

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Diagnostika karcinomu pankreatu

MUDr. Bohuš Bunganič

Praha 2021

Studijní obor: Zobrazovací metody

Předseda oborové rady: Doc. MUDr. Andrea Burgetová, PhD.

Školící pracoviště: Interní klinika Vojenské fakultní nemocnice a ÚVN

Školitel: prof. MUDr. Miroslav Zavoral, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Přemysl Frič, DrSc.

Obsah

1	ABSTRAKT ČESKY	4
2	ABSTRAKT ANGLICKY	5
3	CÍLE	6
4	BUNGANIČ B, LACLAV M, DVOŘÁKOVÁ T ET AL.: ACCURACY OF EUS AND CEH EUS FOR THE DIAGNOSIS OF PANCREATIC TUMOURS. SCAND J GASTROENTEROL. 2018; 53(10–11):1411–1417.	7
4.1	CÍLE	7
4.2	METODIKA	7
4.3	VÝSLEDKY	7
4.3.1	<i>Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí EUS</i>	7
4.3.2	<i>Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí CEH EUS</i>	7
4.3.3	<i>Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí EUS FNA</i>	7
4.3.4	<i>Interobservační shoda</i>	7
4.4	ZÁVĚR A ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ	7
5	BUNGANIČ B, HÁLKOVÁ T, BENEŠOVÁ L ET AL. VYŠETŘENÍ MUTACE KRAS V EUS-FNA PREPARÁTECH PACIENTŮ S TUMOREM PANKREATU [KRAS MUTATION ASSAY ON EUS-FNA SPECIMENS FROM PATIENTS WITH PANCREATIC MASS]. CAS LEK CESK. 2016;155(1):48–51.	8
5.1	CÍLE	8
5.2	MATERIÁL A METODY	8
5.3	VÝSLEDKY	9
5.3.1	<i>Diagnostika pomocí endosonografie</i>	9
5.3.2	<i>Diagnostika pomocí EUS FNA</i>	9
5.3.3	<i>Genetická analýza</i>	9
5.3.4	<i>Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce</i>	10
6	BENESOVA L, HALKOVA T, BUNGANIC B ET AL. COMPARISON OF NATIVE ASPIRATES AND CYTOLOGICAL SMEARS OBTAINED BY EUS-GUIDED BIOPSIES FOR EFFECTIVE DNA/RNA MARKER TESTING IN PANCREATIC CANCER. PATHOL ONCOL RES. 2020 JAN;26(1):379–385.	10
6.1	CÍLE	10
6.2	METODIKA	10
6.3	VÝSLEDKY	11
6.3.1	<i>Prediktivní role exprese miR-21</i>	11
6.3.2	<i>EUS FNC</i>	11
6.3.3	<i>EUS FNA</i>	11
6.4	DISKuze, ZÁVĚR A ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ CÍLŮ A HYPOTÉZ PRÁCE	11
7	BUNGANIČ B, ŠŤOVÍČKOVÁ L, TATARKOVIČ M ET AL. MOLEKULÁRNĚ SPEKTROSKOPICKÁ ANALÝZA KREVNÍ PLASMY: CESTA K DIAGNOSTICE KARCINOMU PANKREATU? GASTROENT HEPATOL 2015, 69(6): 518-524. 12	
7.1	CÍLE	12
7.2	MATERIÁL A METODY	12
7.3	VÝSLEDKY	12
7.3.1	<i>Ramanova spektroskopie</i>	12
7.3.2	<i>Ramanova optická aktivita</i>	13
7.3.3	<i>Elektronový cirkulární dichroismus</i>	13
7.4	ZÁVĚR A ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ PRÁCE	13
8	HABARTOVÁ L, BUNGANIČ B, TATARKOVIČ M ET AL. CHIROPTICAL SPECTROSCOPY AND METABOLOMICS FOR BLOOD-BASED SENSING OF PANCREATIC CANCER. CHIRALITY. 2018 MAY;30(5):581-591 14	
8.1	CÍLE	14
8.2	METODIKA	14
8.3	VÝSLEDKY	14

8.3.1	<i>Klinicky známé markery spojované s karcinogenezí</i>	14
8.3.2	<i>Identifikace nových metabolitů typických pro KP</i>	14
8.4	ZÁVĚR A ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ PRÁCE	15
9	BIBLIOGRAFIE	15
10	SEZNAM PUBLIKACÍ	22
10.1	PUBLIKACE S IF	22
10.1.1	<i>Přímá souvislost s disertační prací</i>	22
10.1.2	<i>Nepřímá souvislost s disertační prací</i>	22
10.2	PUBLIKACE BEZ IF	23
10.2.1	<i>Přímá souvislost s disertační prací</i>	23
10.2.2	<i>Nepřímá souvislost s disertační prací</i>	23
10.3	PUBLIKACE KTERÉ NESOUVISÍ S DISERTAČNÍ PRACÍ	23
10.3.1	<i>Publikace s IF</i>	23
10.3.2	<i>Publikace bez IF</i>	24

1 Abstrakt česky

Karcinom pankreatu je maligní onemocnění s nepříznivou prognózou. V současnosti se diagnostika karcinomu pankreatu opírá zejména o zobrazovací metody CT, MR a EUS, protože spolehlivý biomarker karcinomu pankreatu není dostupný. Za úspěch je v současné klinické praxi považováno, pokud se podaří selektovat pacienty vhodné k chirurgické resekcii, v této skupině je celkové přežití mírně lepší než ve skupině, kde chirurgický výkon není technicky možný.

Předkládaná disertační práce se v první části zabývá testováním již zavedených zobrazovacích diagnostických metod používaných v běžné praxi EUS a EUS FNA a navíc moderními vyšetřovacími možnostmi s využitím kontrastní endosonografie (CEH EUS) a srovnání přesnosti zmiňovaných metod. Byla potvrzena dominantní role EUS FNA.

V další fázi práce byl testován metodický postup EUS FNA odběru a předúpravy vzorku pankreatické tkáně s ohledem na množství a kvalitu pro epigenetická vyšetření a rovněž testováním prognostické role *KRAS* a miR-21. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším zdrojem biologického materiálu pro DNA a miRNA analýzy jsou cytologické nátěry, kde je kontaminace nenádorovou tkání nízká, a i když prognostická role *KRAS* je zanedbatelná, miR-21 vykazuje značné rozdíly v přežívání pacientů v závislosti na míře exprese.

V poslední části práce byl kladen důraz na vývoj a testování nových metod vhodných k detekci karcinomu pomocí vyšetření krevní plazmy. Jedná se o kombinaci spektroskopických metod a metabolomické analýzy. Ve spektrech byly identifikovány oblasti, které ukazují na patologické změny asociované s KP, zejména kolísající hladiny karotenoidů a aromatických aminokyselin, strukturní alterace proteinů a lipidů. Metabolomická analýza umožnila určit molekuly se specifickou vazbou ke kancerogenezi – tyrosin a guanosin a jejich deriváty, dále např. 8-isoprostan nebo deriváty karnitinu, jež úzce souvisejí s oxidačním stresem a poškozením buněčných membrán či genetické informace indukovanými přítomností karcinomu. Testovaná metodika vykazovala vyšší výkonnostní charakteristiky než současně využívaný klinický marker CA 19-9.

2 Abstrakt anglicky

Pancreatic cancer is a malignant disease with an unfavorable prognosis. Currently, the diagnosis of pancreatic cancer is based mainly on CT, MR and EUS imaging methods, because a reliable biomarker of pancreatic cancer is not available. It is considered a success in the current clinical practice if patients suitable for surgical resection can be selected, because in this group the overall survival is slightly better than in the group where surgery is not technically possible.

In the first part, the presented dissertation focuses on testing of already established imaging diagnostic methods used in common practice, *i.e.* EUS and EUS FNA, as well as modern examination possibilities, such as contrast endosonography (CEH EUS), and the comparison of the accuracy of the methods used. The dominant role of the EUS FNA was confirmed.

In the next phase of the work, the methodological procedure of EUS FNA collection and the preprocessing of pancreatic tissue samples was tested with regard to the quantity and quality for epigenetic examination and further testing using the prognostic role of *KRAS* and miR-21. It has been suggested that cytological smears are the most suitable source of biological material for DNA and miRNA analysis, where non-tumor tissue contamination is low. Although the prognostic role of *KRAS* is negligible, miR-21 showed differences in patient survival depending on its expression levels.

In the last part of the work, emphasis was placed on the development and testing of new methods for cancer detection using blood plasma testing *via* a combination of spectroscopic methods and metabolomics. Specific areas have been identified in the spectrum, which determine pathological changes associated with pancreatic cancer, especially fluctuating levels of carotenoids and aromatics, structural alterations in proteins and lipids. Metabolomics allowed for the identification of certain molecules with specific connection to carcinogenesis - tyrosine and guanosine and their derivatives, 8-isoprostane, or carnitine derivatives - which are closely related to oxidative stress, cell membrane or genetic information damage induced by the presence of cancer. The tested methodology showed higher performance characteristics than the currently employed clinical marker CA 19-9.

3 Cíle

V práci byl největší důraz kladen na diagnostiku karcinomu pankreatu pomocí zavedených zobrazovacích metod a jejich moderních alternativ, a dále na genetickou a molekulární diagnostiku s ohledem na jejich potenciál do budoucnosti. Zde je uveden výčet hlavních cílů disertační práce:

1. Diagnostika karcinomu pankreatu pomocí endosonografie

Tato část disertační práce poskytuje pohled na srovnání diagnostické přesnosti při EUS, CEH EUS a EUS FNA a rovněž na význam interobservační shody mezi různými endoskopujícími lékaři při provádění EUS a CEH EUS.

2. Diagnostika KP a využití materiálu získaného pomocí EUS FNA

V další části disertační práce bylo cílem hodnocení senzitivity KRAS testu s použitím různých typů vzorků pacientů s tumory pankreatu a testování vlivu přítomnosti mutace *KRAS* na prognózu přežití těchto pacientů. Dále byla práce doplněna o analýzu exprese miR-21 u pacientů s KP ve vzorcích EUS FNA a o zhodnocení prognostické role miR-21 vyjádřené délkou celkového přežití pacientů s KP, rovněž o hodnocení rozdílů exprese miR-21 mezi dvěma způsoby zpracování EUS jehlou aspirované tkáně.

3. Diagnostika KP na základě analýzy biomolekul krevní plazmy

Poslední část přináší výsledky práce z testování nových molekulárních metod diagnostiky KP, kde hlavním cílem bylo srovnání senzitivity a specifity jediného klinicky dostupného biomarkeru CA19-9 a nového spektrálního sérového biomarkeru. Jako navazující projekt byla analýza menších molekul s pomocí metabolomického vyšetření.

4 Bunganič B, Laclav M, Dvořáková T et al.: Accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours. Scand J Gastroenterol. 2018; 53(10–11):1411–1417.

4.1 Cíle

Porovnání diagnostické přesnosti EUS, CEH EUS a EUS FNA v diagnostice karcinomu pankreatu a míry interobservační shody mezi různými endoskopujícími lékaři u EUS a CEH EUS.

4.2 Metodika

Do studie bylo podle inkluzních kritérií zařazeno 116 pacientů s tumorem detekovaným a popsáným na CT vyšetření. Medián věku byl 67.5 let (minimum 38 a maximum 86 let), 54 z celkového počtu bylo žen a 62 mužů. Z celkového počtu bylo detekováno a potvrzeno 73 pacientů s karcinomem pankreatu, 14 s neuroendokrinním tumorem, 20 s jinými tumory.

4.3 Výsledky

4.3.1 Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí EUS

Senzitivita, specificita, negativní prediktivní hodnota a pozitivní prediktivní hodnota a přesnost EUS pro diagnózu karcinomu pankreatu byla 83,1% (CI 72,34–90,95 %), 62,5% (CI 43,69–78,90 %), 83,1 % (CI 75,64–88,62 %), 70,7 % (CI 48,24–74,88 %) a 78,6 % (CI 67,34–84,46 %). ($p < 0,001$, $\kappa = 0,45$, Spearman $R = 0,45$)

4.3.2 Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí CEH EUS

Senzitivita, specificita, NPV, PPV a přesnost CEH EUS pro diagnózu karcinomu pankreatu byla 94,5 % (CI 86,56–98,49 %), 61,7% (CI 43,56–77,83), 84,1 % (CI 77,53–89,09 %), 84 % (CI 66,14–93,38 %) a 84,1 % (CI 75,79–90,46 %), ($p < 0,001$, $\kappa = 0,60$, Spearman $R = 0,62$)

4.3.3 Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí EUS FNA

Senzitivita, specificita, NPV, PPV a přesnost pro EUS FNA a karcinom pankreatu byla 87,6% (CI 77,88–94,2%), 91,2% (CI 76,32–98,14%), 95,5% (CI 87,83–98,44%), 77,5% (CI 64,93–86,50%) a 88,8% (CI 81,23–94,07%), ($p < 0,001$, $\kappa = 0,75$, Spearman $R = 0,76$)

4.3.4 Interobservační shoda

Interobservační shoda mezi pozorovateli pro EUS marker KP byla dobrá ($\kappa = 0,75$) a ta pro CEH EUS byla průměrná ($\kappa = 0,59$ pro arteriální fázi a $\kappa = 0,68$ pro „wash out“ ve venózní fázi).

4.4 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz

CEH EUS je metoda umožňující přesnější identifikaci karcinomu pankreatu s vyšší přesností než konvenční EUS. Zejména pokud se objeví hypoechancement v průběhu venózní fáze, nazývané „wash out“, maligní etiologie tumoru je vysoce pravděpodobná. V určení diagnózy

NET má EUS a CEH EUS nižší přesnost, včetně statistické významnosti. Nejvyšší přesnost má v diagnostice karcinomu pankreatu EUS FNA, která je právem pokládána za metodu „zlatého standardu“. V případě, že EUS FNA není indikována či je kontraindikována, přináší aplikace CEH EUS v diagnostice KP vyšší přesnost než EUS samotná. Interobservační shoda v hodnocení nálezů EUS a CEH EUS je přijatelná, navíc u CEH EUS panuje nejlepší shoda ve venózní fázi v případě odplavení kontrastní látky (wash out).

5 Bunganič B, Hálková T, Benešová L et al. Vyšetření mutace KRAS v EUS-FNA preparátech pacientů s tumorem pankreatu [KRAS mutation assay on EUS-FNA specimens from patients with pancreatic mass]. Cas Lek Cesk. 2016;155(1):48–51.

5.1 Cíle

Stanovení senzitivity *KRAS* testu s použitím vzorků získaných EUS FNA a odběrem krve u pacientů s tumory pankreatu a testování vlivu přítomnosti mutace *KRAS* na prognózu přežití těchto pacientů. Vedlejším cílem byl výpočet senzitivity, specificity, pozitivní prediktivní hodnoty a negativní prediktivní hodnoty EUS a EUS FNA.

5.2 Materiál a metody

Do studie bylo zahrnuto celkem 147 pacientů s tumorem pankreatu, kteří podstoupili vyšetření EUS s FNA a následný odběr krve. V souboru bylo 118 pacientů s karcinomem pankreatu, 26 pacientů s chronickou pankreatitidou a 3 pacienti s neuroendokrinním tumorem. Skupinu pacientů s karcinomem tvořilo 64 mužů ve věku průměrně 69 ± 9 let (rozmezí 44 až 92 let) a 54 žen ve věku průměrně 66 ± 9 let (rozmezí 44 až 87 let) s KP ve stádiu II ($n = 3$), III ($n = 53$) a IV ($n = 58$). K vyšetření byl použit lineární echoendoskop GF-UCT 180 a ultrazvukový přístroj Prosound Alpha 10. K EUS FNA byly použity jehly Pro-Core 19G a 22G, Expect 19G a 22G a standardní jehly Olympus 22G. Část bioptického vzorku byla uchována nativní ve stabilizačním roztoku při -20 °C, část byla zpracována do cytologického nátěru. Suché cytologické nátěry byly doručeny na patologii, kde byly vzorky fixovány a barveny roztokem Giemsa Romanovski. Na cytologických preparátech byla cytopatologem vyznačena oblast s majoritním výskytem nádorových buněk (minimálně 80 %) a vzorky byly poté odeslány na genetickou analýzu. Z cytologických preparátů byl mikrodisekovan materiál z vyznačené oblasti nádorových buněk a přenesen do mikrozkuřavky. DNA pak byla z obou typů materiálu izolována speciálním kitem. Ze vzorku krve byla nejprve dvojí centrifugací separována plazma a bezprostředně zmrazena na -20 °C. Ve zmraženém stavu byla dopravena

do genetické laboratoře, kde byla z plazmy izolována cirkulující tumorová DNA (ctDNA) kitem. Detekce somatických mutací genu *KRAS* byla ve všech třech typech vzorků provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) s následnou heteroduplexní analýzou pomocí kapilární gelové elektroforézy. K testu prognostické role mutace *KRAS* byly využity pouze cytologické preparáty, u kterých byla dosažena nejvyšší senzitivita. Pacienti byli rozděleny do skupiny s *KRAS* mutací a bez *KRAS* mutace. Byla stanovena korelace přítomnosti *KRAS* mutace s prognózou (celkovým přežitím) pomocí Kaplan-Meierovy metody a křivky přežití obou skupin pacientů byly porovnány pomocí log-rank testu. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$.

5.3 Výsledky

5.3.1 Diagnostika pomocí endosonografie

Byla vypočtena senzitivita, specificita, pozitivní prediktivní hodnota a negativní prediktivní hodnota pro EUS, které dosahovaly 82,9 %, 45,5 %, 82,9 % a 45,5 %.

5.3.2 Diagnostika pomocí EUS FNA

Celková senzitivita FNA pro karcinom pankreatu činila 88 %, specificita 100 %, PPV 100 %, NPV 20 %. Jako nekonkluzivních bylo patologem označeno 13 % vzorků.

5.3.3 Genetická analýza

Celkem bylo na přítomnost *KRAS* mutace testováno 147 nativních aspirátů všech pacientů podstupujících EUS FNA, 118 cytologických preparátů a 94 vzorků plazmy pacientů s karcinomem pankreatu. U pacientů s NET a CHP byly ke *KRAS* testu použity pouze nativní buněčné aspiráty se záchytem 0/3 (0 %) respektive 4/26 (15 %). Pro skupinu pacientů s karcinomem pankreatu byly k dispozici všechny 3 typy vzorků, přičemž nejvyšší senzitivity detekce (záchyty) *KRAS* mutace bylo dosaženo při použití cytologických preparátů (90 %). V nativních aspirátech, byla mutace detekována pouze v 78 %, tedy výsledky vyšetření v těchto vzorcích byly z 22 % falešně negativní. Nejnižšího záchyty bylo dosaženo při detekci z plazmy, kde bývá DNA pocházející z nádoru (ctDNA) obecně přítomna ve velmi nízkých koncentracích. Výsledný záchyt *KRAS* mutace v ctDNA byl pouze 27 %. U 4 z 28 pacientů s CHP detekována mutace *KRAS*. U žádného nebyl karcinom iniciálně cytologicky diagnostikován. V průběhu klinického sledování byl potvrzen karcinom pankreatu u 2 pacientů, 1 pacient předčasně zemřel pro komplikace alkoholového deliria, 1 pacient byl aktuálně indikován k resekčnímu výkonu, který však odmítl. Srovnání přežití pacientů s mutovaným *KRAS* oproti nemutovanému (wt *KRAS*) nepřineslo statisticky významný rozdíl v prognóze.

5.3.4 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Vyšetřování *KRAS* mutace z EUS FNA preparátů je dostatečně senzitivní. Specificita *KRAS* testu je natolik vysoká, že pozitivita s vysokou přesností signalizuje malignitu, naproti tomu negativní výsledek svědčí spíše pro benigní etiologii. Přínos je především u pacientů s chronickou pankreatitidou, kde nebyla na základě ostatních klinických faktorů indikována resekce. V případě průkazu přítomnosti mutace *KRAS* by měla být resekce znovu zvážena vzhledem k vysokému riziku skrytého karcinomu pankreatu. Pro využití *KRAS* jako prediktivního markeru ovšem prozatím nejsou dostatečné klinické důkazy.

6 Benesova L, Halkova T, Bunganic B et al. Comparison of Native Aspirates and Cytological Smears Obtained by EUS-Guided Biopsies for Effective DNA/RNA Marker Testing in Pancreatic Cancer. Pathol Oncol Res. 2020 Jan;26(1):379–385.

6.1 Cíle

Cílem této práce byla analýza exprese miR-21 u pacientů s KP ve vzorcích získaných pomocí EUS-tenkojehlové biopsie a zhodnocení prognostické role miR-21 vyjádřené délkou celkového přežití pacientů s KP. Mezi sekundární cíle patřilo hodnocení rozdílů exprese miR-21 mezi 2 způsoby zpracování EUS jehlou aspirované tkáně, a to standardní EUS FNA, kdy jsou odebrané vzorky uloženy do nativního stabilizačního roztoku, a dále cytologickými stěry odebranými pod EUS navigací (EUS FNC).

6.2 Metodika

Pacienti a materiál použitý ve studii odpovídá metodice popsané v předchozí publikaci, přičemž ve výsledku bylo zpracováno 91 vzorků pomocí EUS FNC. Při hodnocení exprese miR-21 se postupovalo dle speciálního protokolu. Prognostická role miR-21 byla testována ve smyslu celkového přežívání s použitím Kaplan-Meierovy metody. Nejprve byl vypočítán medián relativní exprese miR-21 ve všech 118 vzorcích s KP. Každá hodnota vyšší než medián byla považována za nadměrnou expresi a hodnoty nižší než medián za nízkou expresi. Celkové přežití pacientů bylo počítáno od doby stanovení diagnózy KP. Aby bylo možné hodnotit vzorek pacientů jako homogenní skupinu, ty, kteří zemřeli z důvodu jiné příčiny ($n = 7$) anebo byli operováni ($n = 13$), byli ze studie exkludováni. Ve zbývajícím skupině ($n = 91$) byla posuzována souvislost přežití mírou exprese miR-21. Celkové přežití pro vysoké i nízké

hodnoty exprese miR-21 bylo vyhodnoceno Kaplan-Meierovou analýzou s použitím statistického softwaru MedCalc. Křivky přežívání byly srovnávány pomocí long-run testu na 5% statistické hladině významnosti ($p > 0.5$).

6.3 Výsledky

6.3.1 Prediktivní role exprese miR-21

Byla potvrzena negativní prediktivní hodnota exprese miR-21, výsledky jsou srovnatelné s experimenty s materiálem z resekátů.

6.3.2 EUS FNC

Z materiálu získaného při vyšetření EUS FNC byla nízká exprese miR-21 zaznamenána u 48 pacientů, celkové přežití v této skupině bylo 200 dní, u 43 pacientů byla zaznamenána vysoká exprese miR-21 s celkovým přežitím 128 dní. Kaplan-Meierova analýza ukázala na statisticky významný rozdíl v přežívání mezi nízkou a vysokou expresí miR-21 ($p = 0.02$).

6.3.3 EUS FNA

Z materiálu získaného při vyšetření EUS FNA, byla nízká exprese miR-21 zaznamenána u 43 pacientů s mediánem přežití 208 dní a u 48 pacientů byla zaznamenána vysoká exprese miR-21 s celkovým přežitím 117 dní ($p = 0.06$).

6.4 Diskuze, závěr a zhodnocení výsledků cílů a hypotéz práce

Metoda EUS FNC není zatím rutinně používána k molekulární genetické analýze získaných vzorků, ale dle dosažených výsledků je dostatečně přesná a do budoucna bude vhodnou metodou k odběru testovaného materiálu. Mohla by posloužit všem jedincům KP, obzvláště skupině inoperabilních pacientů. Ve FNA je speciální médium, ale s malou frakcí maligních buněk a excesivním množstvím buněk stromatu (90 % celého materiálu). (Neesse A 2011 Jun) Pro tuto konkrétní analýzu exprese miR-21 se však zdá, že důležitější je primární zpracování a označení konkrétní nádorové populace „na skle“, které umožňuje provedení mikrodisekce, jak je tomu při FNC. Z důvodu, že bylo doposud hodnocení molekulárních markerů prováděno pouze z resekátů, byly hodnocené výsledky efektu molekulární diagnostiky u KP sporné. Díky FNC je nyní průkazně dodáván selektovaný materiál zcela vhodný k další podrobné genetické a molekulární analýze. Podrobnější studium genetického pozadí stromatu je dalším výhledem do budoucna.

7 Bunganič B, Šťovíčková L, Tatarkovič M et al. Molekulárně spektroskopická analýza krevní plasmy: cesta k diagnostice karcinomu pankreatu? Gastroent Hepatol 2015, 69(6): 518-524.

7.1 Cíle

Cílem pilotní studie je srovnání senzitivity a specificity jediného klinicky dostupného biomarkeru CA19-9 a nového spektrálního sérového biomarkeru.

7.2 Materiál a metody

Do této pilotní studie bylo zařazeno 10 pacientů s KP a 23 kontrolních jedinců v průměrném věku 66 ± 7 , resp. 61 ± 8 let. Ve všech případech se jednalo o pokročilá stádia III a IV. V rámci odběru krve bylo provedeno základní biochemické vyšetření, včetně stanovení hladiny sérového albuminu, celkové bílkoviny, glykémie a hladiny CA 19-9.

Po punkci žíly a odběru krve byla provedena centrifugace vzorků; následně byly získané frakce krevní plazmy zamrazeny, transportovány v termoboxu při teplotě suchého ledu (-78 °C) na VŠCHT Praha, kde byly nadále skladovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C. Rozmrazené vzorky byly analyzovány kombinací různých spektroskopických metod.

Pro odlišení pacientů s karcinomem pankreatu a kontrolní skupiny, byla získaná spektrální data vyhodnocena lineární diskriminační analýzou (LDA) v programu XLSTAT (Addinsoft, Francie). Pro vybrané oblasti spekter, ve kterých jsou obsaženy informace o struktuře plazmatických biomolekul a jejich možné změny, byl vytvořen statistický model, u něž byla zároveň stanovena senzitivita a specificita. K ověření jeho platnosti a vypovídací schopnosti byla rovněž provedena křížová validace typu leave-one-out (LOOCV) a výpočet hodnot pro křivku receiver operating characteristics (ROC).

7.3 Výsledky

7.3.1 Ramanova spektroskopie

V průměrných Ramanových spektrech pacientů s KP a kontrolních jedinců jsou patrné tři intenzivní pásy náležící především vibračním karotenoidů (1006 , 1156 a 1517 cm^{-1}), které jsou přítomny v plasmě v nízkých koncentracích. U skupiny kontrolních jedinců byla pozorována několikanásobně vyšší intenzita těchto pásů v porovnání s pacienty, což naznačuje možnou roli karotenoidů v procesu kancerogeneze.

Ve spektrech je zároveň možné pozorovat změnu intenzity pásů typických pro proteiny s vysokým obsahem alfa-helikální struktury, a to především u 1270 cm^{-1} v oblasti rozšířeného amidu III, který odpovídá vibračním peptidové vazby. V krvi rovněž přítomné sacharidy a

lipidy jsou zastoupeny pásy 960 a 1450 cm^{-1} , jejichž intenzita byla nižší v případě pacientů s KP.

7.3.2 Ramanova optická aktivita

Ve spektrech Ramanovy optické aktivity byla zaznamenána skupina pásů proteinů v oblastech amidu I (1645, 1674 cm^{-1}) a amidu III (1248, 1311, 1345 cm^{-1}). Spektrální průběh v těchto oblastech je opět typický pro proteiny s vysokým obsahem alfa-helikálních struktur. Výrazné pozitivní pásy 1156 a 1517 cm^{-1} vyskytující se ve spektrech kontrolních jedinců mohou být přiřazeny karotenoidům, přičemž některé z nich se překrývají s pásy aromatických aminokyselin.

7.3.3 Elektronový cirkulární dichroismus

Ve spektrech ECD dominují tři pásy charakteristické pro sekundární strukturu proteinů. Pozitivní pás 192 nm a dva částečně se překrývající negativní pásy 209 a 222 nm jsou výsledkem elektronových přechodů v rámci peptidové vazby. Intenzita a tvar těchto pásů se mění v závislosti na sekundární struktuře peptidového řetězce. Průběh spekter odpovídá proteinům s vysokým obsahem alfa-helikální struktury, které jsou v krvi zastoupeny převážně lidským sérovým albuminem. Je patrné, že v případě pacientů s KP mají všechny tři uvedené pásy nižší intenzitu než ve spektrech kontrolních jedinců.

Jelikož byly některé změny ve spektrech pacientů s KP a kontrolních jedinců obtížně pozorovatelné, byla získaná spektrální data vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami.

7.4 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Časná diagnostika KP s cílem detekce operabilního stádia vyžaduje identifikaci efektivního biomarkeru. Je testováno několik kandidátů ze skupiny biomarkerů časného karcinomu pankreatu, ale zatím nejsou dostupné pro běžnou klinickou praxi. CA 19-9 je sice klinicky dostupný, ale jako marker časného karcinomu není vyhovující. V této studii byla testována specifita a senzitivita nového spektrálního biomarkeru, charakterizovaného vybranými změnami všech biomolekul krevní plazmy. Pro obě sledované charakteristiky bylo dosaženo hodnot $\sim 90\%$, což je více než doposud publikované výsledky pro CA 19-9. Získané výsledky korespondují s patogenezi KP. Karotenoidy, jako ústřední regulační prvek funkce stelate cells, které se prokazatelně podílí na patogenezi KP, se jeví se jako příslib do budoucna vhodný k dalšímu testování na větším souboru pacientů. Jedním z dalších úkolů je spektroskopické vyšetření rizikových pacientů s recentně diagnostikovanou poruchou glukózové tolerance, pacientů s premaligním stádiem karcinomu a familiárními rizikovými syndromy.

8 Habartová L, Bunganič B, Tatarkovič M et al. Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer. Chirality. 2018 May;30(5):581-591

8.1 Cíle

V této práci byla kromě analýzy větších molekul (jako v předchozí publikaci) provedena analýza menších molekul s pomocí metabolomického vyšetření. Byly provedeny dvě analýzy, první k detekci a kvantifikaci klinicky relevantních markerů oxidativního stresu popisovaného u nádorových onemocnění a druhá, tzv. multimarker screening sloužící k identifikaci potenciálních markerů, které by mohly mít reálný klinický význam.

8.2 Metodika

Vzorky krevní plazmy byly odebrané náhodně 5 subjektům s KP a 5 zdravým kontrolám k obou zmíněným metabolomickým analýzám. K detekci markerů oxidativního stresu byl použit spektrometrický systém. Byla provedena kapalinová chromatografie a ke kvantifikaci byla použita hmotnostní spektrometrie. Detekované markery byly kvantifikovány za použití komerčně dostupných standardů zakoupených od Cayman Chemicals. Pro účely identifikace potenciálních markerů KP byla využita databáze Human Metabolome Database.

8.3 Výsledky

8.3.1 Klinicky známé markery spojované s karcinogenezí

Prvním krokem metabolomické studie bylo stanovení hodnot klinicky známých markerů oxidativního stresu spojovaných s karcinogenezí, které nebyly doposud využity v diagnostice KP. Významné zvýšení hladin derivátů tyrosinu, tj. ortho-, chloro a nitro-tyrosinu, demonstruje podíl oxidativního a nitrosativního stresu, nejpravděpodobněji způsobeného vznikem vysoce reaktivních radikálů v průběhu růstu tumoru. Oxidativní stres spolu s narušením fosfolipidových membrán je také reflektován vyššími hodnotami 8-isoprostanu u pacientů s KP. Navíc jsme ve skupině KP pozorovali možné poškození genetické informace indikované mírným zvýšením hladin 8-hydroxyguanosinu a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu. I když byly rozdíly v rámci leukotrienové kaskády nevýrazné, aktivace imunitního systému pacientů byla zřejmá z významně vyšších hladin leukotrienu B₄, primárního markeru zánětu.

8.3.2 Identifikace nových metabolitů typických pro KP

Druhým cílem metabolomické studie bylo identifikovat sloučeniny, jejichž pozměněné hladiny by byly typickým znakem KP. Zatím nebyly detekované metabolity kvantifikovány, pouze byly srovnávány intenzity jejich signálů. Převážná většina identifikovaných metabolitů je zapojena do procesů buněčné signalizace, spravování energetického metabolismu buněk a

zajištění integrity a stabilitu buněčných membrán, tedy do procesů, které jsou při nádorovém růstu poškozené.

8.4 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Metabolomická analýza potvrdila signifikantní změny na celulární / molekulární úrovni vedoucí především k oxidativnímu stresu a k narušení lipidového metabolismu a energetického řízení v průběhu procesu karcinogeneze KP. Kromě detekce klinicky uznávaných markerů oxidativního stresu (deriváty 8-isoprostanu a tyrosinu), jejichž propojení s karcinomy bylo prokázáno u jiných malignit, jako například karcinomy prsu či plic, byly také identifikovány molekuly (lysofosfatidylcholin, dekanoyl-karnitin atd.), které doposud nebyly s KP spojovány a mohly by se tak stát vhodnými kandidátními markery.

9 Bibliografie

- ADA, American Diabetes Association. 2010. „Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.“ *Diabetes care* 62-69.
- Akita H, Ritchie SA, Takemasa I et al. 2016. „Serum Metabolite Profiling for the Detection of Pancreatic Cancer: Results of a Large Independent Validation Study.“ *Pancreas* (45(10)): 1418-1423.
- Andersen DK, Korc M, Petersen GM et al. 2017. „Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer.“ *Diabetes* (66(5)): 1103-1110.
- Arabul M, Karakus F, Alper E et al. 2012. „Comparison of multidetector CT and endoscopic ultrasonography in malignant pancreatic mass lesions.“ *Hepatogastroenterology* 59 (117): 1599-603.
- Baine, M. 2009. „Pancreatic cancer biomarkers. In: Encyclopedia of Cancer.“ *Heidelberg, Germany: Springer* 790–805.
- Baker MJ, Byrne HJ, Chalmers JM et al. 2018. „Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: state of play nad future challenges.“ *Analyst*, 1735-1757.
- Ballehaninna UK, Chamberlain RS. 2012 . „The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal.“ *J Gastrointest Oncol* (3(2)): 105-19.
- Barron LD, Zhu F, Hecht L, a et al. 2007. „Raman optical activity: An incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure.“ *J Mol Struct* 834-836.
- Berova N, Nakanishi K, Polavarapu PL et al. 2012. „Comprehensive Chiroptical Spectroscopy.“ *John Wiley & Sons Inc.: New Jersey* Vol. 2nd.
- Berova N, Polavarapu PL, Nakanishi K at al. 2012. „Comprehensive chiroptical spectroscopy.“ *Hoboken*, 3–35.
- Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT et al. 2012. „Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4).“ *Ann Oncol.* 23 (7): 1880-8.
- Bournet B, Gayral M, Torrisani J et al. 2014 . „Role of endoscopic ultrasound in the molecular diagnosis of pancreatic cancer.“ *World J Gastroenterol* (20(31)): 10758-68.

- Bournet B, Souque A, Senesse P et al. 2009 . „Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis.“ *Endoscopy* (41(6)): 552-7.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. 2018. „Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.“ *CA Cancer J Clin* (International Agency for Research on Cancer) 68 (6): 394-424.
- Brennan DD, Zamboni GA, Raptopoulos VD, Kruskal JB. 2007. „Comprehensive preoperative assessment of pancreatic adenocarcinoma with 64-section volumetric CT.“ *Radiographics* 27:1653–1666.
- Buscail L, Bournet B, Cordelier P. 2020. „Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer.“ *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, Mar: 153-168.
- Busek P, Vanickova Z, Hrabal P et al. 2016. „Increased tissue and circulating levels of dipeptidyl peptidase–IV enzymatic activity in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.“ *Pancreatology* 829-38.
- Cancer, Board Editorial. 2012. „Pancreatic Cancer - Statistics.“ *Cancer.net Articles*. American Society of Clinical Oncology (ASCO) - Cancer.Net. 25. Jun. <https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics>.
- Carrara S, Cangi MG, Arcidiacono PG et al. 2011. „Mucin expression pattern in pancreatic diseases: findings from EUS-guided fine-needle aspiration biopsies.“ *Am J Gastroenterol* (106): 1359–1363.
- Catalano MF, Sahai A, Levy M et al. 2009 . „EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification.“ *Gastrointest Endosc* (69(7)): 1251-61.
- Chen J, Yang R, Lu Y, Xia Y, Zhou H. 2012. „Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for solid pancreatic lesion: a systematic review.“ *J Cancer Res Clin Oncol* 138 (9): 1433-41.
- Coussens LM, Werb Z. 2002 . „Inflammation and cancer.“ *Nature* (420(6917)): 860-7.
- Cui YF, Andersen DK. 2012. „Diabetes and pancreatic cancer.“ *Endocrine related cancer* 9–26. nedatováno. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018, 46, D608–d617.
- Dietrich CF, Ignee A, Frey H. 2005. „Contrast-enhanced endoscopic ultrasound with low mechanical index: a new technique.“ *Z Gastroenterol*, 1219–23.
- Dąbrowska N, Wiczkowski A. 2017. „Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage .“ *Adv Clin Exp Med* 26(1): 155-166.
- Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R et al. 2010. „Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report.“ *Ann Oncol* (21): 441–447.
- Egawa S, Toma H, Ohigashi H, a et al. 2012. „Japan Pancreatic Cancer Registry; 30th year anniversary.“ *Pancreas* (41): 985–92.
- Frič P, Škrha J, Šedo A, et al. 2017 . „Precursors of pancreatic cancer.“ *Eur J Gastroenterol Hepatol*, Mar: e13-e18.
- Frič P, Škrha J, Šedo A et al. 2016. „Early detection of pancreatic cancer: impact of high-resolution imaging methods and biomarkers.“ *Eur J Gastroenterol Hepatol* e33-e43.
- Fukukura Y, Takumi K, Kamimura K et al. 2012. „Pancreatic adenocarcinoma: variability of diffusion-weighted MR imaging findings.“ *Radiology* 263 (3): 732-40.
- Fusari M, Maurea S, Imbriaco M et al. 2010. „Comparison between multislice CT and MR imaging in the diagnostic evaluation of patients with pancreatic masses.“ *Radiol Med* 115 (3): 453-66.
- Fusaroli P, Napoleon B, Gincul R et al. 2016 . „The clinical impact of ultrasound contrast agents in EUS: a systematic review according to the levels of evidence.“ *Gastrointest Endosc* (84(4)): 587-596.

- Fusaroli P, Spada A, Mancino MG, Caletti G. 2010. „Contrast harmonic echo-endoscopic ultrasound improves accuracy in diagnosis of solid pancreatic masses.“ *Clin Gastroenterol Hepatol* 8(7): 629-34.
- Gao L, He SB, Li DC et al. 2014. „Effects of miR-16 plus CA19-9 detections on pancreatic cancer diagnostic performance.“ *Clin Lab* (60(1)): 73-7 .
- Gheonea DI, Streba CT, Ciurea T, Săftoiu A. 2013. „Quantitative low mechanical index contrast- enhanced endoscopic ultrasound for the differential diagnosis of chronic pseudotumoral pancreatitis and pancreatic cancer.“ *BMC Gastroenterol* 13: 2.
- Gonzalo-Marin J, Vila JJ, Perez-Miranda M. 2014. „Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of pancreatic cancer.“ *World J Gastrointest Oncol* 6 (9): 360-8.
- Hanada K, Okazaki A, Hirano N et al. 2015. „Diagnostic strategies for early pancreatic cancer.“ *J Gastroenterol* (50(2)): 147-54.
- Harima H, Kaino S, Shinoda S et al. 2015. „Differential diagnosis of benign and malignant branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm using contrast-enhanced endoscopic ultrasonography.“ *World J Gastroenterol*. 6252-60.
- Hijioka S, Ikari T, Kamei A et al. 2007. „CT and MRI findings with contrast enhancement of small pancreatic adenocarcinoma in the late phase.“ *Hepatogastroenterology* 54 (74): 389-392.
- Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Ohno E, Itoh Y, Nakamura Y, et al. 2012. „Contrast-enhanced endoscopic ultrasonography in digestive diseases.“ *J Gastroenterol* 47 (10): 1063-72.
- Hirst JD, Colella K, Gilbert ATB. 2003. „Electronic Circular Dichroism of Proteins from First-Principles Calculations.“ *J Phys Chem B* (107): 11813-11819.
- Hocke M, Ignee A, Topalidis T, Stallmach A, Dietrich CF. 2007. „Contrast-enhanced endosonographic Doppler spectrum analysis is helpful in discrimination between focal chronic pancreatitis and pancreatic cancer.“ *Pancreas* 35 (3): 286-8.
- Horn A, Chakraborty S, Dey P et al. 2013. „Immunocytochemistry for MUC4 and MUC16 is a useful adjunct in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma on fine-needle aspiration cytology.“ *Arch Pathol Lab Med* (137): 546–551.
- Hou X, Jin Z, Xu C et al. 2015. „Contrast-Enhanced Harmonic Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration in the Diagnosis of Solid Pancreatic Lesions: A Retrospective Study.“ *PLoS ONE* 10 (3): e0121236.
- Francis IR. 2007. „Pancreatic adenocarcinoma: diagnosis and staging using multidetector-row computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI).“ *Cancer Imaging* 160-165.
- Ishige F, Hoshino I, Iwatate Y et al. 2020. „MIR1246 in body fluids as a biomarker for pancreatic cancer.“ *Sci Rep*, 26. May: 8723.
- Itzkowitz SH, Kim YS. 1986 . „New carbohydrate tumor markers.“ *Gastroenterology* (90(2)): 491-4.
- Kala Z, Válek V, Hlavsa J et al. 2007. „The role of CT and endoscopic ultrasound in pre-operative staging of pancreatic cancer.“ *Eur J Radiol* 62 (2): 166-9.
- Karmazanovsky G, Fedorov V, Kubyshev V, Kotchatkov A. 2005. „Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability.“ *Abdom Imaging* 30:488–500.
- Kaur S, Kumar S, Momi N, a et al. 2013. „Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment.“ *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (10): 607–620.
- Kenner BJ, Chari ST, Maitra A et al. 2016. „Early Detection of Pancreatic Cancer-a Defined Future Using Lessons From Other Cancers: A White Paper.“ *Pancreas* 45 ((8)): 1073-9.
- Khalid A, Dewitt J, Ohori NP et al. 2011 . „EUS-FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer.“ *Pancreatol* (11(5)): 482-6.

- Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW. 2004. „Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population.“ *J Gastroenterol Hepatol* (19): 182–186.
- Kim YR, Park MK, Kang GJ et al. 2016. „Leukotriene B4 induces EMT and vimentin expression in PANC-1 pancreatic cancer cells: Involvement of BLT2 via ERK2 activation.“ *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (115): 67-76.
- Kitano M, Kudo M, Yamao K et al. 2012 . „Characterization of small solid tumors in the pancreas: the value of contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography.“ *Am J Gastroenterol* (107(2)): 303-10.
- Kitano M, Yoshida T, Itonaga M et al. 2019. „Impact of endoscopic ultrasonography on diagnosis of pancreatic cancer.“ *J Gastroenterol* (54(1)): 19-32.
- Klein AP, Brune KA, Petersen GM et al. 2004. „Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds.“ *Cancer Res.* 64 (7): 2634-8.
- Koelblinger C, Ba-Ssalamah A, Goetzinger P et al. 2011. „Gadobenate dimeglumine-enhanced 3.0-T MR imaging versus multiphase 64-detector row CT: prospective evaluation in patients suspected of having pancreatic cancer.“ *Radiology* 259 (3): 757-66.
- Liou SH, Wu WT, Liao HY et al. 2017 . „Global DNA methylation and oxidative stress biomarkers in workers exposed to metal oxide nanoparticles.“ *J Hazard Mater* (331): 329-335.
- Loeffler DA, Klaver AC, Coffey MP et al. 2017 . „Increased Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid from Healthy Subjects with Parkinson's Disease-Associated LRRK2 Gene Mutations.“ *Front Aging Neurosci* (9): 89.
- Louvet C, Philip PA. 2008. „Accomplishments in 2007 in the treatment of metastatic pancreatic cancer.“ *Gastrointest Cancer Res* (2(3 Suppl)): 37-41.
- Maluf-Filho F, Kumar A, Gerhardt Ret al. 2007 . „Kras mutation analysis of fine needle aspirate under EUS guidance facilitates risk stratification of patients with pancreatic mass.“ *J Clin Gastroenterol* (41(10)): 906-10.
- Miura S, Kume K, Kikuta K et al. 2020. „Parenchymal Atrophy and Fat Replacement Are Clues for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer with Abnormalities of the Main Pancreatic Duct.“ *Tohoku J Exp Med*, Sep: 63-71.
- Molina V, Visa L, Conill C et al. 2012. „CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer.“ *Tumour Biol* (33): 799.
- Muniraj T, Chari ST. 2012. „Diabetes and pancreatic cancer.“ *Minerva Gastroenterol Dietol* 331–345.
- NCI. 2018. „In: Pancreatic Cancer Cancer Stat Facts [Internet].“ *Available from: <https://seer.cancer.gov/>*.
- Nakao M, Katayama K, Fukuda J et al. 2017. „Evaluating the ability to detect pancreatic lesions using a special ultrasonography examination focusing on the pancreas.“ *Eur J Radiol.* (91): 10-14.
- Nannini G, Meoni G, Amedei A et al. 2020. „Metabolomics profile in gastrointestinal cancers: Update and future perspectives.“ *World J. Gastroenterol*, 2514–2532.
- Neesse A, Michl P, Frese KK et al. 2011 Jun. „Stromal biology and therapy in pancreatic cancer.“ *Gut* 60(6):861-8.
- Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR et al. 2008. „Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus.“ *Gastroenterology* 134:981–987.
- Parker SF, Tavender SM, Dixon NM et al. 1999. „Raman spectrum of beta-carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): Implications for the characterization of conjugated polyenes.“ *Appl Spectrosc* (53 (1)): 86-91.

- Pellis  M, Castells A, Gin s A et al. 2003. „Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy.“ *Aliment Pharmacol Ther* (17(10)): 1299-307.
- Poruk KE, Firpo MA, Adler DG et al. 2013. „Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? .“ *Ann Surg* (257): 17–26.
- Pourshams A, Sepanlou SG, Ikuta KS et al. 2019. „The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.“ *Lancet Gastroenterol*, 934–47.
- Rachakonda PS, Bauer AS, Xie H et al. 2013. „Somatic mutations in exocrine pancreatic tumors: association with patient survival.“ *PLoS One* (8(4)): e60870.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R et al. 2014. „Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States.“ *Cancer Res* (74(11)): 2913-21.
- Raman SP, Horton KM, Fishman EK. 2012. „Multimodality imaging of pancreatic cancer-computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography.“ *Cancer J* 18:511–522.
- Rastegar N, Matteoni-Athayde LG, Eng J et al. 2015. „Incremental value of secretin-enhanced magnetic resonance cholangiopancreatography in detecting ductal communication in a population with high prevalence of small pancreatic cysts.“ *Eur J Radiol* 84 (4): 575-80.
- Ross T, Jakubzig B, Grundmann M et al. 2016. „The molecular mechanism by which saturated lysophosphatidylcholine attenuates the metastatic capacity of melanoma cells.“ *FEBS Open Bio* (6(12)): 1297-1309.
- Schima W, Ba-Ssalamah A, K lblinger C et al. 2007. „Pancreatic adenocarcinoma.“ *Eur Radiol* 17 (3): 638-49.
- Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV et al. 2014. „MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer.“ *JAMA* (311(4)): 392-404.
- S ftoiu A, Vilmann P. 2009 . „Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis and staging of pancreatic cancer.“ *J Clin Ultrasound* 37 (1): 1-17.
- Sah RP, Sharma A, Nagpal S et al. 2019 . „Phases of Metabolic and Soft Tissue Changes in Months Preceding a Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.“ *Gastroenterology*, May: 1742-1752.
- Salek C, Benesova L, Zavoral M et al. 2007. „Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer.“ *World J Gastroenterol* (13(27)): 3714-20.
- Salek C, Minarikova P, Benesova L et al. 2009. „Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer.“ *Anticancer Res* (29(5)): 1803-10.
- Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P, ESMO Guidelines Working Group. 2012. „Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.“ *Ann Oncol* (23 Suppl 7): 33-40.
- Shin EJ, Canto MI. 2012. „Pancreatic cancer screening.“ *Gastroenterol Clin North Am.* 41 (1): 143-57.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2013. „Cancer statistics.“ *CA Cancer J Clin* 63:11–30.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE et al. 2021. „Cancer Statistics, 2021.“ *CA – Cancer J. Clin.*, 7–33.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2020. „Cancer statistics 2020.“ *CA A Cancer J Clin.*, 7–30.

- Singhi AD, Koay EJ, Chari ST et al. 2019. „Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges.“ *Gastroenterology*, May: 2024-2040.
- Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. 2019. „Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges.“ *Gastroenterology* 156 (7): 2024-2040.
- Sohn TA, Lillemoe KD, Cameron JL et al. 1999. „Surgical palliation of unresectable periampullary adenocarcinoma in the 1990s.“ *J Am Coll Surg* 188 (6): 658-66.
- Stolzenberg-Solomon R, Derkach A, Moore S et al. 2020. „Associations between metabolites and pancreatic cancer risk in a large prospective epidemiological study.“ *Gut*, Nov: 2008-2015.
- Synytsya A, Judexová M, Hrubý T et al. 2013. „Analysis of human blood plasma and hen egg-white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA) .“ *Anal Bioanal Chem* (405 (16)): 5441-5453.
- Syslová K, Böhmová A, Mikoška M et al. 2014. „Multimarker screening of oxidative stress in aging.“ *Oxid Med Cell Longev* 2014:562860.
- Tada M, Komatsu Y, Kawabe T et al. 2002. „Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor.“ *Am J Gastroenterol* (97(9)): 2263-70.
- Takahashi K, Yamao K, Okubo K et al. 2005. „Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA.“ *Gastrointest Endosc* (61(1)): 76-9 .
- Tamm EP, Balachandran A, Bhosale P, Szklaruk J. 2009. „Update on 3D and multiplanar MDCT in the assessment of biliary and pancreatic pathology.“ *Abdom Imaging* 34 (1): 64-74.
- Tanaka S, Nakao M, Ioka T et al. 2010. „Slight dilatation of the main pancreatic duct and presence of pancreatic cysts as predictive signs of pancreatic cancer: a prospective study.“ *Radiology* 254 (3): 965-72.
- Tatarkovič M, Fišar Z, Jiráček R et al. 2012. „Can Chiroptical Spectroscopy Be Used for the Analysis of Blood Plasma?“ *Chirality*, 951-955.
- Tatarkovič M, Synytsya A, Šťovíčková L et al. 2015. „The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma.“ *Anal Bioanal Chem* , 1335–42.
- Tatarkovič M, Synytsya A, Šťovíčková L et al. 2015. „The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma.“ *Anal Bioanal Chem* (407 (5)): 1335-1342.
- Tellez-Avila FI, Chavez-Tapia NC, López-Arce G et al. 2012. „Vascular invasion in pancreatic cancer: predictive values for endoscopic ultrasound and computed tomography imaging.“ *Pancreas* 41 (4): 636-8.
- Tempero MA, Arnoletti JP, Behrman S et al. 2010. „Pancreatic Adenocarcinoma: Clinical Practice Guidelines in Oncology.“ *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* (8(9)): 972-1017.
- Teoh AY, Tang RS. 2015. „Clinical evaluation of new diagnostic modalities of endoscopic ultrasound for pancreaticobiliary diseases.“ *Dig Endosc* 27 (1): 55-9.
- Thorne Research Inc.. 1999. „Monograph on acetyl carnitine.“ *Alt Med Rev* (4): 439.
- Tollefsbol, TO. 2009. „Cancer Epigenetics.“ Boca Raton: CRC Press.
- Uehara H, Ikezawa K, Kawada N et al. 2011. „Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for suspected pancreatic malignancy in relation to the size of lesions.“ *J Gastroenterol Hepatol* 26 (8): 1256-61.
- Vargas R, Nino-Murcia M, Trueblood W et al. 2004. „MDCT in Pancreatic adenocarcinoma: prediction of vascular invasion and resectability using a multiphasic technique with curved planar reformations.“ *AJR Am J Roentgenol* 182 (2): 419-25.

- Wang G, Lipert RJ, Jain M et al. 2011. „Detection of the potential pancreatic cancer marker MUC4 in serum using surface-enhanced Raman scattering.“ *Anal Chem* (83): 2554–2561.
- Wang KX, Ben QW, Jin ZD et al. 2011. „Assessment of morbidity and mortality associated with EUS-guided FNA: a systematic review.“ *Gastrointest Endosc* (73): 283–290.
- Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. 1992. „Pancreatic carcinoma.“ *N Engl J Med* 326 (7): 455-65.
- Whitmore L, Wallace BA. 2008. „Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases.“ *Biopolymers* (89 (5)): 392-400.
- Wishart DS, Feunang YD, Marcu A et al. 2018. „HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018.“ *Nucleic Acids Res*, 4. Jan: D608-D617.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC et al. 2013 . „HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013.“ *Nucleic Acids Res* (41): D801-7.
- Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J et al. 2003. „Raman spectra of carotenoids in natural products.“ *Spectrochim Acta* (59 (10)): 2207-2212.
- Xie G, Lu L, Qiu Y et al. 2015. „Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer.“ *J Proteome Res*, 1195–1202.
- Yachida S, Jones S, Bozic I et al. 2010 . „Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer.“ *Nature* (467(7319)): 1114-7.
- Yamaguchi K, Okusaka T, Shimizu K et al. 2017. „Clinical practice guidelines for pancreatic cancer 2016 from the Japan pancreas society a synopsis.“ *Pancreas* (46): 595–604.
- Yamamoto N, Kato H, Tomoda T et al. 2016. „Contrast- enhanced harmonic endoscopic ultrasonography with time-intensity curve analysis for intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.“ *Endoscopy* 26-34.
- Yamashita Y, Kato J, Ueda K et al. 2015. „Contrast-Enhanced Endoscopic Ultrasonography for Pancreatic Tumors.“ *Biomed Res Int* 491782.
- Yasuda I, Iwashita T, Doi S et al. 2011. „Role of EUS in the early detection of small pancreatic cancer.“ *Dig Endosc* 23 (1): 22-5.
- Yasuda K, Mukai H, Nakajima M, Kawai K. 1993. „Staging of pancreatic carcinoma by endoscopic ultrasonography.“ *Endoscopy* 25 (2): 151-5.
- Zamboni GA, Kruskal JB, Vollmer CM et al. 2007. „Pancreatic adenocarcinoma: value of multidetector CT angiography in preoperative evaluation.“ *Radiology* 245 (3): 770-8.
- Zheng M, Liu LX, Zhu AL et al. 2003 . „K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses.“ *World J Gastroenterol* (9(1)): 188-91.
- Zhu F, Isaacs NW, Hecht L et al. 2005. „Raman optical activity: a tool for protein structure analysis.“ *Structure* (13 (10)): 1409-19.

10 Seznam publikací

10.1 Publikace s IF

10.1.1 Přímá souvislost s disertační prací:

Bunganič B, Laclav M, Dvořáková T, Bradáč O, Traboulsi E, Suchánek Š, Frič P, Zavoral M. Accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours. Scand J Gastroenterol. **2018** Oct - Nov;53(10-11):1411-1417. **IF 2,13**

Benesova L, Halkova T, **Bunganic B**, Belsanova B, Zavoral M, Traboulsi E, Minarik M. Comparison of Native Aspirates and Cytological Smears Obtained by EUS-Guided Biopsies for Effective DNA/RNA Marker Testing in Pancreatic Cancer. Pathol Oncol Res. **2018** Oct 25. **IF 2,83**

Habartová L, **Bunganič B**, Tatarkovič M, Zavoral M, Vondroušová J, Syslová K, Setnička V. Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer. Chirality. **2018** May;30(5):581-591. **IF 2,17**

10.1.2 Nepřímá souvislost s disertační prací:

Michálková L, Horník Š, Sýkora J, Habartová L, Setnička V, **Bunganič B**. Early Detection of Pancreatic Cancer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Based on 1H NMR Metabolomics. J Proteome Res. 2021 Mar 5;20(3):1744-1753

Frič P, Škrha J, Šedo A, Zima T, Bušek P, Kmochová K, Laclav M, **Bunganič B**, Solař S, Hrabal P, Bělina F, Záruba P, Škrha P, Zavoral M. Early detection of pancreatic cancer: impact of high-resolution imaging methods and biomarkers. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2016 Dec;28(12):e33-e43. Review.

Frič P, Škrha J, Šedo A, Bušek P, Kmochová K, Laclav M, Solař S, **Bunganič B**, Zavoral M. Early pancreatic carcinogenesis - risk factors, early symptoms, and the impact of antidiabetic drugs. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2016 Jul;28(7):e19-25

Škrha J, Bušek P, Uhrová J, Hrabal P, Kmochová K, Laclav M, **Bunganič B**, Frič P. Lower plasma levels of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and pancreatic polypeptide (PP) in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas and their relation to the presence of impaired glucoregulation and weight loss. Pancreatology. 2017 Jan - Feb;17(1):89-94.

Frič P, Škrha J, Šedo A, Bušek P, Laclav M, **Bunganič B**, Zavoral M. Precursors of pancreatic cancer. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017 Mar;29(3):e13-e18.

Busek P, Vanickova Z, Hrabal P, Brabec M, Fric P, Zavoral M, Skrha J, Kmochova K, Laclav M, **Bunganic B**, Augustyns K, Van Der Veken P, Sedo A. Increased tissue and circulating levels of dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Pancreatology. 2016 Sep-Oct;16(5):829-38.

Tatarkovič M, Synytsya A, Šťovíčková L, **Bunganič B**, Miškovičová M, Petruželka L, Setnička V. The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and

Raman spectra of human blood plasma. Anal Bioanal Chem. 2015 Feb;407(5):1335-42.

Bunganič B, Laclav M, Zaruba P, Belina F, Ryska M, Zavoral M. Feedback is the best way to see. Endosc Ultrasound. 2014 Apr;3(Suppl 1):S14.

10.2 Publikace bez IF

10.2.1 Přímá souvislost s disertační prací:

Bunganič B, Hálková T, Benešová L, Belšánová B, Laclav M, Hrůzová M, Traboulsi E, Frič P, Suchánek Š, Minárik M, Zavoral M. [KRAS mutation assay on EUS-FNA specimens from patients with pancreatic mass]. Cas Lek Cesk. 2016;155(1):48-51. Czech.

10.2.2 Nepřímá souvislost s disertační prací:

Hrůzová M, **Bunganič B**, Csomor J, Zavoral M, Bělina F, Habartová L, Setnička V. Diagnosis of early pancreatic cancer and precursor lesions. Rozhl Chir. Fall 2017;96(9):369-374. Czech. PubMed PMID: 29063770.

Frič P, Šedo A, Škrha J, Zima T, Bušek P, Škrha P, Kmochová K, Laclav M, **Bunganič B**, Zavoral M. Early detection of sporadic pancreatic cancer. Cas Lek Cesk. 2016;155(1):44-7. Review. Czech.

Bunganič B, Frič P, Zavoral M. Pancreatic adenocarcinoma - early symptoms and screening. Cas Lek Cesk. 2014;153(6):267-70. Czech.

Ryska M, Dusek L, Pohnán R, **Bunganič B**, Bieberová L, Ryska O, Lovecek M, Jon B, Rupert K, Krejčí M, Jarkovský J. [Quality of life is an important factor in the indication in patients with advanced pancreatic carcinoma--a prospective multicentric study]. Rozhl Chir. 2012 Apr;91(4):199-208. Czech.

Bunganič B, Dvořáková T, Laclav M, Kmochová K, Traboulsi E, Májek O, Suchánek Š, Zavoral M. 2015. Využití kontrastní endosonografie v diagnostice karcinomu pankreatu. Gastroenterologie a hepatologie 69:215-216.

Laclav M, Hrůzová M, **Bunganič B**, Zavoral M. Přínos endosonografie v diagnostice karcinomu pankreatu. Onkologická Revue, 2016(9), 39-45.

10.3 Publikace které nesouvisí s disertační prací

10.3.1 Publikace s IF

Suchanek S, Grega T, Ngo O, Vojtechova G, Majek O, Minarikova P, Brogyuk N, **Bunganič B**, Seifert B, Dusek L, Zavoral M. How significant is the association between metabolic syndrome and prevalence of colorectal neoplasia? World J Gastroenterol. 2016 Sep 28;22(36):8103-11.

Csomor J, **Bunganič B**, Dvořáková D, Hříbek P, Kmochová K, Campr V, Tučková I, Šálek C, Urbánek P, Zavoral M. Extramedullary Plasmacytoma of the Pancreas Complicated with Left-Sided Portal Hypertension-a Case Report and Literature Review. *J Gastrointest Cancer*. 2018 Jul 23.

Ryska O, Serclova Z, Martinek J, Dolezel R, Kalvach J, Juhas S, Juhasova J, **Bunganič B**, Laszikova E, Ryska M. A new experimental model of calculous cholecystitis suitable for the evaluation and training of minimally invasive approaches to cholecystectomy. *Surg Endosc*. 2017 Feb;31(2):987-994.

10.3.2 Publikace bez IF

Bunganič B, Zavoral M. Efektivita přímé vizualizace žlučových cest. *Postgraduální Gastroenterologie & Hepatologie*. 2017, 3(4), 238-243.

Brogyuk, N., Suchánek, Š., **Bunganič, B.**, & Zavoral, M. Endoskopická léčba dehiscence anastomózy s pomocí Danišova stentu. *Gastroenterologie A Hepatologie*. 2016, 70(1), 77.

Bunganič, B., Suchánek, Š., Veselá, K., & Zavoral, M. Komplikovaný průběh endometriózy tenkého střeva. *Vnitřní Lékařství*. 2008, 54(5), 544.

Štrosová, A., Martínek, J., Suchánek, Š., Závada, F., Stefanová, M., **Bunganič, B.**, et al. Eozinofilní ezofagitida. *Gastroenterologie A Hepatologie*. 2011, 65(5), 272-278.

Hrdlička F, Větvička J, Bendová V, Beran J, **Bunganič B**, Krejčí St P, Kroček L, Monhart V, Mühlfeit J, Rákosník P, Stejskal P, Šafář M, Veselka J, Vitek L. A comprehensive interdisciplinary view at the Return to Sport after COVID-19 infection. *Vnitr Lek*. 2021 Winter;67(1):14-21