritin

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, 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.

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

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

Koncentrace all-trans-retinové kyseliny byly u PDAC signifikantně sníženy ve srovnání s T2DM (1,14±0,49µg/l vs 1,37±0,56µg/l, p<0,001) a zdravými kontrolami ((1,14±0,49µg/l vs 1,43±0,55µg/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±0,47 µg/l; retinol: 0,42±0,19 mg/l) a IV PDAC (ATRA: 1,07±0,45 µg/l, , retinol: 0,40±0,15 mg/l) vs zdravé kontroly

(ATRA: $1,43 \pm 0,55$ $\mu\text{g/l}$, retinol: $0,61 \pm 0,15$ mg/l) a T2DM (ATRA: $1,37 \pm 0,56$ $\mu\text{g/l}$, retinol: $0,65 \pm 0,19$ 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 stádiích PDAC nejsou hladiny ATRA ani retinolu statisticky významně odlišné od ostatních skupin.

7. Diskuse

Naše práce ukazuje, že přidání biomarkerů k CA19-9 je možnou cestou zvýšení efektivitu tohoto markeru.

V našem souboru se 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, 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. Jde o 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 parametry zánětu (CRP, adiponektin, AAT, OPG, SAA). Tyto parametry mohou zčásti odrážet malnutriční stav a přítomnost zánětlivých změn u PDAC či ChP, což je považováno za negativní prognostický faktor PDAC, zejména je-li přítomna sarkopénie či kachexie. (Dell'Aquila E. et al., 2020)

Výsledky iniciační 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.

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 neprokázali.

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)

Spojujícím článkem mezi buňkami PDAC a nádorovým stroma jsou pankreatické stelátní buňky. Jejich aktivace je úzce svázána s metabolismem retinolu.

Hladiny retinolu, stejně jako ATRA – jeho aktivního metabolitu – byly v naší práci (s výjimkou ATRA u ChP vs PDAC) u pacientů s PDAC statisticky významně nižší nežli v ostatních skupinách. 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.

Změny v koncentrací retinolu lze u malnutričních pacientů se závažnou malignitou očekávat. V naší práci jsme však neprokázali korelaci některých ostatních 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. (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.

Úspěšné využití ATRA jako terapeutické modality 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, Wang K. et al., 2019, Kakwere H. et al., 2020, Kocher HM. et al., 2020)

Retinol, ATRA a chronická pankreatitida

Studie, zabývající se hladinami retinoidů u ChP nám dávají mnohdy protichůdné informace. (Duggan SN. et al., 2014) 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 <0,15mg/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, M. et al., 1991, Taneera J. et al., 2021)

Naše práce tedy alespoň částečně přispívá do skládky patofyziologie metabolismu retinoidů u T3DM, 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 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 statisticky významné změny hladin obou látek ve srovnání se zdravými kontrolami. (Han Y. et al., 2021)

8. 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.

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, ferritin, GGT, glykémie, HDL cholesterol, HSP27, IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-2, inzulín, 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, ferritin“ odliší karcinom pankreatu od zdravých kontrol a panel „CA19-9, S100P-plazma, 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 CA 19-9 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.

c/ 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.

d/ Výsledky naší práce nepotvrzují ATRA ani retinol jako diagnostické markery časného PDAC, neboť časná stadia tohoto onemocnění nedokáží odlišit od pacientů s ChP, T2DM ani od zdravých kontrol.

e/ Analýzou korelací mezi ATRA, retinolem a ostatními měřeními 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-mediovanými signálními drahami a metabolismem ATRA u tohoto onemocnění.

Naše práce tedy celkově potvrzuje důležitost interakce nádorového stroma s nádorovými buňkami jakožto diagnostického i terapeutického cíle. Vzhledem k tomu, že možnosti diagnostiky časného PDAC je stále velmi limitované, může v budoucnu výrazněji ke zlepšení terapie tohoto onemocnění

přispět spolu s rozvojem onkologické terapie i identifikace biomarkerů, které svědčí pro účinnost jednotlivých modalit onkologické léčby.

9. Literatura:

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

10. Seznam publikací autora

10.1. Publikace s IF, které jsou základem 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**

10.2. Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

10.2.1. Publikace s IF

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)

10.2.2. Publikace bez IF

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)