

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Benediktas

KURLINKUS

# Kasos adenokarcinomos diagnostinių ir prognostinių biožymenų paieška

**DAKTARO DISERTACIJA**

Medicinos ir sveikatos mokslai,  
Medicina (M 001)

---

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2017–2021 metais Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (pagal programą „Sveikas senėjimas“, sutarties nr. S-SEN-20-16, buvo gauta stipendija už akademinis pasiekimus).

**Mokslinis vadovas:**

**prof. dr. Audrius Šileikis** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

**Pirmininkas – prof. dr. Eugenijus Lesinskas** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Nariai:**

**prof. dr. Dainius Characiejus** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**prof. dr. Matthias Löhr** (Karolinskos institutas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**prof. dr. Rūta Navakauskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

**prof. dr. Jūratė Šipylaitė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. sausio 21 d. 12 val. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Raudonojoje auditorijoje. Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius, Lietuva, tel. +370 523 65000; el. paštas info@santa.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Benediktas

KURLINKUS

# Search for Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Pancreatic Adenocarcinoma

**DOCTORAL DISSERTATION**

Medicine and Health Sciences  
Medicine (M 001)

---

VILNIUS 2022

This dissertation was written between 2017 and 2021 at Vilnius University.

This research was funded by the “Healthy Ageing” programme of the Research Council of Lithuania, agreement No. S-SEN-20-16. Also a scholarship was granted for academic accomplishments from the Research Council of Lithuania.

**Academic supervisor:**

**Prof. Dr. Audrius Šileikis** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman – Prof. Dr. Eugenijus Lesinskas** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Members:**

**Prof. Dr. Dainius Characiejus** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Prof. Dr. Matthias Löhr** (Karolinska Institute, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Prof. Dr. Rūta Navakauskienė** (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

**Prof. Dr. Jūratė Šipylaitė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12:00 on the 21<sup>st</sup> of January 2022 in Red meeting room of the Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

Address: Santariškių str., house no. 2, Red meeting room, Vilnius, Lithuania.

Tel. +37052365000; e-mail: info@santa.lt.

The text of this dissertation can be accessed at Vilnius University Library as well as on the website of Vilnius University:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

# TURINYS

SANTRUMPOS .....	8
1. ĮVADAS.....	10
1.1. Problemos aktualumas.....	10
1.2. Darbo tikslas.....	13
1.3. Darbo uždaviniai .....	13
1.4. Ginamieji teiginiai.....	13
1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė .....	14
2. LITERATŪROS APŽVALGA .....	17
2.1. Kasos vėžio epidemiologija.....	17
2.2. Kasos vėžio rizikos veiksniai .....	20
2.3. Kasos vėžio onkogenėzė, reikšmingiausios mutacijos ir ligos unikalumą lemiantys veiksniai .....	23
2.4. Kasos vėžio patogenezės moksliniai tyrimai Lietuvoje .....	24
2.5. Kasos vėžio ankstyvoji diagnostika ir individualizuotas gydymas ...	25
2.5.1. Efektyvių ankstyvosios diagnostikos metodikų trūkumai .....	25
2.5.2. Tobulėjantis KDA chirurginis gydymas.....	27
2.5.3. Ligoninių ištyrimas chemorezistencijai numatyti – KDA gydymo ateitis .....	27
2.6. Kasos vėžio biožymenys .....	29
2.6.1. Šiuo metu naudojami biožymenys neatitinka ateities iššūkių ....	29
2.6.2. Kūno audiniai ir skysčiai, kuriuose galima tirti biožymenis .....	32
2.6.3. Su karcinoembrioniniu antigenu susijusios ląstelių adhezijos molekulės (CEACAM-ai), jų kaip biožymenų reikšmė .....	34
2.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir idėja atlikti šią studiją .....	37
3. TYRIMO METODIKA.....	38
3.1. Bendras studijos dizainas, tyrimo eiga .....	38
3.2. Naujų biožymenų radimo principai .....	42
3.3. Kasos audinių ir kraujo serumo mėginių surinkimas, saugojimas ir paruošimas tyrimams.....	43

3.4. Kasos audinių masių spektrometrija ir gautų duomenų proteominė analizė.....	45
3.5. Kasos audinių <i>Western-blot</i> tyrimas.....	46
3.6. Kraujo serumo mėginių tyrimai ELISA ir MCIA metodikomis.....	49
3.7. Statistinė analizė.....	51
4. TYRIMO REZULTATAI .....	53
4.1. Kasos audinių masių spektrometrijos ir proteominės analizės rezultatai, CEACAM6 kaip potencialaus kasos vėžio biožymens atradimas .....	53
4.2. CEACAM6 verifikacija KDA audiniuose.....	55
4.3. CEACAM6 validizacija kraujo serume, CEACAM6 palyginimas su CEA ir CA19-9.....	58
4.3.1. CEACAM6, CEA ir CA19-9 diagnostinių savybių vertinimas..	58
4.3.2. Pasiruošimas vertinti CEACAM6, CEA ir CA19-9 prognostines savybes .....	60
4.3.3. CEACAM6, CEA ir CA19-9 prognostinių savybių vertinimas, <i>Kaplan-Meier</i> išgyvenamumo analizė ir CEACAM6 savybė prognozuoti chemorezistenciją.....	65
5. REZULTATŲ APTARIMAS .....	71
5.1. CEACAM6 – prognostinis KDA biožymuo.....	71
5.2. CEACAM6 – netinkamas diagnostinis KDA biožymuo .....	73
5.3. CEACAM šeimos baltymai – potencialus KDA gydymo taikinyis ...	74
5.4. CEACAM6 – KDA chemorezistencijos predikcijos biožymuo .....	75
5.5. Tiriamųjų grupių demografiniai skirtumai .....	76
5.6. CEACAM6 – mažiausiai priklausomas KDA biožymuo .....	77
6. IŠVADOS.....	78
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	78
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	80
9. PRIEDAI .....	115
10. SANTRAUKA .....	116
11. GYVENIMO, KŪRYBINĖS IR MOKSLINĖS VEIKLOS APRAŠYMAS .....	147
12. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS .....	150

13. PRANEŠIMAI TARPTAUTINĖSE KONFERENCIJOSE .....	150
PADĖKA.....	152

## SANTRUMPOS

**BI** – bendras išgyvenamumas (angl. *overall survival*)

**BMT** – biomedicininis tyrimas

**Ca** – karcinoma (angl. *carcinoma*)

**CA19-9** – karbohidratinis antigenas 19-9 (angl. *carbohydrate antigen 19-9*)

**CD** – cukrinis diabetas

**CEA** – karcinoembrioninis antigenas (angl. *carcinoembryonic antigen*)

**CEACAM-ai** – su karcinoembrioniniu antigenu susijusios ląstelių adhezijos molekulės (angl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*)

**CEACAM1** – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 1 (angl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*)

**CEACAM5** – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 5 (angl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5*)

**CEACAM6** – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6 (angl. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*)

**DNR** – deoksiribonukleino rūgštys

**ELISA** – imunofermentinis tyrimas (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

**G** – tumoro diferenciacija

**IBL** – išgyvenamumas be ligos (angl. *disease-free survival*)

**IQR** – interkvartilinis intervalas

**IPMN** – intraduktalinė papilinė mucininė neoplazija

**JAV** – Jungtinės Amerikos Valstijos

**KMI** – kūno masės indeksas

**KDA** – kasos duktalinė adenokarcinoma



**LMS** – limfmazgių santykis

**LP** – lėtinis pankreatitas

**M** – tumoro tolimosios metastazės

**MCIA** – mikrodalelių chemiliuminescencinė imuninė analizė (angl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*)

**MSE** – masių spektrometrijos nuo duomenų nepriklausomos analizės režimas

**N** – tumoro infiltracija į regioninius limfmazgius

**OT** – optinis tankis

**PanIN1** – pankreatinė intraepitelinė neoplazija 1

**PanIN2** – pankreatinė intraepitelinė neoplazija 2

**PanIN3** – pankreatinė intraepitelinė neoplazija 3

**R** – tumoro rezekcijos statusas

**RNR** – ribonukleino rūgštys

**ROC** – priėmėjo veikimo charakteristika (angl. *receiver operating characteristic*)

**SK** – sveika kontrolė

**T** – tumoro dydis

**VRBTEK** – Vilniaus regioninis biomedicininų tyrimų etikos komitetas

**VU GMC** – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras

**VUL SK** – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos

# 1. ĮVADAS

## 1.1. Problemos aktualumas

Lietuvoje, kaip ir daugumoje išsivysčiusių šalių, piktybiniai navikai yra antra pagal dažnumą mirties priežastis po širdies ir kraujagyslių ligų. Tarp šių ligų kasos duktalinės adenokarcinomos (KDA), paties dažniausio kasos piktybinio naviko tipo, reikšmingumas vis didėja. Sergamumas kasos vėžiu (arba KDA, toliau šie terminai vartojami kaip sinonimai) Europoje kasmet vis didėja. Europos Sąjungoje nuo 1992 iki 2016 metų sergamumas KDA padidėjo 62 proc. [1]. Tai galimai lėmė visuomenėje plintantys pagrindiniai šią ligą provokuojantys veiksniai – sergamumas cukriniu diabetu, lėtiniu pankreatitu ir nutukimas. Prie to prisideda ir nepakankamas sveikatos priežiūros politikų dėmesys šiai ligai, per mažas atliekamų tyrimų finansavimas. Iš visų onkologinių ligų tyrimams Europoje skiriamų lėšų kasos vėžiui tirti skiriama tik mažiau nei 2 proc. šios sumos [1, 2]. Dėl to vis dar nėra sukurta efektyvių visuomenės patikros programų, jautrių diagnostinių priemonių, veiksmingų gydymo būdų bei trūksta individualizuotos medicinos sprendimų. Šių priemonių trūkumas lemia jau kelis dešimtmečius išliekančią ir nesikeičiančią blogą prognozę ir trumpą išgyvenamumą po šios ligos diagnozavimo. Šiuo metu, nepaisant medicinos ir mokslo pažangos, išgyvenamumo prognozė, susirgus KDA, tebėra tokia pati, kokia buvo prieš 40 metų: 5 metus išgyvena tik 3 proc. ligonių [1]. Tai tampa dar akivaizdžiau, palyginus šio naviko lemiamą mirtingumą su kitų onkologinių ligų mirtingumu, daugelio kurių jis pastaruoju metu mažėja. 2017 m. Europos Sąjungoje kasos vėžio sukeliamas mirtingumas viršijo krūties vėžio mirtingumą: 91 500 mirčių *vs* 91 000 mirčių [3]. Taigi KDA Europos Sąjungoje yra trečia pagal dažnumą onkologinių ligų sukeliama mirtingumo priežastis po plaučių ir kolorektalinio vėžio (bendrai abiem lytims) [4]. Pagal kai kurių specialistų prognozes, vyraujant dabartinėms tendencijoms, 2030 metais kasos vėžys gali tapti antra pagal dažnumą onkologinių ligų sukeliama mirtingumo priežastis [5].

Jautrių šios ligos diagnostinių metodų ir patikros programų trūkumas lemia, kad dažniausiai liga yra diagnozuojama vėlyvos stadijos [6]. Išplitusi liga neleidžia gydytojui skirti vienintelio gydymo būdo, kuris suteikia pasveikimo galimybę – radikali chirurginė operacija. Vienintelis liekantis gydymo būdas – paliatyvus, lemiantis blogą ligonio išgyvenamumo prognozę. Vidutinis išgyvenamumas po KDA diagnozės nustatymo yra 4–6 mėnesiai [3]. Šią ligą diagnozavus ir pradėjus gydyti ankstyvose stadijose būtų galima tikėtis reikšmingai didesnio išgyvenamumo ir geresnės prognozės. Kasos

vėžys galutinai diagnozuojamas gydytojui patologui ištyrus kasos biopsijos arba rezekuoto organo preparatą, o įtarti šią ligą galima remiantis laboratoriniais ir radiologiniais tyrimais.

Remiantis klinicine praktika, pagrindinis kasos vėžio laboratorinis tyrimas yra kraujo serume nustatomas biožymuo karbohidratinis antigenas 19-9 (CA19-9). Išanalizavus kelis atliktų tyrimų rezultatus nustatytas vidutinis CA19-9 jautrumas ir specifiškumas diagnozuojant kasos vėžį atitinkamai yra 79 proc. ir 82 proc. [7]. Šis biožymuo turi kelis svarbius trūkumus, galimai lemiančius jo negebėjimą aptikti ankstyvų stadijų kasos vėžį. CA19-9 netinkamas naudoti kuriant KDA patikros programą dėl santykinai mažo sergamumo kasos vėžiu bendroje populiacijoje ir to lemiamos mažos teigiamos predikcinės šio tyrimo vertės. Kitas trūkumas – nustatomos klaidingai teigiamos tyrimo reikšmės pacientams, sergantiems gerybinėmis ligomis, tokiomis kaip antai pankreatitas, cholangitas, obstrukcinė gelta, taip pat kepenų ar kasos cistos [8–11]. Apie 5–7 proc. populiacijos turi Lewis (a-b-) kraujo grupę ir negali ekspresuoti CA19-9, taigi jiems niekada nenustatoma šio biožymens aktyvumo padidėjimo [12]. Visi šie trūkumai riboja visavertį šio biožymens panaudojimą klinikinėje praktikoje, ypač siekiant geresnės ankstyvosios kasos vėžio diagnostikos, ir skatina tyrėjus ieškoti naujo biožymens, turinčio mažiau apribojimų.

Kita tyrimų grupė, leidžianti įtarti kasos vėžį, – radiologiniai tyrimai. Tarp pastarųjų transabdominalinis ultragarsinis tyrimas yra lengviausiai prieinamas, pigiausias ir neskleidžiantis radioaktyviosios spinduliuotės, bet šiam tyrimui trūksta jautrumo. Jis, pagal literatūros duomenis, yra 50–90 proc. [13], dėl to, nustačius reikšmingesnių pakitimų, prieš kasos biopsiją vis tiek reikia atlikti papildomus radiologinius tyrimus. Didesniu jautrumu ir specifiškumu pasižymi kompiuterinė tomografija, magnetinio rezonanso tomografija ir endoskopinis ultragarsinis tyrimas. Kelių detektorių eilučių kompiuterinė tomografija leidžia įvertinti artimąjį ir tolimąjį kasos vėžio išplitimą, infiltraciją į gretimas kraujagysles, teikia galimybę planuoti tolesnį ligonio gydymą [14]. Tyrimas leidžia 100 proc. jautrumu ir 72 proc. specifiškumu numatyti KDA rezektabilumą [15]. Magnetinio rezonanso tomografija neteikia galimybės įvertinti tolimojo ligos išplitimo, bet dėl geresnės minkštųjų audinių skiriamosios gebos pasižymi didesniu specifiškumu ir todėl esant ryškesniems pokyčiams kasoje yra pranašesnė už kompiuterinę tomografiją [16]. Endoskopinis ultragarsinis tyrimas taip pat pasižymi aukštu jautrumu ir specifiškumu, atitinkamai 86,8 proc. ir 95,8 proc. bei leidžia tyrimo metu atlikti biopsiją [17]. Deja, visi šie tyrimai yra riboti dėl mažo prieinamumo, didelės tyrimų kainos ir radioaktyviosios spinduliuotės (kompiuterinės tomografijos atveju). Taigi tarp radiologinių

tyrimų nėra lengvai prieinamo, pigaus, pakankamai jautraus ir reikšmingesnę populiacijos dalį dėl kasos vėžio leidžiančio ištirti metodo.

Mokslininkai sutaria, kad pirmosios piktybinės KDA ląstelės kasoje atsiranda keli metai prieš išplisdamos po visą kasą arba toliau metastazuodamos [18]. Šioms ląstelėms būdingas pakitęs ir įprastoms sveikoms ląstelėms nebūdingas metabolizmas, dėl to pasigamina ir į ląstelės aplinką išsiskiria įvairūs medžiagų apykaitos produktai. Šių medžiagų nustatymas leidžia ankstyvąją KDA diagnostiką ir atveria kelią kasos vėžį tirti tokiomis mokslo sritims kaip proteomika, metabolomika, transkriptomika, lipidomika [19–21]. Šiuos tyrimus galima atlikti tik mokslo centruose, ne klinikinėse laboratorijose, bet jais identifikuotas molekules, tarp jų įvairius baltymus ir aminorūgštis, jau galima tirti bei vertinti ir klinikiniais metodais. Tai leidžia jas panaudoti kaip klininius kasos vėžio biožymenis [22–24]. Dalis šių naujai identifikuotų biožymenų jau įrodė savo potencialą būti panaudoti KDA ankstyvajai diagnostikai: Galectin-3, IL28RA, PROZ, TNFRSF6B, HSP70 [25–28].

Sėkmingai diagnozavus kasos vėžį, iškyla dar vienas sunkumas, lemiantis sudėtingą šių ligonių tolesnę priežiūrą – individualizuotos medicinos sprendimų stoka. KDA būdingas heterogeniškumas, nulemtas besiformuojant ligai įvykstančių skaitlingų genų mutacijų [29–31]. Tai apsunkina prognozuoti kiekvieno individualaus atvejo klinikinę eigą, atsaką į gydymą, dėl to tam tikrais atvejais gydytojui sudėtinga pasirinkti tinkamiausią gydymo metodą. Individualizuotos medicinos sprendimai, paremti naujų prognostinių ir predikcinių biožymenų atradimu, padėtų spręsti šias klinikinės dilemas ir leistų subalansuoti geriausią kiekvieno ligonio gydymo schemą: paskirti optimalų operacijos laiką, parinkti tinkamą chemoterapiją, imunoterapiją arba taikinių terapiją. Atliktos klinikinės studijos, tyrusios šių gydymo principų pritaikymą kasos vėžiu sergančių ligonių priežiūrai, įrodė, kad tai gali padėti prognozuoti atsaką į chemoterapiją ir reikšmingai pailginti išgyvenamumą [32–34].

Taigi kasos vėžys yra itin aktuali liga. Jos reikšmė dėl didėjančio sergamumo, išliekančio blogo išgyvenamumo geriau kontroliuojamų daugumos kitų piktybinių ligų kontekste vis didėja. Daugelio specialistų nuomone, pagrindinės priemonės, galinčios pagerinti šią situaciją, – ankstyvoji KDA diagnostika ir individualizuotos medicinos sprendimai. Įvertinus šių priemonių sukūrimo galimybes – daugiausia vilčių teikia naujo, pakankamai jautraus ir specifinio biožymens, turinčio reikšmingų diagnostinių, prognostinių ir predikcinių savybių, radimas. Šiai nuomonei pritaria ir 2018 metais išleista Jungtinės Europos gastroenterologų organizacijos (angl. *United European Gastroenterology*) ataskaita apie kasos

vėžį Europoje [2]. Joje raginama plėsti ir aktyvinti kasos vėžio molekulinį biožymenų tyrimus.

## 1.2. Darbo tikslas

Identifikuoti ir įvertinti kasos duktalinės adenokarcinomos diagnostinius ir prognostinius biožymenis ligonių kraujo serume.

## 1.3. Darbo uždaviniai

1. Biobanko, kuriame būtų kaupiami ir saugomi kasos vėžinių, uždegiminių ir sveikų audinių bei atitinkamų asmenų kraujo serumo mėginiai, sukūrimas.
2. Kasos vėžinių, uždegiminių ir sveikų audinių mėginių aukštos raiškos masių spektrometrijos atlikimas bei rezultatų proteominė analizė, potencialaus kasos vėžio biožymens identifikavimas.
3. Potencialaus kasos vėžio biožymens verifikacija *Western-blot* metodika kasos vėžinių audinių mėginiuose, kaip neigiamą kontrolę naudojant kasos uždegiminių ir sveikų audinių mėginius.
4. Potencialaus kasos vėžio biožymens koncentracijos nustatymas ligonių, sergančių KDA, uždegimu ir sveikos kontrolės kraujo serumo mėginiuose naudojant *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) metodiką. Dabar klinikinėje praktikoje naudojamų biožymenų (karcinoembrioninio antigeno (CEA) ir CA19-9) koncentracijos nustatymas atitinkamuose kraujo serumo mėginiuose pagal mikrodalelių chemiluminescencinės imuninės analizės (MCIA) metodiką.
5. Potencialaus kasos vėžio biožymens diagnostinių savybių vertinimas, jų palyginimas su CEA ir CA19-9.
6. KDA sergančių ligonių išgyvenamumo analizė pagal *Kaplan-Meier* metodą. Potencialaus KDA biožymens prognostinių savybių vertinimas, jų palyginimas su CEA ir CA19-9.

## 1.4. Ginamieji teiginiai

1. Kasos vėžio onkogenezės metu įvykstančios mutacijos lemia metabolizmo pakitimus, dėl kurių KDA audinyje susidaro reikšmingas kiekis unikalių baltymų, kurių dalis išskiriama į ląstelės aplinką ir gali būti panaudoti kaip kasos vėžio biožymenys.

2. Su karcinoembrioniniu antigenu susijusios ląstelių adhezijos molekulės 6 (CEACAM6) ekspresija kasos vėžiniame audinyje dominuoja, palyginti su ekspresija uždegiminiame ar sveikos kontrolės grupės audiniuose.
3. CEACAM6 diagnostinės savybės yra ribotos dėl koncentracijos padidėjimo kontrolinėje grupėje – ligonių, sergančių lėtiniu pankreatitu, kraujo serume.
4. CEACAM6 yra reikšmingas prognostinis biožymuo, kurio didelė koncentracija kraujo serume statistiškai reikšmingai koreliuoja su pablogėjusiu bendru ligonių, sergančių KDA, išgyvenamumu po skirto radikalaus gydymo ir adjuvantinės chemoterapijos.
5. CEACAM6 galima panaudoti kaip chemorezistencijos predikcijos biožymenį, nes jo didelė koncentracija kraujo serume lemia blogesnę atsaką į skiriamą adjuvantinę chemoterapiją. Tai leidžia tobulinti kasos vėžiu sergančių ligonių individualizuotos medicinos metodikas.

#### 1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė

Šiuo moksliniu tyrimu siekiama pagerinti ligonių, sergančių kasos vėžiu, gydymo baigtį. Tuo tikslu nusitaikėme į dvi pagrindines priežastis, kurios, daugelio specialistų nuomone, lemia blogą prognozę sergant KDA: ankstyvosios diagnostikos priemonių stoka ir individualizuotos medicinos metodų trūkumas. Iš visų šiuo metu galimų medicininių priemonių šioms problemoms išspręsti itin daug potencialo turi biožymenys [2].

Kadangi dėl pakitusio metabolizmo KDA sintetina, kaupia ir į ląstelės aplinką išskiria daug unikalių baltymų, biožymenų tyrimams buvo sukurtas kasos audinių ir kraujo serumo mėginių biobankas. Ilga tyrimo trukmė (nuo 2013 iki 2020 metų) į tyrimą leido įtraukti 267 tiriamuosius. Iš jų 142 tiriamiesiems yra histologiškai patvirtintas kasos vėžys, o 104 tiriamieji įtraukti kaip kontrolinė grupė, jie sirgo lėtiniu pankreatitu arba nepiktybinėmis kasos ligomis ar hospitalizuoti dėl nesudėtingų planinių operacijų (pvz., pilvo sienos išvaržos plastika, hemoroidektomija). Toks skaitlingas KDA sergančių tiriamųjų ir kontrolinės grupės dydis leido galutinėje analizėje ištirti pakankamą kiekį asmenų ir gauti statistiškai reikšmingų rezultatų. Iš viso ELISA ir MCIA metodika ištirti 239 kraujo serumo mėginiai, *Western-blot* metodu ištirta 16 kasos audinių mėginių, o didelės raiškos masių spektrometrijos metodu ištirta 19 kasos audinių mėginių. Tiek į tyrimą įtrauktų tiriamųjų asmenų skaičiumi, tiek ištirtu galutiniu kasos audinių ir kraujo serumų mėginių kiekiu šis tyrimas yra gana unikalus ir, mūsų duomenimis, kasos vėžio biožymenų tyrimų srityje panašios apimties tyrimų atlikta tik keli [25, 28, 35, 36].

Atliktas pakankamas kiekis išsamių eksperimentinių tyrimų, kuriais įrodyta CEACAM6 reikšmė kasos vėžio onkogenezeje, lemianti agresyvesnę, greičiau progresuojantį, atsparesnę chemoterapijai ir trumpesniu išgyvenamumu pasižymintį ligos tipą [35, 37–43]. Nepaisant to, atlikti tik keli klinikiniai tyrimai, kuriuose tirta galima CEACAM6 ekspresijos koreliacija su pablogėjusiu išgyvenamumu, tokiu būdu įvertinant jo kaip prognostinio biožymens savybes [35, 44, 45]. Šie tyrimai, nors ir nustatytas CEACAM6 ekspresijos ryšys su pablogėjusiu išgyvenamumu, turėjo trūkumų. Visų tyrimų buvo ribotas tiriamųjų kiekis, nors tai ir leido autoriams gauti statistiškai reikšmingų duomenų, bet apribojo galutinių ir svarių išvadų suformulavimą. Atliekant daugelį tyrimų tirti tik kasos audiniai, kurie nors ir turi reikšmingą kiekį pakitusių baltymų ir yra lengvai tiriama laboratorijoje, bet tokius tyrimus pritaikyti klinikinėje praktikoje sudėtinga dėl itin invazyvaus tiriamosios medžiagos paėmimo metodikos (reikalinga chirurginė operacija arba biopsija) [44, 45]. Taip pat kai kuriais atvejais trūko duomenų apie tiriamų grupių (KDA sergančių asmenų ir kontrolinių grupių asmenų) pasiskirstymą pagal amžių, lytį, kūno masės indeksą (KMI), sergamumą cukriniu diabetu (CD) [35], o tokie svyravimai itin tikėtini tarp šių grupių ir gali turėti įtakos galutiniams tyrimo rezultatams. Mūsų atliktame tyrime aiškiai įvertinti šie ir kiti demografiniai rodikliai, jų reikšmingas pasiskirstymas tarp grupių, galima įtaka biožymenų koncentracijoms. Taip pat šiame tyrime ištirtas reikšmingas kiekis kraujo serumo mėginių. Ši tiriamoji medžiaga yra labai plačiai naudojama įvairaus lygmens sveikatos priežiūros įstaigose, todėl tikėtina, kad joje nustačius galimą biožymenį, jis būtų lengviau pritaikomas klinikinėje praktikoje.

Kitas mūsų atlikto tyrimo naujumas, ko pasigedome anksčiau kitų mokslininkų atliktose studijose, – potencialaus tiriamo vėžio biožymens diagnostinių, prognostinių ir kitų savybių palyginimas su jau klinikinėje praktikose naudojamais ir šiuo metu aukso standartu laikomais biožymenimis. Siekiant rasti naują, jautresnę, specifiskesnę, mažiau nuo įvairių veiksnių priklausomą, naujomis savybėmis pasižyminti biožymenį, natūraliai kyla poreikis jį lyginti su jau naudojamais biožymenimis. Dėl to šiame moksliniame darbe visuose tiriamuose kraujo serumo mėginiuose kartu ištirtos ir CA19-9 bei CEA koncentracijos. Tai leido nustatyti sritis, kuriose CEACAM6 galimai yra pranašesnis už šiuos konvencinius biožymenis.

Kasos vėžiui būdingas didelis kiekis genetinių mutacijų ir to nulemti metabolizmo pokyčiai lemia ne tik įvairių baltyminių molekulių sintezę, bet ir kiekvieno vėžinio susirgimo heterogeniškumą bei skirtingą atsaką į chemoterapiją. Tai yra viena iš priežasčių, lemiančių sudėtingesnę šių ligonių priežiūrą ir blogesnę gydymo baigtį. Remiantis atliktais eksperimentiniais

tyrimais nustatyta, kad CEACAM6 gali turėti chemorezistencijos predikcijos biožymens savybių [42, 46]. Šiuo aspektu mūsų atliktas tyrimas yra reikšmingas, nes pirmieji ištyrė CEACAM6 kaip galimą chemorezistencijos predikcijos biožymenį, atliekant klinikinį tyrimą ir tiriant kraujo serumo mėginius. Gauti rezultatai patvirtinto eksperimentų prielaidas apie šią svarbią ir kliniškai reikšmingą CEACAM6 savybę.

Taigi šio klinikinio tyrimo mokslinis naujumas ir reikšmė yra nulemta tarptautiniu mastu svaraus ištirto asmenų kiekio, tame tarpe ir jų kraujo serumo mėginių, aiškaus tiriamosios ir kontrolinės grupės demografinių savybių palyginimo, tiriamo biožymens savybių palyginimo su konvenciniais biožymenimis, galimų chemorezistencijos predikcijos biožymens savybių įvertinimo klinikiniam kontekste.

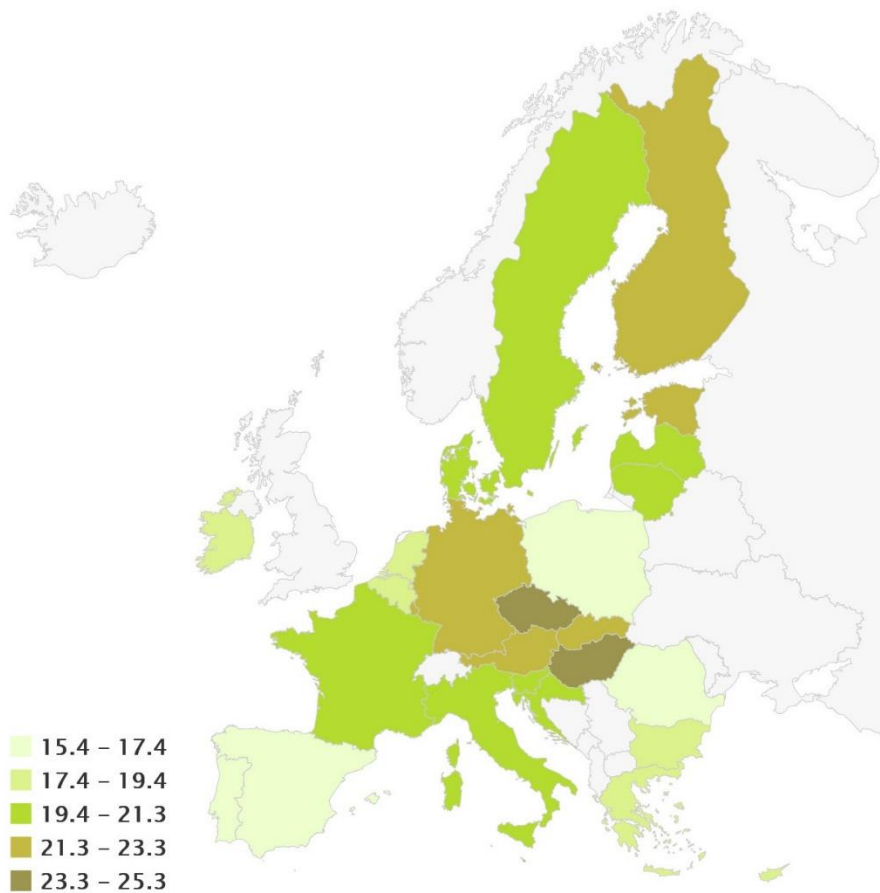


## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. Kasos vėžio epidemiologija

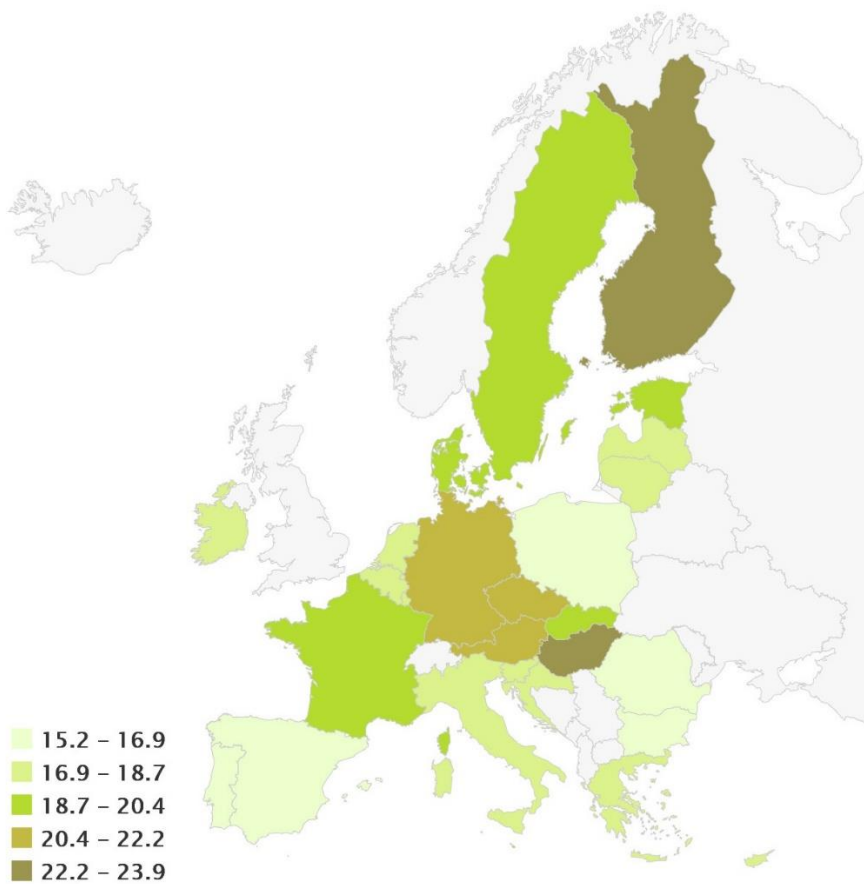
Onkologinės ligos yra viena iš aktualiausių pasaulio ir kartu Lietuvos sveikatos problemų. 2017 metais pasaulyje 9,56 milijono žmonių pirma laiko mirė dėl vėžio, o tarp visų mirusiųjų pasaulyje kas 6 žmogus mirė nuo onkologinės ligos [47]. Iš šių ligų epidemiologijos kasos vėžys pasižymi ypač blogomis tendencijomis. Nuo 1992 iki 2016 m. pasaulyje sergamumas kasos vėžiu padidėjo 62 proc., nuo 56 072 1992 metais iki 90 591 2016 metais [47], tikėtina todėl, kad didėja ligą provokuojančių veiksnių paplitimas. Sergančiųjų cukriniu diabetu skaičius Europos Sąjungoje nuo 2000 m. beveik padvigubėjo: nuo 16,8 mln. 2000 m. iki 32,3 m. 2019 m. [48]. Nutukimo paplitimas Europos Sąjungoje taip pat išaugo nuo 9,3 proc. 1975 m. iki 22,82 proc. 2016 m. [49]. Nepaisant pasiektos pažangos, per paskutinius kelis dešimtmečius neįvyko reikšmingesnio šios ligos ankstyvosios diagnostikos ar gydymo proveržio. Dėl to per paskutinius keturiasdešimt metų išgyvenamumas susirgus šia liga išlieka labiau nepakitęs [1]. Tai lemia, kad KDA tiek pagal sergamumą, tiek pagal sukeliama mirtingumą vis aktualėja, palyginti su kitomis onkologinėmis ligomis, daugelio kurių šie rodikliai pastaruoju metu mažėja. 2017 m. Europos Sąjungoje kasos vėžio mirtingumas praaugo moterų krūties vėžio mirtingumą [3], o vyrų jis lenkia prostatos vėžio mirtingumą [2]. Todėl KDA Europos Sąjungoje dabar yra trečia pagal dažnumą onkologinių ligų sukeliama mirtingumo priežastis po plaučių ir kolorektalinio vėžio [4]. Yra paskelbta nerimą keliančių įžvalgų, kad, vyraujant dabartinėms tendencijoms, 2030 metais kasos vėžys Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV) gali tapti antra pagal dažnumą onkologinių ligų sukeliama mirtingumo priežastimi [5].

Tarp Europos Sąjungos šalių Lietuva pagal sergamumą kasos vėžiu priskiriama vidutinio sergamumo šalims (2.1.1 pav.) ir užima 13 vietą tarp 27 šalių. Mažiausias sergamumas yra Portugalijoje, didžiausias – Vengrijoje [4].



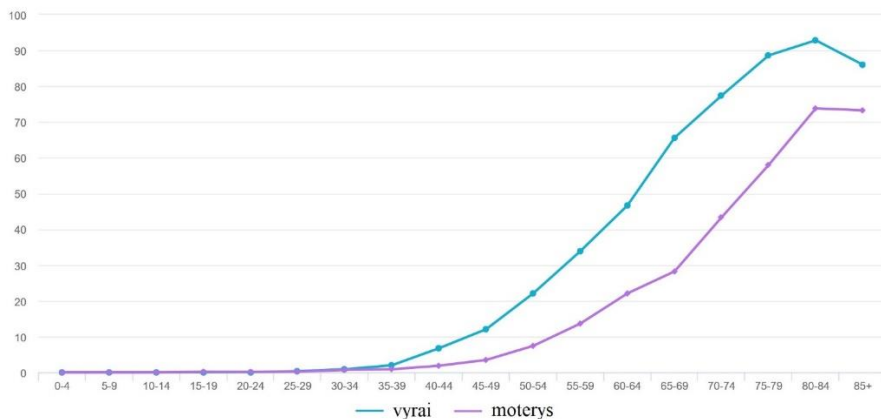
**2.1.1 pav.** Sergamumas kasos vėžiu Europos Sąjungoje. Pagal amžių standartizuotas dažnis 100 000 gyventojų. 2020 m. duomenys. Šaltinis – *European Cancer Information System*

Tarp Europos Sąjungos šalių pagal mirštamumą dėl kasos vėžio Lietuva taip pat priskiriama vidutinio mirtingumo šalims (2.1.2 pav.) ir užima 15 vietą tarp 27 Europos Sąjungos šalių. Mažiausias mirštamumas vėlgi yra Portugalijoje, didžiausias – Vengrijoje [4].



**2.1.2 pav.** Kasos vėžio sukeliamas mirštamumas Europos Sąjungoje. Pagal amžių standartizuotas dažnis 100 000 gyventojų. 2020 m. duomenys. Šaltinis – *European Cancer Information System*

Dar viena priežastis, lemianti kasos vėžio aktualumą, yra visuomenės senėjimas, nes kasos vėžys dažniausiai diagnozuojamas vyresnio amžiaus asmenims. Tai matoma ir iš sergamumo KDA pasiskirstymo pagal amžiaus grupes Lietuvoje [4] (2.1.3 pav.).



**2.1.3 pav.** Abiejų lyčių sergamumas kasos vėžiu Lietuvoje pagal amžiaus grupes. Pagal amžių standartizuotas dažnis 100 000 gyventojų. 1993–2012 m. duomenys. Šaltinis – *European Cancer Information System*

Nerimą kelia visuomenės senėjimo Europos Sąjungoje prognozė, pagal kurią, 80 metų ir vyresnių gyventojų dalis iki 2100 m. padidės du su puse karto – nuo 5,8 proc. iki 14,6 proc. [50].

Taigi kasos vėžys dėl plintančių rizikos veiksnių ir senėjančios visuomenės pasižymi didėjančiu sergamumu ir mirštamumu, todėl tampa vis aktualesnė visuomenės sveikatos problema.

## 2.2. Kasos vėžio rizikos veiksniai

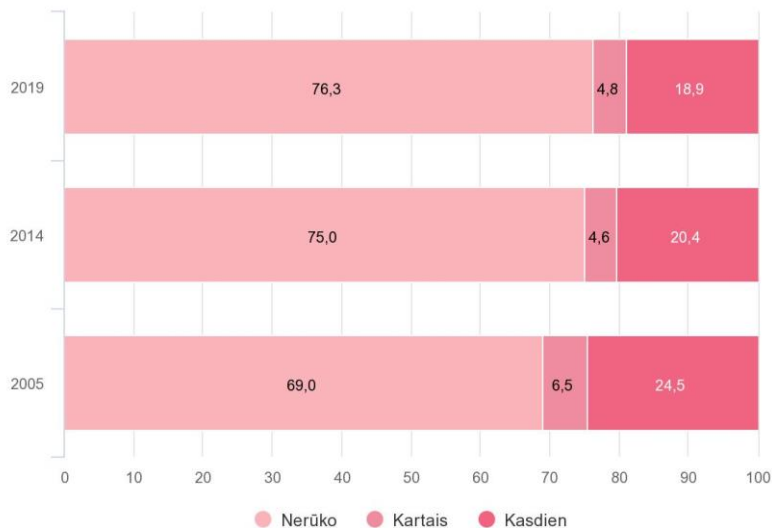
Siekiant suvaldyti didėjančią kasos vėžio naštą sveikatos priežiūros sistemos, nerandant naujų efektyvių diagnostikos ir gydymo metodų, buvo identifikuotas ne vienas rizikos veiksnys, reikšmingai padidinantis kasos vėžio išsivystymo tikimybę. Tai teikia galimybę imtis kasos vėžio prevencinių priemonių.

Cukrinio diabeto, kaip svarbaus KDA rizikos veiksnio, reikšmė buvo įrodyta kelių plačių epidemiologinių studijų [51–54]. CD ir kasos vėžys yra labai susiję. Abi šios ligos turi bendrus rizikos veiksnius: nutukimas, atsparumas insulinui, genetinė predispozicija, vyresnis amžius. Taip pat nustatyta, kad medikamentai, skirti CD gydyti, sumažina KDA išsivystymo riziką, o skiriant juos kartu su chemoterapija, pagerėja išgyvenamumas [55, 56]. Nustatyta, kad CD yra ne tik KDA rizikos veiksnys, bet ir komplikacija, atsirandanti po kasos vėžio išsivystymo [57]. Nors pacientai, sergantys CD, turi didesnę riziką susirgti KDA, ši rizika būna didžiausia pirmaisiais metais po CD diagnozės nustatymo. Nustatyta, kad pirmaisiais 4 metais po CD

nustatymo kasos vėžio išsivystymo rizika yra 50 proc. didesnė, palyginti su pacientų, sergančių CD 5 metus ir ilgiau [52]. Dėl to daugelis specialistų po CD diagnozės suformulavimo rekomenduoja atlikti ištyrimą dėl kasos naviko. Atsižvelgiant į didėjantį sergamumą CD Europos Sąjungoje, šis rizikos veiksnys KDA išsivystyti taps vis aktualesnis [48].

Kitas svarbus kasos vėžio rizikos veiksnys yra nutukimas. Nustatyta, kad žmonės, sergantys nutukimu, turi nuo 20 proc. iki 47 proc. didesnę riziką susirgti KDA [2, 58]. Po diagnozės nustatymo šie žmonės taip pat pasižymi blogesne prognoze ir išgyvenamumu [59, 60]. Nutukimas dažnai siejamas su būklėmis, apibrėžiančiomis metabolinį sindromą: hipercholesterolemija, hiperglikemija, atsparumas insulinui, CD. Dieta, sukelianti cholesterolio koncentracijos kraujyje padidėjimą, taip pat padidėjusi gliukozės koncentracija kraujyje ir hiperinsulinemija buvo identifikuoti kaip galimi kasos vėžio rizikos veiksniai [61–63]. Nutukimo paplitimas Europos Sąjungoje taip pat didėja, taigi, tikėtina, prisideda prie didėjančio sergamumo KDA [49].

Tabako rūkymas susijęs su 20 proc. visų kasos vėžio atvejų, o rūkančiųjų rizika susirgti KDA yra padidėjusi dukart, palyginti su nerūkančiais asmenimis. Rizika didėja atitinkamai didėjant per dieną surūkomų cigarečių skaičiui ir rūkymo trukmei [64]. Kai kurių studijų duomenimis, tai yra vienas iš reikšmingiausių kasos vėžio rizikos veiksnių, labiausiai didinantis šios ligos išsivystymo riziką [65]. Laimei, tabako rūkymo paplitimas mažėja tiek Europos Sąjungoje [66], tiek Lietuvoje (2.2 pav.) [67].



**2.2 pav.** Lietuvos gyventojų tabako gaminių rūkymo įpročiai procentiniu santykiu 2005, 2014 ir 2019 metais. Šaltinis – BĮ „Lietuvos statistika“.

Asmenys, kurie serga lėtiniu pankreatitu, turi didesnę riziką susirgti kasos vėžiu. Apskaičiuota, kad 5 proc. šių asmenų per 20 metų susergera KDA [68]. Ši rizika ypač padidėja, kai lėtiniu kasos uždegimu susergera jauno amžiaus: esant paveldimam arba tropiniam pankreatitui, rizika sirgti kasos vėžiu padidėja bent 50 kartų [68]. Pagal kitos studijos rezultatus, praėjus 5 metams nuo susirgimo lėtiniu pankreatitu, KDA išsivystymo rizika padidėja beveik 8 kartus [69]. Sergamumas lėtiniu pankreatitu, pagal tyrimus, turi tendenciją didėti [70], taigi šio rizikos veiksnio aktualumas taip pat nemažes.

Gausus alkoholinių gėrimų vartojimas (daugiau negu 3 alkoholio vienetai per dieną) susijęs su didesne kasos vėžio išsivystymo rizika [71]. Atitinkamai saikingas alkoholio vartojimas veikia kaip prevencinis KDA atsiradimo veiksnys [72]. Europoje atliktame dideliame multicentriname tyrime nustatyta vidutinė, bet statistiškai reikšminga kasos vėžio ir piktnaudžiavimo alkoholiu sąsaja [73]. Taip pat palygintos alkoholio rūšys: alus ir spiritiniai alkoholiniai gėrimai sukelia didesnę KDA išsivystymo riziką nei vynas.

Dar vienas svarbus kasos vėžio rizikos veiksnys yra paveldimumas. Susirgimo šia liga rizika padidėja nuo 2 iki 3 kartų, jeigu asmens tėvai, broliai, sesės ar vaikai sirgo KDA [2]. Kito tyrimo nustatyta, kad kuo daugiau pirmos eilės giminaičių serga šia liga, tuo labiau didėja susirgimo rizika: jeigu serga vienas giminaitis, susirgimo rizika yra padidėjusi 4,5 karto, jeigu du – 6,4 karto, jeigu trys ar daugiau – iki 32 kartų [74]. Manoma, kad 10 proc. kasos vėžio atvejų yra nulemti genetinės predispozicijos [58].

Kiti du svarbūs nemodifikuojami rizikos veiksniai yra lytis ir amžius. Dėl lyties įtakos KDA išsivystyti duomenys yra prieštaringi: pagal vienus šaltinius, didesnę riziką susirgti turi vyrai [58], pagal kitus – moterys [75]. Tai gali būti priežastimi, kodėl Jungtinės Europos gastroenterologų organizacijos ataskaitoje neišskiriama lytis kaip kasos vėžio rizikos veiksnys [2]. Kita vertus, dėl amžiaus didėjanti rizika susirgti KDA yra ne kartą įrodyta ir visuotinai pripažįstama: du trečdaliai visų ligonių yra vyresni negu 65 metų [2, 58, 75].

Taigi yra nustatyta visa grupė aktualių kasos vėžio rizikos veiksnių, kurių reikšmė pagrįsta epidemiologiniais ir klinikiniais tyrimais. Du trečdaliai šių rizikos veiksnių yra modifikuojami, tai leidžia imtis efektyvių prevencinių priemonių.

### 2.3. Kasos vėžio onkogenezė, reikšmingiausios mutacijos ir ligos unikalumą lemiantys veiksniai

Kasos duktalinė adenokarcinoma – egzokrininės kasos dalies piktybinis navikas, kurį sudaro sutrikusios diferenciacijos epitelinės ląstelės su gausia ryškia desmoplastine stroma ir grupėmis įsiterpusiomis duktalinio epitelio ląstelėmis [76]. Manoma, kad kiekvienas kasos vėžys iki visiškai susiformuoja pereina tam tikras stadijas. Dėl pakitusių acinarinių ląstelių visų pirma vystosi acinarinė-duktalinė metaplazija, vėliau atsiranda pankreatinė intraepitelinė neoplazija 1 (PanIN1), pankreatinė intraepitelinė neoplazija 2 (PanIN2), pankreatinė intraepitelinė neoplazija 3 (PanIN3) ir galiausiai KDA [77]. Galutinės priežastys, lemiančios šį patogenezinį mechanizmą, neištirtos, bet pasaulyje šia linkme atliekama daug tyrimų ir dauguma reikšmingų genetinių mutacijų jau nustatyta. Taip pat ištirti ir nustatyti KDA unikalumą lemiantys veiksniai.

Tiriant KDA mėginius matoma, kad kiekvienam pacientui būdingas skirtingas įvykusių genetinių mutacijų, lėmusių onkologinės ligos išsivystymą, rinkinys. Nepaisant to, tam tikrų mutacijų aptinkama daugelyje KDA ir galima susidaryti įspūdį, kad yra molekulinė mechanizmų, lemiančių kasos vėžio susiformavimą.

Kras yra pirmasis onkogenas, identifikuotas kaip turintis kritinę svarbą KDA išsivystyti. Manoma, kad Kras GTP-azė lemia naviko proliferaciją, diferenciaciją ir paciento išgyvenamumą [78]. Kras 12-ojo kodono aktyvacija nustatyta beveik 100 proc. KDA ir daugelyje PanIN ištirtų audinių mėginių [79, 80]. Kras onkogeno reikšmė patvirtinta atlikus tyrimus su KDA ląstelių linijomis, kuriose Kras buvo genetiškai nuslopintas ir tai lėmė reikšmingą KDA ląstelių augimo sulėtėjimą [81]. Vien Kras mutacijos aktyvinimo nepakanka kasos vėžiui susiformuoti, nes ši mutacija nustatoma ir daugelyje lėtinio pankreatito audinių mėginių [82]. Kita vertus, tai paaiškina, kodėl ši būklė yra KDA išsivystymo rizikos veiksnys.

Antra pagal dažnumą genetinė mutacija, nustatoma KDA mėginiuose, yra ARF tumoros supresoriaus Ink4a lokuse įvykstanti mutacija. Ji nustatoma iki 95 proc. kasos vėžio atvejų [79]. Šis lokusas yra atsakingas už tinkamą ląstelės senėjimo procesą kaip atsaką į stresą, amžių ar telomerų eroziją [83]. *In vivo* tyrimų įrodyta, kad šio geno lokuso funkcijos praradimas kartu su Kras aktyvinimu lemia KDA išsivystymą [84, 85]. Taigi tikėtina, kad, įvykus Kras aktyvacijos ir ARF mutacijos nulemtu ląstelių senėjimo sutrikimo kombinacijai, susidaro tinkamos aplinkybės išsivystyti KDA. Šio geno lokuso mutacijų taip pat buvo aptikta lėtinio pankreatito audinių mėginiuose [86].

Dar vienas tumoro supresoriaus baltymas, galimai atsakingas už KDA heterogeniškumą, agresyvumą ir atsparumą skiriamai chemoterapijai, yra p53 [87, 88]. Šis proteinas akumuliuoja mutacijas, įvykstančias dėl aktyviųjų deguonies formų ar telomerų sutrumpėjimo. Šios mutacijos būdingos ankstyvosios kasos vėžio stadijoms, PanIN pažeidimams [79, 89]. p53 mutacijos nustatomos apie pusę KDA atvejų, bet kur kas dažniau aptinkama šio baltymo geno supresija [79, 80, 90].

SMAD4 yra kitas svarbus tumoro supresoriaus baltymas, kurio geno pažeidimų taip pat dažnai aptinkama PanIN mėginiuose ir iki 50 proc. KDA atvejų [80, 91].

Kasos vėžio patogenezės metu įvykstantys pakitimai lemia šios onkologinės ligos unikalumą, palyginti su kitomis vėžinėmis ligomis. Vienas iš tokių pakitimų – itin ryški desmoplastinė stroma, kuri gali sudaryti iki 90 proc. naviko tūrio ir lemia jo mechaninį kietumą. Manoma, kad šis audinys susiformuoja iš su vėžiu susijusių fibroblastų, o jų atsiranda dėl lėtinio naviko sukkelto uždegimo, kuris aktyvina kasos žvaigždines ląsteles. Šios ląstelės KDA patogenezės metu pagamina didelį kiekį ekstraceliulinio matrikso [92]. Kai kurių mokslininkų nuomone, šios ląstelės onkologinės ligos eigai yra tokios pat svarbios, o gal net ir svarbesnės už pačias KDA ląsteles [93]. Dar viena itin kasos vėžiui būdinga savybė – hipoksinė aplinka. Ši aplinkybė yra lemiamą ryškios desmoplastinės stromos ir to nulemtos hipovaskuliarizacijos, o tai *vice versa* skatina kasos žvaigždinių ląstelių aktyvaciją ir tolesnę stromos produkciją [94, 95]. Ši hipoksinė ir gausi ekstraceliulinio matrikso aplinka nulemia dar vieną KDA būdingą savybę – imunosupresinę aplinką dėl sutrikdyto T limfocitų patekimo į naviką ir vėlesnio aktyvinimo [96–98].

#### 2.4. Kasos vėžio patogenezės moksliniai tyrimai Lietuvoje

Lietuva pasaulyje žinoma dėl savo išvystytų mokslo institucijų ir įžvalgių bei kruopščių mokslininkų. Tarp šių tyrėjų atliekamų darbų yra nemažai tyrimų, susijusių su kasos vėžio patogeneze.

Dalis šių tyrimų atlikta *in vitro* būdu tiriant kasos vėžio ląstelių linijas, jas veikiant tais pačiais gydymo metodais kaip ir ligonius (radioterapija, chemoterapija) ir vertinant šio gydymo poveikį [99, 100]. Viename iš tokių tyrimų net sukurta ir išanalizuota nauja kasos vėžio ląstelių linija pavadinimu „Capan-26“ [101], o kitame tirtas specialių nanodalelių poveikis kasos vėžio ląstelėms [102]. Lietuvos mokslininkai taip pat yra atlikę svarbių šios ligos įtakos ligonių metaboliniams pokyčiams, kurie galiausiai lemia gyvenimo kokybės blogėjimą ir blogesnę šių ligonių gydymo baigtį, tyrimų [60, 103]. Iš atliktų klinikinių studijų išsiskiria randomizuotas skirtingų diagnostinių



algoritmų gebėjimo atlikti kasos vėžio ir lėtinio pankreatito tikslią diferencinę diagnostiką tyrimas [104].

Kasos vėžio biožymenų tyrimų srityje Lietuvoje pasižymėjo tyrėjas dr. Jaroslav Tumas, identifikavęs aminorūgščių profilius, kurie gali padėti kasos navikų (piktybinių vs. gerybinių) diferencinėje diagnostikoje, taip pat nustatant kasos vėžio tipus, tuo prisidedama prie šios ligos individualizuotos medicinos tobulinimo [24].

2019 metais Lietuvos mokslo premija už 15 metų mokslinį darbą kasos navikinių ir uždegiminių ligų srityje apdovanoti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto mokslininkai profesoriai Giedrius Barauskas, Antanas Gulbinas ir Žilvinas Dambrauskas. Ilgametis tyrėjų darbas matomas dešimtyse išsamių mokslinių publikacijų [60, 105–108].

## 2.5. Kasos vėžio ankstyvoji diagnostika ir individualizuotas gydymas

### 2.5.1. Efektyvių ankstyvosios diagnostikos metodikų trūkumai

Kasos vėžio diagnozavimas ankstyvosiose stadijose leidžia taikyti vienintelį efektyvų gydymo būdą – radikalią chirurginę operaciją. Deja, toks gydymas galimas tik 15–20 proc. ligonių [19, 93]. Didesnės tokiu būdu operuojamų ligonių dalies pasiekti nepavyksta, nes nėra kasos vėžio ankstyvosios diagnostikos programos. KDA išsivystymo rizika bendroje populiacijoje per visą asmens gyvenimą nėra didelė – 0,5–1 proc. [109], o 90 proc. asmenų diagnozės nustatymo metu ligos simptomų nejaučia [93]. Taigi sukurti efektyvią ir ekonomiškai naudingą ankstyvosios diagnostikos programą visos populiacijos tyrimui yra sudėtinga.

Atliktų tyrimų nustatyta, kad 40 proc. kasos vėžio atvejų yra sporadiniai, 30 proc. susiję su tabako rūkymu, 15 proc. – su netinkama mityba, 10–15 proc. – su genetinė predispozicija ir < 5 proc. – su lėtinio pankreatitu [109]. Taigi panašu, kad rizikos grupių, turinčių vieną ar daugiau rizikos veiksnių, tyrimai galimai būtų perspektyvesni. Bet ir šioms grupėms efektyvių ankstyvosios diagnostikos metodikų dar nėra sukurta. Atlikti tokios plačios visuomenės dalies radiologinius tyrimus būtų sudėtinga dėl jų kainos ir riboto prieinamumo.

Šiuo atveju daug vilties teikia vadinamoji skystoji biopsija, kai, atliekant kūno skysčių (kraujo, šlapimo, seilių) tyrimus, gaunama išsami informacija apie galimą onkologinę ligą. Dažniausiai šiomis metodikomis tiriamos medžiagos yra įvairūs baltymai, cirkuliuojančios vėžinės deoksiribonukleino rūgštys (DNR) ir ribonukleino rūgštys (RNR) arba net nuo tumoro

atsilaisvinusios vėžinės ląstelės. Jau yra atlikta nemažai ikiklinikinių šios krypties studijų, bet klinikinėje praktikoje pritaikomo metodo nėra sukurta [110–112]. Vienas iš svarbiausių vis dar esamų tokios sistemos trūkumų yra mažas diferencinės diagnostikos pajėgumas, kai KDA siekiama atskirti nuo lėtinio pankreatito [104, 113]. Kitas svarbus iššūkis tobulinant skystųjų biopsijų technologiją – pirmiau minėtų medžiagų paieška kūno skysčiuose, kur jų koncentracija yra itin maža. Pavyzdžiui, radiologiniais tyrimais aptinkamas 1 cm skersmens kasos vėžys gali nesintezuoti ir neiškirti pakankamo kiekio pakitusių molekulių, kad jas galėtų aptikti šiuolaikinė laboratorinė įranga [93]. Tai ypač aktualu, kai yra tiriama cirkuliuojanti vėžinė DNR, kurios paprastai aptinkama itin mažos koncentracijos. Taip pat kai kurios mutacijos, pvz., Kras, nustatomos ne tik KDA, bet ir sergant kitomis vėžinėmis ligomis ar net gerybinėse kasos cistose ir ne visada reiškia didesnę supiktybėjimo riziką [114, 115]. Galima gauti klaidingai teigiamų tyrimo rezultatų, kurių turėtų būti itin vengiama dėl sukeliama nepagrįsto streso tiriamiesiems. Dėl to šiuo metu yra rekomenduojama šias mutacijas tirti ne tik kokybiškai, bet ir kiekybiškai arba net derinti šiuos tyrimus su baltymine analize [93].

Kasos vėžio ankstyvosios diagnostikos programai sukurti reikia pažangos dviejose srityse. Viena, jau aptarta, yra ankstyvų vėžio formų aptikimo metodikos tobulinimas. Kita sritis, ne ką mažiau svarbi, sukurti tokią metodiką, kuri leistų identifikuoti asmenis, turinčius didžiausią KDA išsivystymo riziką. Ši metodika turėtų apimti ne tik jau identifikuotus rizikos veiksnius, bet ir kompiuterių programų arba dirbtinio intelekto atliekamą asmens elektroninės sveikatos sistemos įrašų, joje atsirandančių per visą tokio asmens gyvenimą, analizę. Dirbtinio intelekto gebėjimas aiškiai identifikuoti kasos vėžio rizikos grupes, kurioms indikuotini papildomi tyrimai, jau patikrintas atliktoje studijoje [116]. Atitinkamos ankstyvosios diagnostikos programos, kai reguliariai tiriama tiksliai atrinkta rizikos grupė, įrodė savo naudą. Viename šių tyrimų 354 pacientai buvo stebimi 16 metų [117]. Stebėjimo metu, atsižvelgiant į kasos vėžio išsivystymo riziką, kas 3, 6 arba 12 mėnesių buvo atliekamas endoskopinis ultragarsinis tyrimas, kompiuterinė tomografija arba magnetinio rezonanso tomografija. Per studijos laikotarpį 14 šios grupės asmenų susirgo KDA. Tyrimo rezultatas: 90 proc. pacientų buvo galima atlikti radikalią operaciją, o trejų metų išgyvenamumas pasiekė 85 proc.

Taigi kasos vėžio ankstyvosios diagnostikos programa dar nėra sukurta, bet nubrėžtos aiškios kryptys, kuriomis reikia judėti. Tai yra rizikos grupių identifikavimas, pasinaudojant kompiuterių programomis arba dirbtiniu intelektu, ir ankstyvosios diagnostikos metodikų tobulinimas. Ikiklinikiniai

tyrimai ir bandomosios studijos jau pateikia daug žadančių rezultatų, todėl reikia tik kažkiek laiko, kol tokia programa bus sukurta.

### 2.5.2. Tobulėjantis KDA chirurginis gydymas

Galimybė atlikti radikalias chirurgines operacijas ligoniams, sergantiems kasos duktaline adenokarcinoma, pastaruoju metu didėja. Ji padidėjo nuo 5 proc. [118] XX amžiaus viduryje iki 15–20 proc. šiais laikais [19, 93]. Tai, daugelio tyrėjų nuomone, lėmė patobulėjusi neoadjuvantinė chemoterapija, pagerėjusi chirurginė technika ir įranga bei ištobulėjusi perioperacinė ligonių priežiūra [119]. Per tą patį laikotarpį pooperacinis mirštamumas po tokių operacijų reikšmingai sumažėjo ir dabar tesiekia mažiau nei 5 proc. [120]. Manoma, kad vienas iš pagrindinių veiksnių, lėmusių šį mirštamumo sumažėjimą ir geresnę pooperacinę baigtį, buvo kasos chirurginių operacijų atlikimo sukonzentravimas specializuotuose centruose [121]. Kitas svarbus veiksnys – optimizuota pooperacinių komplikacijų priežiūra dėl padidėjusio tarpdisciplininio komandinio darbo [119]. Patobulėjo ir adjuvantinė chemoterapija, lėmusi išaugusį bendrą išgyvenamumą po KDA operacinio gydymo [119]. Bendrai tobulėjant gydymui atsirado net nauja KDA išplitimą apibūdinanti sąvoka – paribiškai operabilus navikas [122]. Tai toks navikas, kai atliekant radikalią operaciją yra didesnė tikimybė nevisiškai rezekuoti naviką ir dėl to turėti blogesnę gydymo baigtį. Geriausias gydymo būdas esant tokio tipo navikui tebėra diskusijų objektas [119]. Tuo tarpu esant dar vienam KDA išplitimo tipui, vietiskai išplitusiam navikui, tinkamiausia yra skirti neoadjuvantinę chemoterapiją. Tai leidžia 60 proc. ligonių galų gale atlikti chirurginę operaciją [123]. Taigi per paskutinius dešimtmečius KDA chirurginio gydymo galimybės išsiplėtė ir patobulėjo, bet tai išlieka sudėtinis multidisciplininės šių ligonių priežiūros elementas.

### 2.5.3. Ligonų ištyrimas chemorezistencijai numatyti – KDA gydymo ateitis

Kasos vėžys dėl būdingo gausaus įvairių mutacijų skaičiaus būna itin heterogeniškas ir dėl to šia liga sergančių pacientų atsakas į skiriamą gydymą dažniausiai skirtingas [29–31]. Viena iš kasos vėžio gydymo aktualijų – chemorezistencija ir sudėtingai prognozuojama ligos eiga. Taigi susidaro įspūdis, kad galimai yra tam tikrų KDA potipių, kurių kiekvienam būtų galima pasiūlyti individualizuota medicina paremtą gydymo metodiką. Siekiant įvertinti galimą tokių potipių egzistavimą atlikti tyrimai įnešė daugiau

aiškumo šia tema, bet unifikuotai KDA potipių nenustatė, taip pat nebuvo daugiau dėmesio skirta chemorezistencijai [24, 80, 124–126]. Tik Waddel su bendraautoriais tarp savo darbo rezultatų pateikia tikėtinus terapinio atsako biožymenis į platinos pagrindu skiriamą chemoterapiją. Iš tikrųjų klinikinėje praktikoje reikšmingo kasos vėžio galimos chemorezistencijos biožymens, kuris galėtų KDA sugrupuoti pagal tikėtiną atsaką į chemoterapiją, praktiškai nėra. Šiuo metu aukso standarto biožymuo CA19-9 gali būti naudojamas ne tik kasos vėžio diagnozės tikimybei įvertinti, bet ir siekiant vertinti atsaką į paskirtą chemoterapiją, prognozuoti ligos stadiją, chirurginio gydymo baigtį [127–133]. Taip pat nustatyta CA19-9 savybė, kuri leidžia pagal jo koncentracijos dinamiką neoadjuvantinės chemoterapijos metu numatyti tinkamiausią adjuvantinės chemoterapijos režimą [134]. Vis dėlto nėra duomenų apie CA19-9 galimybę prognozuoti atsaką į chemoterapiją dar pačioje ligos pradžioje, iškart po diagnozės nustatymo. Šiuo metu daugelis mokslininkų ir klinikistų linkę manyti, kad kasos vėžį reikia vertinti ne kaip vienalytę ligą, net ir tuo atveju, kai liga yra išplitusi ir chemoterapija yra praktiškai vienintelis gydymo variantas. Tokiu būdu išvengiama „vienas dydis tinka visiems“ požiūrio ir pacientai yra apsaugomi nuo medikamentų toksinio poveikio ir šalutinių reakcijų, kurie kai kuriais atvejais nepailgina išgyvenamumo ir nepagerina gyvenimo kokybės.

Šiuo metu pagrindinės adjuvantinės chemoterapijos schemas KDA gydyti yra *FOLFIRINOX* (FOL – folinė rūgštis, F – fluorouracilas, IRIN – irinotekanas, OX – oksaliplatina) ir gemcitabino pagrindu bei galimos įvairios šių schemų modifikacijos, papildymai. Nors abiejų schemų pagrindu skiriamo gydymo efektyvumas jau šio amžiaus pradžioje buvo įrodytas ir patvirtintas išsamiais klinikiniais tyrimais [135, 136], daugėja kasos vėžio tipų, kurie yra mažai jautrūs šioms gydymo metodikoms. Identifikuoti šiems KDA tipams skirti tam tikros rūšies biožymenis – chemoterapijos rezistencijos biožymenis.

Atliktose bandomosiose klinikinėse studijose kaip galimi kasos vėžio chemoterapijos rezistencijos biožymenis yra ištirtos kelios medžiagos. Jos gali atverti duris individualizuotai medicinai šioje onkologijos srityje. Shin et al. pagal hENT1 (angl. *human Equilibrative Nucleoside Transporter 1*) baltymo ekspresiją KDA audiniuose atrinko grupę ligonių ir ją suskirstė į du pogrupius. Pirmas pogrupis buvo su maža hENT1 ekspresija (< 50 % audinio), ligoniams skirtas adjuvantinis 5-fluorouracilas su folio rūgštimi. Antro pogrupio ligoniai su didele hENT1 ekspresija (≥ 50 % audinio), jiems skirtas adjuvantinis gemcitabinas. Vėliau visi šie ligoniai buvo palyginti su kontroline tiriamųjų grupe, kuriai chemoterapija buvo skirta neatsižvelgiant į hENT1 ekspresiją. Rezultatas – pagal hENT1 ekspresiją KDA audinyje

ligoniams paskyrus chemoterapinį gydymą statistiškai reikšmingai pagerėjo išgyvenamumas be ligos (IBL) ir bendras išgyvenamumas (BI), palyginti šiuos ligonius su kontroline grupe: 22,9 vs. 10,9 mėnesio ( $p = 0,043$ ) ir 36,2 vs. 22,1 mėnesio ( $p = 0,001$ ). Kita studija taip pat paskelbta 2021 metais, joje Gao su bendraautoriais kaip galimą KDA biožymenį įvertinto glikaną – sialintą (sialilimas – kovalentinis sialo rūgšties pridėjimas terminaliniame glikoproteino gale) su tumoru susijusį antigeną (angl. *sialylated Tumor-Related Antigen (sTRA)*) [137]. Tyrime įvertinti sTRA ekspresija įvairių tipų KDA ląstelių linijose, organoiduose, pirminiuose navikuose ir kraujo plazmoje. Atlikus studiją nustatyta, kad ląstelių linijos su sTRA buvo atsparios 7 dažniausiai nuo kasos vėžio skiriamiems chemoterapiniams preparatams, pacientams su sTRA ekspresuojančiu pirminiu naviku skiriama chemoterapija nedavė statistiškai reikšmingo efekto (skirtingai nei pacientams su sTRA neekspresuojančiu pirminiu naviku), o pacientams su kraujo plazmoje aptinkama padidėjusia sTRA koncentracija pasireiškė greitas ligos atkrytis po neoadjuvantinės chemoterapijos.

Taigi individualizuota medicina paremti medicinos sprendimai turėtų teikti daugiau galimybių parenkant ligoniui tinkamiausią chemoterapinį preparatą ir tokiu būdu pagerinti šių ligonių išgyvenamumą, kuris šiuo metu yra vienas iš blogiausių tarp visų onkologinių ligų. Chemorezistencijos prognostiniai biožymenys, kurių nustatoma tiek pačiame navike, tiek ligonių kraujyje, tikėtina yra perspektyviausia priemonė tikslui pasiekti šioje srityje. Šiuo metu naudojamas biožymuo CA19-9 neturi galimybės KDA diagnozės nustatymo pradžioje įvertinti galimo atsako į būsimą chemoterapinį gydymą, dėl to mokslininkai ieško kito. Atlikti tyrimai, ypač paskelbti šiais metais, atskleidė kelias medžiagas, turinčias tokio biožymens savybių, ir net preliminariai įrodė galimą jų klinikinį efektyvumą.

## 2.6. Kasos vėžio biožymenys

### 2.6.1. Šiuo metu naudojami biožymenys neatitinka ateities iššūkių

Remiantis Nacionalinio vėžio instituto (angl. *National Cancer Institute at the National Institutes of Health, USA*) rekomenduojamu apibrėžimu, biožymuo – biologinė molekulė, randama kraujyje, kituose kūno skysčiuose ar audiniuose, kuri yra normalaus ar nenormalaus proceso, būklės ar ligos požymis [138]. Biožymenys yra vienas iš pagrindinių daugelio onkologinių ligų diagnostikos, prognozavimo ir atsako į gydymą vertinimo elementų.

Ne išimtis yra ir kasos vėžys, kurio diagnostikai ir eigai prognozuoti dabar yra naudojami keli biožymenys.

CA19-9 šiuo metu visuotinai pripažįstamas kaip aukso standarto KDA biožymuo. Šis biožymuo atrastas dar 1982 m. ir yra tolygiai pasiskirstęs pankreatobiliarinės sistemos ląstelėse [139]. Nuo pat atradimo CA19-9 buvo įvertintas kaip galimas biožymuo ir įvairioms kitoms onkologinėms ligoms: kolorektaliniam, skrandžio, tulžies latakų, kiaušidžių vėžiui [140]. Vis dėlto didžiausia jo pritaikymo galimybė nustatyta kasos vėžiui [7]. Tai vienintelis JAV maisto ir vaistų administracijos patvirtintas kasos vėžio biožymuo. Nepaisant to, šis biožymuo turi ne vieną trūkumą, kuris riboja jo platesnį pritaikymą. CA19-9 jautrumas ir specifiskumas yra nepakankami, dėl to jo negalima naudoti kasos vėžio prevencinėse programose, siekiant diagnozuoti ankstyvas ligos formas [7, 141–143]. Kitas svarbus trūkumas, nulemtas šio biožymens gausaus pasiskirstymo visoje pankreatobiliarinėje sistemoje – gaunami klaidingai teigiami tyrimo rezultatai esant gerybinėms hepatopankreatobiliarinės sistemos ligoms: obstrukcinei gelta, cholangitui, pankreatitui, kepenų cirozei, kepenų ir kasos cistiniams navikams [10, 11, 144]. CA19-9 ekspresija taip pat priklauso nuo *Lewis* kraujo grupės. Asmenys, turintys *Lewis* (a+b<sup>-</sup>) ir *Lewis* (a-b<sup>+</sup>) kraujo grupes, gali sintetinti CA19-9, o 5–7 proc. populiacijos turi *Lewis* (a-b<sup>-</sup>) kraujo grupę ir CA19-9 sintetinti negali, nes neturi fukoziltransferazės, kuri katalizuoja vieną svarbią šio angliavandenio sintezės reakciją [12]. Šio biožymens ekspresiją lemia ir *Secretor* genotipas [145].

CA19-9 yra netinkamas tikrinti visuomenę, net atrinktas rizikos grupes dėl nepakankamo specifiskumo ir santykinai mažo bendro sergamumo šia liga. Šio biožymens jautrumo mediana yra 79 proc., o specifiskumo mediana – 82 proc. [7]. CA19-9 predikcinė vertė asimptotiniams pacientams yra 0,5–0,9 proc., tai taip pat apribojama ankstyvųjų ligos stadijų identifikavimo galimybę daugeliui tiriamųjų [143, 146]. Taigi šio biožymens naudojimas tokiose patikros programose baigtusi dideliu klaidingai teigiamų tyrimo rezultatų skaičiumi, be reikalo sunerimusiais tiriamaisiais ir reikšmingais sveikatos priežiūros sistemos kaštais dėl reikalingų atlikti papildomų tyrimų siekiant atmesti KDA diagnozę. Tam, kad biožymuo būtų tinkamas tokioms patikros programoms, jo jautrumas ir specifiskumas turėtų būti arti 100 proc. [144].

Nepaisant prieš beveik tris dešimtmečius įvykusio atradimo, CA19-9 iš naujo domina mokslininkus ir tyrėjus dėl galimo pritaikymo. Luo et al. nustatė, kad CA19-9 jautrumą ir neigiamą predikcinę vertę galima padidinti, prieš tai atlikus tiriamųjų *Lewis* ir *Secretor* genotipavimą [147]. Nors tokia galimybė ir reikšmingai išplečia CA19-9 naudojimo ribas, patys genotipavimo

tyrimai yra brangūs ir dar nesukurta platesnio jų pritaikymo klinikinėje praktikoje technologijų. Atrasta ir galimybė šį biožymenį panaudoti vertinant atsaką į skiriamą chemoterapiją. CA19-9 koncentracija kinta priklausomai nuo chemoterapijos efektyvumo, kai kasos vėžys gydomas įvairiose išplitimo stadijose [127–129], o koncentracijos padidėjimas po operacijos gali būti ankstyvas ir patikimas KDA atkryčio požymis [148]. Vis dėlto šiuo metu pasaulyje itin ieškomas kasos vėžio biožymuo su chemorezistencijos predikcijos savybe, kurios CA19-9 neaprašyta.

Kiti vėžiniai biožymenys, turintys karbohidratinį antigeną, įskaitant CA242, CA50, CA195, CA72-4, CA125, taip pat buvo ištirti dėl galimo pritaikymo kasos vėžiu sergančių ligonių klinikinėje priežiūroje, bet pasirodė esantys mažiau jautrūs ir specifiški nei CA19-9 [149, 150].

Iš minėtų biožymenų su karbohidratinium antigenu galima išskirti CA242. Šio biožymens reikšmė išryškėjo paskutiniaisiais metais, atlikus didelės apimties tyrimus, ir lemia jo naudojimą klinikinėje praktikoje. Dou et al. Kinijoje atliktame tyrime ištyrė CA242 koncentraciją 34 680 pacientų kraujo serumo mėginiuose ir nustatė reikšmingą jo koncentracijos padidėjimą ligonių, sergančių KDA, kraujyje [151]. Šio biožymens panaudojimas kartu su CA19-9 išplečia pastarojo diagnostines savybes, ypač diagnozuojant ankstyvųjų stadijų kasos vėžį, tai įrodyta tiek klinikiniais tyrimais, tiek metaanalize [149, 152, 153]. Taip pat manoma, kad dėl mažesnės ekspresijos kasos ir tulžies latakuose, CA242 yra jautresnis diferencinėje KDA ir lėtinio pankreatito diagnostikoje už CA19-9 [154]. Tikėtina galutinį aiškumą dėl CA242 vietos klinikinėje praktikoje įneš tarptautinė metaanalizė, kurios tyrimo protokolas jau paskelbtas [155].

Pagal šį protokolą atliekamas tyrimas turėtų įvertinti ir kitą biožymenį su karbohidratinium antigenu, CA125 ir jo vietą ligonių, sergančių KDA, priežiūroje. Šis biožymuo laikomas aukso standartu tiriant ligonius dėl kiaušidžių vėžio, dėl to jis yra gana paplitęs ir lengvai prieinamas klinikinėje praktikoje. 1986 m. aprašytas ir galimas šio biožymens pritaikymas tiriant ligonius dėl įtariamo kasos vėžio [156]. Nuo tada atlikta nemažai tyrimų, kuriais vertintas galimas CA125 pritaikymas pankreatologijoje. Liu et al. nustatė šio biožymens sąsajas su metastazavusiu kasos vėžiu [157]. Jiang et al. imunohistocheminiu metodu pademonstravo normalaus kasos audinio ir KDA CA125 ekspresijos skirtumus [158]. Luo et al. net nustatė šio biožymens pranašumą prognozuojant kasos vėžio rezektabilumą, palyginti su CA19-9 [159]. Taip pat CA125 yra itin perspektyvus pacientams su *Lewis* (a–b–) kraujo grupe ir negaminantiems CA19-9, kurie yra tiriami ir gydomi dėl kasos vėžio [160]. Vis dėlto susidaro įspūdis, kad pats vienas CA125 yra per mažai jautrus ir specifiškas, kad jį būtų galima naudoti klinikinėje praktikoje

pavieniui. Kita vertus, atlikti tyrimai rodo, kad CA125 naudojant kartu su kitais KDA biožymenimis, būna sinergetinis efektas ir padidėja visų naudojamų biožymenų efektyvumas [161–165].

Kitos grupės biožymuo, dažniausiai naudojamas ligonių, sergančių storosios žarnos vėžiu, priežiūroje, bet turintis savo vaidmenį ir kasos vėžio medicinoje yra karcinoembrioninis antigenas, arba CEA. Šis biožymuo priklauso su karcinoembrioniniu antigenu susijusių ląstelių adhezijos molekulėms, o pilnas ir dažnai primirštas pavadinimas yra su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 5 (CEACAM5). 2020 m. Olandijos mokslininkų atliktoje studijoje rekomenduojama naudoti CEA per multidisciplininius onkologinių ligonių aptarimus dėl jo itin didelės koreliacijos su KDA rezektabilumu [130]. Šis biožymuo, kaip ir CA125, yra tinkamas tirti pacientus, turinčius *Lewis* (a–b–) kraujo grupę ir todėl neturinčius CA19-9 ekspresijos [160]. Įvertinus visus duomenis taip pat peršasi išvada, kad vienas CEA yra per silpnas, kad jį būtų galima naudoti vieną. Tai pagrindžia ir atlikti tyrimai, kai CEA naudojant kartu su kitais biožymenimis padidėja visų naudojamų biožymenų efektyvumas [162, 166–168].

Įvertinus šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamus biožymenis (CA19-9, CA242, CA125 ir CEA) akivaizdu, kad juos galima naudoti kasos vėžiu sergančių ligonių priežiūroje, bet jie neatitinka ateities iššūkių, keliamų siekiant pagerinti šių ligonių gydymo baigtį. Tai yra KDA ankstyvoji diagnostika, prevencijos programos bei individualizuota medicina, ypač galimos chemorezistencijos numatymas.

## 2.6.2. Kūno audiniai ir skysčiai, kuriuose galima tirti biožymenis

Kasos vėžio biožymenų paieškai gali būti panaudoti įvairūs žmogaus kūno audiniai ir skysčiai. Vieni yra gaunami be invazinių metodikų, pvz., šlapimas ar seilės, kitiems reikia minimalios invazijos, pvz., kraujui, dar kitų surinkimas yra itin invazyvus, pvz., kasos audinio, sulčių ar cistų skysčio. Galimų gauti biožymenų kiekis ir tipai taip pat skiriasi. Juos toliau panagrinėsime šiame poskyryje.

Kasos audinys. Kaip ir galima tikėtis, šiame darinyje yra aptinkama daugiausiai įvairių galimų biožymenų. Dėl to tai puiki tiriamoji medžiaga biožymenų atradimo etape. Kita vertus, šios medžiagos surinkimas labai invazyvus, reikalinga chirurginė operacija arba biopsija. Tai riboja didesnio kiekio mėginių surinkimą, dėl to kasos audinio nebegalima panaudoti validizacijos etape. Taigi kasos audinys yra puiki tiriamoji medžiaga atradimo etape, leidžianti identifikuoti gausų sąrašą patikimų biožymenų kandidatų, bet



dėl invazyvaus surinkimo būdo tolesniais tyrimo etapais paprastai nebenaudojama.

Kraujas. Tai vienas plačiausiai tiriamų ir lengviausiai prieinamų organizmo skysčių biožymenų tyrimams. Čia gausu įvairių baltymų, galimų KDA biožymenų. Kraujo plazmos interleukinas 11 buvo nustatytas kaip galimas kasos vėžio biožymuo, turintis 97,7 proc. jautrumą ir 70 proc. specifiškumą [169]. Kraujyje aptinkamas makrofagų inhibicinis citokinas 1 turi ankstyvųjų KDA stadijų diagnostinio biožymens savybių [36]. Kraujo komplemento faktorius b taip pat turi kasos vėžio diagnostinio biožymens savybių, leidžia diferencijuoti KDA nuo kitų gastrointestinių navikų [170]. Kraujo autoantikūnai prieš su naviku susijusius antigenus taip pat gali būti panaudoti kaip kasos vėžio diagnostiniai biožymenys, pasižymintys mažesniu jautrumu (< 50 proc.), bet dideliu specifiškumu (> 90 proc.) [171]. Kraujo mėginiai yra ir metabolomikos tyrimų objektas, nes juose aptinkama reikšmingų, su KDA susijusių, įvairių metabolitų koncentracijų pakitimų [172, 173].

Kraujyje taip pat galima aptikti egzosomų – pastaruoju metu intensyviai tiriamų nanodalelių. Tai įvairių ląstelių išskiriamos ekstraceliulinės pūslelės, kurios turi pakitusių DNR, RNR ir baltymų. „Nature“ žurnale paskelbtoje publikacijoje nurodoma, kad kraujo serume aptinkamos egzosomos su glipikanu-1 leidžia su absoliučiu specifiškumu ir jautrumu diferencijuoti sveikus asmenis, gerybines ir piktybines kasos ligas [174]. Egzosomose taip pat galima aptikti ir nustatyti kasos KDA būdingas įvairias genetines mutacijas, pavyzdžiui, Kras onkogeno mutacijas [175].

Šlapimas. Tai, viena vertus, yra puikus biožymenų šaltinis, nes yra gaunamas visiškai neinvaziniu būdu, o pagal savo sudėtį leidžia atlikti proteominius ir metabolominius tyrimus. Kita vertus, šlapimo baltymų, DNR ir RNR kiekis yra ribotas, be to, šlapimo sintezė neturi tiesioginio ryšio su pakitimais kasoje [176]. Radon et al. įrodė, kad trijų baltymų-biožymenų (LYVE-1, REG1A ir TFF1) paletė gali identifikuoti ankstyvasias KDA stadijas su 80 proc. jautrumu ir 76,9 proc. specifiškumu [177]. Hogendorf et al. nustatė, kad su neutrofilų želatinaze susijęs lipokalinas šlapime taip pat gali būti panaudotas ankstyvai kasos vėžio diagnostikai ir yra pranašesnis už kraujo CA19-9 ir CA125 [178]. Be baltymų, kaip galimi šlapimo biožymenys nustatyti ir mikroRNR (mikroRNR-143, mikroRNR-30e ir mikroRNR-223) [179]. Visų pastarųjų tyrimų išanalizuotų šlapimo mėginių kiekis, nepaisant lengvo tiriamosios medžiagos prieinamumo, yra mažas, atitinkamai: 18 [177], 36 [178] ir 26 [179]. Tiksliau įvertinti šlapimo biožymenų vaidmenį kasos vėžiu sergančių ligonių priežiūroje turėtų didelės apimties, galimai multicentrinės, prospektyvinės studijos.

Kasos cistų skystis. Kasos cistos gali būti gerybinės, ikivėžinės ir vėžinės. Diferencinė šių būklių diagnostika iki šiol yra iššūkis net ir patyrusiems specialistams specializuotuose centruose. Tai gali palengvinti šiuose cistiniuose pakitimuose aptinkamos medžiagos, potencialūs biožymenys. Jabbar et al. nustatė, kad kasos cistos mucinas-5AC ir mucinas-2 gali atskirti gerybinius pakitimus nuo ikivėžinių ir vėžinių pakitimų 97 proc. tikslumu [180]. Pagrindinis šių tyrimų trūkumas – būtina invazyvi mėginių surinkimo metodika.

Kasos sultys. Tai daug biožymenų turintis skystis, tiesiogiai atspindintis pokyčius kasoje, kurį galima analizuoti proteomikos, metabolomikos, genomikos ir transkriptomikos metodais. Wang et al. įrodė, kad padidėjusi keturių kasos sulčių mikroRNR koncentracija leidžia KDA diagnozuoti su 87 proc. jautrumu ir su 88 proc. specifiškumu, kraujo CA19-9 koncentracijos įtraukimas į šią schemą jautrumą padidino iki 91 proc., o specifiškumą iki 100 proc. [181]. Mateos et al. tyrė genetines mutacijas kasos sultyse ir nustatė, kad mutacijos ir jų kopijų kiekis leidžia patikimai diferencijuoti KDA nuo intraduktalinės papilinės mucininės neoplazijos (IPMN) [182]. Proteominė kasos sulčių analizė leido nustatyti ARG2 baltymą kaip galimą ankstyvo kasos vėžio biožymenį [183]. Vis dėlto kasos sultims surinkti reikia chirurginės operacijos ar bent endoskopinės intervencijos, tai riboja atrastų biožymenų validizaciją. Taigi nors šie tyrimo rezultatai ir padaro aiškesnę KDA patogenezę, platesnis jų klinikinis pritaikymas yra ribotas.

Seilės. Tai taip pat geras biožymenų šaltinis, o joms surinkti nereikia invazinių procedūrų. Kaip galimi KDA biožymenys seilėse yra nustatytos informacinės RNR (KRAS, MBD3L2, ACRV1 ir CDKL3), kurios kasos vėžį gali diagnozuoti su 71 proc. jautrumu ir 69 proc. specifiškumu [184]. Kitu, taip pat transkriptomikos srities tyrimu, įrodyta, kad seilių ilgas nekoduojančias RNR (HOTAIR ir PVT1) taip pat galima panaudoti KDA diagnostikai su 78,2 proc. jautrumu ir 90,9 proc. specifiškumu [185].

### 2.6.3. Su karcinoembrioniniu antigenu susijusios ląstelių adhezijos molekulės (CEACAM-ai), jų kaip biožymenų reikšmė

Su karcinoembrioniniu antigenu susijusios ląstelių adhezijos molekulės (CEACAM-ai) yra grupė baltymų, aptinkamų tik žinduoliuose. Visi CEACAM-ai sudaro šeimą, o ji atitinkamai priklauso ląstelių adhezijos molekulių imunoglobulinų superšeimai, kurią sudaro didelė grupė ląstelių paviršiaus glikoproteinų [186]. CEACAM-ų šeimoje yra 12 struktūriškai panašių baltymų, ekspresuojamų įvairių ląstelių apikaliniuose paviršiuose, įskaitant epitelines, endotelines ir hemopoetines (2.6.3 lentelė) [35].

Pagrindinė šių baltymų funkcija – ląstelių tarpusavio adhezija ir atpažinimas, taip pat įvairių ląstelinių lygmeniu vykstančių procesų valdymas, įskaitant ląstelės gyvavimo ciklo etapų reguliavimą, tumoro supresiją, angiogenezę ir metastazavimą [186–189]. Kadangi CEACAM-ai valdo tokius svarbius ląstelių gyvavimo procesus, nestebina ir nustatyta jų įtaka bei reikšmė įvairių vėžinių ligų, įskaitant KDA, onkogenezėje.

Pirmasis šios šeimos baltymas atrastas 1965 m. ir iki šiol naudojamas kaip pagrindinis storosios žarnos vėžio biožymuo – CEA (karcinoembrioninis antigenas) [190]. Toks pavadinimas baltymui duotas dėl to, kad biožymenį antigeno pavidalu atradę Gold et al. jį aptiko ne tik pirminiame ir metastatiniame kolorektaliniame vėžyje, bet ir 2–6 mėn. žmogaus embriono žarnoje, kepenyse, kasoje. Vėlesnis tyrimas, patvirtinęs šio biožymens galimą klinikinę reikšmę, paskelbtas 1972 metais [191]. Jame nurodoma, kad, ištyrus ligonių, sergančių storosios žarnos vėžiu, kraujo serumo mėginius, šis biožymuo aptiktas 85 proc. mėginių. Dar vėliau nustatytas pakartotinio CEA koncentracijos padidėjimo po radiklios operacijos ir vietinio recidyvo arba tolimųjų metastazių ryšys [192]. Tobulėjančios monokloninių antikūnų technologijos leido klonuoti CEA cDNR [193], pagal kurias toliau klonuoti bei atrasti ir kiti šios šeimos baltymai: tulžies glikoproteinas (angl. *Biliary glycoprotein*) ir nespecifinis kryžmiškai reaguojantis antigenas (angl. *Nonspecific cross-reacting antigen*) [194, 195]. Šių trijų baltymų reikšmė įvairių navikų onkogenezėje, galimybė būti biožymenimis yra labiausiai ištirta. Vėliau atrasta ir daugelis kitų šios šeimos narių, dėl daug skirtingų pavadinimų jų klasifikacija tapo per daug sudėtinga ir dėl to 1999 metais suvienodinta [187]. Taigi tulžies glikoproteinas tapo su karcinoembrioniniu antigenu susijusia ląstelių adhezijos molekule 1 (CEACAM1), CEA – CEACAM5, o nespecifinis kryžmiškai reaguojantis antigenas – CEACAM6.

Specifinė šių baltymų struktūra leidžia atlikti jiems numatytas funkcijas. Kiekvienas CEACAM-ų šeimos baltymas turi į imunoglobuliną panašų domeną – kompaktišką ~85–110 aminorūgščių struktūrą, sudarytą iš dviejų  $\beta$  lankų, išdėstytų vienas priešais kitą [196]. Šio domeno formai būdingos mažos variacijos, dėl kurių galimi keli domeno variantai: kintamasis (angl. *Ig variable, IgV*), pastovusis 1 (angl. *Ig constant-1, IgC-1*) ir pastovusis 2 (angl. *Ig constant-2, IgC-2*). Evoliuciniu požiūriu į imunoglobuliną panašaus domeno formos mažos variacijos yra svarbi sėkmės istorija, kuri pavertė šio domeno koduojančias sekas gausiausiai genais žmogaus genome. Taigi šis domenas baltymams suteikia universalią sąsają, kurią galima pritaikyti beveik kiekvienai susijungimo užduočiai. CEACAM-ų susijungimo užduotys dažniausiai nukreiptos į tos pačios klasės molekules arba juos pačius, tai įrodyta genetiniu, biocheminiu ir struktūriniu lygiu [197, 198].

### 2.6.3 lentelė. Žmogaus CEACAM šeimos baltymų panaudojimas kaip biožymenų

Pavadinimas	Senasis pavadinimas	Biožymuo	Informacijos šaltiniai
CEACAM1	Tulžies glikoproteinas	KDA, melanoma, šlapimo pūslės Ca, plaučių Ca, skrandžio Ca, skydliaukės Ca, storosios žarnos Ca, galvos ir kaklo Ca, kepenų Ca, krūties Ca, kiaušidžių Ca, kepenų Ca, mieloma, gimdos Ca, prostatos Ca	[231–245]
CEACAM3	CEA genų šeimos narys 1	Storosios žarnos Ca, leukemija	[229, 230]
CEACAM4	CEA genų šeimos narys 7	Skydliaukės Ca, stemplės Ca,	[227, 228]
CEACAM5	Karcinoembrioninis antigenas	Storosios žarnos Ca, prostatos Ca, plaučių Ca, KDA, tulžies pūslės Ca, šlapimo pūslės Ca, kiaušidžių Ca, gimdos Ca, skrandžio Ca, krūties Ca,	[161, 190, 222–226]
CEACAM6	Nespecifinis kryžmiškai reaguojantis antigenas	KDA, krūties Ca, kiaušidžių Ca, skrandžio Ca, plaučių Ca, prostatos Ca, leukemija, tulžies pūslės Ca, osteosarkoma, inksto Ca, galvos ir kaklo Ca, cholangiokarcinoma, tulžies pūslės Ca,	[35, 205, 206, 212–221]
CEACAM7	CEA genų šeimos narys 2	KDA, storosios žarnos Ca, skrandžio Ca, krūties Ca, liežuvio	[207–211]
CEACAM8	CEA genų šeimos narys 6	Storosios žarnos Ca, krūties Ca, leukemija	[204–206]
CEACAM16	Atrastas po 1999 m.	Nėra	Nėra
CEACAM18	Atrastas po 1999 m.	Nėra	Nėra
CEACAM19	Atrastas po 1999 m.	Varpos Ca, skrandžio Ca, krūties Ca,	[201–203]
CEACAM20	Atrastas po 1999 m.	Nėra	Nėra
CEACAM21	Atrastas po 1999 m.	Prostatos Ca, kiaušidžių Ca	[199, 200]

CEACAM - su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė; KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; CEA – karcinoembrioninis antigenas; Ca – karcinoma.

## 2.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir idėja atlikti šią studiją

Įvertinus prieinamus literatūros šaltinius tampa aišku, kad KDA išlieka itin aktuali neišspręsta sveikatos priežiūros sistemos problema visame pasaulyje ir Lietuvoje. Ši aktualumą daugiausia lemia šios ligos heterogeniškumas, ankstyvos diagnostikos ir individualizuotos medicinos metodų trūkumas, dažnas KDA chemorezistentyvumas. Siekiant išspręsti šią dilemą, visame pasaulyje atliekami įvairūs moksliniai tyrimai, tarp kurių labai svarbūs yra biožymenų tyrimai. Dauguma mokslininkų sutaria, kad būtent šiose medžiagose slypi raktas, kaip išspręsti minėtas KDA aktualijas.

Šios disertacijos autorius ir jo darbo vadovas dirbdami klinikinį darbą iš arti mato kasos vėžio sukeltą našą sveikatos priežiūros sistemai. Taigi norėjome prisidėti ne tik sprendžiant šios ligos sukeltus padarinius, bet pabandyti spręsti priežastis, nulemiančias KDA aktualumą, t. y. tinkamų biožymenų trūkumą. Dėl to truputį mažiau nei prieš dešimtmetį buvo užmegzti glaudūs ryšiai su Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro (VU GMC) Proteomikos centru, kuris turi sukaupęs didelį potencialą, techninę bazę ir proteomikos bei baltymų tyrimų patirtį. Pasiūlėme šio centro mokslininkams tinkamai surinktą pakankamą kiekį tiriamosios medžiagos ir rezultatų klinikinę interpretaciją. Greitai radę bendrą kalbą, po kruopštaus planavimo nusprendėme atlikti klasikinį kasos vėžio biožymenų tyrimą: atradimo etape proteomikos metodais tirti kasos audinius, antrame etape biožymenis verifikuoti tuose pačiuose kasos audiniuose *Western-blot* metodika ir galutiniame etape juos validizuoti kraujo serumo mėginiuose.

Vykdam tyrimą surinktas ir ištirtas unikaliai skaitlingas kasos audinių ir kraujo serumo mėginių biobankas, o tyrimams panaudota viena iš naujausių ir itin tiksliai VU GMC Proteomikos centro mokslinių tyrimų įranga leido mums tikėtis atrasti naują KDA biožymenį. Šis biožymuo galėtų įnešti daugiau aiškumo tiriant išliekančias neišspręstas šios ligos aktualijas: tikslios diagnostikos ir individualizuotos medicinos priemonių trūkumą, ligos heterogeniškumą ir chemorezistentyvumą.

### 3. TYRIMO METODIKA

#### 3.1. Bendras studijos dizainas, tyrimo eiga

Šio biomedicininio tyrimo (BMT) tipas – prospektyvinis, stebimasis, analitinis, monocentrinis. Tyrimas vykdytas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose (VUL SK) bendradarbiaujant su VU GMC. Leidimą atlikti BMT išdavė Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas (VRBTEK) 2013 m. rugsėjo 10 d., leidimo nr. 158200-13-675-214 (priedas nr. 1). Dėl sėkmingų, daug žadančių pradinių tyrimų rezultatų ir iškilusių naujų idėjų atlikti papildomus tyrimus kartu su kitais vykdomais moksliniais projektais kelis kartus kreiptasi į VRBTEK ir jų leidimu šio BMT atlikimo terminas pratęstas iki 2021-12-31. Visi tiriamieji buvo informuoti apie galimybę dalyvauti tyrime, savanoriškai sutiko būti įtraukti į BMT ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Nuo 2013 m. lapkričio 20 d. iki 2020 m. spalio 6 d. į tyrimą iš viso įtraukti 267 asmenys, kurie gydyti VUL SK Pilvo chirurgijos bei Hepatologijos, gastroenterologijos ir dietologijos centruose.

Tiriamieji suskirstyti į tris grupes (tiriamoji grupė ir dvi kontrolinės grupės): KDA sergantys ligoniai (tiriamoji grupė), lėtiniu pankreatitu (LP) sergantys ligoniai (kontrolinė grupė), asmenys kaip sveika kontrolė (SK) (kontrolinė grupė).

KDA sergantys ligoniai hospitalizuoti radikaliai gydymui ir jiems atlikta *pylorus* išsauganti pankreatoduodeninė rezekcija ar hemipankreatektomija arba hospitalizuoti paliatyviui gydymui ir jiems atlikta apeinamųjų jungčių operacija ir (ar) kasos naviko biopsija. LP sergantiems ligoniams atlikta *Frey* rezekcijos operacija. Sveikos kontrolės asmenims atlikta nesudėtinga planinė operacija (pilvo sienos išvaržos plastika, hemoroidektomija) arba *pylorus* išsauganti pankreatoduodeninė rezekcija ar hemipankreatektomija dėl nepiktybinės kasos ligos. Pastaruoju atveju paimami kasos audiniai traktuoti kaip „sveiki“, nes buvo išpjaujami iš nepakitusio kasos audinio, kuris standartiškai turėjo būti pašalintas pagal operacijos planą. Ligoniams ryte prieš chirurginę operaciją ir (arba) biopsiją paimti kraujo serumo mėginiai. Radikalios chirurginės operacijos metu paimti kasos audinio mėginiai. Gavus rezekuoto organo preparato arba biopsinio stulpelio histologinio ištyrimo išvadą dalis ligonių atkrito dėl netinkamos galutinės diagnozės (diagnozės pateikiamos 3.1 pav.), likę tiriamieji galutinai suskirstyti į tris grupes. Įtraukimo į kiekvieną grupę kriterijai pateikiami 3.1 lentelėje.

### 3.1 lentelė. Įtraukimo į tiriamųjų grupes kriterijai

KDA sergantys ligoniai	LP sergantys ligoniai	Asmenys kaip SK
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amžius: 18–85 metai.</li> <li>• Anamnezėje nėra kitų onkologinių ligų.</li> <li>• Rezekuoto organo preparato arba biopsinio stulpelio histologinio ištyrimo išvada: KDA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amžius: 18–85 metai.</li> <li>• Anamnezėje nėra onkologinių ligų.</li> <li>• Rezekuoto organo preparato histologinio ištyrimo išvada: LP.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amžius: 18–85 metai.</li> <li>• Anamnezėje nėra onkologinių ligų.</li> <li>• Rezekuoto organo preparato histologinio ištyrimo išvada: nepiktybinė kasos liga (kasos mucininė arba serozinė cistadenoma). ARBA</li> <li>• Hospitalizacija dėl nesudėtingos planinės operacijos (pilvo sienos išvaržos plastika, hemoroidektomija).</li> </ul>

KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė.

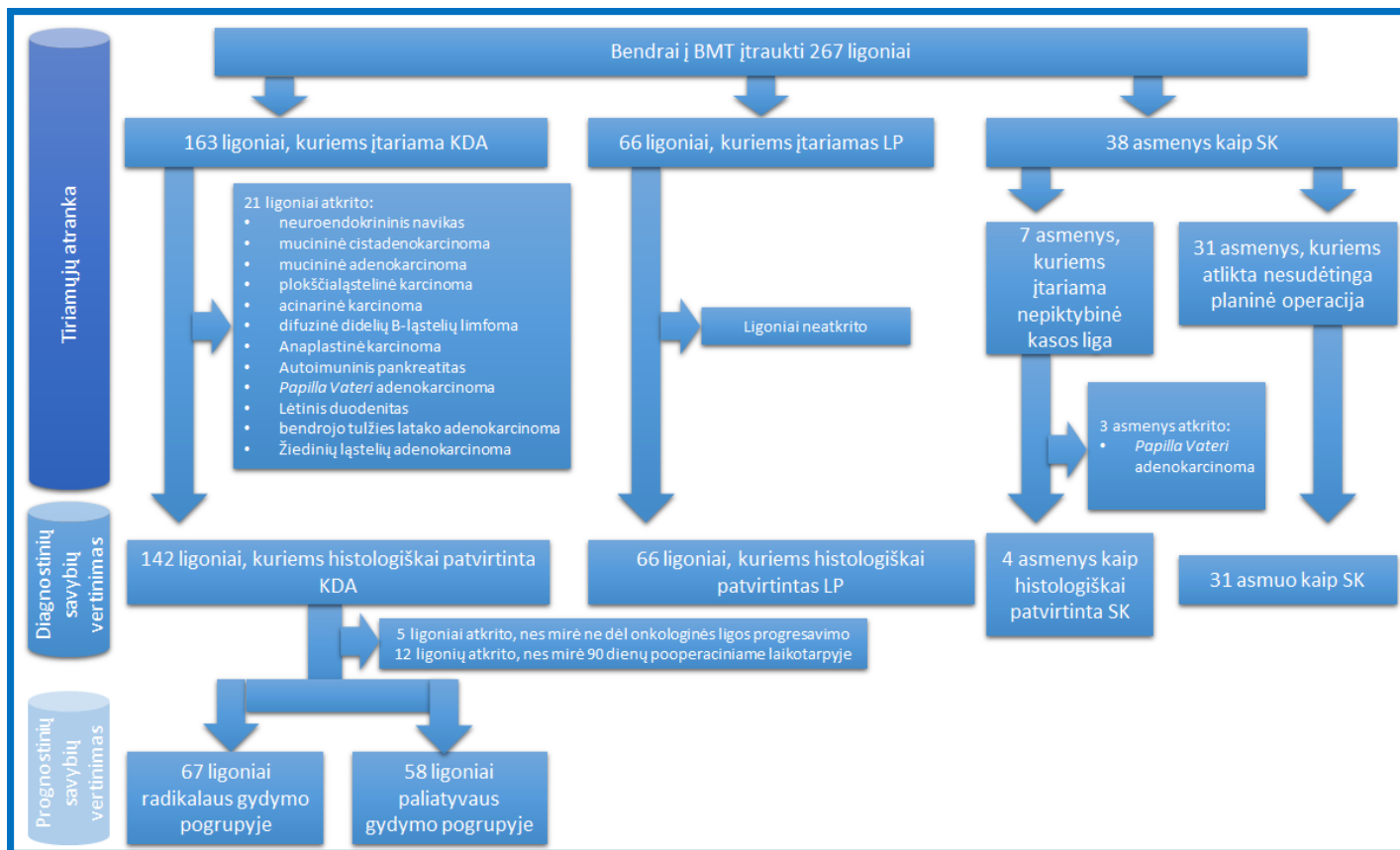
Po galutinio tiriamųjų įtraukimo į grupes surinkta numatyta informacija apie tiriamuosius. Demografiniai rodikliai: lytis, amžius, KMI, sirgimas CD. Rezekuoto organo preparato arba biopsinio stulpelio histologinio ištyrimo duomenys: T – tumoro dydis, N – tumoro infiltracija į regioninius limfmazgius, M – tumoro tolimosios metastazės, G – tumoro diferenciacija, R – tumoro rezekcijos statusas, tumoro stadija, LMS – limfmazgių santykis (angl. *lymph node ratio*, apskaičiuojamas visų rezekuoto organo preparate rastų naviko infiltruotų limfmazgių skaičių padalijus iš bendro preparate rasto limfmazgių skaičiaus), perineurinė tumoro invazija, perivaskulinė tumoro invazija, tumoro skersmuo, tumoro lokalizacija kasoje. Laboratorinių tyrimų rodikliai: bilirubino koncentracija prieš operaciją. Visi TNM (*tumour, nodes, metastases*) rodikliai perskaičiuoti ir atitinka Amerikos jungtinio komiteto vėžio klausimais (angl. *American Joint Committee on Cancer* arba *AJCC*) nustatytą pataloginės kasos egzokrininių navikų stadijavimo sistemos 8 leidimą [246].

Į biobanką surinkus tinkamą mėginių skaičių atlikti numatyti tyrimai: kasos audinių aukštos raiškos masių spektrometrija ir rezultatų proteominė analizė (atliko dr. Algirdas Kaupinis), biožymens verifikavimas *Western-blot* metodika (atliko disertacijos autorius), kraujo serumo mėginių tyrimas ELISA (atliko disertacijos autorius ir studentas Tomas Bukys) ir MCIA metodikomis (atliko VUL SK Laboratorinės medicinos centro darbuotojai).

Tyrimo pabaigoje, t. y. 2021 m. kovo mėn., iš VUL SK elektroninės ligos istorijos sistemos surinkta informacija apie KDA sergantiems ligoniams skirtą adjuvantinę chemoterapiją, jos toleravimą, mėnesių skaičių nuo radikalios operacijos iki ligos recidyvavimo (išgyvenamumo be ligos laikotarpis). Ligonų stebėjimo laikotarpis buvo nuo 0,5 iki 5 metų. Taip pat, padedant VUL SK Biomedicininų tyrimų vykdymo skyriui, iš VĮ „Registru centras“ gauta informacija, ar KDA sergantys ligoniai tebėra gyvi, ar mirę. Jeigu pastarieji identifikuoti kaip mirę, mums perduoti duomenys apie mirties datą ir priežastis. Pagal šią informaciją apskaičiuotas mėnesių skaičius nuo operacijos ir (ar) biopsijos iki letalios baigties (bendro išgyvenamumo laikotarpis). Tai taip pat leido iš išgyvenamumo analizės atmesti tiriamuosius, mirusius dėl kitų priežasčių, bet ne dėl onkologinės ligos progresavimo, bei 90 dienų pooperaciniu laikotarpiu mirusius asmenis.

Remiantis šia informacija įvertintos biožymenų koncentracijų ribinės reikšmės, diagnostinės ir prognostinės savybės, jos palygintos, nustatyta tiriamo biožymens savybė numatyti chemorezistenciją, taip pat atlikta išgyvenamumo analizė pagal *Kaplan-Meier* metodą. Bendra tyrimo schema pateikiama 3.1 pav.





BMT – biomedicininis tyrimas; KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė.

**3.1 pav.** Bendra tyrimo schema

### 3.2. Naujų biožymenų radimo principai

Nuo galimo biožymens identifikavimo iki jo pradėjimo taikyti klinikinėje praktikoje jo tyrimai turi pereiti tam tikrus etapus: atradimo (angl. *discovery*), verifikacijos (angl. *verification*), validizacijos (angl. *validation*) [247]. Šiems etapams praeiti dažniausiai prireikia kelių dešimtmečių. Turint mintyje, kad šiuo metu kaip kasos vėžio biožymuo yra patvirtintas tik CA19-9, kiti galimi biožymenys tebėra įstrigę minėtuose etapuose. To priežastis – lėšų trūkumas tolesniems tyrimams, didelis potencialių biožymenų kiekis, dėl to tyrėjams sudėtinga sutelkti dėmesį ir tyrimus į daugiausiai žadančius biožymenis.

Atradimo etape dažniausiai atliekami sudėtingi tyrimai specializuotuose mokslo centruose. Tiriamas nedidelis kiekis kruopščiai atrinktų mėginių. Juose potencialūs biožymenys identifikuojami tiek kokybiškai, tiek kiekybiškai. Šis įvertinimas leidžia atlikti statistinius skaičiavimus, siekiant nustatyti statistiškai reikšmingus svyravimus tarp tiriamosios ir kontrolinės grupės mėginių. Šiame etape paprastai dirbama su tokiomis mokslo sritimis kaip genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika. Jų atrandami potencialūs biožymenys atitinkamai gali būti traktuojami kaip genetiniai, epigenetiniai, baltyminiai, metabolitiniai. Pagrindinis iššūkis šiame etape yra tikslių medžiagų identifikavimas ir išskyrimas iš likusių „foninių“ medžiagų. Pavyzdžiui, žmogaus kraujo plazma turi ~1 milijoną skirtingų baltymų, iš kurių 22 gerai žinomi baltymai sudaro 99 proc. viso šio baltymų kiekio. Taigi galimų baltymų biožymenų koncentracija santykinai yra labai maža, palyginti su bendra baltymų koncentracija. Taigi reikalingas itin kruopštus mėginių paruošimas, jautri metodika ir įranga. Atradimo etape paprastai dirbama su itin dideliu duomenų, kurie matuojami terabaitais, kiekiu. Šiems duomenims apdoroti ir išanalizuoti reikalingos specialios bioinformatinės kompiuterių programos, nes žmogus tokio kiekio duomenų įvertinti pats nesugebėtų. Šio etapo rezultatas – potencialių biožymenų, kurie yra statistiškai reikšmingai labiau išreikšti tiriamųjų mėginiuose negu kontroliniuose mėginiuose, rinkinys.

Kitas etapas yra verifikacija. Tai yra pirmame etape nustatytų biožymenų kandidatų tolesnis tyrimas, tolesnė atranka prieš paskutinį etapą. Verifikacija reikalinga siekiant išvengti „butelio kaklelio“ fenomeno, kuris galėtų sulėtinti viso tyrimo eigą, validizacijos etape. Taigi šiame etape su kiekvienu potencialiu biožymeniu atliekami papildomi tyrimai, vertinama jų ekspresija tarp tiriamųjų mėginių ir kontrolinėse grupėse. Taigi tiriamas ne bendras visų galimų biožymenų kiekis ir koncentracija, o konkrečios anksčiau

identifikuotos medžiagos, turint tikslą įvertinti, ar jos tikrai gali būti nustatomos tiriamuose mėginiuose. Šie papildomi tyrimai iš potencialių biožymenų rinkinio leidžia atrinkti perspektyviausius ir daugiausiai žadančius biožymenis, kurių reikšminga ekspresija tik tiriamosios grupės mėginiuose patvirtinta jau dviem tyrimų metodikomis.

Dėl galimo biologinio ar klinikinio kintamumo atradimo fazėje nustatyti ir verifikacijos fazėje patikrinti biožymenis turi būti galutinai patvirtinti paskutiniame – validizacijos etape. Šiame etape tiriamas didesnis mėginių kiekis, nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių. Dėl to pakyla tyrimų kaina, ilgėja atlikimo laikas, reikalinga tyrimo metodika su nesudėtingu mėginių paruošimu. Sėkmingai atliktas validizacijos etapas patvirtinta biožymens efektyvumą, pakankamą jautrumą ir specifiškumą ir užbaigia biožymens ištyrimo eigą.

Taigi atradimo etape nustatomi galimi biožymenis, jų išreikštumas mėginiuose antrą kartą patikrinamas verifikacijos etape ir tada galutinai patvirtinamas ištiriant didelį kiekį mėginių validizacijos etape. Užbaigus šiuos etapus iki galutinio biožymens pradėjimo naudoti klinikinėje praktikoje dar reikia gauti atsakingų reguliavimo institucijų patvirtinimą, biožymens ištyrimo reagentus turi pradėti komerciškai gaminti ir tiekti suinteresuotos biotechnologijų kompanijos, reikia patvirtinimo apie šio tyrimo išlaidų padengimą iš sveikatos draudimo kompanijų / fondų, biožymuo ir jo ribinės reikšmės turi būti įtrauktos į klinikinių gairių sprendimų priėmimo schemas.

### 3.3. Kasos audinių ir kraujo serumo mėginių surinkimas, saugojimas ir paruošimas tyrimams

Kasos audinių surinkimas ir saugojimas. Kasos audinių išpjauta praėjus ne daugiau kaip 5 minutėms po chirurginio preparato rezekcijos iš pagal standartinę operacijos planą pašalinto chirurginio preparato. Išpjovimą atliko operaciją atliekantis chirurgas arba jo padedamas pats disertacijos autorius. Kasos audiniai sudėti į tris 2 mililitrų talpos šaldymo mėgintuvėlius „*Cryo Tubes with Internal Thread*“ (*Ratiolab*, Dreieichas, Vokietija) (3.3 pav. A). Vėliau mėgintuvėliai 5 minučių intervale greitai užšaldyti skysto azoto pripildytame konteineriulyje, t. y.  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Su šiuo konteineriu šaldymo mėgintuvėliai per 10–15 minučių pernešti į galutinio saugojimo vietą, t. y.  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrą užtikrinantį šaldiklį.

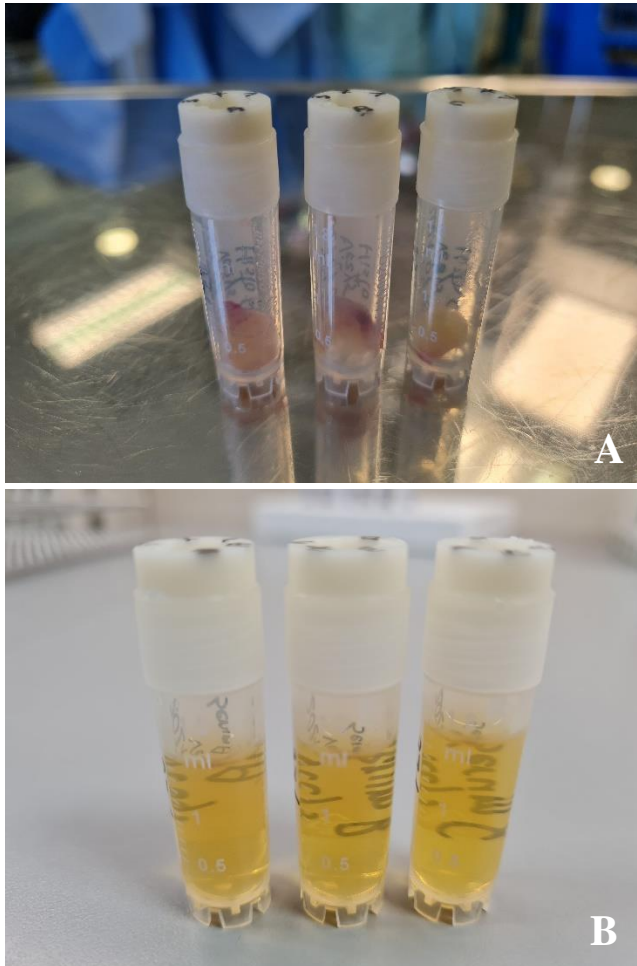
Kasos audinių paruošimas aukštos raiškos masių spektrometrijai ir lizatu sukūrimas. Skalpelio homogenizuoti audiniai buvo lizuojami naudojant karbamido / tiokarbamido lizės buferį ir veikti ultragarsu „*Sonopuls*“ (*Bandelin*, Berlynas, Vokietija) 1 minutę 20 % amplitudėje 0,4 sekundžių

trukmės pulsacijų įjungimo / išjungimo ciklais. Vėliau susidarę lizatai centrifuguoti  $20\ 000 \times g$  greičiu 15 minučių  $4\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje, galutiniai supernatantai surinkti ir saugoti  $-80\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje. Tripsinizacija atlikta pagal modifikuotą su filtro pagalba atliekamą mėginio paruošimo protokolą, kaip buvo aprašyta anksčiau [248].

Kasos audinių paruošimas *Western-blot* analizei ir lizatų sukūrimas. Skalpeliumi iš kiekvieno mėginio homogenizuota po 0,02 g audinio, ši vientisa masė kiekviename mėgintuvėlyje sumaišyta su 240  $\mu\text{L}$  buferio, pagaminto iš TRIS/HCl pH 7,6 ir natrio dodecilsulfato. Susidarę tirpalai 5 minutes kaitinti  $100\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje, vėliau veikti ultragarsu „*Sonopuls*“ (*Bandelin*, Berlynas, Vokietija) po 1 minutę ciklais  $4 \times 10\ \%$ ,  $20\ \%$  amplitudėje. Šis kaitinimo ir veikimo ultragarsu ciklas pakartotas dar kartą prieš galutinį mėgintuvėlių centrifugavimą  $20\ 000 \times g$  greičiu 15 minučių  $22\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje. Tolesniems tyrimams susidarę supernatantai atskirti nuo mėgintuvėliuose likusių nuosėdų. Į 210  $\mu\text{L}$  šių lizatų įdėta po 50  $\mu\text{L}$  dichlordifeniltrichloretano ir šie tirpalai iki *Western-blot* analizės saugoti  $-20\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje. Likę 30  $\mu\text{L}$  kiekvieno sukurto lizato panaudoti matuojant bendrą baltymų koncentraciją mėginiuose, panaudojant baltymų tyrimų rinkinį „*BCA Protein Assay Kit*“ (*Thermo Fisher Scientific*, Valthamas, JAV). Šis tyrimas atliktas pagal gamintojo pateikiamą instrukciją, naudojant spektrofotometrą „*BioPhotometer*“ (*Eppendorf*, Hamburgas, Vokietija). Remiantis šia informacija  $-20\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje saugomi atitinkami lizatų mėginiai vėliau buvo praskiesti iki vienodos 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  bendros baltymų koncentracijos.

Kraujo serumo mėginių surinkimas, saugojimas ir paruošimas tyrimams. Visi kraujo serumo mėginiai buvo surenkami operacijos rytą, venos punkcijos metu kartu su kitais pagal ligonio standartinio ištyrimo planą atliekamais kraujo tyrimais. Paimti 2 arba 4 mėgintuvėliai „*BD Vacutainer*®“ (*Becton, Dickinson and Company*, Niujorkas, JAV) su krešėjimo aktyviu ir skiriamuoju geliu, siekiant surinkti 3–4,5 mililitrus kraujo serumo. Mėgintuvėliai kambario temperatūroje vertikaliajame padėtyje laikyti nuo 30 iki 60 min., kad krešulys susiformuotų mėgintuvėlyje ir kraujo serumas atsiskirtų nuo kraujo ląstelių. Tada mėgintuvėliai centrifuguoti  $20\ 000 \times g$  greičiu 20 minučių  $22\ ^\circ\text{C}$  temperatūroje ir vienkartinė pipete išpilstyti į tris 2 mililitrų talpos šaldymo mėgintuvėlius „*Cryo Tubes with Internal Thread*“ (*Ratiolab*, Dreieichas, Vokietija) (3.3 pav. B). Jeigu mėgintuvėlyje nustatyta hemolizės požymių (mėgintuvėlis nusidažė rausvai), toks serumas buvo sunaikinamas ir toliau nesaugomas. Galutiniai saugoti mėgintuvėliai laikyti  $-80\ ^\circ\text{C}$  temperatūrą palaikančiame šaldiklyje. Kraujo serumo mėginiai surinkti pagal tarptautinį protokolą [249]. Kraujo serumo mėginiai paruošti ELISA ir MCIA analizėms

juos atitirpinant kambario temperatūroje ir naudojant atitinkamiems tyrimams nepraskiestus.



**3.3 pav. A** – Kasos audiniai, sudėti į tris 2 mililitrų talpos šaldymo mėgintuvėlius. **B** – kraujo serumas, pipete išpilstytas į tris 2 mililitrų talpos šaldymo mėgintuvėlius

#### 3.4. Kasos audinių masių spektrometrija ir gautų duomenų proteominė analizė

Siekiant identifikuoti baltymus – kandidatus į KDA biožymenis šios studijos atradimo etape atlikta aukštos raiškos masių spektrometrija. Tirtas kasos vėžinis audinys, kaip neigiama kontrolė naudoti kasos uždegiminis ir sveiki audiniai. Šio etapo tyrimai pradėti nuo skysčių chromatografijos būdu

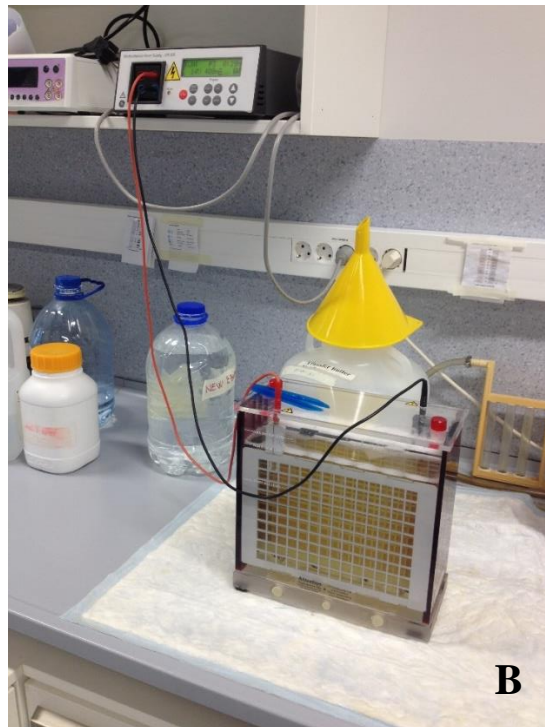
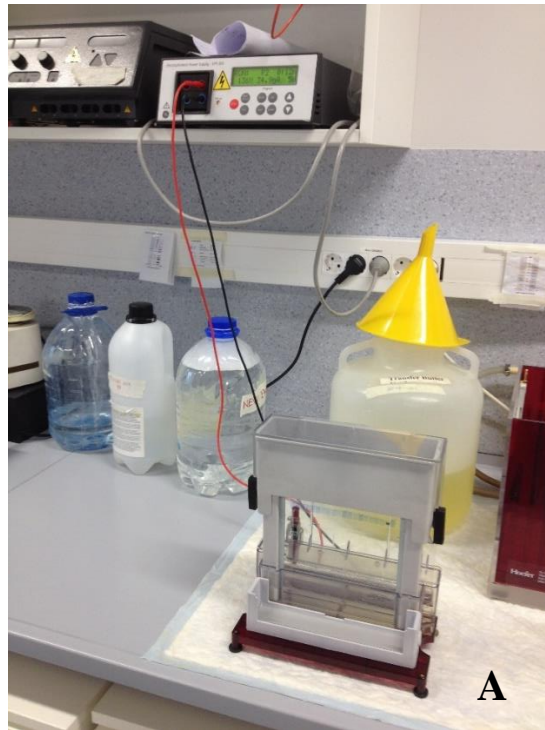
paremtos peptidų separacijos, kuri atlikta su skysčių chromatografijos sistema „NanoAcquity“ (Waters Corporation, Elstrė, Jungtinė Karalystė), naudojant atvirkštinės fazės gaudyklės koloną, kaip aprašyta anksčiau [248]. Duomenys gauti naudojant programinę įrangą „MassLynx 4.1“ (Waters Corporation, Milfordas, JAV) teigiamo jono režimu. Skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos duomenys surinkti naudojant nepriklausomą nuo duomenų analizės režimą (MSE) kartu su internetiniu jonų judrumo atskyrimu. Masės spektrometro gaudyklės susidūrimo energija buvo tarp 18 eV – 40 eV, skirta aukštos energijos nuskaitymams MSE režimu. Gaudyklės ir perkėlimo susidūrimo energija, skirta aukštos energijos nuskaitymams aukštos raiškos masių spektrometrijos režimui, buvo atitinkamai tarp 4 eV – 5 eV ir tarp 27 eV – 50 eV. Masės diapazonas buvo nustatytas tarp 50 Da – 2000 Da, o nuskaitymo laikas 0,9 sekundės. Etaloninis junginys [Glu1]-fibrinopeptidas B (Merck, Kenilvorthas, JAV), kurio koncentracija 500 fmol/μL, buvo pilamas nuolatine srove 500 nL/min. greičiu ir kas 30 sekundžių nuskaitymas dėl masių spektrometro internetinio kalibravimo. Mėginiai buvo tiriami trimis egzemplioriais.

Neapdoroti arba „žali“ proteominių duomenų failai buvo apdoroti ir analizuoti programine įranga „ProteinLynx Global SERVER 2.5.3“ (Waters Corporation, Milfordas, JAV). Šie parametrai naudoti kuriant piko sąrašus: (i) minimalus pirmtakų intensyvumas nustatytas iki 150 skaičiavimų; (ii) minimalus fragmento jonų intensyvumas nustatytas iki 50 skaičiavimų; (iii) intensyvumas nustatytas iki 500 skaičiavimų. Apdoroti duomenys buvo analizuojami naudojant tripsiną kaip skilimo proteazę. Buvo leidžiamas vienas praleistas skilimas, fiksuota modifikacija nustatyta kaip „cisteinų karbamidometilinizas“, o kintama modifikacija nustatyta kaip „metionino oksidacija“. Minimalūs identifikavimo kriterijai: 1 fragmento jonas peptide, 3 fragmento jonai baltyme ir mažiausiai 2 peptidai baltyme. Klaidingų atradimų dažnis peptidams ir baltymams identifikuoti buvo nustatytas pagal paiešką atvirkštinėje duomenų bazėje, automatiškai sugeneruotoje, kai pasaulinis klaidingų atradimų dažnis buvo 4 %. Baltymams identifikuoti buvo naudojama žmogaus baltymų duomenų baza „UniProtKB/SwissProt“.

### 3.5. Kasos audinių *Western-blot* tyrimas

Potencialaus kasos vėžio baltyminio biožymens verifikacijai naudota *Western-blot* metodika, tiriant kasos vėžinį audinį, kaip neigiamą kontrolę naudojant kasos uždegiminį ir sveiką audinius. Šioje analizėje kaip skirstomasis gelis naudotas 10 % tirpalas, sudarytas iš: 7,5 ml akrilamido / bisakrilamido; 5,6 ml TRIS / SDS pH 8,8; 9,4 ml distiliuoto vandens; 225 μl

amonio persulfato 10 %; 35 µl TEMED. Kaip koncentruojantis gelis naudotas tirpalas, sudarytas iš: 0,97 ml akrilamido / bisakrilamido; 1,9 ml TRIS / SDS pH 6,8; 4,6 ml distiliuoto vandens; 75 µl amonio persulfato 10 %; 15 µl TEMED. Sistema iš viso turi 16 tyrimui tinkamų takelių, į kiekvieną jų įpilta po 30 µL anksčiau paruoštų lizatų. Kaip bloto žymuo naudotas „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Valthamas, JAV), dažantis 10–180 kDa. Baltymams perkelti iš lizatų į gelį 30 minučių buvo leidžiama 30–35 mA elektros srovė (3.5 pav. A). Baltymams iš lizatų perėjus į gelį, dar 16 valandų leista 4 mA elektros srovė. Vėliau baltymai nuo gelio perkelti į polivinilideno difluorido membraną (Bio-Rad, Hercules, JAV), naudojant perkėlimo buferį ir 2,5 valandos sistemą veikiant 400 mA elektros srove (3.5 pav. B). Po perkėlimo membrana dar 15 minučių paveikta bloto buferiu, sudarytu iš: 0,9 % NaCl; 8 mM Tris HCl; 2 mM Tris; 1 % nugriebto pieno; 0,025 % Tween-20; 0,05 % NaN<sub>3</sub>. Membranai dažyti kaip pirminiai antikūnai naudoti CEACAM6 pelės monokloninis antikūnas, klonas 9A6, kategorijos numeris sc-59899 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dalasas, JAV) ir β-aktino pelės monokloninis antikūnas, klonas #937215, kategorijos numeris MAB8929 (Bio-Techne, Mineapolis, JAV). β-aktino funkcija šiuo atveju – pakrovimo kontrolė, nes šio baltymo kiekis visuose takeliuose turėtų būti toks pats. Jais membranos veiktos dvi valandas. Kaip antrinis antikūnas naudotas IRDye® 800 CW ožkos antipelės imunoglobulinas G (LI-COR Biosciences, Linkolnas, JAV), juo membranos veiktos 30 minučių. Nuskaityti naudotas membranų skaitytuvas „LI-COR Odyssey 9120“ kartu su jam pritaikyta programine įranga „Odyssey“ (LI-COR Biosciences, Linkolnas, JAV). Baltymų ekspresijos intensyvumui vertinti densitometrija naudota programa „ImageJ“ (National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, Viskonsino universitetas, JAV).



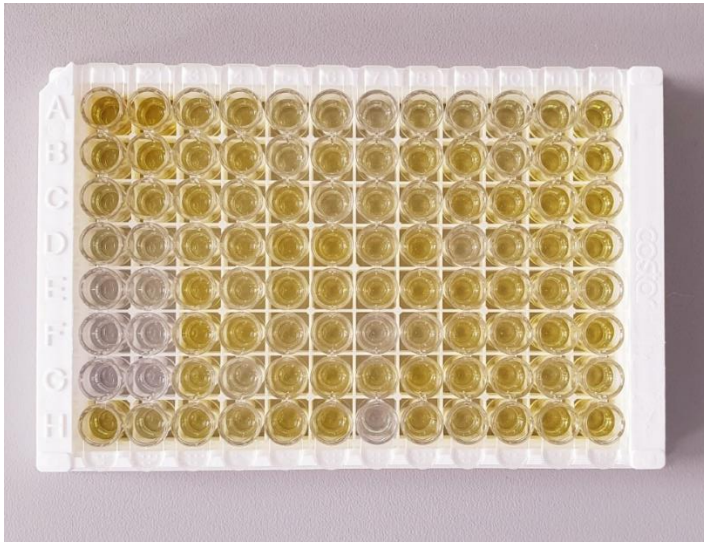
**3.5 pav. A** – Baltymų perkėlimas iš lizatų į gelį. **B** – Baltymų perkėlimas iš gelio į polivinilideno difluorido membraną



### 3.6. Kraujo serumo mėginių tyrimai ELISA ir MCIA metodikomis

Potencialaus kasos vėžio baltyminio biožymens koncentracijoms nustatyti ligonių, sergančių kasos vėžiu, lėtiniu pankreatitu ir sveikos kontrolės kraujo serume naudota ELISA (imunofermentinis tyrimas, angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metodika. Ši tyrimo dalis atitinka studijos validizacijos etapą. Dabar klinikinėje praktikoje naudojamų KDA biožymenų (CEA, CA19-9) koncentracijoms nustatyti tuose pačiuose kraujo serumo mėginiuose naudota MCIA (mikrodalelių chemiluminescencinė imuninė analizė, angl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*) metodika.

Kiekybiškai įvertinti CEACAM6 ekspresiją kraujo serumo mėginiuose naudotas CEACAM6 ELISA tyrimo rinkinys, katalogo numeris MBS7203989 (*MyBiosource*, San Diegas, JAV). Gamintojo rekomendacijų buvo laikomasi ruošiant mėginius ir reagentus, atliekant patį tyrimą ir apskaičiuojant rezultatus. Šio tyrimo principas – konkurencinė fermentinė imunologinė reakcija, panaudojant anti-CEACAM6 antikūnus ir CEACAM6-krienių peroksidazės konjugatą. 100 µL kraujo serumo buvo inkubuota su 50 µL CEACAM6-krienių peroksidazės konjugato į iš anksto padengtą 96 šulinėlių mikrotitravimo paletę 1 valandai 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos periodo šulinėliai buvo dekantuoti, 5 kartus perplauti ir inkubuoti su krienių peroksidazės fermento substratu 15 minučių 37 °C temperatūroje. Reakcijai užbaigti į kiekvieną šulinėlį įpilta po 50 µL specialaus reakcijos stabdymo tirpalo (rūgštinis tirpalas). Dėl šio tirpalo kiekvieno šulinėlio turinys įgijo geltoną spalvą, kurios intensyvumas priklausė nuo CEACAM6 ekspresijos mėginyje (3.6 pav.). Šulinėliuose esančių tirpalų spalvų intensyvumas (optinis tankis, OT) vertintas palečių skaitytuve spektrofotometru ties 450 nm bangos ilgiu.



**3.6 pav.** 96 šulinėlių mikrotitravimo paletė užbaigus chemines reakcijas, prieš tirpalų spalvų intensyvumo vertinimą spektrofotometru

Gauti rezultatai įvertinti nubraižius kalibracinę kreivę. Apskaičiuoti tiriamųjų mėginių ir kiekybinių standartų OT reikšmių vidurkiai. Iš gautų reikšmių atimtas kontrolinių šulinėlių OT verčių vidurkis. Ant abscisių ašies atidėtos kiekybinių standartų koncentracijų reikšmės, o ant ordinačių ašies apskaičiuotos jų OT reikšmės. Per išdėliotus taškus nubrėžta *logit-log* linijinės regresijos kreivė. Po šio žingsnio apskaičiuotos tiriamųjų mėginių CEACAM6 koncentracijos.

Šios ELISA sistemos jautrumas yra 0,1 ng/mL. Gamintojas nėra nustatęs reikšmingo kryžminio reaktyvumo ar trikdžių tarp CEACAM6 ir analogų.

Kiekybiškai įvertinti CA19-9 ir CEA ekspresijas kraujo serumo mėginiuose naudota: „ARCHITECT i2000“ analizatorius, „ARCHITECT iSystem“ laboratorinė įranga su atitinkamais reagentais „ARCHITECT CA 19-9XR assay“ ir „ARCHITECT CEA assay“ (Abbott, Čikaga, JAV). Gamintojo rekomendacijų buvo laikomasi ruošiant mėginius ir reagentus, atliekant patį tyrimą ir apskaičiuojant rezultatus. Minimalus mėginio tūris buvo apskaičiuotas su sistema ir pateiktas „Orderlist“ ataskaitoje. Sukelta reakcija tarp tiriamųjų mėginių kraujo serumo ir antikūnais (1119-NS-19-9 buvo naudojamas CA19-9 nustatyti, anti-CEA – CEA nustatyti) padengtų paramagnetinių mikrodalelių. Šios reakcijos metu sureagavo mėginiuose esantys antigenai (1116-NS-19-9 reaktyvūs determinantai arba CEA) su atitinkamais antikūnais padengtomis mikrodalelėmis. Po tirpalų išplovimo į sistemą įpilta antikūno, žymėto akridinu, konjugato, siekiant sukurti reakcijos

mišinį. Tada vėl atliktas susidariusių tirpalų išplovimas, po to į reakcijos mišinį įpilta išankstinio paleidiklio (*Pre-Trigger*) ir paleidiklio (*Trigger*) tirpalų. Įvykusios chemiliuminescencinės reakcijos intensyvumas vertintas santykiniais šviesos vienetais. Tyrimo esmė ta, kad yra tiesioginė priklausomybė tarp antigeno kiekio mėginyje ir santykinų šviesos vienetų, kuriuos išmatuoja analizatoriaus optika.

Mėginiai, kuriuose CEA koncentracijų vertės buvo didesnės nei 1500 ng/ml (standartinė matavimo riba), buvo skiedžiami: 20  $\mu$ l mėginio praskiesta su 1980  $\mu$ l „*ARCHITECT multi-Assay*“ mėginių skiedikliu. Tada skiedimo koeficientas įvestas į sistemą. Pagal šią reikšmę sistema po skiedimo automatiškai apskaičiuoja mėginio koncentraciją. Praskiesto mėginio vertė negalėjo būti mažesnė nei 4 ng/ml. „*ARCHITECT CEA*“ tyrime rezultatai apskaičiuoti sudarius keturių parametru logistinę kreivę, kuri atitinka duomenų redukcijos metodą.

Mėginiai, kuriuose CA19-9 koncentracijų vertės buvo didesnės nei 1200 U/ml (standartinė matavimo riba), buvo skiedžiami: 50  $\mu$ l mėginio praskiesta su 450  $\mu$ l „*ARCHITECT multi-Assay*“ mėginių skiedikliu. Tada skiedimo koeficientas įvestas į sistemą. Pagal šią reikšmę sistema po skiedimo automatiškai apskaičiuoja mėginio koncentraciją. Praskiesto mėginio vertė negalėjo būti mažesnė nei 30 U/ml. „*ARCHITECT CA19-9XR*“ tyrime rezultatai apskaičiuoti sudarant kalibracinę kreivę, pritaikant tiesinės regresijos duomenų redukcijos metodą.

Gamintojo apskaičiuota, kad analitinis sistemos jautrumas naudojant „*ARCHITECT CA 19-9XR assay*“ reagentus yra geresnis nei 2,00 U/mL, o naudojant „*ARCHITECT CEA assay*“ – geresnis nei 0,5 ng/mL.

### 3.7. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojant programinę įrangą: „*R statistical software package V 4.0.2*“ (© *The R Foundation for Statistical Computing*, <https://www.r-project.org/foundation>), „*Rstudio 1.3.959*“ (© 2021–2020 *RStudio, Inc.*), „*SPSS Statistics V.23*“ (*IBM*, Niujorkas, JAV), „*G\*Power V. 3.1.9.4*“ (*Diuseldorf universitetas*, Vokietija). *Shapiro-Wilk* ir *Kolmogorov-Smirnov* testai buvo naudojami patikrinti duomenų normalumą. Intervaliniai kintamieji, kurie nebuvo normaliai pasiskirstę, apibūdinti medianomis ir interkvartiliniais intervalais (IQR). Nominaliniai kintamieji apibūdinti pagal dažnį ir santykį atitinkamame imties pogrupyje. Tikrinant kategorinių kintamųjų ryšius naudotas *chi* kvadrato ( $\chi^2$ ) nepriklausomybės testas. Kai reikšmių dažniai buvo mažesni nei 5, tikrinant kategorinių kintamųjų ryšius, naudotas *Fisher* tikslusis testas. Siekiant įvertinti statistiškai reikšmingą ryšį

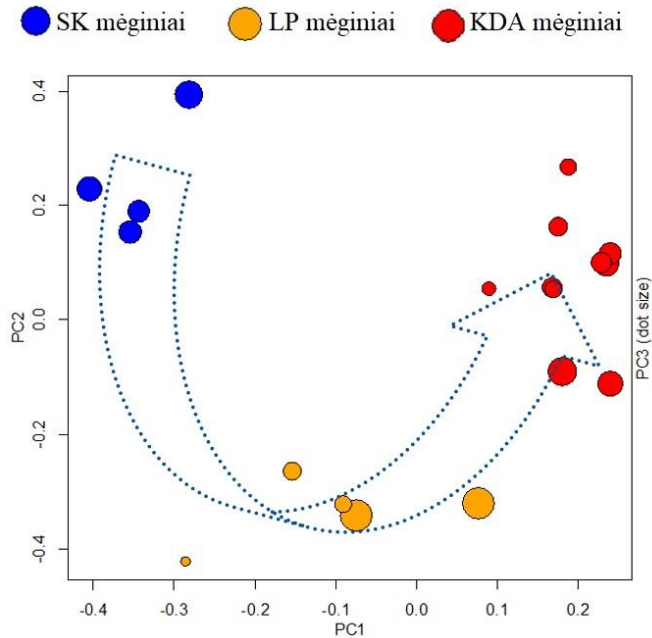
tarp kintamųjų grupių naudotas *Kruskal-Wallis* rangų sumos testas. Ryšio stiprumas buvo matuojamas *eta* kvadratu, remiantis H statistikos ( $\eta^2 [H]$ ) efekto dydžiu. Kai  $\eta^2 [H] = 0,01 \leq 0,06$ , efektas buvo nedidelis; kai  $\eta^2 [H] = 0,06 \leq 0,14$ , efektas buvo vidutinis ir kai  $\eta^2 [H] > 0,14$  efektas buvo didelis. *Youden* indeksas naudotas apskaičiuojant optimalią kraujo serumo koncentracijos ribinę reikšmę kiekvienam biožymeniui pagal jo prognostines savybes. *Kaplan-Meier* analizė (*log-rank* testas) naudota analizuojant IBL ir BI, atmetus 90 dienų mirtingumą (15 įvykių) ir su onkologine liga nesusijusias mirtis (5 įvykiai). Kintamųjų ryšys vertintas kaip statistiškai reikšmingas, kai *p* reikšmė buvo mažesnė nei 0,05 ( $p < 0,05$ ), o statistinė testo galia buvo 0,95 ( $1 - \beta = 0,95$ ).

## 4. TYRIMO REZULTATAI

### 4.1. Kasos audinių masių spektrometrijos ir proteominės analizės rezultatai, CEACAM6 kaip potencialaus kasos vėžio biožymens atradimas

Potencialiems kasos vėžio biožymenims rasti pirmame (atradimo) studijos tyrimų etape atlikta surinktų kasos audinių mėginių masių spektrometrija ir gautų duomenų proteominė analizė. Iš viso ištirta 19 iš kasos audinių sukurtų lizatų: 4 lizatai sukurti iš sveiko kasos audinio (SK), 5 iš lėtinio pankreatito paveikto kasos audinio (LP) ir 10 lizatų sukurta iš vėžinio kasos audinio (KDA). Turint tikslą nustatyti, kurie biožymenys būdingesni mažiems, o kurie – dideliems navikams, KDA mėginiai suskirstyti į dvi grupes: 5 lizatai sukurti iš mažesnių KDA navikų (skersmuo < 2 cm arba T1 pagal Amerikos jungtinio komiteto vėžio klausimais nustatytą pataloginės kasos egzokrininių navikų stadijavimo sistemos 8 leidimą), kiti 5 lizatai – iš didesnių KDA navikų (skersmuo > 3 cm arba T2–T4 pagal Amerikos jungtinio komiteto vėžio klausimais nustatytą pataloginės kasos egzokrininių navikų stadijavimo sistemos 8 leidimą). Pradinius tyrimo duomenis po pirminio apdorojimo galima peržiūrėti internete adresu:

<https://www.mdpi.com/2075-1729/11/6/542/s1> arba prie publikacijos skilties „*Supplementary Material: Supplementary File 1*“ [250], failo pavadinimas „*Table S1: Proteins identified in HDMS analysis*“. Visuose tirtuose mėginiuose iš viso nustatyti ir kiekybiškai įvertinti 3 627 baltymai. Trijų tiriamųjų grupių bendras baltymų pasiskirstymas aiškiai skyrėsi, LP mėginių baltymų profilis net suformavo pereinamąją grupę iš SK į KDA baltymus, taigi LP galėtų būti traktuojamas kaip kasos ikivėžinė būklė ir tai dar kartą pabrėžia šios ligos kaip KDA rizikos veiksnio aktualumą (4.1 pav.).



KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė.

**4.1 pav.** Skirtingų tiriamųjų grupių baltymų pasiskirstymas. Taškine rodykle pažymėta, kaip LP baltymų komponentės suformavo pereinamąją grupę iš SK baltymų į KDA baltymus

Iš nustatytų baltymų 350 baltymų buvo statistiškai reikšmingai labiau išreikšti KDA mėginiuose ( $p$  vertė  $< 0,05$ ; kartų pokytis  $> 1,5$ ). Vertinant baltymų pasiskirstymą pagal navikų dydį, kaip mažiems navikams būdingi baltymai identifikuoti PCBP3, HBE1 ir RHOB, o dideliems – GPRC5A, KRT13 ir GNAT3. Pradinių duomenų tyrimu taip pat nustatyta, kad 10 baltymų buvo aptikta tik KDA mėginiuose, bet neidentifikuota SK ar LP mėginiuose (4.1 lentelė). Atlikta šių KDA baltymų proteominė analizė atskleidė, kad du iš jų buvo pirmą kartą identifikuoti KDA audinyje (THBS3 ir MYO1F), bet jie neturi savybės būti sekretuojami į kraują, taigi ir galimo pritaikymo klinikinėje praktikoje, todėl iš tolesnių studijos tyrimų pašalinti. Kaip turintys savybę būti sekretuojami į kraują nustatyti tik du baltymai: CEACAM5 ir CEACAM6. CEACAM5 arba CEA jau yra naudojamas klinikinėje praktikoje kaip kelių onkologinių ligų, iš jų ir KDA, biožymuo. CEACAM6, kaip toks biožymuo dar nenaudojamas, bet pagal literatūros duomenis yra glaudžiai susijęs su KDA onkogeneze [35, 37–39, 41, 42], todėl yra itin perspektyvus kaip galimas naujas kasos vėžio biožymuo. Taigi šis baltymas buvo pasirinktas kitam studijos tyrimų etapui – verifikacijai.

**4.1 lentelė.** Tik KDA mėginiuose aptikti baltymai ir jų pagrindinės charakteristikos

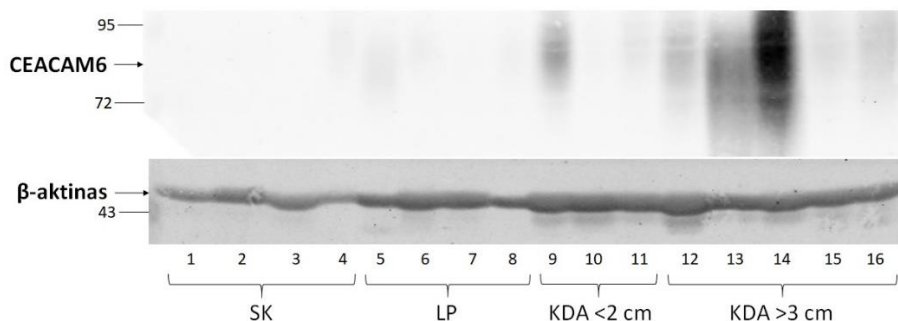
<b>Geno pavadinimas</b>	<b>Baltymo pavadinimas</b>	<b>Žinomas ryšys su KDA</b>	<b>Sekretuojamas į kraują</b>
THBS3	<i>Thrombospondin-3</i>	Ne	Ne
FLT3	<i>Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3</i>	Taip	Ne
CEACAM6	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6</i>	Taip	Taip
GPRC5A	<i>Retinoic acid-induced protein 3</i>	Taip	Ne
MYO1F	<i>Unconventional myosin-If</i>	Ne	Ne
GPX2	<i>Glutathione peroxidase 2</i>	Taip	Ne
KRT23	<i>Keratin, type I cytoskeletal 23</i>	Taip	Ne
CEACAM5	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5</i>	Taip	Taip
PSCA	<i>Prostate stem cell antigen</i>	Taip	Ne
S100A14	<i>Protein S100-A14</i>	Taip	Ne

KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma.

#### 4.2. CEACAM6 verifikacija KDA audiniuose

Siekiant verifikuoti, t. y. patvirtinti, CEACAM6 ekspresiją KDA mėginiuose ir paneigti šio baltymo ekspresiją SK ir LP mėginiuose, atlikta surinktų kasos audinių mėginių *Western-blot* analizė. Iš viso ištirta 16 iš kasos audinių sukurtų lizatų: 4 lizatai sukurti iš sveiko kasos audinio (SK), 4 – iš lėtinio pankreatito paveikto kasos audinio (LP) ir 8 – iš vėžinio kasos audinio (KDA). Turint tikslą nustatyti biožymens ekspresijos išraiškos sąsają su naviko dydžiu, KDA mėginiai suskirstyti į dvi grupes: 3 lizatai sukurti iš mažesnių KDA navikų (skersmuo < 2 cm arba T1 pagal Amerikos jungtinio komiteto vėžio klausimais nustatytą patologinės kasos egzokrininių navikų stadijavimo sistemos 8 leidimą), kiti 5 – iš didesnių KDA navikų (skersmuo > 3 cm arba T2–T4 pagal Amerikos jungtinio komiteto vėžio klausimais nustatytą patologinės kasos egzokrininių navikų stadijavimo sistemos 8 leidimą). Pilnus, neapkarpytus *Western-blot* analizės skenuotus atvaizdus galima peržiūrėti internete adresu:

<https://www.mdpi.com/2075-1729/11/6/542/s1> arba prie publikacijos skilties „Supplementary Material: Supplementary File 1“ [250], failų pavadinimai: „Figure S1: Full view of Western blot analysis of CEACAM6 expression in HC, CP, and PDAC tissue lysates“ ir „Figure S2: Full view of Western blot analysis of  $\beta$ -actin used as a loading control for HC, CP, and PDAC tissue lysates“. Ši analizė ir paskui atlikti densitometriniai skaičiavimai įrodė CEACAM6 ekspresiją KDA audiniuose (4.2 pav., 4.2 lentelė). Taip pat nustatyta tendencija, kad, didėjant naviko skersmeniui, didėja ir šio baltymo ekspresija. Šiuo tyrimu taip pat paneigta CEACAM6 ekspresija SK mėginiuose, o LP mėginiuose nustatyta tik ekspresijos pėdsakų. Tai vėlgi gali būti užuomina į LP kaip kasos ikivėžinės būklės aktualumą. Taigi šis tyrimų etapas verifikavo CEACAM6 ekspresijos dominavimą KDA audiniuose ir atvėrė kelią trečiam studijos etapui – CEACAM6 ekspresijos validizacijai klinikinėje praktikoje labiau pritaikomoje tiriamojoje medžiagoje, t. y. kraujo serume.



KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6.

**4.2 pav.** *Western-blot* analizė, įvertinusi CEACAM6 ekspresiją KDA, SK ir LP audinių lizatuose



**4.2 lentelė.** Densitometrijos duomenys, atspindintys santykinę CEACAM6 ir  $\beta$ -aktino ekspresijos intensyvumą *Western-blot* analizėje

	<b>SK</b>				<b>LP</b>				<b>KDA &lt; 2 cm</b>			<b>KDA &gt; 3 cm</b>				
Takelio nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CEACAM6	1,0	0,6	0,5	2,4	11,7	1,8	1,4	1,1	19,9	1,2	6,4	15,6	69,4	110,3	14,9	24,0
$\beta$ -aktinas	1,0	1,8	1,9	0,7	1,3	2,3	2,2	1,4	2,8	2,7	2,3	3,8	2,4	2,8	2,1	2,2

KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6.

### 4.3. CEACAM6 validizacija kraujo serume, CEACAM6 palyginimas su CEA ir CA19-9

#### 4.3.1. CEACAM6, CEA ir CA19-9 diagnostinių savybių vertinimas

Siekiant validizuoti CEACAM6 ekspresiją KDA sergančių ligonių kraujo serume ir palyginti ją su ekspresija SK asmenų ir LP sergančių ligonių kraujo serume, atliktas surinktų mėginių ištyrimas ELISA metodika. Galimybė detektuoti CEACAM6 kraujo serume jau buvo įrodyta kitų tyrėjų [35]. Turint tikslą palyginti šio baltymo savybes su klinikinėje praktikoje naudojamų biožymenų savybėmis, tuose pačiuose kraujo serumo mėginiuose MCIA metodika nustatyta CA19-9 ir CEA koncentracija.

Prieš pradėdant tyrimą palyginti tiriamųjų grupių demografiniai duomenys: įvertinti demografiniai ir bendri sveikatos būklės rodikliai (4.3.1.1 lentelė). Šis palyginimas atskleidė tiriamųjų grupių statistiškai reikšmingų visų tirtų rodiklių skirtumų. Šie skirtumai galėjo turėti įtakos tolesniems tyrimo rezultatams, bet jų neįmanoma išvengti dėl kiekvienai tiriamųjų grupei būdingų tam tikrų ypatybių: LP ligoniams paprastai būdingas mažesnis KMI, vyriška lytis ir didesnis sergamumas CD, KDA ligoniams būdingas vyresnis amžius, SK asmenims būdingas mažas sergamumas CD ir didesnis KMI.

**4.3.1.1 lentelė.** Demografiniai tiriamųjų grupių duomenys

<b>Rodiklis</b>	<b>KDA</b>	<b>LP</b>	<b>SK</b>	<b>p</b>
Tiriamųjų skaičius	142	66	31	
Lytis				<0,001
Moterys skaičius (procentinė dalis)	71 (50,0)	15 (22,7)	17 (54,8)	
Vyrai skaičius (procentinė dalis)	71 (50,0)	51 (77,3)	14 (45,2)	
Amžius (metais) mediana (IQR)	66 (13,8)	49 (12,0)	56 (11,0)	<0,001
KMI mediana (IQR)	25,4 (5,5)	22,5 (4,4)	27,3 (9,7)	<0,001
Cukrinis diabetas				0,009
Yra skaičius (procentinė dalis)	32 (22,5)	27 (40,9)	5 (16,1)	
Nėra skaičius (procentinė dalis)	110 (77,5)	39 (59,1)	26 (83,9)	

KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė; IQR – interkvartilinis intervalas; KMI – kūno masės indeksas.

Pradedant kraujo serumo tyrimus pirmiausia siekta įvertinti CEACAM6 galimybę atskirti KDA sergančius ligonius nuo LP sergančių ligonių bei SK asmenų, taigi jo diagnostines savybes. Tuo tikslu ištirti 239 kraujo serumo mėginiai, nustatyta CEACAM6 koncentracija juose. Palyginti su klinikinėje praktikoje jau naudojamais biožymenimis tuose pačiuose mėginiuose nustatytos ir CA19-9 bei CEA koncentracijos. Tirtų medžiagų koncentracijos kraujo serume medianos buvo statistiškai reikšmingai skirtingos visų trijų tiriamųjų grupių, jos pateikiamos 4.3.1.2 lentelėje. Taigi tiriamųjų biožymenų diagnostinių savybių tyrimas patvirtino CEA ir CA19-9 diagnostinį potencialą tiriant ligonius, kuriems įtariama KDA, nes jų koncentracijos buvo statistiškai reikšmingai padidėjusios KDA mėginiuose. O CEACAM6 koncentracija buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi vienos kontrolinės grupės, t. y. LP sergančių ligonių, kraujo serume, taip apribodama šio biožymens diagnostines savybes.

**4.3.1.2 lentelė.** Skirtingų tiriamųjų grupių tiriamų biožymenų koncentracijų kraujo serume medianos

Biožymuo	KDA	LP	SK	p
CEA (mkg/L) mediana (IQR)	2,9 (3,8)	2,6 (2,7)	1,4 (0,8)	<0,001
CEACAM6 (ng/mL) mediana (IQR)	2,1 (2,4)	3,3 (2,3)	1,1 (1,8)	<0,001
CA19-9 (kU/L) mediana (IQR)	176,0 (1386,9)	7,6 (22,1)	3,6 (5,1)	<0,001

KDA – kasos ductalinė adenokarcinoma; LP – lėtinis pankreatitas; SK – sveika kontrolė; CEA – carcinoembrioninis antigenas; CEACAM6 – su carcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9.

#### 4.3.2. Pasiruošimas vertinti CEACAM6, CEA ir CA19-9 prognostines savybes

Siekiant tiksliai įvertinti CEACAM6, CEA ir CA19-9 prognostines savybes visų pirma įvertinta kiekvieno biožymens priklausomybė nuo įvairių demografinių ir onkologinių rodiklių, apskaičiuotos jų koncentracijų optimalios ribinės reikšmės, KDA grupės ligoniai suskirstyti į pogrupius pagal jiems skirtą gydymą.

Turint tikslą nustatyti, kuris iš tiriamų biožymenų yra mažiausiai priklausomas nuo įvairių demografinių ir onkologinių rodiklių, atlikta KDA sergančių ligonių CEACAM6, CEA ir CA19-9 koncentracijos kraujo serume priklausomybės nuo šių rodiklių analizė (4.3.2.1 lentelė). Ši analizė leido

nustatyti, kad CEACAM6 statistiškai reikšmingai priklauso nuo 4 rodiklių (T, M, perineurinės invazijos, perivaskulinės invazijos), o CEA priklauso nuo 5 rodiklių (T, M, stadijos, perineurinės invazijos, perivaskulinės invazijos), CA19-9 – nuo 7 rodiklių (T, N, M, stadijos, perineurinės invazijos, perivaskulinės invazijos, tumoro skersmens). Taigi ši analizė atskleidė, kad CEACAM6 yra mažiausiai nuo įvairių rodiklių priklausomas KDA biožymuo, palyginti su CEA ir CA19-9.

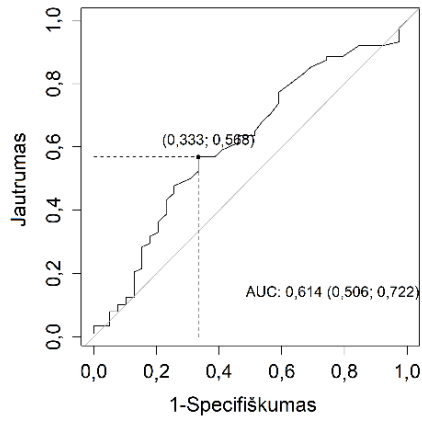
**4.3.2.1 lentelė.** Tiriamų biožymenų priklausomybė nuo demografinių ir onkologinių rodiklių

<b>Rodiklis</b>	<b>CEA</b> Efekto dydis (p reikšmė)	<b>CEACAM6</b> Efekto dydis (p reikšmė)	<b>CA19-9</b> Efekto dydis (p reikšmė)
<b>Demografinis</b>			
Lytis	0,01 (0,1) **	-0,01 (0,8) **	0,00 (0,3) **
Amžius	0,04 (0,46) *	0,09 (0,13) *	-0,05 (0,42) *
Cukrinis diabetas	0,01 (0,1) **	0,01 (0,06) **	0,00 (0,9) **
KMI	-0,04 (0,47) *	0,01 (0,85) *	0,04 (0,51) *
<b>Onkologinis</b>			
T	0,05 (0,001) **	0,04 (0,008) **	0,05 (0,001) **
N	-0,01 (0,9) **	0,00 (0,5) **	0,05 (0,002) **
M	0,07 (0,00005) **	0,02 (0,03) **	0,03 (0,004) **
G	-0,01 (0,9) **	0,00 (0,6) **	-0,01 (0,7) **
R	0,00 (0,5) **	0,00 (0,3) **	0,01 (0,1) **
Stadija	0,06 (0,002) **	0,00 (0,3) **	0,04 (0,01) **
LMS	-0,05 (0,59) *	-0,05 (0,56) *	0,13 (0,14) *
Perineurinė invazija	0,10 (0,000004) **	0,05 (0,0008) **	0,03 (0,02) **
Perivaskulinė invazija	0,09 (0,000007) **	0,06 (0,0005) **	0,02 (0,02) **
Tumoro skersmuo	0,1 (0,1) *	0,1 (0,09) *	0,2 (0,00) *
Tumoro lokalizacija	0,00 (0,3) **	-0,02 (0,9) **	0,00 (0,4) **
Bilirubino koncentracija	0,05 (0,4) *	0,01 (0,83) *	-0,04 (0,46) *

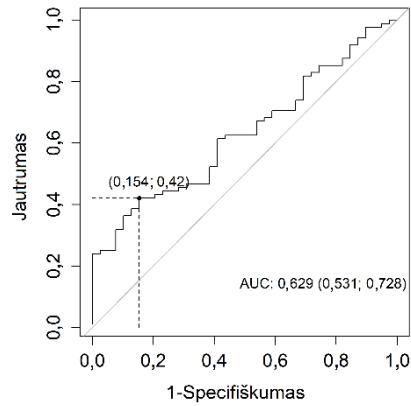
\* Kendall koreliacijos koeficientas; \*\* eta<sup>2</sup>, remiantis H statistikos efekto dydžiu; CEA – karcinoembrioninis antigenas; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9; T – tumoro dydis; N – tumoro infiltracija į regioninius limfmazgius; M – tumoro tolimosios metastazės; G – tumoro diferenciacija; R – tumoro rezekcijos statusas; LMS – limfmazgių santykis.

Tiriamų biožymenų prognostinėms savybėms tinkamai įvertinti reikėjo apskaičiuoti jų kraujo serumo koncentracijų optimalias ribines reikšmes. Kadangi diagnostinės CEACAM6 savybės buvo atmestos, šios ribinės reikšmės apskaičiuotos remiantis kiekvieno biožymens prognostinėmis savybėmis pagal *Youden* indeksą. Apskaičiuotos tokios ribinės reikšmės: CEA 2,6 mkg/L; CEACAM6 3,018 ng/mL; CA19-9 308,85 kU/L. Šias reikšmes apskaičiuojant kiekvienam biožymeniui naudotos priėmėjo veikimo charakteristikos (angl. *receiver operating characteristic*) (ROC) kreivės pateikiamos 4.3.2 paveiksle. Nustatytos atitinkamos optimalios ribinės reikšmės naudotos atlikti tolesnį šių medžiagų prognostinių savybių vertinimą.

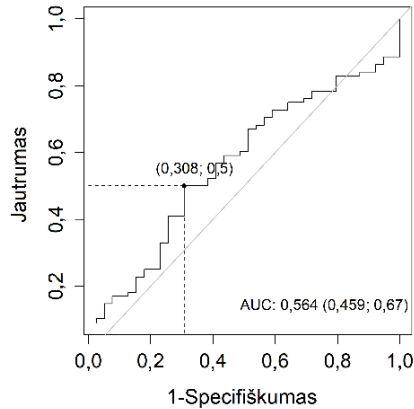
(A)



(B)



(C)



CEA – karcinoembrioninis antigenas; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9; ROC – priėmėjo veikimo charakteristika.

**4.3.2 pav.** CEA (A), CEACAM6 (B), CA19-9 (C) ROC kreivės, nubrėžtos pagal jų prognostines savybes apskaičiuojant optimalias kraujo serumo koncentracijos ribines reikšmes

Šiame tyrime KDA grupės ligoniams buvo taikytas skirtingas gydymas, jis turėjo įtakos jų ligos prognozei ir išgyvenamumui. Dėl to KDA grupės ligoniai suskirstyti į pogrupius pagal jiems skirtą gydymą: radikalaus gydymo ir paliatyvaus gydymo. Radikalaus gydymo pogrupio 73 ligoniams atlikta pankreatoduodeninė rezekcija ar hemipankreatektomija, o paliatyvaus gydymo pogrupio 69 ligoniams atlikta apeinamųjų jungčių operacija ir (ar) kasos naviko biopsija. Šiame pogrupyje taip pat buvo ligonių, sergančių rezektabiliu kasos vėžiu, kurie radikali operacija atsisakė arba ji negalėjo būti atlikta dėl gretutinių ligų. Kiekvieno pogrupio charakteristikos pateikiamos 4.3.2.2 lentelėje.

**4.3.2.2 lentelė.** KDA sergančių tiriamųjų pogrupių charakteristikos

<b>Rodiklis</b>	<b>Radikalus gydymas</b>	<b>Paliatyvus gydymas</b>
Tiriamųjų skaičius	73	69
Stadija		
IA	4	4
IB	8	0
IIA	11	1
IIB	33	8
III	17	21
IV	0	35
Adjuvantinė chemoterapija		
Bendrai gavo	58	57
Gemcitabino pagrindu	23	19
<i>Folfirinox</i> pagrindu	13	8
Gemcitabino ir <i>Folfirinox</i> pagrindu	22	30
Atsisakė / netoleravo	11	11
Nėra duomenų	4	1



#### 4.3.3. CEACAM6, CEA ir CA19-9 prognostinių savybių vertinimas, *Kaplan-Meier* išgyvenamumo analizė ir CEACAM6 savybė prognozuoti chemorezistenciją

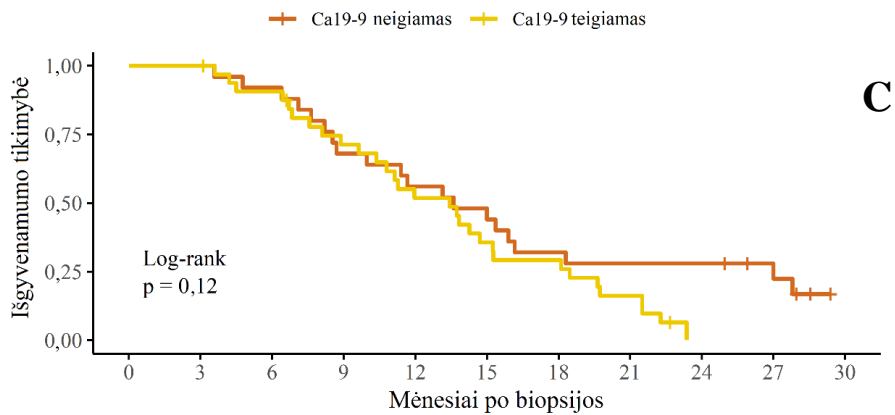
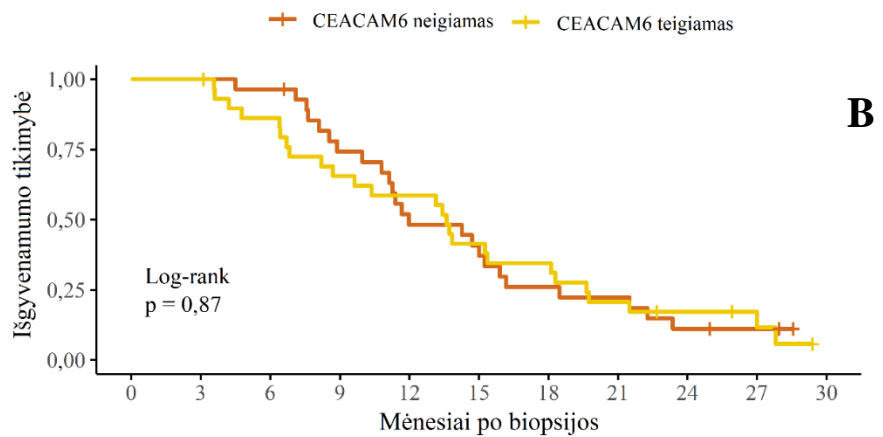
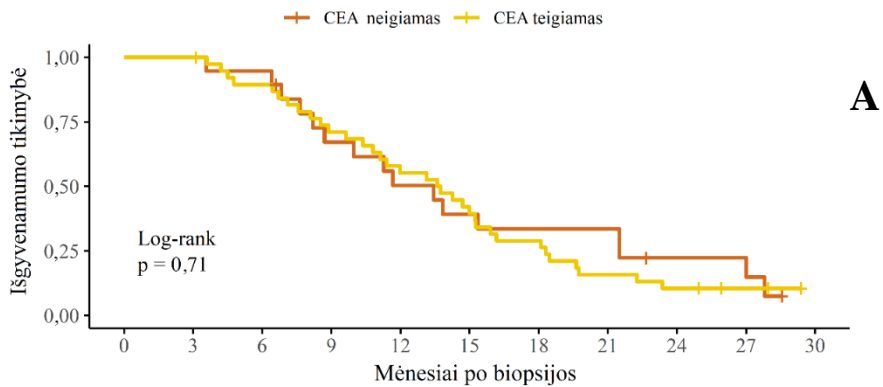
CEACAM6 prognostinėms savybėms įvertinti ir jas palyginti su tokiomis pačiomis CEA ir CA19-9 savybėmis atlikta *Kaplan-Meier* išgyvenamumo analizė. Jos metu tirta kiekvieno biožymens koncentracijų, viršijančių anksčiau apskaičiuotas optimalias ribines reikšmes, įtaka išgyvenamumui. Siekiant įvertinti tik su onkologinės ligos progresavimu susijusį mirtingumą iš analizės pašalinti tiriamieji, mirę dėl kitų priežasčių, bet ne dėl onkologinės ligos progresavimo, bei 90 dienų pooperaciniu laikotarpiu mirę asmenys. Abiejų KDA sergančių ligonių pogrupių kiekvieno biožymens apskaičiuotos BI ir IBL medianos (4.3.3 lentelė).

**4.3.3 lentelė.** KDA sergančių ligonių pogrupių apskaičiuotos BI ir IBL medianos priklausomai nuo tiriamų biožymenų koncentracijos reikšmės

		BI (mėnesiai)			IBL (mėnesiai)		
		Neigiamas *	Teigiamas **	p	Neigiamas *	Teigiamas **	p
Radikalus gydymas	CEA mediana (IQR)	15,6 (22,8)	15,4 (16,6)	0,3	8,7 (17,3)	7,9 (11,0)	0,38
	CEACAM6 mediana (IQR)	17,0 (21,3)	12,6 (14,1)	0,017	8,7 (14,4)	7,0 (19,0)	0,094
	CA19-9 mediana (IQR)	16,4 (18,8)	13,3 (21,8)	0,64	8,1 (16,4)	9,2 (11,9)	0,23
Paliatyvus gydymas	CEA mediana (IQR)	11,7 (13,6)	13,6 (9,9)	0,71			
	CEACAM6 mediana (IQR)	11,8 (7,9)	13,5 (12,6)	0,87			
	CA19-9 mediana (IQR)	13,6 (16,4)	12,0 (10,5)	0,12			

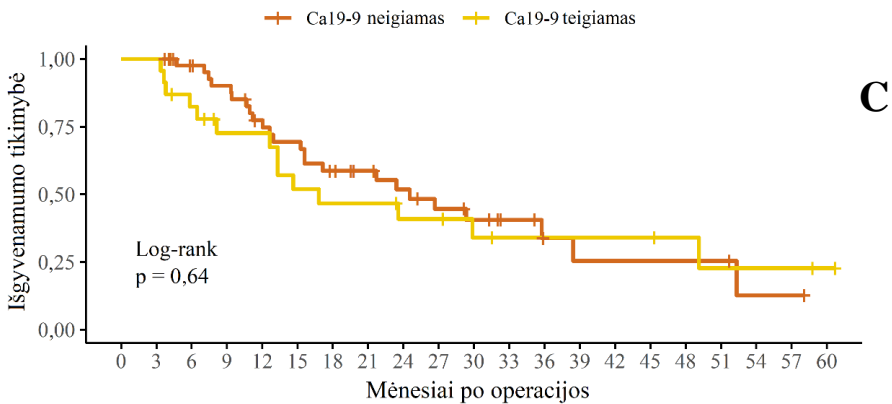
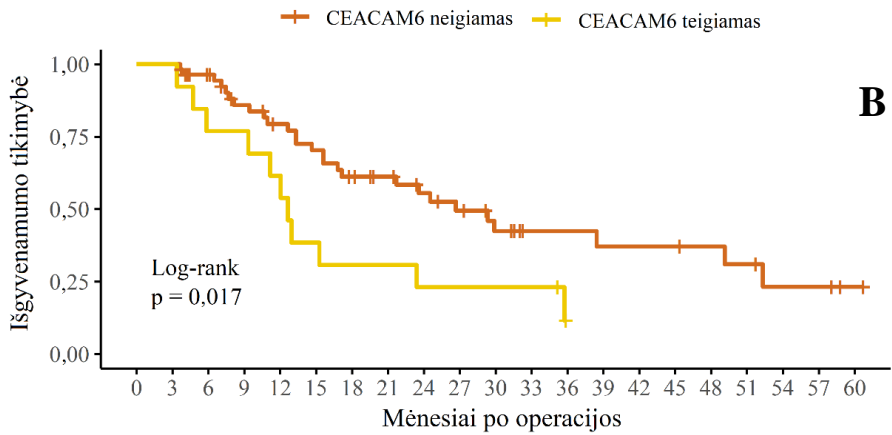
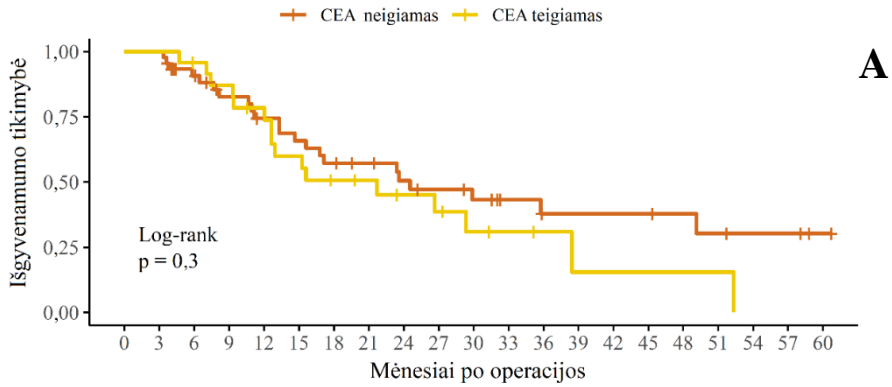
\* - biožymens koncentracijos žemiau optimalios ribinės reikšmės; \*\* - biožymens koncentracijos aukščiau optimalios ribinės reikšmės; BI – bendras išgyvenamumas; IBL – išgyvenamumas be ligos; CEA – karcinoembrioinis antigenas; CEACAM6 – su karcinoembrioiniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9.

Paliatyvus gydymo pogrupio nėra vienas biožymuo neidentifikuotas kaip gebantis statistiškai reikšmingai prognozuoti BI (4.3.3.1 pav. A, B, C). Kita vertus, radikalaus gydymo pogrupio tiriamųjų tik CEACAM6 koncentracijos, viršijančios optimalią ribinę reikšmę, leido statistiškai reikšmingai prognozuoti blogesnę BI (12,6 mėnesio CEACAM6 koncentracijai esant didesnei nei ribinė reikšmė vs. 17,0 mėnesių CEACAM6 koncentracijai esant žemiau ribinės reikšmės,  $p = 0,017$ ) (4.3.3.2 pav. B). To paties pogrupio tyrimųjų CEA ir CA19-9 koncentracijų reikšmės negalėjo statistiškai reikšmingai prognozuoti BI (4.3.3.2 pav. A, C). Nė vienas iš tirtų biožymenų neidentifikuotas kaip gebantis reikšmingai prognozuoti IBL (4.3.3.3 pav. A, B, C). Kadangi aukšta CEACAM6 ekspresija kraujo serume leidžia reikšmingai prognozuoti blogesnę BI, bet ne IBL, galime teigti, kad šio biožymens koncentracija, viršijanti ribinę reikšmę, neleidžia numatyti ankstyvesnio onkologinės ligos atkryčio. Tačiau kai tai nutinka, ligoniams, kurių CEACAM6 koncentracija didesnė nei ribinė reikšmė, liga būna agresyvesnė ir greičiau progresuoja. Kadangi dauguma radikalaus gydymo pogrupio ligonių buvo gydyti adjuvantine chemoterapija (4.3.2.2 lentelė), galime konstatuoti, kad CEACAM6 koncentracija, viršijanti ribinę reikšmę, taip pat leidžia prognozuoti KDA sergančių ligonių chemorezistenciją po radikalaus gydymo.



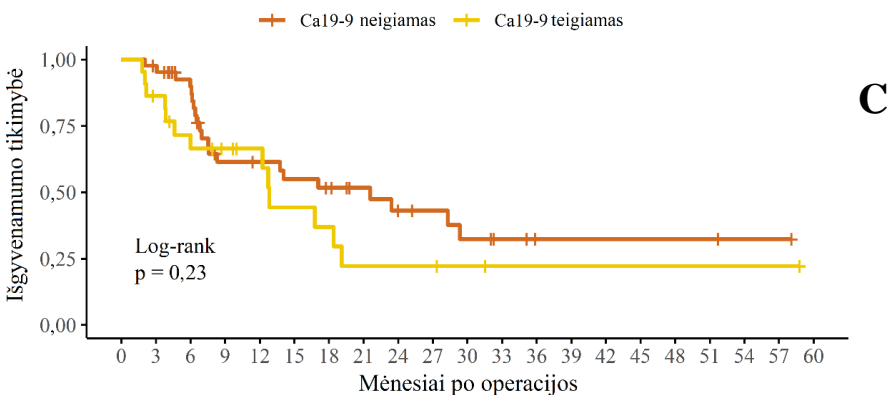
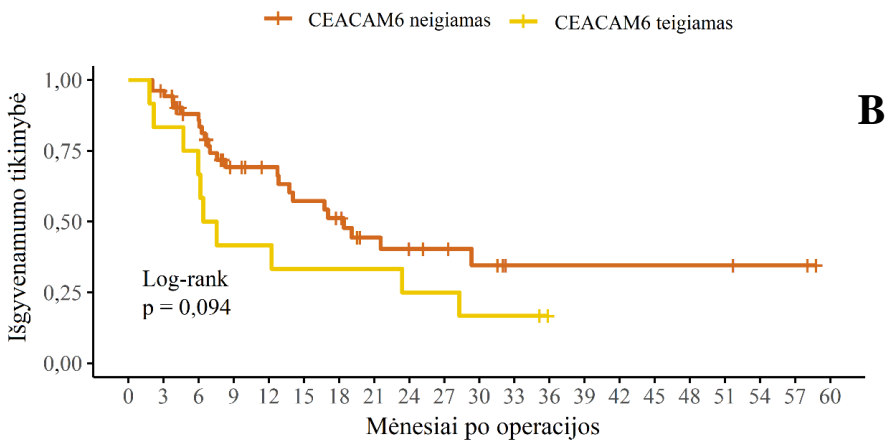
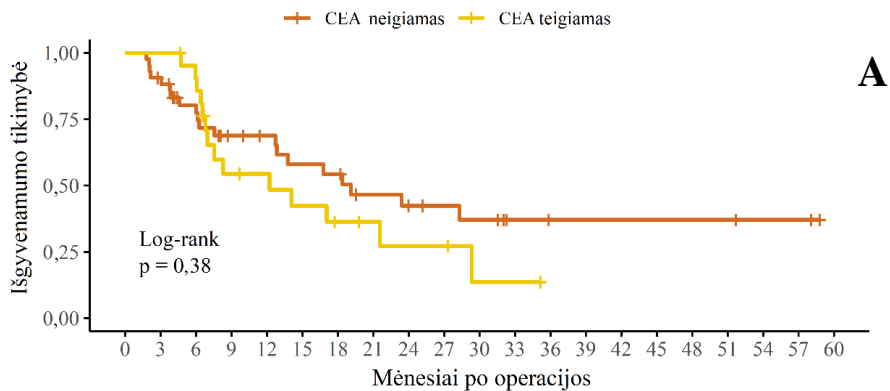
CEA – karcinoembrioninis antigenas; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9.

**4.3.3.1 pav.** Kaplan-Meier kreivės, atspindinčios paliatyvaus gydymo pogrupio tiriamų biožymenų kraujo serumo koncentracijų ir BI priklausomybę. **A** – CEA; **B** – CEACAM6; **C** – CA19-9.



CEA – karcinoembrioninis antigenas; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9.

**4.3.3.2 pav.** Kaplan-Meier kreivės, atspindinčios radikalaus gydymo pogrupio tiriamų biožymenų kraujo serumo koncentracijų ir BI priklausomybę. **A** – CEA; **B** – CEACAM6; **C** – CA19-9.



CEA – karcinoembrioninis antigenas; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6; CA19-9 – karbohidratinis antigenas 19-9.

**4.3.3.3 pav.** Kaplan-Meier kreivės, atspindinčios radikalaus gydymo pogrupio tiriamų biožymenų kraujo serumo koncentracijų ir IBL priklausomybę. **A** – CEA; **B** – CEACAM6; **C** – CA19-9.

## 5. REZULTATŲ APTARIMAS

### 5.1. CEACAM6 – prognostinis KDA biožymuo

Mūsų tyrimo rezultatai įrodė, kad KDA sergantiems ligoniams, kurių kraujo serume CEACAM6 koncentracija prieš atliktą radikalią operaciją viršijo nustatytą ribinę reikšmę ( $> 3,018$  ng/mL), BI prognozė buvo statistiškai reikšmingai blogesnė (12,6 mėnesio vs. 17,0 mėnesio,  $p = 0,017$ ) (4.3.3.2 pav. B).

Šis įrodymas buvo tikėtinas, nes pasaulyje iki šiol atlikta nemažai mokslinių tyrimų ir eksperimentų, kuriuose analizuota ir įrodyta, kaip CEACAM6 nulemia agresyvesnę KDA eigą ir greitesnę ligos progresavimą. Duxbury su bendraautoriais 2004 metais paskelbė kelių tyrimų, kuriuose nagrinėjo CEACAM6 vaidmenį kasos vėžio onkogenezėje, rezultatus. Vienas iš įdomesnių mokslininko komandos ištirtų procesų – anoikis. Tai yra ypatinga ląstelių apoptozės forma, sukelta ląstelių atsijungimo nuo tarpląstelinės matricos ir kitų ląstelių, o atsparumas anoikiui yra piktybiškumo požymis ir paprastai nulemia ląstelių tumorogenezės ir metastazavimo potencialą. Duxbury et al. šio reiškinio įtaką KDA onkogenezėje ir sąsajas su CEACAM6 ištyrė atlikdami *in vitro* ir *in vivo* tyrimus [37]. Mokslininkai tyrė paplitusios kasos vėžio ląstelių linijos MiaPaCa2 potipį Mia<sup>AR</sup>, kuris buvo specialiai modifikuotas ir pasižymėjo atsparumu anoikiui. Tyrime vienoje šių ląstelių linijų CEACAM6 ekspresija buvo užblokuota inaktyvinant jos sintezės geną. Tai lėmė atsparumo anoikiui praradimą, kuris įrodytas suleidžiant ląstelių linijų su užblokuota ir normalia CEACAM6 ekspresija laboratorinėms pelėms. Po 4 savaičių atlikus skrodimą, visoms pelėms, kurioms suleista ląstelių su aktyvia CEACAM6 ekspresija, nustatytos kepenų metastazės. O pelėms, kurioms suleista ląstelių su užblokuota CEACAM6 ekspresija, jokių tolimųjų metastazių nenustatyta. Kitame tyrime to paties autoriaus vadovaujama tyrėjų grupė tyrė kitą KDA ląstelių liniją, BxPC, pasižyminčia gausia CEACAM6 ekspresija [38]. Naudodami šio baltymo specifinius antikūnus mokslininkai kryžmiškai susiejo intraceliulinius signalizavimo procesus ir nuo prisitvirtinimo nepriklausomą išgyvenamumą, tokiu būdu reikšmingai padidindami tiriamų ląstelių atsparumą anoikiui. Dar kitame tyrime to paties autoriaus komanda tyrė KDA ląstelių liniją Capan2, kuri buvo paveikta stabilia transfekcija ir ėmė gausiai ekspresuoti CEACAM6 [39]. Vėliau naudojant slopinančius antikūnus įrodyta, kad šio baltymo hiperekspresija lemia tiriamų ląstelių invazyvumą link į insuliną panašaus augimo faktoriaus I (angl. *Insulin-like growth factor I*), kuris turi svarbų poveikį kasos vėžio ląstelių piktybiškumui. Šie tyrėjai taip pat ištyrė

CEACAM6 įtaką KDA ląstelių sąveikai su tarpląstelinės matricos komponentais fibronektinu ir vitronektinu [40]. Analizuotos BxPC3 linijos ląstelės, kurios natūraliai sintetina šį tiriamą baltymą. Nustatyta, kad CEACAM6 skatina KDA ląstelių interakciją su tarpląsteline matrica per kryžminę sąveiką su alphavbeta3 integrinu ir taip prisideda prie ląstelių invazinio ir metastatinio potencialo. Galiausiai Duxbury komandos mokslininkai dviejose kasos vėžio ląstelių linijose (Capan2 ir BxPC3) modifikavo CEACAM6 ekspresiją [41]. Vėliau buvo kiekybiškai ištirtas šių linijų ląstelių invazyvumas panaudojant „*modified Boyden chamber assay*“ bei jų buvo suleista laboratorinėms pelėms. Nustatyta, kad ląstelių linijoje su didesne CEACAM6 ekspresija reikšmingai padidėjo ląstelių invazyvumas, ląstelėse su mažesne pastarojo baltymo ekspresija, priešingai, – sumažėjo. O *in vivo* eksperimentas atskleidė, kad CEACAM6 ekspresija gali lemti invazinį KDA fenotipą per ląstelių matricos metaloproteinazės-9 aktyvumo pakitimus. Gebauer et al. taip pat atliko *in vivo* tyrimus ir į pusės laboratorinių pelių paodį suleido įprastų KDA ląstelių, o į kitų pelių – modifikuotų KDA ląstelių, kurios neekspresuoja CEACAM6 [35]. Pelių, kurioms buvo suleista modifikuotų KDA ląstelių, bendras išgyvenamumas buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis. Epitelio – mezenchimos moduliacija yra procesas, apimantis ląstelių tarpusavio adhezijos praradimą, o KDA ląstelių atveju tai leidžia įgyti invazinių ir metastatinių gebėjimų. Chen et al. nustatė, kad CEACAM6 skatina kasos vėžio ląstelių plitimą veikiant šiam procesui per ZEB1 / ZEB2 kelią [42]. Pastarasis baltymas taip pat gali moduluoti KDA ląstelių proliferaciją per ciklino D1 / CDK4 ekspresiją, tai įrodė Yan et al [43].

Įvertinus kitų tyrėjų darbus aišku, kad jau paskelbta nemažai studijų, nustačiusių stiprios CEACAM6 ekspresijos ir agresyvesnio KDA tipo ryšį. Nepaisant to, atlikta dar nedaug tyrimų, kuriuose tirtos šio baltymo prognostinės savybės klinikiame kontekste. Viena iš tokių studijų buvo paskelbta to paties Duxbury et al., praėjus metams po autoriaus ikiklinikinių CEACAM6 tyrimų serijos, tikriausiai nusprendus išsiaiškinti, ar laboratorinių eksperimentų rezultatai pasitvirtins praktikoje [44]. Mokslininko komanda analizavo chirurgiškai rezekuotus kasos vėžio audinius juose imunohistochemiškai vertindami šio baltymo ekspresiją. CEACAM6 ekspresija nustatyta 92 % KDA mėginių ir buvo statistiškai reikšmingai susijusi su blogesniu šių ligonių bendru išgyvenamumu (1,37 metų *vs.* 5,42 metų,  $p = 0,047$ ). Pandey et al. atliktame tyrime analizuoti Vėžio genomo atlaso (angl. *The Cancer Genome Atlas*) duomenys apie KDA sergančius ligonius [45]. Autorius taip pat CEACAM6 ekspresiją kasos vėžio audiniuose statistiškai reikšmingai susiejo su išgyvenamumu: kai ekspresija maža, BI buvo ~ 800 dienų, o esant didelei ekspresijai ~ 400 dienų ( $p = 0,01$ ). Alikta



Cox regresinė analizė leido nustatyti, kad esant didelei CEACAM6 ekspresijai rizikos santykis yra 1,92 (95 % pasiklovimo intervalas: 1,11–3,30). Vienas iš išsamiausių tyrimų, atliktų iki šiol, kai tirta ne tik CEACAM6, bet ir CEACAM1 bei CEACAM5, buvo paskelbtas Gebauer et al [35]. Šis darbas buvo inovatyvus, palyginti su anksčiau atliktais tyrimais, nes mokslininkai analizavo ne tik chirurgiškai rezekuotus kasos audinius, bet ir ligonių kraujo serumą, be to, vertintas ne tik BI, bet ir IBL. KDA audiniuose, vertinant imunohistochemiškai, didelė CEACAM5 ir CEACAM6 ekspresija buvo statistiškai reikšmingai susijusi su blogesniu BI ir IBL. O kraujo serume tik didelė CEACAM1 koncentracija buvo statistiškai reikšmingai susijusi su blogesniu BI, o CEACAM5 ar CEACAM6 koncentracijų reikšmingo ryšio su išgyvenamumu nenustatyta. Šio ryšio galimai nepavyko nustatyti dėl mažos tiriamųjų imties, nes ištirti tik 46 KDA sergančių ligonių kraujo serumo mėginiai.

CEACAM6 savybės skatinti onkogenezę yra universalios, būdingos ne tik KDA, todėl jis jau buvo identifikuotas kaip prognostinis biožymuo ir kitų onkologinių ligų: cholangiokarcinomos, osteosarkomos, inkstų vėžio, storosios žarnos vėžio, skrandžio vėžio [218, 219, 221, 251–254].

Mūsų žiniomis, šioje disertacijoje ir susijusioje publikacijoje yra pirmą kartą skelbiama, kad CEACAM6 ekspresija kraujo serume yra statistiškai reikšmingas kasos vėžio prognostinis biožymuo.

## 5.2. CEACAM6 – netinkamas diagnostinis KDA biožymuo

Mūsų tyrimo duomenimis, CEACAM6 nėra tinkamas būti naudojamas kaip diagnostinis kasos vėžio biožymuo. Šio baltymo koncentracija vienos iš kontrolinių grupių, t. y. ligonių, sergančių LP, kraujo serume buvo didesnė nei ligonių, kurie serga KDA (3,3 ng/mL vs. 2,1 ng/mL,  $p = < 0,001$ ) (4.3.1.2 lentelė).

Kitų mokslininkų anksčiau atliktų tyrimų nustatyta, kad ankstesniame skyriuje aprašyti CEACAM6 inicijuojami onkogenetiniai procesai gali prasidėti labai anksti, tik galimai be žymesnės klinikinės išraiškos. Taip galime teigti, nes šio baltymo ekspresija nustatyta ne tik KDA audiniuose, bet ir ikivėžinės būklės kasoje – kasos intraepitelinės neoplazijos audiniuose [35, 44, 255, 256]. Taip pat svarbu, kad šiai ikivėžinei būklei būdingi histologiniai pakitimai buvo nustatyti ir LP audiniuose [255, 257–259]. Tai yra viena iš priežasčių, kodėl kai kurie mokslininkai LP mano esant kasos ikivėžinę būklę. Esant tokiai situacijai natūraliai kyla poreikis įvertinti CEACAM6 ekspresija LP audiniuose ar ligonių kraujo serume. Šio baltymo ekspresija buvo patvirtinta LP chirurgiškai rezekuotuose audiniuose, bet ištirtas mėginių

skaičius buvo mažas, atitinkamai: 32 ir 18 [255, 260]. CEACAM6 aptiktas net LP sergančių ligonių tulžies mėginiuose, bet tiriamųjų imtis simbolinė (tik 2 ligoniai) ir skirta tik metodikos efektyvumui patikrinti. Gebauer et al. minėtame išsamiaame CEACAM šeimos baltymų tyrime taip pat kaip kontrolines grupes tyrė ir ligonių, sergančių LP, ir SK asmenų kraujo serumo mėginius. Jis nustatė, kad KDA kraujo serumo mėginiuose CEACAM6 koncentracijų mediana yra didesnė nei LP ar SK mėginiuose (KDA 2,90 µg/l vs. LP 2,25 µg/l vs. SK 2,34 µg/l;  $p = 0,06$  ir  $p = 0,029$ ), bet statistškai reikšmingas skirtumas buvo tik KDA ir SK koncentracijų. Todėl tyrėjai daugiau diagnostinių šio baltymo savybių neanalizavo. Šie mūsų rezultatai netgi iš dalies atitinka Sharma et al. studijos radinius, kad CEACAM6 ekspresija Bareto stemplės (t. y. stemplės ikivėžinės būklės) audinių mėginiuose buvo didesnė nei paties stemplės vėžio audiniuose [261].

Taigi dėl didelės CEACAM6 ekspresijos kontrolinės grupės mėginiuose nei mums, nei kitiems tyrėjams nepavyko įrodyti šio baltymo diagnostinio potencialo, o KDA ir LP ligonių diferencinė diagnostika yra itin aktuali klinikinė dilema. Viena tai galėjusių lempiti priežasčių – devyniuose mūsų LP audinių mėginiuose chirurginio preparato patologinio ištyrimo metu buvo identifikuota kasos intraepitelinė neoplazija, t. y. ikivėžinė būklė, kuriai būdinga CEACAM6 ekspresija. Tuo metu įvertinti, ar mėginyje yra tokių pakitimų, nebuvo standartinio patologo tyrimo dalis, dėl to tikrasis šių pakitimų paplitimas mūsų LP mėginiuose liko nežinomas. Kita vertus, CEACAM6 galimai galėtų būti panaudotas kaip LP klinikinės priežiūros biožymuo, turintis tikėtiną prognostinį potencialą, nurodantį ligos supiktybėjimo riziką. Iki šiol nėra atlikta šios krypties tyrimų.

### 5.3. CEACAM šeimos baltymai – potencialus KDA gydymo taikyns

Kadangi CEACAM6 inicijuoja reikšmingus onkogenezinius procesus, tikėtina, kad jį užblokavus šie procesai turėtų sutrikti. Taigi nenuostabu, kad šis baltymas buvo ištirtas ir kaip galimas taikinių terapijos taikyns, o CEA šiuo metu tiriamas dėl galimo vaidmens imunoterapijoje.

Cheng et al. įrodė, kad antikūnai prieš CEACAM6 gali nuslopinti KDA ląstelių linijos angiogenezę, invazyvumą ir Matricos metaloproteinazės-9 aktyvumą – tris savybes, itin svarbias tumor augimui ir tolesniam metastazavimui [262]. Šioje studijoje ląstelių linijos taip pat buvo paveiktos skirtingais gydymo būdais: vienai skirta standartinė chemoterapija gemcitabino pagrindu, kitai – CEACAM6 specifiniai antikūnai. Nustatyta, kad šie antikūnai yra pranašesni nei gemcitabinas, nes geba slopinti angiogenezę ir Matricos metaloproteinazės-9 aktyvumą. Strickland et al. savo

studijoje sukūrė antikūno – vaisto konjugatą, kaip antikūnus panaudodamas CEACAM6 specifinius imunoglobulinus [256]. Sukurto medikamento poveikį mokslininkas išbandė su laboratoriniais gyvūnais: pelėmis ir primatais, bet ne žmonėmis. Pelėms į paodį buvo suleista KDA ląstelių ir vėliau joms skirtas šis medikamentas, o primatams pastarasis medikamentas skirtas tik tiriant dėl galimo gydymo toksiškumo. Tiriamo baltymo ekspresija patvirtinta > 90 % pelėse susidariusių auglių, o pelėms į veną leidžiant sukurtą medikamentą nustatyta reikšminga naviko augimo inhibicija. Kontrolinėje pelių grupėje, kurių navikai neekspresavo CEACAM6, leidžiamas medikamentas efektyvumo neturėjo. Tyrimai su primatais leido konstatuoti tik grįžtamąjį toksinį poveikį kaulų čiulpsams.

Kitas CEACAM šeimos baltymas – CEA šiuo metu yra tiriamas dėl galimo panaudojimo imunoterapijoje [263]. Šioje studijoje tiriami ligoniai, sergantys IV stadijos kasos vėžiu, kurio metastazės kepenyse ekspresuoja CEA. Į studiją įtrauktiems tiriamiesiems į kepenų arteriją kiekvieną savaitę suleidžiama CAR2 Anti-CEA CAR-T limfocitų. Tai yra speciali imunoterapijos rūšis, kai iš ligonio surinkti T limfocitai laboratorijoje yra modifikuojami, padauginami ir vėl suleidžiami ligoniui. Modifikacijos metu jiems integruojami specialūs receptoriai, pagerinantys jų prisijungimą prie naviko paviršiaus, šiuo atveju tas receptorius atpažįsta CEA molekules. Toks receptorius bendrai vadinamas chimeriniu antigeno receptoriumi (CAR), taigi iš čia kyla ir gydymo metodikos terminas. Šiems modifikuotiems T limfocitams prisijungus prie naviko, imuninė sistema sugeba jį atpažinti ir su juo kovoti, nes tumoro „slėpimosi“ mechanizmai tampa nebeefektyvūs. Šio tyrimo pabaigos data – 2022 m. vasario 1 d., tada tikėtina bus aiškesnė ir galima CEACAM šeimos baltymų reikšmė imunoterapijoje.

Taigi CEACAM6 ir CEA yra svarbūs ne tik kaip KDA biožymenys. Dėl universalių onkogenezę skatinančių savybių CEACAM6 yra galimas KDA taikinių terapijos taikinytis, o CEA dėl paplitimo kasos navikuose gali rasti savo vietą imunoterapijoje.

#### 5.4. CEACAM6 – KDA chemorezistencijos predikcijos biožymuo

CEACAM6 ekspresija kasos vėžio audinyje lemia agresyvesnę ligos eigą, o vienas šio agresyvumo požymių yra atsparumas skiriamai chemoterapijai – chemorezistencija.

Chemorezistenciją, kaip CEACAM6 lemiamą kasos vėžio agresyvumo išraišką, vienoje savo studijų apraše šio baltymo tyrimuose daug nuveikęs Duxbury et al [46]. Studijoje vėl tirtos KDA ląstelių linijos su modifikuota CEACAM6 ekspresija (Capan2 ir BxPC3). Abi ląstelių linijos veiktos

gemcitabinu, o jo sukeliamas citotoksiškumas vertintas šiomis metodikomis: tĕkmĕs citometrijos apoptozĕs kiekybiniu vertinimu, kaspazĕs profiliavimu, *Western-blot* būdu analizuojant citoplazminio citochromo C atsipalaidavimą ir 3-2,5-difeniltetrazolio bromido citotoksiškumo tyrimu. Šiomis tyrimo metodikomis įrodyta, kad CEACAM6 ekspresuojančios ląstelių linijos pasižymĕjo padidĕjusia chemorezistencija skiriamam gemcitabinui, o tiriamo baltymo neekspresuojančių ląstelių linijų nustatytas reikšmingas jautrumo gemcitabinui padidĕjimas. Ankstesniame skyriuje minĕtam procesui – epitelio – mezenchimos moduliacijai būdinga tai, kad, be kitų piktybiškumo veiksnių, ji KDA ląstelĕms suteikia ir chemorezistencijos savybių. Chen et al. įrodĕ, kad šį procesą skatina CEACAM6 [42].

Klinikinių tyrimų, nagrinĕjančių CEACAM6 kaip chemorezistencijos predikcijos biožymens reikšmĕ, nėra atlikta. Vieninteliame tyrime, kuriame nagrinĕtas ligonių su KDA išgyvenamumas ir šio bei kitų jo šeimos biožymenų ekspresija ligonių kraujo serume, apie tirtiems ligoniams skirtą chemoterapinį gydymą neužsimenama, taigi ir daugiau įžvalgų padaryti negalima [35]. Mūsų tyrime daugumai ligonių buvo skirta chemoterapija, nepaisant to radikalaus gydymo pogrupio ligonių, turinčių CEACAM6 koncentraciją, didesnę nei optimali ribinė reikšmĕ, toks gydymas buvo neefektyvus dĕl reikšmingai blogesnio BI (12,6 mėnesio vs. 17,0 mėnesio,  $p = 0,017$ ) (4.3.3.2 pav. B).

Galime daryti išvadą, kad CEACAM6 koncentracijos kraujo serume reikšmĕ gali padĕti kliniciams rasti specifinius KDA sergančius ligonius, kurių tumoras tikĕtinai būtų atsparus paskirtai chemoterapijai, bet galimai būtų jautrus į CEACAM6 nukreiptai taikinių terapijai arba imunoterapijai. Tokiu būdu būtų ne tik pagerintas šių ligonių išgyvenamumas, bet ir jų gyvenimo kokybĕ, nes būtų atsisakoma daug šalutinių poveikių sukeliančio ir šiuo atveju neefektyvaus gydymo. Galiausiai, pritaikius šią individualizuotos medicinos metodiką, būtų optimizuotos ir taupomos sveikatos priežiūros sistemos išlaidos.

## 5.5. Tiriamųjų grupių demografiniai skirtumai

Mūsų studijoje yra išnagrinĕti ir pateikti tiriamų grupių (KDA sergančių ligonių, LP sergančių ligonių ir SK asmenų) demografiniai duomenys: įvertinti demografiniai ir bendri sveikatos būklĕs rodikliai (4.3.1.1 lentelĕ). Ši analizĕ atskleidĕ statistiškai reikšmingų tiriamųjų grupių skirtumų pagal visus nagrinĕtus rodiklius (lytį, amžių, KMI, sirgimą cukriniu diabetu). Šie skirtumai nebuvo netikĕti, nes kai kurie demografiniai ypatumai yra būdingi tam tikroms tiriamųjų grupĕms, pavyzdžiui: LP sergantys ligoniai dažniau

būna jaunesnio amžiaus vyrai, kurių sumažėjęs KMI ir serga CD, KDA dažniau serga vyresnio amžiaus žmonės, jų KMI vidutinis, jie taip pat turi didesnę polinkį sirgti CD, o SK asmenys dažnai gali turėti padidėjusį KMI. Mūsų tirtų biožymenų sintezė organizme priklauso nuo įvairių veiksnių, iš jų ir nuo šių analizuotų rodiklių. Manome, kad šie demografiniai skirtumai galėjo daryti įtaką mūsų tyrimo rezultatams, bet jų buvo neįmanoma išvengti. Kiti tyrėjai atlikdami tyrimus su panašiomis tiriamųjų grupėmis taip pat galėjo susidurti su panašia situacija. Pavyzdžiui, Gebauer et al. savo panašios struktūros studijoje pateikia tik KDA ir SK grupių tiriamųjų pasiskirstymą pagal lytį, bet apie tiriamųjų lyčių santykį LP grupėje informacijos nėra [35]. Tame pačiame tyrime amžiaus mediana vėlgi pateikiama tik KDA ir LP grupių, o informacijos apie SK grupės amžiaus medianą trūksta.

Taigi demografiniai skirtumai tarp tiriamųjų grupių kasos vėžio tyrimuose yra praktiškai neišvengiami. Juos atvirai pateikiame, norėdami parodyti jų galimą įtaką tyrimo rezultatams.

#### 5.6. CEACAM6 – mažiausiai priklausomas KDA biožymuo

Vienas iš mūsų tyrimo uždavinių buvo įvertinti tiriamų biožymenų priklausomybę nuo įvairių demografinių ir onkologinių rodiklių KDA ligonių grupėje (4.3.2.1 lentelė). Nustatyta, kad CEACAM6 statistiškai reikšmingai priklauso tik nuo 4 rodiklių: T, M, perineurinės invazijos ir perivaskulinės invazijos. CEA priklausomybė nuo tirtų rodiklių beveik identiška, tik papildomai nustatyta priklausomybė nuo rodiklio stadija. Atsižvelgiant į tai, kad jie abu yra priklausomi nuo T, M, perineurinės invazijos ir perivaskulinės invazijos rodiklių, skirtumą dėl rodiklio stadija galima susieti su imties dydžiu. Kitas biožymuo CA19-9 pasižymėjo didesniu priklausomybių nuo tirtų rodiklių kiekiu. Nustatyta, kad jis priklausomas nuo tų pačių rodiklių kaip CEACAM6 ir CEA, bet papildomai ir nuo N ir tumorų skersmens rodiklių. Tiriamų biožymenų kraujo serumo koncentracijos priklausomybę nuo panašių rodiklių savo studijoje vertino ir Gebauer et al. [35]. Šio tyrimo analizėje CEACAM6 priklausė nuo rodiklių G ir M, o CEA biožymens nenustatyta priklausomybės nė nuo vieno rodiklio. Tačiau šioje studijoje iširti tik 46 KDA sergančių ligonių kraujo serumo mėginiai, be to, vertinta priklausomybė nuo mažiau rodiklių.

Taigi mūsų tyrime, nustatius 142 KDA ligonių kraujo serumo mėginių biožymenų koncentracijas ir jų priklausomybę nuo įvairių demografinių ir onkologinių rodiklių, CEACAM6 identifiкуotas kaip labiausiai nepriklausomas KDA biožymuo, palyginti su šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamais biožymenimis CEA ir CA19-9.

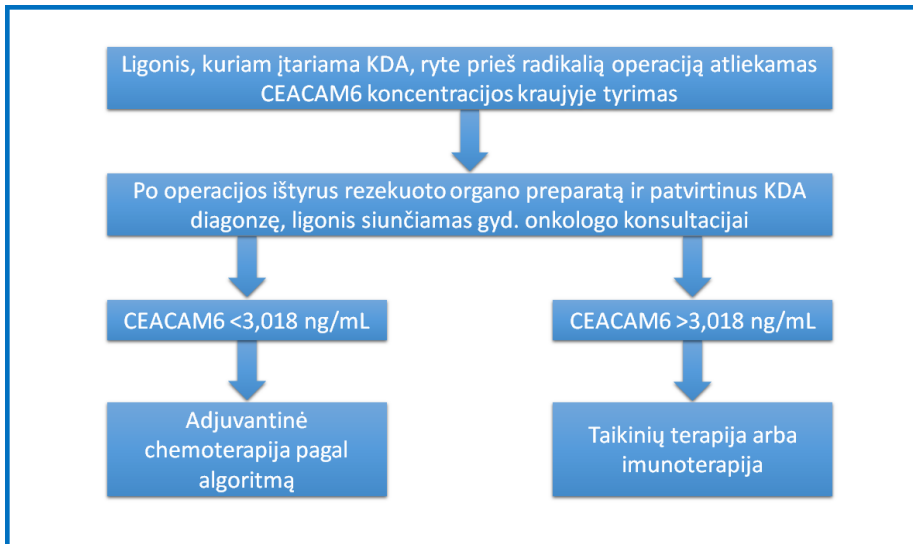
## 6. IŠVADOS

1. Sukurtas 267 tiriamųjų biologinės medžiagos mėginių biobankas.
2. Kasos audinių mėginiuose CEACAM6 identifikuotas kaip potencialus KDA biožymuo.
3. CEACAM6 verifikacijos metu nustatytas jo ekspresijos KDA audinyje dominavimas, palyginti su LP ir SK audiniais.
4. Optimali CEACAM6 kraujo serumo koncentracijos ribinė reikšmė 3,018 ng/mL; CEA – 2,6 mkg/L; CA19-9 – 308,85 kU/L.
5. CEACAM6 kraujo serumo koncentracijos neturi KDA diagnostinių savybių.
6. CEACAM6 kraujo serumo koncentracijos turi KDA prognostinių savybių. KDA sergantiems pacientams, kurių CEACAM6 koncentracija kraujo serume yra  $> 3,018$  ng/mL, vietoje chemoterapijos būtų galima siūlyti taikinių terapiją arba imunoterapiją.

## 7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Atsižvelgdami į šios disertacijos išvadas siūlytume šias praktines rekomendacijas.

Ligoniams prieš radikalią operaciją dėl įtariamo kasos vėžio (operacijos dienos rytą) rekomenduotume atlikti CEACAM6 koncentracijos kraujo serume tyrimą. Jeigu po operacijos patvirtinama KDA diagnozė, dėl tolesnės gydymo taktikos sprendžiantis gydytojas onkologas turėtų atsižvelgti į prieš operaciją nustatytą CEACAM6 koncentraciją. Jeigu ji  $< 3,018$  ng/mL, rekomenduotume skirti įprastą adjuvantinę chemoterapiją, o jeigu  $> 3,018$  ng/mL, – klinikinę situaciją reikėtų aptarti su pačiu pacientu ir jam pritarus nuo chemoterapijos susilaikyti, vietoje jos skirti taikinių terapiją arba imunoterapiją, esant galimybei kaip taikinį arba imunoterapijos elementą panaudoti CEACAM6 ar kitą jo šeimos baltymą (7 pav.).



KDA – kasos duktalinė adenokarcinoma; CEACAM6 – su karcinoembrioniniu antigenu susijusi ląstelių adhezijos molekulė 6.

**7 pav.** Praktinės ligonių ištyrimo ir gydymo rekomendacijos, esant įtariamam kasos vėžiui ir planuojamam radikaliai gydymui

## 8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Max Roser, Hannah Ritchie. Cancer. Available online: <https://Ourworldindata.Org/Cancer> (Accessed on 8 February 2021).
- [2] United European Gastroenterology Report: Pancreatic Cancer Across Europe - Taking a United Stand. Available online: <https://ueg.eu/files/630/9cc138f8dc04cbf16240daa92d8d50e2.pdf> (Accessed on 22 February 2021).
- [3] Ferlay, J.; Partensky, C.; Bray, F. More Deaths from Pancreatic Cancer than Breast Cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol.*, **2016**, 55 (9–10), 1158–1160. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2016.1197419>.
- [4] European Commission. European Cancer Information System. Available online: [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-%200\\$1-All\\$2-All\\$4-1,2\\$3-0\\$6-0,14\\$5-2008,2008\\$7-7\\$CEstByCountry\\$X0\\_8-3\\$X0\\_19-AE27\\$X0\\_20-No\\$CEstBySexByCountry\\$X1\\_8-%203\\$X1\\_19-AE27\\$X1\\_-1-1\\$CEstByIndiByCountry\\$X2\\_8-3\\$X2\\_19-AE27\\$X2\\_20-No\\$CEstRelative\\$X3\\_8-3\\$X3\\_9-AE27\\$X3\\_19-%20AE27\\$CEstByCountryTable\\$X4\\_19-AE27](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-%200$1-All$2-All$4-1,2$3-0$6-0,14$5-2008,2008$7-7$CEstByCountry$X0_8-3$X0_19-AE27$X0_20-No$CEstBySexByCountry$X1_8-%203$X1_19-AE27$X1_-1-1$CEstByIndiByCountry$X2_8-3$X2_19-AE27$X2_20-No$CEstRelative$X3_8-3$X3_9-AE27$X3_19-%20AE27$CEstByCountryTable$X4_19-AE27) (Accessed on 15 February 2021).
- [5] Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.; Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.*, **2014**, 74 (11), 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>.
- [6] Brasiūniene, B.; Brasiūnas, V.; Juozaityte, E. [Effect of combined treatment methods on quality of life in patients with pancreatic cancer]. *Medicina (Kaunas)*, **2006**, 42 (10), 817–822.
- [7] Goonetilleke, K. S.; Siriwardena, A. K. Systematic Review of Carbohydrate Antigen (CA 19-9) as a Biochemical Marker in the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.*, **2007**, 33 (3), 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.10.004>.
- [8] Steinberg, W. The Clinical Utility of the CA 19-9 Tumor-Associated Antigen. *Am. J. Gastroenterol.*, **1990**, 85 (4), 350–355.



- [9] Lamerz, R. Role of Tumour Markers, Cytogenetics. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, **1999**, *10 Suppl 4*, 145–149.
- [10] Sang, X.; Sun, Y.; Mao, Y.; Yang, Z.; Lu, X.; Yang, H.; Xu, H.; Zhong, S.; Huang, J. Hepatobiliary Cystadenomas and Cystadenocarcinomas: A Report of 33 Cases. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver*, **2011**, *31* (9), 1337–1344.  
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02560.x>.
- [11] Jones, N. B.; Hatzaras, I.; George, N.; Muscarella, P.; Ellison, E. C.; Melvin, W. S.; Bloomston, M. Clinical Factors Predictive of Malignant and Premalignant Cystic Neoplasms of the Pancreas: A Single Institution Experience. *HPB (Oxford)*, **2009**, *11* (8), 664–670.  
<https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2009.00114.x>.
- [12] Grollman, E. F.; Kobata, A.; Ginsburg, V. An Enzymatic Basis for Lewis Blood Types in Man. *J. Clin. Invest.*, **1969**, *48* (8), 1489–1494.  
<https://doi.org/10.1172/JCI106115>.
- [13] Lee, E. S.; Lee, J. M. Imaging Diagnosis of Pancreatic Cancer: A State-of-the-Art Review. *World J. Gastroenterol.*, **2014**, *20* (24), 7864–7877. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7864>.
- [14] Manak, E.; Merkel, S.; Klein, P.; Papadopoulos, T.; Bautz, W. A.; Baum, U. Resectability of Pancreatic Adenocarcinoma: Assessment Using Multidetector-Row Computed Tomography with Multiplanar Reformations. *Abdom. Imaging*, **2009**, *34* (1), 75–80.  
<https://doi.org/10.1007/s00261-007-9285-2>.
- [15] Zamboni, G. A.; Kruskal, J. B.; Vollmer, C. M.; Baptista, J.; Callery, M. P.; Raptopoulos, V. D. Pancreatic Adenocarcinoma: Value of Multidetector CT Angiography in Preoperative Evaluation. *Radiology*, **2007**, *245* (3), 770–778. <https://doi.org/10.1148/radiol.2453061795>.
- [16] Miller, F. H.; Rini, N. J.; Kepcke, A. L. MRI of Adenocarcinoma of the Pancreas. *AJR. Am. J. Roentgenol.*, **2006**, *187* (4), W365-74.  
<https://doi.org/10.2214/AJR.05.0875>.
- [17] Puli, S. R.; Bechtold, M. L.; Buxbaum, J. L.; Eloubeidi, M. A. How Good Is Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration in Diagnosing the Correct Etiology for a Solid Pancreatic Mass?: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Pancreas*, **2013**, *42* (1), 20–26.  
<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182546e79>.

- [18] Canto, M. I.; Harinck, F.; Hruban, R. H.; Offerhaus, G. J.; Poley, J.-W.; Kamel, I.; Nio, Y.; Schulick, R. S.; Bassi, C.; Kluijft, I.; et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium Summit on the Management of Patients with Increased Risk for Familial Pancreatic Cancer. *Gut*, **2013**, *62* (3), 339–347. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303108>.
- [19] Tumas, J.; Kvederaviciute, K.; Petrulionis, M.; Kurlinkus, B.; Rimkus, A.; Sakalauskaite, G.; Cicenias, J.; Sileikis, A. Metabolomics in Pancreatic Cancer Biomarkers Research. *Med. Oncol.*, **2016**, *33* (12), 133. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0853-6>.
- [20] A. Sileikis, M. Petrulionis, B. Kurlinkus, M. Ger, A. Kaupinis, J. Cicenias, M. Valius, K. S. Current Role of Proteomics in Pancreatic Cancer Biomarkers Research. *Curr. Proteomics*, **2016**, *13* (1), 68–75. <https://doi.org/10.2174/1570164613666160413130201>.
- [21] Zhou, D.; Mu, D.; Cheng, M.; Dou, Y.; Zhang, X.; Feng, Z.; Qiu, G.; Yu, H.; Chen, Y.; Xu, H.; et al. Differences in Lipidomics May Be Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Acta Cir. Bras.*, **2020**, *35* (5), e202000508. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020200050000008>.
- [22] Ger, M.; Kaupinis, A.; Petrulionis, M.; Kurlinkus, B.; Cicenias, J.; Sileikis, A.; Valius, M.; Strupas, K. Proteomic Identification of FLT3 and PCBP3 as Potential Prognostic Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.*, **2018**, *38* (10), 5759–5765. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12914>.
- [23] Law, H. C.-H.; Lagundžin, D.; Clement, E. J.; Qiao, F.; Wagner, Z. S.; Krieger, K. L.; Costanzo-Garvey, D.; Caffrey, T. C.; Grem, J. L.; DiMaio, D. J.; et al. The Proteomic Landscape of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Liver Metastases Identifies Molecular Subtypes and Associations with Clinical Response. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2020**, *26* (5), 1065–1076. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1496>.
- [24] Tumas, J.; Baskirova, I.; Petrenas, T.; Norkuniene, J.; Strupas, K.; Sileikis, A. Towards a Personalized Approach in Pancreatic Cancer Diagnostics Through Plasma Amino Acid Analysis. *Anticancer Res.*, **2019**, *39* (4), 2035–2042. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13314>.
- [25] Yi, N.; Zhao, X.; Ji, J.; Xu, M.; Jiao, Y.; Qian, T.; Zhu, S.; Jiang, F.;

- Chen, J.; Xiao, M. Serum Galectin-3 as a Biomarker for Screening, Early Diagnosis, Prognosis and Therapeutic Effect Evaluation of Pancreatic Cancer. *J. Cell. Mol. Med.*, **2020**, *24* (19), 11583–11591. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15775>.
- [26] Yang, L.; Wei, W.-C.; Meng, X.-N.; Gao, J.; Guo, N.; Wu, F.-T.; Zeng, W.-W. Significance of IL28RA in Diagnosis of Early Pancreatic Cancer and Its Regulation to Pancreatic Cancer Cells by JAK/STAT Signaling Pathway - Effects of IL28RA on Pancreatic Cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2019**, *23* (22), 9863–9870. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201911\\_19550](https://doi.org/10.26355/eurev_201911_19550).
- [27] Wu, X.; Zhang, Z.-X.; Chen, X.-Y.; Xu, Y.-L.; Yin, N.; Yang, J.; Zhu, D.-M.; Li, D.-C.; Zhou, J. A Panel of Three Biomarkers Identified by ITRAQ for the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Proteomics. Clin. Appl.*, **2019**, *13* (5), e1800195. <https://doi.org/10.1002/prca.201800195>.
- [28] Dutta, S. K.; Girotra, M.; Singla, M.; Dutta, A.; Otis Stephen, F.; Nair, P. P.; Merchant, N. B. Serum HSP70: A Novel Biomarker for Early Detection of Pancreatic Cancer. *Pancreas*, **2012**, *41* (4), 530–534. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182374ace>.
- [29] Peng, J.; Sun, B.-F.; Chen, C.-Y.; Zhou, J.-Y.; Chen, Y.-S.; Chen, H.; Liu, L.; Huang, D.; Jiang, J.; Cui, G.-S.; et al. Single-Cell RNA-Seq Highlights Intra-Tumoral Heterogeneity and Malignant Progression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Res.*, **2019**, *29* (9), 725–738. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0195-y>.
- [30] Pedersen, K.; Bilal, F.; Bernadó Morales, C.; Salcedo, M. T.; Macarulla, T.; Massó-Vallés, D.; Mohan, V.; Vivancos, A.; Carreras, M.-J.; Serres, X.; et al. Pancreatic Cancer Heterogeneity and Response to Mek Inhibition. *Oncogene*, **2017**, *36* (40), 5639–5647. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.174>.
- [31] Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Ragulan, C.; Cros, J.; Patil, Y.; Martinet, M.; Erkan, M.; Kleeff, J.; Wilson, J.; Apte, M.; et al. Inter- and Intra-Tumoural Heterogeneity in Cancer-Associated Fibroblasts of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Pathol.*, **2019**, *248* (1), 51–65. <https://doi.org/10.1002/path.5224>.
- [32] Aung, K. L.; Fischer, S. E.; Denroche, R. E.; Jang, G.-H.; Dodd, A.; Creighton, S.; Southwood, B.; Liang, S.-B.; Chadwick, D.; Zhang, A.;

- et al. Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2018**, *24* (6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2994>.
- [33] Aguirre, A. J.; Nowak, J. A.; Camarda, N. D.; Moffitt, R. A.; Ghazani, A. A.; Hazar-Rethinam, M.; Raghavan, S.; Kim, J.; Brais, L. K.; Ragon, D.; et al. Real-Time Genomic Characterization of Advanced Pancreatic Cancer to Enable Precision Medicine. *Cancer Discov.*, **2018**, *8* (9), 1096–1111. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0275>.
- [34] Pishvaian, M. J.; Blais, E. M.; Brody, J. R.; Lyons, E.; DeArbeloa, P.; Hendifar, A.; Mikhail, S.; Chung, V.; Sahai, V.; Sohal, D. P. S.; et al. Overall Survival in Patients with Pancreatic Cancer Receiving Matched Therapies Following Molecular Profiling: A Retrospective Analysis of the Know Your Tumor Registry Trial. *Lancet. Oncol.*, **2020**, *21* (4), 508–518. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30074-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30074-7).
- [35] Gebauer, F.; Wicklein, D.; Horst, J.; Sundermann, P.; Maar, H.; Streichert, T.; Tachezy, M.; Izbicki, J. R.; Bockhorn, M.; Schumacher, U. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer. *PLoS One*, **2014**, *9* (11), e113023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113023>.
- [36] Wang, X.; Li, Y.; Tian, H.; Qi, J.; Li, M.; Fu, C.; Wu, F.; Wang, Y.; Cheng, D.; Zhao, W.; et al. Macrophage Inhibitory Cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a Novel Diagnostic Serum Biomarker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *BMC Cancer*, **2014**, *14*, 578. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-578>.
- [37] Duxbury, M. S.; Ito, H.; Zinner, M. J.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. CEACAM6 Gene Silencing Impairs Anoikis Resistance and in Vivo Metastatic Ability of Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Oncogene*, **2004**, *23* (2), 465–473. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207036>.
- [38] Duxbury, M. S.; Ito, H.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. CEACAM6 Cross-Linking Induces Caveolin-1-Dependent, Src-Mediated Focal Adhesion Kinase Phosphorylation in BxPC3 Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279* (22), 23176–23182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402051200>.

- [39] Duxbury, M. S.; Ito, H.; Benoit, E.; Zinner, M. J.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. Overexpression of CEACAM6 Promotes Insulin-like Growth Factor I-Induced Pancreatic Adenocarcinoma Cellular Invasiveness. *Oncogene*, **2004**, *23* (34), 5834–5842. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207775>.
- [40] Duxbury, M. S.; Ito, H.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. C-Src-Dependent Cross-Talk between CEACAM6 and Alpha5beta3 Integrin Enhances Pancreatic Adenocarcinoma Cell Adhesion to Extracellular Matrix Components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *317* (1), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.018>.
- [41] Duxbury, M. S.; Ito, H.; Benoit, E.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. CEACAM6 Is a Determinant of Pancreatic Adenocarcinoma Cellular Invasiveness. *Br. J. Cancer*, **2004**, *91* (7), 1384–1390. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602113>.
- [42] Chen, J.; Li, Q.; An, Y.; Lv, N.; Xue, X.; Wei, J.; Jiang, K.; Wu, J.; Gao, W.; Qian, Z.; et al. CEACAM6 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Mediates Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Int. J. Oncol.*, **2013**, *43* (3), 877–885. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2015>.
- [43] Yan, L.; Wang, Y.; Wang, Z.-Z.; Rong, Y.-T.; Chen, L.-L.; Li, Q.; Liu, T.; Chen, Y.-H.; Li, Y.-D.; Huang, Z.-H.; et al. Cell Motility and Spreading Promoted by CEACAM6 through Cyclin D1/CDK4 in Human Pancreatic Carcinoma. *Oncol. Rep.*, **2016**, *35* (1), 418–426. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4338>.
- [44] Duxbury, M. S.; Matros, E.; Clancy, T.; Bailey, G.; Doff, M.; Zinner, M. J.; Ashley, S. W.; Maitra, A.; Redston, M.; Whang, E. E. CEACAM6 Is a Novel Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma and PanIN Lesions. *Ann. Surg.*, **2005**, *241* (3), 491–496. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000154455.86404.e9>.
- [45] Pandey, R.; Zhou, M.; Islam, S.; Chen, B.; Barker, N. K.; Langlais, P.; Srivastava, A.; Luo, M.; Cooke, L. S.; Weterings, E.; et al. Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDA): An Integrative Analysis of a Novel Therapeutic Target. *Sci. Rep.*, **2019**, *9* (1), 18347. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54545-9>.
- [46] Duxbury, M. S.; Ito, H.; Benoit, E.; Waseem, T.; Ashley, S. W.;

- Whang, E. E. A Novel Role for Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 as a Determinant of Gemcitabine Chemoresistance in Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res.*, **2004**, *64* (11), 3987–3993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0424>.
- [47] Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease Results Tool. Available online: <http://Ghdx.Healthdata.Org/Gbd-Results-Tool>.
- [48] Worldwide Trends in Diabetes since 1980: A Pooled Analysis of 751 Population-Based Studies with 4.4 Million Participants. *Lancet (London, England)*, **2016**, *387* (10027), 1513–1530. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8).
- [49] Hannah Ritchie, Max Roser. Obesity. Our World in Data. Available online: <https://Ourworldindata.Org/Obesity>.
- [50] Eurostat. Available online: [https://Ec.Europa.Eu/Eurostat/Statistics-Explained/Index.Php?Title=Population\\_structure\\_and\\_ageing/Lt](https://Ec.Europa.Eu/Eurostat/Statistics-Explained/Index.Php?Title=Population_structure_and_ageing/Lt).
- [51] Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B. Risk Factors for Pancreatic Cancer: A Summary Review of Meta-Analytical Studies. *Int. J. Epidemiol.*, **2015**, *44* (1), 186–198. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu240>.
- [52] Huxley, R.; Ansary-Moghaddam, A.; Berrington de González, A.; Barzi, F.; Woodward, M. Type-II Diabetes and Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis of 36 Studies. *Br. J. Cancer*, **2005**, *92* (11), 2076–2083. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602619>.
- [53] Carreras-Torres, R.; Johansson, M.; Gaborieau, V.; Haycock, P. C.; Wade, K. H.; Relton, C. L.; Martin, R. M.; Davey Smith, G.; Brennan, P. The Role of Obesity, Type 2 Diabetes, and Metabolic Factors in Pancreatic Cancer: A Mendelian Randomization Study. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2017**, *109* (9). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx012>.
- [54] Elena, J. W.; Steplowski, E.; Yu, K.; Hartge, P.; Tobias, G. S.; Brotzman, M. J.; Chanock, S. J.; Stolzenberg-Solomon, R. Z.; Arslan, A. A.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; et al. Diabetes and Risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium. *Cancer Causes Control*, **2013**, *24* (1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0078-8>.
- [55] Hart, P. A.; Chari, S. T. Diabetes Mellitus and Pancreatic Cancer: Why

the Association Matters? *Pancreas*. November 2013, pp 1207–1209. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182a7c963>.

- [56] Amin, S.; Mhango, G.; Lin, J.; Aronson, A.; Wisnivesky, J.; Boffetta, P.; Lucas, A. L. Metformin Improves Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Pre-Existing Diabetes: A Propensity Score Analysis. *Am. J. Gastroenterol.*, **2016**, *111* (9), 1350–1357. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.288>.
- [57] Wang, F.; Gupta, S.; Holly, E. A. Diabetes Mellitus and Pancreatic Cancer in a Population-Based Case-Control Study in the San Francisco Bay Area, California. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev. a Publ. Am. Assoc. Cancer Res. cosponsored by Am. Soc. Prev. Oncol.*, **2006**, *15* (8), 1458–1463. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0188>.
- [58] American Cancer Society. Pancreatic Cancer Risk Factors. Available online: <https://www.cancer.org/Cancer/Pancreatic-Cancer/Causes-Risks-Prevention/Risk-Factors.html>.
- [59] Genkinger, J. M.; Spiegelman, D.; Anderson, K. E.; Bernstein, L.; van den Brandt, P. A.; Calle, E. E.; English, D. R.; Folsom, A. R.; Freudenheim, J. L.; Fuchs, C. S.; et al. A Pooled Analysis of 14 Cohort Studies of Anthropometric Factors and Pancreatic Cancer Risk. *Int. J. cancer*, **2011**, *129* (7), 1708–1717. <https://doi.org/10.1002/ijc.25794>.
- [60] Bieliuniene, E.; Brøndum Frøkjær, J.; Pockevicius, A.; Kemesiene, J.; Lukosevičius, S.; Basevicius, A.; Atstupenaite, V.; Barauskas, G.; Ignatavicius, P.; Gulbinas, A.; et al. CT- and MRI-Based Assessment of Body Composition and Pancreatic Fibrosis Reveals High Incidence of Clinically Significant Metabolic Changes That Affect the Quality of Life and Treatment Outcomes of Patients with Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Medicina (Kaunas)*, **2019**, *55* (10). <https://doi.org/10.3390/medicina55100649>.
- [61] Chen, H.; Qin, S.; Wang, M.; Zhang, T.; Zhang, S. Association between Cholesterol Intake and Pancreatic Cancer Risk: Evidence from a Meta-Analysis. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 8243. <https://doi.org/10.1038/srep08243>.
- [62] Liao, W.-C.; Tu, Y.-K.; Wu, M.-S.; Lin, J.-T.; Wang, H.-P.; Chien, K.-L. Blood Glucose Concentration and Risk of Pancreatic Cancer: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *BMJ*, **2015**, *350*, g7371. <https://doi.org/10.1136/bmj.g7371>.

- [63] Pisani, P. Hyper-Insulinaemia and Cancer, Meta-Analyses of Epidemiological Studies. *Arch. Physiol. Biochem.*, **2008**, *114* (1), 63–70. <https://doi.org/10.1080/13813450801954451>.
- [64] Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Silverman, D. T.; Petersen, G.; Bracci, P. M.; Ji, B. T.; Negri, E.; Li, D.; Risch, H. A.; Olson, S. H.; et al. Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer: An Analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, **2012**, *23* (7), 1880–1888. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr541>.
- [65] Alsamarrai, A.; Das, S. L. M.; Windsor, J. A.; Petrov, M. S. Factors That Affect Risk for Pancreatic Disease in the General Population: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.*, **2014**, *12* (10), 1635-44.e5; quiz e103. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.01.038>.
- [66] EUROPEAN TOBACCO USE. Trends Report 2019. World Health Organization. 2019. Available online: [https://Www.Euro.Who.Int/\\_data/Assets/Pdf\\_file/0009/402777/Tobacco-Trends-Report-ENG-WEB.Pdf](https://Www.Euro.Who.Int/_data/Assets/Pdf_file/0009/402777/Tobacco-Trends-Report-ENG-WEB.Pdf).
- [67] Oficialios Statistikos Portalas. Available online: <https://Osp.Stat.Gov.Lt/Lietuvos-Gyventoju-Sveikata-2020/Rukymas>.
- [68] Raimondi, S.; Lowenfels, A. B.; Morselli-Labate, A. M.; Maisonneuve, P.; Pezzilli, R. Pancreatic Cancer in Chronic Pancreatitis; Aetiology, Incidence, and Early Detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **2010**, *24* (3), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>.
- [69] Kirkegård, J.; Mortensen, F. V.; Cronin-Fenton, D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.*, **2017**, *112* (9), 1366–1372. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.218>.
- [70] Dufour, M. C.; Adamson, M. D. The Epidemiology of Alcohol-Induced Pancreatitis. *Pancreas*, **2003**, *27* (4), 286–290. <https://doi.org/10.1097/00006676-200311000-00002>.
- [71] Gupta, S.; Wang, F.; Holly, E. A.; Bracci, P. M. Risk of Pancreatic Cancer by Alcohol Dose, Duration, and Pattern of Consumption,



- Including Binge Drinking: A Population-Based Study. *Cancer Causes Control*, **2010**, *21* (7), 1047–1059. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9533-6>.
- [72] Lu, P.-Y.; Shu, L.; Shen, S.-S.; Chen, X.-J.; Zhang, X.-Y. Dietary Patterns and Pancreatic Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients*, **2017**, *9* (1). <https://doi.org/10.3390/nu9010038>.
- [73] Naudin, S.; Li, K.; Jaouen, T.; Assi, N.; Kyrø, C.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Boutron-Ruault, M.-C.; Rebours, V.; Védié, A.-L.; et al. Lifetime and Baseline Alcohol Intakes and Risk of Pancreatic Cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Int. J. cancer*, **2018**, *143* (4), 801–812. <https://doi.org/10.1002/ijc.31367>.
- [74] Klein, A. P.; Brune, K. A.; Petersen, G. M.; Goggins, M.; Tersmette, A. C.; Offerhaus, G. J. A.; Griffin, C.; Cameron, J. L.; Yeo, C. J.; Kern, S.; et al. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Res.*, **2004**, *64* (7), 2634–2638. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3823>.
- [75] Andersson, G.; Wennersten, C.; Borgquist, S.; Jirstrom, K. Pancreatic Cancer Risk in Relation to Sex, Lifestyle Factors, and Pre-Diagnostic Anthropometry in the Malmö Diet and Cancer Study. *Biol. Sex Differ.*, **2016**, *7*, 66. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0120-8>.
- [76] Rhim, A. D.; Stanger, B. Z. Molecular Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression: Aberrant Activation of Developmental Pathways. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2010**, *97*, 41–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385233-5.00002-7>.
- [77] Orth, M.; Metzger, P.; Gerum, S.; Mayerle, J.; Schneider, G.; Belka, C.; Schnurr, M.; Lauber, K. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Hallmarks, Current Status, and Future Perspectives of Combined Modality Treatment Approaches. *Radiat. Oncol.*, **2019**, *14* (1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6>.
- [78] Malumbres, M.; Barbacid, M. RAS Oncogenes: The First 30 Years. *Nature reviews. Cancer*. England June 2003, pp 459–465. <https://doi.org/10.1038/nrc1097>.
- [79] Rozenblum, E.; Schutte, M.; Goggins, M.; Hahn, S. A.; Panzer, S.; Zahurak, M.; Goodman, S. N.; Sohn, T. A.; Hruban, R. H.; Yeo, C. J.;

- et al. Tumor-Suppressive Pathways in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.*, **1997**, *57* (9), 1731–1734.
- [80] Waddell, N.; Pajic, M.; Patch, A.-M.; Chang, D. K.; Kassahn, K. S.; Bailey, P.; Johns, A. L.; Miller, D.; Nones, K.; Quek, K.; et al. Whole Genomes Redefine the Mutational Landscape of Pancreatic Cancer. *Nature*, **2015**, *518* (7540), 495–501.  
<https://doi.org/10.1038/nature14169>.
- [81] Fleming, J. B.; Shen, G.-L.; Holloway, S. E.; Davis, M.; Brekken, R. A. Molecular Consequences of Silencing Mutant K-Ras in Pancreatic Cancer Cells: Justification for K-Ras-Directed Therapy. *Mol. Cancer Res.*, **2005**, *3* (7), 413–423. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-04-0206>.
- [82] Popović Hadzija, M.; Korolija, M.; Jakić Razumović, J.; Pavković, P.; Hadzija, M.; Kapitanović, S. K-Ras and Dpc4 Mutations in Chronic Pancreatitis: Case Series. *Croat. Med. J.*, **2007**, *48* (2), 218–224.
- [83] Krishnamurthy, J.; Torrice, C.; Ramsey, M. R.; Kovalev, G. I.; Al-Regaiey, K.; Su, L.; Sharpless, N. E. Ink4a/Arf Expression Is a Biomarker of Aging. *J. Clin. Invest.*, **2004**, *114* (9), 1299–1307.  
<https://doi.org/10.1172/JCI22475>.
- [84] Aguirre, A. J.; Bardeesy, N.; Sinha, M.; Lopez, L.; Tuveson, D. A.; Horner, J.; Redston, M. S.; DePinho, R. A. Activated Kras and Ink4a/Arf Deficiency Cooperate to Produce Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Genes Dev.*, **2003**, *17* (24), 3112–3126.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1158703>.
- [85] Bardeesy, N.; Aguirre, A. J.; Chu, G. C.; Cheng, K.-H.; Lopez, L. V.; Hezel, A. F.; Feng, B.; Brennan, C.; Weissleder, R.; Mahmood, U.; et al. Both P16(Ink4a) and the P19(Arf)-P53 Pathway Constrain Progression of Pancreatic Adenocarcinoma in the Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, *103* (15), 5947–5952.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601273103>.
- [86] Gerdes, B.; Ramaswamy, A.; Kersting, M.; Ernst, M.; Lang, S.; Schuermann, M.; Wild, A.; Bartsch, D. K. P16(INK4a) Alterations in Chronic Pancreatitis-Indicator for High-Risk Lesions for Pancreatic Cancer. *Surgery*, **2001**, *129* (4), 490–497.  
<https://doi.org/10.1067/msy.2001.112071>.

- [87] Harada, T.; Okita, K.; Shiraishi, K.; Kusano, N.; Furuya, T.; Oga, A.; Kawauchi, S.; Kondoh, S.; Sasaki, K. Detection of Genetic Alterations in Pancreatic Cancers by Comparative Genomic Hybridization Coupled with Tissue Microdissection and Degenerate Oligonucleotide Primed Polymerase Chain Reaction. *Oncology*, **2002**, 62 (3), 251–258. <https://doi.org/10.1159/000059573>.
- [88] Brasiūniene, B.; Brasiūnas, V.; Barauskas, G.; Juozaityte, E. [Molecular factors of pancreatic cancer pathogenesis and prognosis]. *Medicina (Kaunas)*, **2003**, 39 (7), 631–636.
- [89] Maitra, A.; Adsay, N. V.; Argani, P.; Iacobuzio-Donahue, C.; De Marzo, A.; Cameron, J. L.; Yeo, C. J.; Hruban, R. H. Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray. *Mod. Pathol. an Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc*, **2003**, 16 (9), 902–912. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000086072.56290.FB>.
- [90] Boschman, C. R.; Stryker, S.; Reddy, J. K.; Rao, M. S. Expression of P53 Protein in Precursor Lesions and Adenocarcinoma of Human Pancreas. *Am. J. Pathol.*, **1994**, 145 (6), 1291–1295.
- [91] Hahn, S. A.; Schutte, M.; Hoque, A. T.; Moskaluk, C. A.; da Costa, L. T.; Rozenblum, E.; Weinstein, C. L.; Fischer, A.; Yeo, C. J.; Hruban, R. H.; et al. DPC4, a Candidate Tumor Suppressor Gene at Human Chromosome 18q21.1. *Science*, **1996**, 271 (5247), 350–353. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.350>.
- [92] Dougan, S. K. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J.*, **2017**, 23 (6), 321–325. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000288>.
- [93] Bender, E. Will a Test to Detect Early Pancreatic Cancer Ever Be Possible? *Nature*. England March 2020, pp S12–S13. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00846-3>.
- [94] Erkan, M.; Kurtoglu, M.; Kleeff, J. The Role of Hypoxia in Pancreatic Cancer: A Potential Therapeutic Target? *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2016**, 10 (3), 301–316. <https://doi.org/10.1586/17474124.2016.1117386>.
- [95] Li, N.; Li, Y.; Li, Z.; Huang, C.; Yang, Y.; Lang, M.; Cao, J.; Jiang, W.; Xu, Y.; Dong, J.; et al. Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)

- Recruits Macrophage to Activate Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, *17* (6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060799>.
- [96] Ene-Obong, A.; Clear, A. J.; Watt, J.; Wang, J.; Fatah, R.; Riches, J. C.; Marshall, J. F.; Chin-Aleong, J.; Chelala, C.; Gribben, J. G.; et al. Activated Pancreatic Stellate Cells Sequester CD8+ T Cells to Reduce Their Infiltration of the Juxtatumoral Compartment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*, **2013**, *145* (5), 1121–1132. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.025>.
- [97] Özdemir, B. C.; Pentcheva-Hoang, T.; Carstens, J. L.; Zheng, X.; Wu, C.-C.; Simpson, T. R.; Laklai, H.; Sugimoto, H.; Kahlert, C.; Novitskiy, S. V; et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell*, **2014**, *25* (6), 719–734. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>.
- [98] Daniel, S. K.; Sullivan, K. M.; Labadie, K. P.; Pillarisetty, V. G. Hypoxia as a Barrier to Immunotherapy in Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Transl. Med.*, **2019**, *8* (1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0226-9>.
- [99] Liubavičiūtė, A.; Kraško, J. A.; Mlynska, A.; Lagzdina, J.; Sužiedėlis, K.; Pašukonienė, V. Evaluation of Low-Dose Proton Beam Radiation Efficiency in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cell Line Vitality and H2AX Formation. *Medicina (Kaunas)*, **2015**, *51* (5), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2015.10.002>.
- [100] Ger M., Zalyte E., Kaupinis A., Kurlinkus B., Petrulionis M., Sileikis A., Strupas K., V. M. Primary Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Cultures Represent the Features of Native Tumours. *BIOLOGIJA*, **2019**, *Vol. 65. N.*
- [101] Zalyte, E.; Dedonyte, V.; Kurlinkus, B.; Sileikis, A.; Schemmer, P.; Valius, M. Establishment and Characterization of a New Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line Capan-26. *Anticancer Res.*, **2021**, *41* (3), 1401–1406. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14897>.
- [102] Pašukonienė, V.; Mlynska, A.; Steponkienė, S.; Poderys, V.; Matulionytė, M.; Karabanovas, V.; Statkutė, U.; Purvinienė, R.; Kraško, J. A.; Jagminas, A.; et al. Accumulation and Biological Effects of Cobalt Ferrite Nanoparticles in Human Pancreatic and Ovarian

- Cancer Cells. *Medicina (Kaunas)*, **2014**, *50* (4), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.medic.2014.09.009>.
- [103] Tumas, J.; Tumiene, B.; Jurkeviciene, J.; Jasiunas, E.; Sileikis, A. Nutritional and Immune Impairments and Their Effects on Outcomes in Early Pancreatic Cancer Patients Undergoing Pancreatoduodenectomy. *Clin. Nutr.*, **2020**, *39* (11), 3385–3394. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.02.029>.
- [104] Brimienė, V.; Brimas, G.; Strupas, K. Differential Diagnosis between Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer: A Prospective Study of 156 Patients. *Medicina (Kaunas)*, **2011**, *47* (3), 154–162.
- [105] Lukosiute-Urboniene, A.; Jasukaitiene, A.; Silkuniene, G.; Barauskas, V.; Gulbinas, A.; Dambrauskas, Z. Human Antigen R Mediated Post-Transcriptional Regulation of Inhibitors of Apoptosis Proteins in Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.*, **2019**, *25* (2), 205–219. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i2.205>.
- [106] Lukosiute-Urboniene, A.; Mazeike, A.; Kazokaite, M.; Silkuniene, G.; Silkunas, M.; Barauskas, V.; Barauskas, G.; Gulbinas, A.; Dauksa, A.; Dambrauskas, Z. Epigenetic Regulation of APAF-1 Through DNA Methylation in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.*, **2020**, *40* (7), 3765–3779. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14366>.
- [107] Jakstaite, A.; Maziukiene, A.; Silkuniene, G.; Kmieliute, K.; Dauksa, A.; Paskauskas, S.; Gulbinas, A.; Dambrauskas, Z. Upregulation of Cugbp2 Increases Response of Pancreatic Cancer Cells to Chemotherapy. *Langenbeck's Arch. Surg.*, **2016**, *401* (1), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s00423-015-1364-1>.
- [108] Jakstaite, A.; Maziukiene, A.; Silkuniene, G.; Kmieliute, K.; Gulbinas, A.; Dambrauskas, Z. HuR Mediated Post-Transcriptional Regulation as a New Potential Adjuvant Therapeutic Target in Chemotherapy for Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.*, **2015**, *21* (46), 13004–13019. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i46.13004>.
- [109] Fay, M. P.; Pfeiffer, R.; Cronin, K. A.; Le, C.; Feuer, E. J. Age-Conditional Probabilities of Developing Cancer. *Stat. Med.*, **2003**, *22* (11), 1837–1848. <https://doi.org/10.1002/sim.1428>.
- [110] Mellby, L. D.; Nyberg, A. P.; Johansen, J. S.; Wingren, C.; Nordestgaard, B. G.; Bojesen, S. E.; Mitchell, B. L.; Sheppard, B. C.;

- Sears, R. C.; Borrebaeck, C. A. K. Serum Biomarker Signature-Based Liquid Biopsy for Diagnosis of Early-Stage Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2018**, *36* (28), 2887–2894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.6658>.
- [111] Castillo, J.; Bernard, V.; San Lucas, F. A.; Allenson, K.; Capello, M.; Kim, D. U.; Gascoyne, P.; Mulu, F. C.; Stephens, B. M.; Huang, J.; et al. Surfaceome Profiling Enables Isolation of Cancer-Specific Exosomal Cargo in Liquid Biopsies from Pancreatic Cancer Patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, **2018**, *29* (1), 223–229. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx542>.
- [112] Cohen, J. D.; Javed, A. A.; Thoburn, C.; Wong, F.; Tie, J.; Gibbs, P.; Schmidt, C. M.; Yip-Schneider, M. T.; Allen, P. J.; Schattner, M.; et al. Combined Circulating Tumor DNA and Protein Biomarker-Based Liquid Biopsy for the Earlier Detection of Pancreatic Cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2017**, *114* (38), 10202–10207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704961114>.
- [113] Vilma Brimiene, Gintautas Brimas, K. S. Kasos Galvos Vėžio Ir Lėtinio Pankreatito Diagnostikos Keblumai. *Liet. Chir.*, **2006**, *4*(2), 177–191.
- [114] Singhi, A. D.; McGrath, K.; Brand, R. E.; Khalid, A.; Zeh, H. J.; Chennat, J. S.; Fasanella, K. E.; Papachristou, G. I.; Slivka, A.; Bartlett, D. L.; et al. Preoperative Next-Generation Sequencing of Pancreatic Cyst Fluid Is Highly Accurate in Cyst Classification and Detection of Advanced Neoplasia. *Gut*, **2018**, *67* (12), 2131–2141. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313586>.
- [115] Singhi, A. D.; Nikiforova, M. N.; Fasanella, K. E.; McGrath, K. M.; Pai, R. K.; Otori, N. P.; Bartholow, T. L.; Brand, R. E.; Chennat, J. S.; Lu, X.; et al. Preoperative GNAS and KRAS Testing in the Diagnosis of Pancreatic Mucinous Cysts. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2014**, *20* (16), 4381–4389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0513>.
- [116] Muhammad, W.; Hart, G. R.; Nartowt, B.; Farrell, J. J.; Johung, K.; Liang, Y.; Deng, J. Pancreatic Cancer Prediction Through an Artificial Neural Network. *Front. Artif. Intell.*, **2019**, *2*, 2. <https://doi.org/10.3389/frai.2019.00002>.
- [117] Canto, M. I.; Almario, J. A.; Schulick, R. D.; Yeo, C. J.; Klein, A.;

- Blackford, A.; Shin, E. J.; Sanyal, A.; Yenokyan, G.; Lennon, A. M.; et al. Risk of Neoplastic Progression in Individuals at High Risk for Pancreatic Cancer Undergoing Long-Term Surveillance. *Gastroenterology*, **2018**, *155* (3), 740-751.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.035>.
- [118] Shapiro, T. M. Adenocarcinoma of the Pancreas: A Statistical Analysis of Biliary Bypass vs Whipple Resection in Good Risk Patients. *Ann. Surg.*, **1975**, *182* (6), 715–721. <https://doi.org/10.1097/00000658-197512000-00010>.
- [119] Hackert, T.; Klaiber, U.; Pausch, T.; Mihaljevic, A. L.; Büchler, M. W. Fifty Years of Surgery for Pancreatic Cancer. *Pancreas*, **2020**, *49* (8), 1005–1013. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001634>.
- [120] Hartwig, W.; Gluth, A.; Hinz, U.; Koliogiannis, D.; Strobel, O.; Hackert, T.; Werner, J.; Büchler, M. W. Outcomes after Extended Pancreatectomy in Patients with Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Br. J. Surg.*, **2016**, *103* (12), 1683–1694. <https://doi.org/10.1002/bjs.10221>.
- [121] Lidsky, M. E.; Sun, Z.; Nussbaum, D. P.; Adam, M. A.; Speicher, P. J.; Blazer, D. G. 3rd. Going the Extra Mile: Improved Survival for Pancreatic Cancer Patients Traveling to High-Volume Centers. *Ann. Surg.*, **2017**, *266* (2), 333–338. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001924>.
- [122] Isaji, S.; Mizuno, S.; Windsor, J. A.; Bassi, C.; Fernández-Del Castillo, C.; Hackert, T.; Hayasaki, A.; Katz, M. H. G.; Kim, S.-W.; Kishiwada, M.; et al. International Consensus on Definition and Criteria of Borderline Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma 2017. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. ... [et al.]*, **2018**, *18* (1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.11.011>.
- [123] Hackert, T.; Sachsenmaier, M.; Hinz, U.; Schneider, L.; Michalski, C. W.; Springfield, C.; Strobel, O.; Jäger, D.; Ulrich, A.; Büchler, M. W. Locally Advanced Pancreatic Cancer: Neoadjuvant Therapy With Folfirinox Results in Resectability in 60% of the Patients. *Ann. Surg.*, **2016**, *264* (3), 457–463. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001850>.
- [124] Bailey, P.; Chang, D. K.; Nones, K.; Johns, A. L.; Patch, A.-M.; Gingras, M.-C.; Miller, D. K.; Christ, A. N.; Bruxner, T. J. C.; Quinn,

- M. C.; et al. Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. *Nature*, **2016**, *531* (7592), 47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>.
- [125] Collisson, E. A.; Sadanandam, A.; Olson, P.; Gibb, W. J.; Truitt, M.; Gu, S.; Cooc, J.; Weinkle, J.; Kim, G. E.; Jakkula, L.; et al. Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat. Med.*, **2011**, *17* (4), 500–503. <https://doi.org/10.1038/nm.2344>.
- [126] Moffitt, R. A.; Marayati, R.; Flate, E. L.; Volmar, K. E.; Loeza, S. G. H.; Hoadley, K. A.; Rashid, N. U.; Williams, L. A.; Eaton, S. C.; Chung, A. H.; et al. Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nat. Genet.*, **2015**, *47* (10), 1168–1178. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>.
- [127] Robert, M.; Jarlier, M.; Gourgou, S.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Juzyna, B.; Conroy, T.; Bennouna, J. Retrospective Analysis of CA19-9 Decrease in Patients with Metastatic Pancreatic Carcinoma Treated with FOLFIRINOX or Gemcitabine in a Randomized Phase III Study (ACCORD11/PRODIGE4). *Oncology*, **2017**, *93* (6), 367–376. <https://doi.org/10.1159/000477850>.
- [128] Laurent, L.; Sefrioui, D.; Bignon, A.-L.; Parzy, A.; Sidali, S.; Hassine, M.; Gangloff, A.; Galais, M.-P.; Bouhier-Leporrier, K.; Michel, P.; et al. CA19.9 Decrease >15% Is a Predictor of Favourable Outcome in Patients Treated for Advanced Pancreatic Carcinoma: Analysis of Two Independent Cohorts. *HPB (Oxford)*, **2019**, *21* (5), 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2018.09.006>.
- [129] Tsai, S.; George, B.; Wittmann, D.; Ritch, P. S.; Krepline, A. N.; Aldakkak, M.; Barnes, C. A.; Christians, K. K.; Dua, K.; Griffin, M.; et al. Importance of Normalization of CA19-9 Levels Following Neoadjuvant Therapy in Patients With Localized Pancreatic Cancer. *Ann. Surg.*, **2020**, *271* (4), 740–747. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003049>.
- [130] van Manen, L.; Groen, J. V.; Putter, H.; Vahrmeijer, A. L.; Swijnenburg, R.-J.; Bonsing, B. A.; Mieog, J. S. D. Elevated CEA and CA19-9 Serum Levels Independently Predict Advanced Pancreatic Cancer at Diagnosis. *Biomarkers Biochem. Indic. Expo. response*,



*susceptibility to Chem.*, **2020**, 25 (2), 186–193.  
<https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1725786>.

- [131] Suzuki, F.; Fujiwara, Y.; Hamura, R.; Haruki, K.; Sakamoto, T.; Shiba, H.; Yanaga, K. Combination of Distance from Superior Mesenteric Artery and Serum CA19-9 as a Novel Prediction of Local Recurrence in Patients With Pancreatic Cancer Following Resection. *Anticancer Res.*, **2019**, 39 (3), 1469–1478.  
<https://doi.org/10.21873/anticancer.13264>.
- [132] Mosquera, C.; Johnson, H. M.; Mitsakos, A. T.; Neill, N. E.; Bellamy, N.; Irish, W.; Zervos, E. E.; Laks, S. Predictive Value of Preoperative Serum CA19-9 on Margin Status. *Am. Surg.*, **2019**, 85 (9), 965–972.
- [133] Herreros-Villanueva, M.; Ruiz-Rebollo, L.; Montes, M.; Rodriguez-Lopez, M.; Francisco, M.; Cubiella, J.; Iyo, E.; Garabitos, E.; Martínez Moneo, E.; Martos, M.; et al. CA19-9 Capability as Predictor of Pancreatic Cancer Resectability in a Spanish Cohort. *Mol. Biol. Rep.*, **2020**, 47 (3), 1583–1588. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05245-5>.
- [134] Liu, H.; Zenati, M. S.; Rieser, C. J.; Al-Abbas, A.; Lee, K. K.; Singhi, A. D.; Bahary, N.; Hogg, M. E.; Zeh, H. J. 3rd; Zureikat, A. H. CA19-9 Change During Neoadjuvant Therapy May Guide the Need for Additional Adjuvant Therapy Following Resected Pancreatic Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, **2020**, 27 (10), 3950–3960.  
<https://doi.org/10.1245/s10434-020-08468-9>.
- [135] Neoptolemos, J. P.; Stocken, D. D.; Friess, H.; Bassi, C.; Dunn, J. A.; Hickey, H.; Beger, H.; Fernandez-Cruz, L.; Dervenis, C.; Lacaïne, F.; et al. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **2004**, 350 (12), 1200–1210. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032295>.
- [136] Oettle, H.; Post, S.; Neuhaus, P.; Gellert, K.; Langrehr, J.; Ridwelski, K.; Schramm, H.; Fahlke, J.; Zuelke, C.; Burkart, C.; et al. Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, **2007**, 297 (3), 267–277.  
<https://doi.org/10.1001/jama.297.3.267>.
- [137] Gao, C.; Wisniewski, L.; Liu, Y.; Staal, B.; Beddows, I.; Plenker, D.; Aldakkak, M.; Hall, J.; Barnett, D.; Gouda, M. K.; et al. Detection of

- Chemotherapy-Resistant Pancreatic Cancer Using a Glycan Biomarker, STRA. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2021**, 27 (1), 226–236. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2475>.
- [138] National Cancer Institute at the National Institutes of Health. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>.
- [139] Magnani, J. L.; Nilsson, B.; Brockhaus, M.; Zopf, D.; Steplewski, Z.; Koprowski, H.; Ginsburg, V. A Monoclonal Antibody-Defined Antigen Associated with Gastrointestinal Cancer Is a Ganglioside Containing Sialylated Lacto-N-Fucopentaose II. *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257 (23), 14365–14369.
- [140] Jalanko, H.; Kuusela, P.; Roberts, P.; Sipponen, P.; Haglund, C. A.; Mäkelä, O. Comparison of a New Tumour Marker, CA 19-9, with Alpha-Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen in Patients with Upper Gastrointestinal Diseases. *J. Clin. Pathol.*, **1984**, 37 (2), 218–222. <https://doi.org/10.1136/jcp.37.2.218>.
- [141] Gui, J.-C.; Yan, W.-L.; Liu, X.-D. CA19-9 and CA242 as Tumor Markers for the Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Clin. Exp. Med.*, **2014**, 14 (2), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s10238-013-0234-9>.
- [142] Satake, K.; Takeuchi, T.; Homma, T.; Ozaki, H. CA19-9 as a Screening and Diagnostic Tool in Symptomatic Patients: The Japanese Experience. *Pancreas*, **1994**, 9 (6), 703–706. <https://doi.org/10.1097/00006676-199411000-00005>.
- [143] Kim, J.-E.; Lee, K. T.; Lee, J. K.; Paik, S. W.; Rhee, J. C.; Choi, K. W. Clinical Usefulness of Carbohydrate Antigen 19-9 as a Screening Test for Pancreatic Cancer in an Asymptomatic Population. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2004**, 19 (2), 182–186. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03219.x>.
- [144] Hasan, S.; Jacob, R.; Manne, U.; Paluri, R. Advances in Pancreatic Cancer Biomarkers. *Oncol. Rev.*, **2019**, 13 (1), 410. <https://doi.org/10.4081/oncol.2019.410>.
- [145] Park, H.-D.; Park, K. U.; Song, J.; Ki, C.-S.; Han, K. S.; Kim, J. Q. The Relationship between Lewis/Secretor Genotypes and Serum

Carbohydrate Antigen 19-9 Levels in a Korean Population. *Korean J. Lab. Med.*, **2010**, *30* (1), 51–57.

<https://doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.1.51>.

- [146] Ballehaninna, U. K.; Chamberlain, R. S. The Clinical Utility of Serum CA 19-9 in the Diagnosis, Prognosis and Management of Pancreatic Adenocarcinoma: An Evidence Based Appraisal. *J. Gastrointest. Oncol.*, **2012**, *3* (2), 105–119. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021>.
- [147] Luo, G.; Guo, M.; Jin, K.; Liu, Z.; Liu, C.; Cheng, H.; Lu, Y.; Long, J.; Liu, L.; Xu, J.; et al. Optimize CA19-9 in Detecting Pancreatic Cancer by Lewis and Secretor Genotyping. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. ... [et al.]*, **2016**, *16* (6), 1057–1062. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2016.09.013>.
- [148] Azizian, A.; Rühlmann, F.; Krause, T.; Bernhardt, M.; Jo, P.; König, A.; Kleiß, M.; Leha, A.; Ghadimi, M.; Gaedcke, J. CA19-9 for Detecting Recurrence of Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.*, **2020**, *10* (1), 1332. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57930-x>.
- [149] Zhang, Y.; Yang, J.; Li, H.; Wu, Y.; Zhang, H.; Chen, W. Tumor Markers CA19-9, CA242 and CEA in the Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **2015**, *8* (7), 11683–11691.
- [150] Bünger, S.; Laubert, T.; Roblick, U. J.; Habermann, J. K. Serum Biomarkers for Improved Diagnostic of Pancreatic Cancer: A Current Overview. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2011**, *137* (3), 375–389. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0965-x>.
- [151] Dou, H.; Sun, G.; Zhang, L. CA242 as a Biomarker for Pancreatic Cancer and Other Diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2019**, *162*, 229–239. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.12.007>.
- [152] Dong, D.; Jia, L.; Zhang, L.; Ma, N.; Zhang, A.; Zhou, Y.; Ren, L. Periostin and CA242 as Potential Diagnostic Serum Biomarkers Complementing CA19.9 in Detecting Pancreatic Cancer. *Cancer Sci.*, **2018**, *109* (9), 2841–2851. <https://doi.org/10.1111/cas.13712>.
- [153] Lei, X. F.; Jia, S. Z.; Ye, J.; Qiao, Y. L.; Zhao, G. M.; Li, X. H.; Chang, H. Application Values of Detection of Serum CA199, CA242 and CA50 in the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *J. Biol. Regul. Homeost.*

- [154] Furuya, N.; Kawa, S.; Hasebe, O.; Tokoo, M.; Mukawa, K.; Maejima, S.; Oguchi, H. Comparative Study of CA242 and CA19-9 in Chronic Pancreatitis. *Br. J. Cancer*, **1996**, *73* (3), 372–376. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.63>.
- [155] Ge, L.; Pan, B.; Song, F.; Ma, J.; Zeraatkar, D.; Zhou, J.; Tian, J. Comparing the Diagnostic Accuracy of Five Common Tumour Biomarkers and CA19-9 for Pancreatic Cancer: A Protocol for a Network Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. *BMJ Open*, **2017**, *7* (12), e018175. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018175>.
- [156] Haglund, C. Tumour Marker Antigen CA125 in Pancreatic Cancer: A Comparison with CA19-9 and CEA. *Br. J. Cancer*, **1986**, *54* (6), 897–901. <https://doi.org/10.1038/bjc.1986.259>.
- [157] Liu, L.; Xu, H.-X.; Wang, W.-Q.; Wu, C.-T.; Xiang, J.-F.; Liu, C.; Long, J.; Xu, J.; Fu, D. L.; Ni, Q.-X.; et al. Serum CA125 Is a Novel Predictive Marker for Pancreatic Cancer Metastasis and Correlates with the Metastasis-Associated Burden. *Oncotarget*, **2016**, *7* (5), 5943–5956. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6819>.
- [158] Jiang, K.; Tan, E.; Sayegh, Z.; Centeno, B.; Malafa, M.; Coppola, D. Cancer Antigen 125 (CA125, MUC16) Protein Expression in the Diagnosis and Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM*, **2017**, *25* (9), 620–623. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000368>.
- [159] Luo, G.; Xiao, Z.; Long, J.; Liu, Z.; Liu, L.; Liu, C.; Xu, J.; Ni, Q.; Yu, X. CA125 Is Superior to CA19-9 in Predicting the Resectability of Pancreatic Cancer. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract*, **2013**, *17* (12), 2092–2098. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2389-9>.
- [160] Luo, G.; Liu, C.; Guo, M.; Cheng, H.; Lu, Y.; Jin, K.; Liu, L.; Long, J.; Xu, J.; Lu, R.; et al. Potential Biomarkers in Lewis Negative Patients With Pancreatic Cancer. *Ann. Surg.*, **2017**, *265* (4), 800–805. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001741>.
- [161] Meng, Q.; Shi, S.; Liang, C.; Xiang, J.; Liang, D.; Zhang, B.; Qin, Y.; Ji, S.; Xu, W.; Xu, J.; et al. Diagnostic Accuracy of a CA125-Based Biomarker Panel in Patients with Pancreatic Cancer: A Systematic

Review and Meta-Analysis. *J. Cancer*, **2017**, 8 (17), 3615–3622. <https://doi.org/10.7150/jca.18901>.

- [162] Gu, Y.-L.; Lan, C.; Pei, H.; Yang, S.-N.; Liu, Y.-F.; Xiao, L.-L. Applicative Value of Serum CA19-9, CEA, CA125 and CA242 in Diagnosis and Prognosis for Patients with Pancreatic Cancer Treated by Concurrent Chemoradiotherapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2015**, 16 (15), 6569–6573. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.15.6569>.
- [163] Liu, L.; Xiang, J.; Chen, R.; Fu, D.; Hong, D.; Hao, J.; Li, Y.; Li, J.; Li, S.; Mou, Y.; et al. The Clinical Utility of CA125/MUC16 in Pancreatic Cancer: A Consensus of Diagnostic, Prognostic and Predictive Updates by the Chinese Study Group for Pancreatic Cancer (CSPAC). *Int. J. Oncol.*, **2016**, 48 (3), 900–907. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3316>.
- [164] Liu, L.; Xu, H.; Wang, W.; Wu, C.; Chen, Y.; Yang, J.; Cen, P.; Xu, J.; Liu, C.; Long, J.; et al. A Preoperative Serum Signature of CEA+CA125+CA19-9 $\geq$ 1000 U/ML Indicates Poor Outcome to Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. *Int. J. cancer*, **2015**, 136 (9), 2216–2227. <https://doi.org/10.1002/ijc.29242>.
- [165] Yang, C.; Cheng, H.; Luo, G.; Lu, Y.; Guo, M.; Jin, K.; Wang, Z.; Yu, X.; Liu, C. The Metastasis Status and Tumor Burden-Associated CA125 Level Combined with the CD4/CD8 Ratio Predicts the Prognosis of Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A New Scoring System. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.*, **2017**, 43 (11), 2112–2118. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2017.07.010>.
- [166] Reitz, D.; Gerger, A.; Seidel, J.; Kornprat, P.; Samonigg, H.; Stotz, M.; Szkandera, J.; Pichler, M. Combination of Tumour Markers CEA and CA19-9 Improves the Prognostic Prediction in Patients with Pancreatic Cancer. *J. Clin. Pathol.*, **2015**, 68 (6), 427–433. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202451>.
- [167] Ni, X. G.; Bai, X. F.; Mao, Y. L.; Shao, Y. F.; Wu, J. X.; Shan, Y.; Wang, C. F.; Wang, J.; Tian, Y. T.; Liu, Q.; et al. The Clinical Value of Serum CEA, CA19-9, and CA242 in the Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.*, **2005**, 31 (2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2004.09.007>.

- [168] Guo, Q.; Kang, M.; Zhang, B.; Chen, Y.; Dong, X.; Wu, Y. Elevated Levels of CA 19-9 and CEA in Pancreatic Cancer-Associated Diabetes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2010**, *136* (11), 1627–1631. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0820-0>.
- [169] Ren, C.; Chen, Y.; Han, C.; Fu, D.; Chen, H. Plasma Interleukin-11 (IL-11) Levels Have Diagnostic and Prognostic Roles in Patients with Pancreatic Cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, **2014**, *35* (11), 11467–11472. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2459-y>.
- [170] Lee, M. J.; Na, K.; Jeong, S.-K.; Lim, J.-S.; Kim, S. A.; Lee, M.-J.; Song, S. Y.; Kim, H.; Hancock, W. S.; Paik, Y.-K. Identification of Human Complement Factor B as a Novel Biomarker Candidate for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.*, **2014**, *13* (11), 4878–4888. <https://doi.org/10.1021/pr5002719>.
- [171] Rezaei, M.; Nikeghbalian, S.; Mojtahedi, Z.; Ghaderi, A. Identification of Antibody Reactive Proteins in Pancreatic Cancer Using 2D Immunoblotting and Mass Spectrometry. *Oncol. Rep.*, **2018**, *39* (5), 2413–2421. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6285>.
- [172] Hirata, Y.; Kobayashi, T.; Nishiumi, S.; Yamanaka, K.; Nakagawa, T.; Fujigaki, S.; Iemoto, T.; Kobayashi, M.; Okusaka, T.; Nakamori, S.; et al. Identification of Highly Sensitive Biomarkers That Can Aid the Early Detection of Pancreatic Cancer Using GC/MS/MS-Based Targeted Metabolomics. *Clin. Chim. Acta.*, **2017**, *468*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.02.011>.
- [173] Unger, K.; Mehta, K. Y.; Kaur, P.; Wang, Y.; Menon, S. S.; Jain, S. K.; Moonjelly, R. A.; Suman, S.; Datta, K.; Singh, R.; et al. Metabolomics Based Predictive Classifier for Early Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncotarget*, **2018**, *9* (33), 23078–23090. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25212>.
- [174] Melo, S. A.; Luecke, L. B.; Kahlert, C.; Fernandez, A. F.; Gammon, S. T.; Kaye, J.; LeBleu, V. S.; Mittendorf, E. A.; Weitz, J.; Rahbari, N.; et al. Glypican-1 Identifies Cancer Exosomes and Detects Early Pancreatic Cancer. *Nature*, **2015**, *523* (7559), 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>.
- [175] Allenson, K.; Castillo, J.; San Lucas, F. A.; Scelo, G.; Kim, D. U.; Bernard, V.; Davis, G.; Kumar, T.; Katz, M.; Overman, M. J.; et al.

High Prevalence of Mutant KRAS in Circulating Exosome-Derived DNA from Early-Stage Pancreatic Cancer Patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, **2017**, 28 (4), 741–747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx004>.

- [176] Zhang, W.-H.; Wang, W.-Q.; Han, X.; Gao, H.-L.; Li, T.-J.; Xu, S.-S.; Li, S.; Xu, H.-X.; Li, H.; Ye, L.-Y.; et al. Advances on Diagnostic Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Systems Biology Perspective. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **2020**, 18, 3606–3614. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.018>.
- [177] Radon, T. P.; Massat, N. J.; Jones, R.; Alrawashdeh, W.; Dumartin, L.; Ennis, D.; Duffy, S. W.; Kocher, H. M.; Pereira, S. P.; Guarner posthumous, L.; et al. Identification of a Three-Biomarker Panel in Urine for Early Detection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2015**, 21 (15), 3512–3521. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2467>.
- [178] Hogendorf, P.; Durczyński, A.; Skulimowski, A.; Kumor, A.; Poznańska, G.; Strzelczyk, J. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Concentration in Urine Is Superior to CA19-9 and Ca 125 in Differentiation of Pancreatic Mass: Preliminary Report. *Cancer Biomark.*, **2016**, 16 (4), 537–543. <https://doi.org/10.3233/CBM-160595>.
- [179] Debernardi, S.; Massat, N. J.; Radon, T. P.; Sangaralingam, A.; Banissi, A.; Ennis, D. P.; Dowe, T.; Chelala, C.; Pereira, S. P.; Kocher, H. M.; et al. Noninvasive Urinary MiRNA Biomarkers for Early Detection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Am. J. Cancer Res.*, **2015**, 5 (11), 3455–3466.
- [180] Jabbar, K. S.; Arike, L.; Verbeke, C. S.; Sadik, R.; Hansson, G. C. Highly Accurate Identification of Cystic Precursor Lesions of Pancreatic Cancer Through Targeted Mass Spectrometry: A Phase IIc Diagnostic Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2018**, 36 (4), 367–375. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.7288>.
- [181] Wang, J.; Raimondo, M.; Guha, S.; Chen, J.; Diao, L.; Dong, X.; Wallace, M. B.; Killary, A. M.; Frazier, M. L.; Woodward, T. A.; et al. Circulating MicroRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer. *J. Cancer*, **2014**, 5 (8), 696–705. <https://doi.org/10.7150/jca.10094>.

- [182] Mateos, R. N.; Nakagawa, H.; Hirono, S.; Takano, S.; Fukasawa, M.; Yanagisawa, A.; Yasukawa, S.; Maejima, K.; Oku-Sasaki, A.; Nakano, K.; et al. Genomic Analysis of Pancreatic Juice DNA Assesses Malignant Risk of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of Pancreas. *Cancer Med.*, **2019**, *8* (10), 4565–4573. <https://doi.org/10.1002/cam4.2340>.
- [183] Pan, S.; Brentnall, T. A.; Chen, R. Proteomics Analysis of Bodily Fluids in Pancreatic Cancer. *Proteomics*, **2015**, *15* (15), 2705–2715. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400476>.
- [184] Liu, H.-J.; Guo, Y.-Y.; Li, D.-J. Predicting Novel Salivary Biomarkers for the Detection of Pancreatic Cancer Using Biological Feature-Based Classification. *Pathol. Res. Pract.*, **2017**, *213* (4), 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.09.017>.
- [185] Xie, Z.; Chen, X.; Li, J.; Guo, Y.; Li, H.; Pan, X.; Jiang, J.; Liu, H.; Wu, B. Salivary HOTAIR and PVT1 as Novel Biomarkers for Early Pancreatic Cancer. *Oncotarget*, **2016**, *7* (18), 25408–25419. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8323>.
- [186] Kuespert, K.; Pils, S.; Hauck, C. R. CEACAMs: Their Role in Physiology and Pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2006**, *18* (5), 565–571. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.008>.
- [187] Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarström S, Holmes K V, Karlsson A, Kuroki M, Lin S H, Lucka L, Najjar S M, Neumaier M, Obrink B, Shively J E, Skubitz K M, Stanners C P, Thomas P, Thompson J A, Virji M, von Kleist S, Z. W. Redefined Nomenclature for Members of the Carcinoembryonic Antigen Family. *Exp. Cell Res.*, **1999**, *252* (2), 243–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.1999.4610>.
- [188] Horst, A. K.; Ito, W. D.; Dabelstein, J.; Schumacher, U.; Sander, H.; Turbide, C.; Brümmer, J.; Meinertz, T.; Beauchemin, N.; Wagener, C. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Modulates Vascular Remodeling in Vitro and in Vivo. *J. Clin. Invest.*, **2006**, *116* (6), 1596–1605. <https://doi.org/10.1172/JCI24340>.
- [189] Obrink, B. CEA Adhesion Molecules: Multifunctional Proteins with Signal-Regulatory Properties. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1997**, *9* (5), 616–626. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(97\)80114-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(97)80114-7).



- [190] Gold, P.; Freedman, S. O. Specific Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive System. *J. Exp. Med.*, **1965**, *122* (3), 467–481. <https://doi.org/10.1084/jem.122.3.467>.
- [191] MacSween, J. M.; Warner, N. L.; Bankhurst, A. D.; Mackay, I. R. Carcinoembryonic Antigen in Whole Serum. *Br. J. Cancer*, **1972**, *26* (5), 356–360. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.46>.
- [192] Sorokin, J. J.; Sugarbaker, P. H.; Zamcheck, N.; Pisick, M.; Kupchik, H. Z.; Moore, F. D. Serial Carcinoembryonic Antigen Assays. Use in Detection of Cancer Recurrence. *JAMA*, **1974**, *228* (1), 49–53.
- [193] Zimmermann, W.; Ortlieb, B.; Friedrich, R.; von Kleist, S. Isolation and Characterization of CDNA Clones Encoding the Human Carcinoembryonic Antigen Reveal a Highly Conserved Repeating Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987**, *84* (9), 2960–2964. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2960>.
- [194] Kuroki, M.; Yamanaka, T.; Matsuo, Y.; Ohtani, T.; Matsuo, Y.; Minowada, J.; Misumi, Y.; Oikawa, S.; Nakazato, H.; Matsuoka, Y. Characterization of a Species of Non-Specific Cross-Reacting Antigen (NCA) Expressed by Human Monocytic Cell Lines: Structure and Expression during Cell Differentiation. *Int. J. cancer*, **1994**, *56* (6), 886–891. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910560622>.
- [195] Kuroki, M.; Arakawa, F.; Matsuo, Y.; Oikawa, S.; Nakazato, H.; Matsuoka, Y. Three Novel Molecular Forms of Biliary Glycoprotein Deduced from CDNA Clones from a Human Leukocyte Library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, *176* (2), 578–585. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)80223-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80223-2).
- [196] Vaughn, D. E.; Bjorkman, P. J. The (Greek) Key to Structures of Neural Adhesion Molecules. *Neuron*, **1996**, *16* (2), 261–273. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80045-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80045-8).
- [197] Walsh, F. S.; Doherty, P. Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily: Role in Axon Growth and Guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1997**, *13*, 425–456. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.425>.
- [198] Crossin, K. L.; Krushel, L. A. Cellular Signaling by Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, **2000**, *218* (2), 260–279.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200006\)218:2<260::AID-DVDY3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<260::AID-DVDY3>3.0.CO;2-9).

- [199] Gao, P.; Xia, J.-H.; Sipeky, C.; Dong, X.-M.; Zhang, Q.; Yang, Y.; Zhang, P.; Cruz, S. P.; Zhang, K.; Zhu, J.; et al. Biology and Clinical Implications of the 19q13 Aggressive Prostate Cancer Susceptibility Locus. *Cell*, **2018**, *174* (3), 576-589.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.003>.
- [200] Kreuzinger, C.; Geroldinger, A.; Smeets, D.; Braicu, E. I.; Sehouli, J.; Koller, J.; Wolf, A.; Darb-Esfahani, S.; Joehrens, K.; Vergote, I.; et al. A Complex Network of Tumor Microenvironment in Human High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2017**, *23* (24), 7621–7632. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1159>.
- [201] Hu, X.; Chen, M.; Li, Y.; Wang, Y.; Wen, S.; Jun, F. Aberrant CEACAM19 Expression Is Associated with Metastatic Phenotype in Penile Cancer. *Cancer Manag. Res.*, **2019**, *11*, 715–725. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S192385>.
- [202] Zhao, H.; Xu, J.; Wang, Y.; Jiang, R.; Li, X.; Zhang, L.; Che, Y. Knockdown of CEACAM19 Suppresses Human Gastric Cancer through Inhibition of PI3K/Akt and NF-KB. *Surg. Oncol.*, **2018**, *27* (3), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2018.05.003>.
- [203] Estiar, M. A.; Esmaeili, R.; Zare, A.-A.; Farahmand, L.; Fazilaty, H.; Zekri, A.; Jafarbeik-Iravani, N.; Majidzadeh-A, K. High Expression of CEACAM19, a New Member of Carcinoembryonic Antigen Gene Family, in Patients with Breast Cancer. *Clin. Exp. Med.*, **2017**, *17* (4), 547–553. <https://doi.org/10.1007/s10238-016-0442-1>.
- [204] Hu, X.; Li, Y.-Q.; Ma, X.-J.; Zhang, L.; Cai, S.-J.; Peng, J.-J. A Risk Signature With Inflammatory and T Immune Cells Infiltration in Colorectal Cancer Predicting Distant Metastases and Efficiency of Chemotherapy. *Front. Oncol.*, **2019**, *9*, 704. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00704>.
- [205] Iwabuchi, E.; Miki, Y.; Onodera, Y.; Shibahara, Y.; Takagi, K.; Suzuki, T.; Ishida, T.; Sasano, H. Co-Expression of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 and 8 Inhibits Proliferation and Invasiveness of Breast Carcinoma Cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **2019**, *36* (5), 423–432. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09981-2>.

- [206] Lasa, A.; Serrano, E.; Carricondo, M.; Carnicer, M. J.; Brunet, S.; Badell, I.; Sierra, J.; Aventín, A.; Nomdedéu, J. F. High Expression of CEACAM6 and CEACAM8 MRNA in Acute Lymphoblastic Leukemias. *Ann. Hematol.*, **2008**, *87* (3), 205–211. <https://doi.org/10.1007/s00277-007-0388-1>.
- [207] Raj, D.; Nikolaidi, M.; Garces, I.; Lorizio, D.; Castro, N. M.; Caiafa, S. G.; Moore, K.; Brown, N. F.; Kocher, H. M.; Duan, X.; et al. CEACAM7 Is an Effective Target for CAR T-Cell Therapy of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2021**, *27* (5), 1538–1552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2163>.
- [208] Zhou, J.; Xie, Z.; Cui, P.; Su, Q.; Zhang, Y.; Luo, L.; Li, Z.; Ye, L.; Liang, H.; Huang, J. SLC1A1, SLC16A9, and CNTN3 Are Potential Biomarkers for the Occurrence of Colorectal Cancer. *Biomed Res. Int.*, **2020**, *2020*, 1204605. <https://doi.org/10.1155/2020/1204605>.
- [209] Zhou, J.; Zhang, L.; Gu, Y.; Li, K.; Nie, Y.; Fan, D.; Feng, Y. Dynamic Expression of CEACAM7 in Precursor Lesions of Gastric Carcinoma and Its Prognostic Value in Combination with CEA. *World J. Surg. Oncol.*, **2011**, *9*, 172. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-172>.
- [210] Casciello, F.; Al-Ejeh, F.; Kelly, G.; Brennan, D. J.; Ngiow, S. F.; Young, A.; Stoll, T.; Windloch, K.; Hill, M. M.; Smyth, M. J.; et al. G9a Drives Hypoxia-Mediated Gene Repression for Breast Cancer Cell Survival and Tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2017**, *114* (27), 7077–7082. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618706114>.
- [211] Ye, H.; Yu, T.; Temam, S.; Ziober, B. L.; Wang, J.; Schwartz, J. L.; Mao, L.; Wong, D. T.; Zhou, X. Transcriptomic Dissection of Tongue Squamous Cell Carcinoma. *BMC Genomics*, **2008**, *9*, 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-69>.
- [212] Litkouhi, B.; Litkouhi, B.; Fleming, E.; Welch, W. R.; Berkowitz, R. S.; Birrer, M. J.; Mok, S. C. Overexpression of CEACAM6 in Borderline and Invasive Mucinous Ovarian Neoplasms. *Gynecol. Oncol.*, **2008**, *109* (2), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.01.031>.
- [213] Kong, L.; Wu, Q.; Zhao, L.; Ye, J.; Li, N.; Yang, H. Identification of Messenger and Long Noncoding RNAs Associated with Gallbladder Cancer via Gene Expression Profile Analysis. *J. Cell. Biochem.*, **2019**,

120 (12), 19377–19387. <https://doi.org/10.1002/jcb.28953>.

- [214] Blumenthal, R. D.; Leon, E.; Hansen, H. J.; Goldenberg, D. M. Expression Patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in Primary and Metastatic Cancers. *BMC Cancer*, **2007**, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-2>.
- [215] Tian, C.; Zhang, B.; Ge, C. Effect of CEACAM6 Silencing on the Biological Behavior of Human Gallbladder Cancer Cells. *Oncol. Lett.*, **2020**, 20 (3), 2677–2688. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11806>.
- [216] Zang, M.; Zhang, Y.; Zhang, B.; Hu, L.; Li, J.; Fan, Z.; Wang, H.; Su, L.; Zhu, Z.; Li, C.; et al. CEACAM6 Promotes Tumor Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Gastric Cancer via FAK Signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, 1852 (5), 1020–1028. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.02.005>.
- [217] Du, H.; Li, Y.; Sun, R.; Yuan, Y.; Sun, S.; Zhang, Y. CEACAM6 Promotes Cisplatin Resistance in Lung Adenocarcinoma and Is Regulated by MicroRNA-146a and MicroRNA-26a. *Thorac. cancer*, **2020**, 11 (9), 2473–2482. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13558>.
- [218] Wang, Z.; Luo, C.; Wang, H.; Yan, X.; Liu, W.; Meng, Z. CEACAM6 Is Associated with Osteosarcoma Metastasis and Facilitates Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells. *Onco. Targets. Ther.*, **2018**, 11, 3159–3166. <https://doi.org/10.2147/OTT.S161807>.
- [219] Zhu, R.; Ge, J.; Ma, J.; Zheng, J. Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 6 Promotes the Proliferation and Migration of Renal Cancer Cells through the ERK/AKT Signaling Pathway. *Transl. Androl. Urol.*, **2019**, 8 (5), 457–466. <https://doi.org/10.21037/tau.2019.09.02>.
- [220] Cameron, S.; de Long, L. M.; Hazar-Rethinam, M.; Topkas, E.; Endo-Munoz, L.; Cumming, A.; Gannon, O.; Guminski, A.; Saunders, N. Focal Overexpression of CEACAM6 Contributes to Enhanced Tumourigenesis in Head and Neck Cancer via Suppression of Apoptosis. *Mol. Cancer*, **2012**, 11, 74. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-74>.
- [221] Ieta, K.; Tanaka, F.; Utsunomiya, T.; Kuwano, H.; Mori, M. CEACAM6 Gene Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer*, **2006**, 95 (4), 532–540.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603276>.

- [222] Bechmann, M. B.; Brydholm, A. V.; Codony, V. L.; Kim, J.; Villadsen, R. Heterogeneity of CEACAM5 in Breast Cancer. *Oncotarget*, **2020**, *11* (43), 3886–3899. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27778>.
- [223] DeLucia, D. C.; Cardillo, T. M.; Ang, L.; Labrecque, M. P.; Zhang, A.; Hopkins, J. E.; De Sarkar, N.; Coleman, I.; da Costa, R. M. G.; Corey, E.; et al. Regulation of CEACAM5 and Therapeutic Efficacy of an Anti-CEACAM5-SN38 Antibody-Drug Conjugate in Neuroendocrine Prostate Cancer. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2021**, *27* (3), 759–774. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3396>.
- [224] Zhou, J.; Fan, X.; Chen, N.; Zhou, F.; Dong, J.; Nie, Y.; Fan, D. Identification of CEACAM5 as a Biomarker for Prewarning and Prognosis in Gastric Cancer. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, **2015**, *63* (12), 922–930. <https://doi.org/10.1369/0022155415609098>.
- [225] Sato, K.; Mori, R.; Hiroshima, Y.; Oba, M. S.; Matsuyama, R.; Bouvet, M.; Hoffman, R. M.; Endo, I. RT-PCR of Peritoneal Washings Predicts Peritoneal Pancreatic Cancer Recurrence. *J. Surg. Res.*, **2018**, *226*, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.11.009>.
- [226] Hammarström, S. The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family: Structures, Suggested Functions and Expression in Normal and Malignant Tissues. *Semin. Cancer Biol.*, **1999**, *9* (2), 67–81. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>.
- [227] Wakabayashi-Nakao, K.; Hatakeyama, K.; Ohshima, K.; Ken Yamaguchi, K.; Mochizuki, T. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 4 (CEACAM4) Is Specifically Expressed in Medullary Thyroid Carcinoma Cells. *Biomed. Res.*, **2014**, *35* (4), 237–242. <https://doi.org/10.2220/biomedres.35.237>.
- [228] Barros, L. R. C.; Souza-Santos, P. T. De; Pretti, M. A. M.; Vieira, G. F.; Bragatte, M. A. D. S.; Mendes, M. F. D. A.; De Freitas, M. V.; Scherer, N. D. M.; De Oliveira, I. M.; Rapozo, D. C. M.; et al. High Infiltration of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures, TCR Oligoclonality, and Neoantigens Are Part of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Microenvironment. *J. Leukoc. Biol.*, **2020**, *108* (4), 1307–1318. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MA0720-710RRR>.

- [229] Taddei, A.; Castiglione, F.; Ringressi, M. N.; Niccolai, E.; Tofani, L.; Boni, L.; Bechi, P.; Amedei, A. The Trend of CEACAM3 Blood Expression as Number Index of the CTCs in the Colorectal Cancer Perioperative Course. *Mediators Inflamm.*, **2015**, *2015*, 931784. <https://doi.org/10.1155/2015/931784>.
- [230] Luo, X.; Zhang, J.; Liu, X.; Du, Q.; Xu, N.; Xu, L.; Huang, B.; Xiao, X. [Identification of differentially expressed genes related to blastic crisis in chronic myeloid leukemia]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **2012**, *32* (6), 840–842.
- [231] Weng, C.-Y.; Hu, X.-Y.; Wang, Y.-J. Integrated Analysis of Gene Expression, Alteration and Clinical Significance of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 in Cancer. *3 Biotech*, **2020**, *10* (3), 132. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2122-9>.
- [232] Park, D. J.; Sung, P. S.; Kim, J.-H.; Lee, G. W.; Jang, J. W.; Jung, E. S.; Bae, S. H.; Choi, J. Y.; Yoon, S. K. EpCAM-High Liver Cancer Stem Cells Resist Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity by Upregulating CEACAM1. *J. Immunother. cancer*, **2020**, *8* (1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000301>.
- [233] Albarran-Somoza, B.; Franco-Topete, R.; Delgado-Rizo, V.; Cerda-Camacho, F.; Acosta-Jimenez, L.; Lopez-Botet, M.; Daneri-Navarro, A. CEACAM1 in Cervical Cancer and Precursor Lesions: Association with Human Papillomavirus Infection. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, **2006**, *54* (12), 1393–1399. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A6921.2006>.
- [234] Simeone, D. M.; Ji, B.; Banerjee, M.; Arumugam, T.; Li, D.; Anderson, M. A.; Bamberger, A. M.; Greenson, J.; Brand, R. E.; Ramachandran, V.; et al. CEACAM1, a Novel Serum Biomarker for Pancreatic Cancer. *Pancreas*, **2007**, *34* (4), 436–443. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3180333ae3>.
- [235] Luebke, A. M.; Ricken, W.; Kluth, M.; Hube-Magg, C.; Schroeder, C.; Büscheck, F.; Möller, K.; Dum, D.; Höflmayer, D.; Weidemann, S.; et al. Loss of the Adhesion Molecule CEACAM1 Is Associated with Early Biochemical Recurrence in TMPRSS2:ERG Fusion-Positive Prostate Cancers. *Int. J. cancer*, **2020**, *147* (2), 575–583. <https://doi.org/10.1002/ijc.32957>.
- [236] Liu, W.; Wei, W.; Winer, D.; Bamberger, A.-M.; Bamberger, C.;

- Wagener, C.; Ezzat, S.; Asa, S. L. CEACAM1 Impedes Thyroid Cancer Growth but Promotes Invasiveness: A Putative Mechanism for Early Metastases. *Oncogene*, **2007**, *26* (19), 2747–2758. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210077>.
- [237] Tilki, D.; Singer, B. B.; Shariat, S. F.; Behrend, A.; Fernando, M.; Irmak, S.; Buchner, A.; Hooper, A. T.; Stief, C. G.; Reich, O.; et al. CEACAM1: A Novel Urinary Marker for Bladder Cancer Detection. *Eur. Urol.*, **2010**, *57* (4), 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.05.040>.
- [238] Pockley, A. G.; Vaupel, P.; Multhoff, G. NK Cell-Based Therapeutics for Lung Cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2020**, *20* (1), 23–33. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1688298>.
- [239] Takeuchi, A.; Yokoyama, S.; Nakamori, M.; Nakamura, M.; Ojima, T.; Yamaguchi, S.; Mitani, Y.; Shively, J. E.; Yamaue, H. Loss of CEACAM1 Is Associated with Poor Prognosis and Peritoneal Dissemination of Patients with Gastric Cancer. *Sci. Rep.*, **2019**, *9* (1), 12702. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49230-w>.
- [240] Fang, J.; Chen, F.; Liu, D.; Gu, F.; Chen, Z.; Wang, Y. Prognostic Value of Immune Checkpoint Molecules in Breast Cancer. *Biosci. Rep.*, **2020**, *40* (7). <https://doi.org/10.1042/BSR20201054>.
- [241] Oliveira-Ferrer, L.; Goswami, R.; Galatenko, V.; Ding, Y.; Eylmann, K.; Legler, K.; Kürti, S.; Schmalfeldt, B.; Milde-Langosch, K. Prognostic Impact of CEACAM1 in Node-Negative Ovarian Cancer Patients. *Dis. Markers*, **2018**, *2018*, 6714287. <https://doi.org/10.1155/2018/6714287>.
- [242] Yamaguchi, S.; Yokoyama, S.; Ueno, M.; Hayami, S.; Mitani, Y.; Takeuchi, A.; Shively, J. E.; Yamaue, H. CEACAM1 Is Associated with Recurrence after Hepatectomy for Colorectal Liver Metastasis. *J. Surg. Res.*, **2017**, *220*, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.07.035>.
- [243] Mao, C.-S.; Yin, H.; Ning, H.-B.; Peng, Z.; Li, K.; Ding, G.-Q. Levels of HBx, VEGF, and CEACAM1 in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma and Their Correlation with Cancer Prognosis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2017**, *21* (17), 3827–3833.
- [244] Xu, J.; Liu, B.; Ma, S.; Zhang, J.; Ji, Y.; Xu, L.; Zhu, M.; Chen, S.;

- Wu, X.; Wu, D. Characterizing the Tumor Suppressor Role of CEACAM1 in Multiple Myeloma. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **2018**, *45* (4), 1631–1640. <https://doi.org/10.1159/000487730>.
- [245] Sapoznik, S.; Ortenberg, R.; Schachter, J.; Markel, G. CEACAM1 in Malignant Melanoma: A Diagnostic and Therapeutic Target. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2012**, *12* (1), 3–10. <https://doi.org/10.2174/156802612798919259>.
- [246] Chun, Y. S.; Pawlik, T. M.; Vauthey, J.-N. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers. *Annals of surgical oncology*. United States April 2018, pp 845–847. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-6025-x>.
- [247] Lau, K. Biomarker Discovery, Verification and Validation. Canary Center at Stanford for Cancer Early Detection. <https://canarycenter.stanford.edu/core-facilities/proteomics/biomarker.html>.
- [248] Ger, M.; Kaupinis, A.; Nemeikaite-Ceniene, A.; Sarlauskas, J.; Cicenias, J.; Cenas, N.; Valius, M. Quantitative Proteomic Analysis of Anticancer Drug RH1 Resistance in Liver Carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2016**, *1864* (2), 219–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.11.005>.
- [249] Tuck, M. K.; Chan, D. W.; Chia, D.; Godwin, A. K.; Grizzle, W. E.; Krueger, K. E.; Rom, W.; Sanda, M.; Sorbara, L.; Stass, S.; et al. Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection: Early Detection Research Network Consensus Statement Standard Operating Procedure Integration Working Group. *J. Proteome Res.*, **2009**, *8* (1), 113–117. <https://doi.org/10.1021/pr800545q>.
- [250] Kurlinkus, B.; Ger, M.; Kaupinis, A.; Jasiunas, E.; Valius, M.; Sileikis, A. CEACAM6's Role as a Chemoresistance and Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer: A Comparison of CEACAM6's Diagnostic and Prognostic Capabilities with Those of CA19-9 and CEA. *Life (Basel, Switzerland)*, **2021**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/life11060542>.
- [251] Jantscheff, P.; Terracciano, L.; Lowy, A.; Glatz-Krieger, K.; Grunert, F.; Micheel, B.; Brümmer, J.; Laffer, U.; Metzger, U.; Herrmann, R.; et al. Expression of CEACAM6 in Resectable Colorectal Cancer: A Factor of Independent Prognostic Significance. *J. Clin. Oncol. Off. J.*



- Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2003**, *21* (19), 3638–3646.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2003.55.135>.
- [252] Kim, K. S.; Kim, J.-T.; Lee, S.-J.; Kang, M. A.; Choe, I. S.; Kang, Y. H.; Kim, S.-Y.; Yeom, Y. Il; Lee, Y.-H.; Kim, J. H.; et al. Overexpression and Clinical Significance of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 in Colorectal Cancer. *Clin. Chim. Acta.*, **2013**, *415*, 12–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.003>.
- [253] Ru, G.-Q.; Han, Y.; Wang, W.; Chen, Y.; Wang, H.-J.; Xu, W.-J.; Ma, J.; Ye, M.; Chen, X.; He, X.-L.; et al. CEACAM6 Is a Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target for Gastric Carcinoma. *Oncotarget*, **2017**, *8* (48), 83673–83683.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19415>.
- [254] Deng, X.; Liu, P.; Zhao, Y.; Wang, Q. Expression Profiling of CEACAM6 Associated with the Tumorigenesis and Progression in Gastric Adenocarcinoma. *Genet. Mol. Res.*, **2014**, *13* (3), 7686–7697.  
<https://doi.org/10.4238/2014.September.26.6>.
- [255] Zińczuk, J.; Zaręba, K.; Romaniuk, W.; Kamińska, D.; Nizioł, M.; Baszun, M.; Kędra, B.; Guzińska-Ustymowicz, K.; Pryczynicz, A. Expression of Chosen Carcinoembryonic-Related Cell Adhesion Molecules in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) Associated with Chronic Pancreatitis and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Int. J. Med. Sci.*, **2019**, *16* (4), 583–592.  
<https://doi.org/10.7150/ijms.32751>.
- [256] Strickland, L. A.; Ross, J.; Williams, S.; Ross, S.; Romero, M.; Spencer, S.; Erickson, R.; Sutcliffe, J.; Verbeke, C.; Polakis, P.; et al. Preclinical Evaluation of Carcinoembryonic Cell Adhesion Molecule (CEACAM) 6 as Potential Therapy Target for Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Pathol.*, **2009**, *218* (3), 380–390.  
<https://doi.org/10.1002/path.2545>.
- [257] LeBlanc, J. K.; Chen, J.-H.; Al-Haddad, M.; Luz, L.; McHenry, L.; Sherman, S.; Juan, M.; Dewitt, J. Can Endoscopic Ultrasound Predict Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Lesions in Chronic Pancreatitis?: A Retrospective Study of Pathologic Correlation. *Pancreas*, **2014**, *43* (6), 849–854. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000142>.
- [258] Rosty, C.; Geradts, J.; Sato, N.; Wilentz, R. E.; Roberts, H.; Sohn, T.;

- Cameron, J. L.; Yeo, C. J.; Hruban, R. H.; Goggins, M. P16 Inactivation in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (PanINs) Arising in Patients with Chronic Pancreatitis. *Am. J. Surg. Pathol.*, **2003**, 27 (12), 1495–1501. <https://doi.org/10.1097/00000478-200312000-00001>.
- [259] Sindhu, R. S.; Parvathy, G.; Fysal, K.; Jacob, M. K.; Geetha, S.; Krishna, B.; Natesh, B.; Rajan, R. Clinical Profile of PanIN Lesions in Tropical Chronic Pancreatitis. *Indian J. Gastroenterol. Off. J. Indian Soc. Gastroenterol.*, **2015**, 34 (6), 436–441. <https://doi.org/10.1007/s12664-015-0609-9>.
- [260] Ludwig, O. J.; Cortese, C. M.; Collins, B. T.; Agarwal, B. Immunostaining As Adjunct to Cytologic Assessment of Endoscopic Ultrasound Guided Fine Needle Aspiration (EUS-FNA) Specimens for Diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma. *Gastrointest. Endosc.*, **2007**, 65 (5), AB119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gie.2007.03.058>.
- [261] Sharma, N.; Srivastava, S.; Kern, F.; Xian, W.; Yeoh, K. G.; Ming, T.; McKeon, F.; Ho, K. Y. CEACAM 6, a Novel Marker for the Diagnosis of Barrett's Esophagus. *Dis. esophagus Off. J. Int. Soc. Dis. Esophagus*, **2017**, 30 (7), 1–5. <https://doi.org/10.1093/dote/dox026>.
- [262] Cheng, T.-M.; Murad, Y. M.; Chang, C.-C.; Yang, M.-C.; Baral, T. N.; Cowan, A.; Tseng, S.-H.; Wong, A.; Mackenzie, R.; Shieh, D.-B.; et al. Single Domain Antibody against Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) Inhibits Proliferation, Migration, Invasion and Angiogenesis of Pancreatic Cancer Cells. *Eur. J. Cancer*, **2014**, 50 (4), 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.07.019>.
- [263] Katz, S. C. Phase 1b Study of CAR2Anti-CEA CAR-T Cell Hepatic Infusions for Pancreatic Carcinoma Patients With CEA+ Liver Metastases (AntiCEA\_CART). ClinicalTrials.Gov Identifier: NCT03818165. Sponsor: Sorrento Therapeutics, Inc. Start Date: February 1, 2019.

## 9. PRIEDAI

### Priedas nr. 1. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą.



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Kodas 211950810, M.K.Čiurlionio 21/27, 03101, Vilnius Tel.(85)2398701, 2398700, faks.2398705.El.p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS  
M.K.Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius Tel.(85) 2686998, el.p.: rbtek@mf.vu.lt

## LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2013-09-10 Nr.158200-13-675-214

Tyrimo pavadinimas:

Kasos intraduktalinės adenokarcinomos ankstyvosios diagnostikos  
ir prognostinių biožymenų paieška ir identifikavimas baltymų masių spektrometrijos metodu

Protokolo Nr.: PancCa001  
Versija: PancCa001-2  
Data: 2013-09-02

Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba):  
Versija: 2  
Data: 2013-09-02

Pagrindiniai tyrėjai: Audrius Šiliekis

Tyrimo centras:  
Ištaigos pavadinimas: Vilniaus Universiteto ligoninė Santariškių klinikos  
Ištaigos adresas: Santariškių g. 2, Vilnius

Ištaigos pavadinimas: VU Biochemijos institutas  
Adresas: Mokslininkų g. 12, LT-08662 Vilnius

Leidimas galioja iki: 2016-08-01

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2013/09), vykusio 2013 m. rugsėjo mėn. 10 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. Dr.Laimutė Jakavonytė	filosofija	ne
2	prof.dr.Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	ne
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	taip
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	Laura Linkevičienė	odontologija	taip
6	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
7	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	Eglė Zubienė	psichologija	taip
9	Ugnė Sakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė



Laura Malinauskienė

## 10. SANTRAUKA

### SUMMARY

#### Search for Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Pancreatic Adenocarcinoma

### ABBREVIATIONS

**AUC** – area under the curve;

**BMI** – body mass index;

**CA19-9** – carbohydrate antigen 19-9;

**CEA** – carcinoembryonic antigen;

**CEACAMs** – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules;

**CEACAM6** – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6;

**CMIA** – chemiluminescent microparticle immunoassay;

**CP** – chronic pancreatitis;

**DFS** – disease-free survival;

**ELISA** – enzyme-linked immunosorbent assay;

**EU** – European Union;

**G** – differentiation;

**HC** – healthy control;

**HDMS** – high-definition mass spectrometry;

**IQR** – interquartile ranges;

**LNR** – lymph node ratio;

**M** – distant metastasis;

**N** – regional lymph nodes;

**OS** – overall survival;

**PDAC** – pancreatic ductal adenocarcinoma;

**R** – resection status;

**ROC** – receiver operating characteristic;

**T** – primary tumour.

## 10.1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most common type of pancreatic cancer, is emerging as one of the most significant oncological diseases in the European Union (EU). Recent estimations have concluded that pancreatic cancer mortality rates overtook the number of deaths from breast cancer in the EU in 2017. Pancreatic cancer is now the EU's third leading cause of cancer-related death, just below lung and colorectal cancers [1]. The only option for curative treatment of this disease is radical surgery, while properly selected chemotherapy or immunotherapy can improve survival. Most cases of pancreatic cancer are identified in the late stages, thus making curative treatment impossible and leading to a poor prognosis. Life expectancy after diagnosis is just 4 to 6 months and has not improved much over the last four decades [2]. This is mostly due to the lack of ways to diagnose the disease at the early stages. Radiological methods are limited in terms of availability, cost, and diagnostic sensitivity. Scientists agree that the first invasive cancer cells are present in the pancreas for several years before they expand across the pancreas or further metastasize [3]. Due to altered metabolism, these cells distinguish themselves by producing and secreting various unique metabolites, including amino acids and proteins. These molecules can be used as biomarkers, providing exceptional potential for early cancer detection [4–6]. Another important reason for poor prognosis after pancreatic cancer diagnosis is the heterogenic nature of the disease [7–9]. This makes it difficult for clinicians to select the best treatment strategy for each individual patient. A significant prognostic biomarker, especially with the possibility to predict chemoresistance, would enable more individualised patient evaluations and eventually lead to a more balanced treatment plan for each particular patient. A recently published United European Gastroenterology report on pancreatic cancer called for efforts at the highest level to increase research into molecular markers [10].

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) belongs to the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) family. This is a group of proteins found only in mammals [11]. This family belongs to the immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules, which is comprised of a large group of cell surface glycoproteins [12]. Inside the CEACAMs family, there are more than 17 structurally similar members expressed on the apical surfaces of various cells, including epithelial, endothelial and hematopoietic cells [13]. These proteins specialize in cell–cell adhesion and recognition, as well as modulating various cellular processes, including regulation of the cell cycle, tumour suppression, and angiogenesis [11,12,14,15]. Because CEACAMs are crucial for such important processes of the cell cycle, they influence the progression of various cancers, including pancreatic cancer. One of the CEACAMs members, CEACAM6, is particularly promising. Research analysis has already shown its potential to be used as a biomarker, even in pancreatic cancer precursor lesions—pancreatic intraepithelial neoplasia [13,16–18]. Since increased CEACAM6 expression is associated with a more aggressive subtype of PDAC, it was identified as a prognostic biomarker, also relevant to evaluating the patients’ response to chemotherapy [13,16,19,20]. However, CEACAM6 analyses performed so far have rarely examined blood serum samples, nor have there been comparisons with biomarkers already in use. Thus, its evaluation for possible clinical use remains incomplete.

In our study, we searched for a new improved biomarker for PDAC and identified and validated CEACAM6 expression predominantly in pancreatic cancer tissue samples. Furthermore, we evaluated CEACAM6 and the conventional biomarkers carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) concentrations in blood serum samples from patients with PDAC, chronic pancreatitis (CP), and healthy controls (HC). Finally, we determined optimal concentration cut-off values and evaluated and compared the diagnostic and prognostic capabilities of these three biomarkers.

## 10.2. Aim of the study

To identify and evaluate diagnostic and prognostic biomarkers of PDAC in patients' blood serum.

### 10.3. Tasks of the study

1. Establishment of a biobank to collect and store samples of pancreatic cancerous, inflammatory and healthy tissue and blood serum samples from relevant individuals.
2. High-resolution mass spectrometry analysis of pancreatic cancerous, inflammatory and healthy tissue samples and proteomic analysis of the results, identification of a potential PDAC biomarker.
3. Verification of a potential PDAC biomarker by Western-blot technique in PDAC tissue samples using inflammatory and healthy pancreatic tissue samples as a negative control.
4. Determination of potential PDAC biomarker concentrations in blood serum samples from patients with PDAC, CP and HC using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Determination of concentrations of biomarkers currently used in clinical practice (CEA and CA19-9) in the same blood serum samples using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA).
5. Evaluation of diagnostic capabilities of potential PDAC biomarker, their comparison with those of CEA and CA19-9.
6. Kaplan–Meier survival analysis of PDAC patients. Evaluation of prognostic capabilities of potential PDAC biomarker, their comparison with those of CEA and CA19-9.

### 10.4. Statements to be defended

1. Mutations during the oncogenesis of pancreatic cancer lead to metabolic changes that result in the production of significant amounts of unique proteins in PDAC tissue, some of which are secreted into the cellular environment and can be used as biomarkers of pancreatic cancer.
2. CEACAM6 expression in pancreatic cancer tissue dominates compared to expression in inflammatory or healthy control tissues.
3. CEACAM6 diagnostic capabilities are limited due to the increase in blood serum concentrations in the control group - patients with chronic pancreatitis.
4. CEACAM6 is a significant prognostic biomarker whose high serum concentrations are statistically significantly correlated with deteriorating overall survival (OS) in PDAC patients after radical treatment and adjuvant chemotherapy.
5. CEACAM6 can be used as a biomarker for the prediction of chemoresistance, as the high concentration of the latter in the blood serum leads to a worse response to adjuvant chemotherapy. This enables the

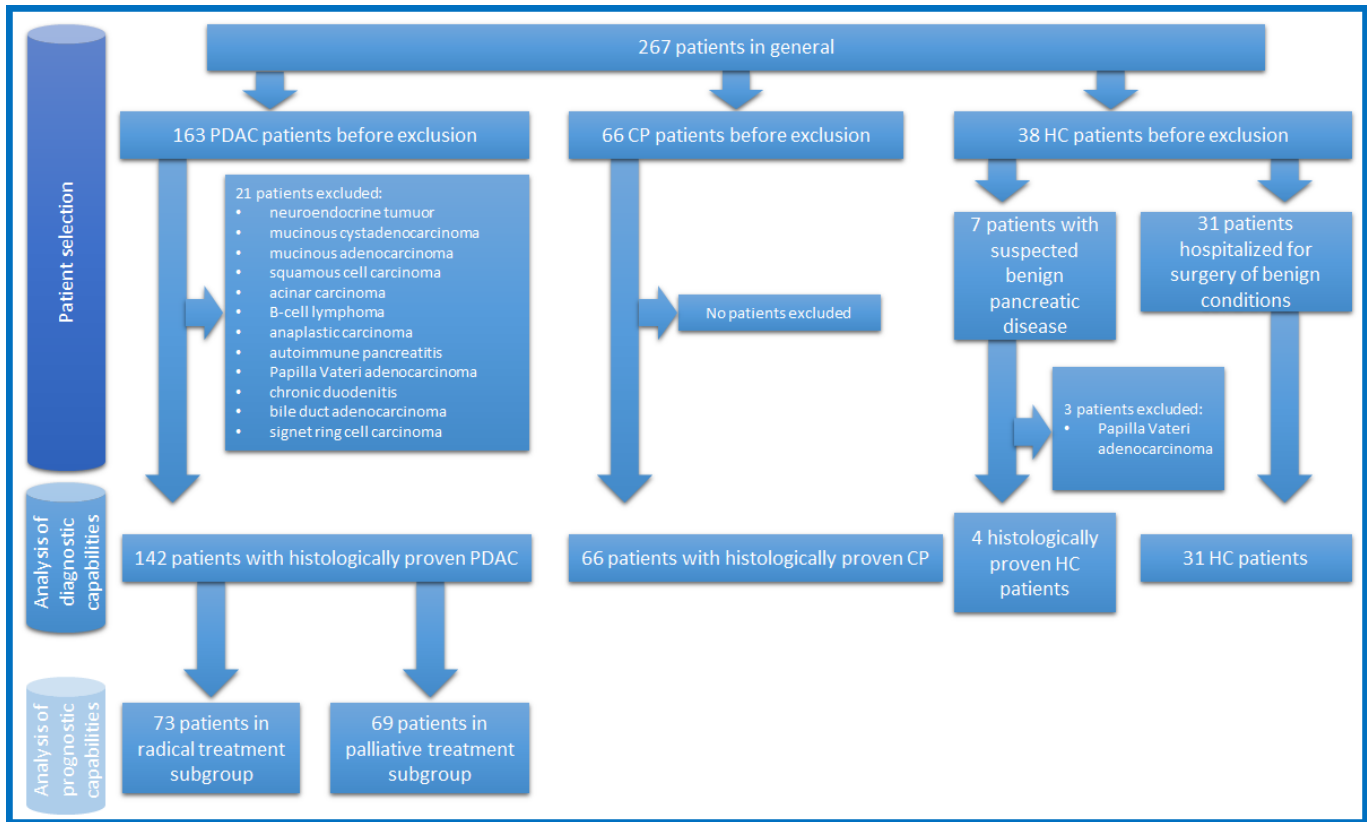
improvement of individualized medicine methods for patients with pancreatic cancer.

## 10.5. Materials and Methods

### 10.5.1. Study Design, Patients' Selection and Samples Collection

This research was approved by Vilnius Regional Ethics Committee for Biomedical Research on September 10th, 2013 (approval number 158200-13-675-214). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Between 20 November 2013 and 6 October 2020, 267 Caucasian patients were included in the study. They were treated in the Vilnius University Hospital Santaros Clinics. Patients were divided into three groups: patients with histologically proven PDAC, patients with histologically proven CP, and patients as HC (patients with histologically proven benign pancreatic disease (pancreatic mucinous or serous cystadenomas), or patients hospitalized for surgery of benign conditions (i.e., inguinal hernia, haemorrhoids). Surgical pancreatic tissue samples and blood serum samples were collected. Patients with PDAC were hospitalized either for radical treatment and underwent pancreaticoduodenectomy/hemipancreatectomy or for palliative treatment and underwent bypass operations and/or biopsies. Patients with CP underwent Frey's procedure. HC patients underwent standard treatment for their benign conditions or pancreaticoduodenectomy/hemipancreatectomy in cases of benign pancreatic disease. In latter cases, samples are considered as HC as they were taken from adjacent healthy pancreatic tissue. The study design, numbers of patients in each analysed group, and reasons for exclusion are demonstrated in Figure 1. All tissue samples were collected during surgery and flash-frozen in liquid nitrogen for 10–15 min, then further stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until lysate preparation. All blood serum samples were collected directly before surgery and prepared for further storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  according to a standardized protocol [21]. None of the patients in the PDAC group received neoadjuvant chemotherapy. Most of the patients with PDAC received adjuvant chemotherapy. All patients with PDAC had subsequent follow up between 0.5 and 5 years.





PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma; CP – chronic pancreatitis; HC – healthy controls.

**Figure 1.** The study design, numbers of patients in each analysed group, and reasons for exclusion.

### 10.5.2. Proteomic Analysis of Tissue Samples

To examine disease-associated changes in the proteome, high-throughput differential label-free quantitative proteomic analysis of PDAC, CP, and HC patients' tissue samples was performed using high-definition mass spectrometry (HDMS) technology. In addition, PDAC samples were divided into 2 groups according to diameter: smaller (<2 cm) tumours and larger (>3 cm) tumours. Homogenized samples were lysed using urea/thiourea lysis buffer and sonicated for 1 min at the amplitude of 20% and 0.4 s pulsations of on/off cycles. Lysates were centrifuged at 20,000× g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were collected and stored at –80 °C. Trypsin digestion was performed according to a modified filter-aided sample preparation protocol, as described previously [22].

Liquid chromatography separation of peptides was performed with the nanoAcquity ultra-performance liquid chromatography system (Waters Corporation, Elstree, UK) on a reversed-phase trap column, as described previously [22]. Data were acquired using MassLynx version 4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA) in positive ion mode. Liquid chromatography–mass spectrometry data were collected using data-independent acquisition mode MSE in combination with online ion mobility separation. The trap collision energy of the mass spectrometer was ramped up from 18 to 40 eV for high-energy scans in MSE mode. The trap and transfer collision energy for high-energy scans in HDMS mode was ramped up from 4 to 5 eV and from 27 to 50 eV. The mass range was set to 50–2000 Da with a scan time set to 0.9 s. The reference compound [Glu1]-fibrinopeptide B (Merck, Kenilworth, NJ, USA) was infused continuously (500 fmol/μL at a flow rate 500 nL per minute) and scanned every 30 s for online mass spectrometer calibration purposes. The samples were run in triplicate.

Raw proteomic data files were processed and searched using ProteinLynx Global SERVER (PLGS) version 2.5.3 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). The following parameters were used to generate peak lists: (i) the minimum intensity for precursors was set to 150 counts; (ii) the minimum intensity for fragment ions was set to 50 counts; (iii) the intensity was set to 500 counts. Processed data were analysed using trypsin as the cleavage protease. One missed cleavage was allowed, fixed modification was set to “carbamidomethylation of cysteines”, and variable modification was set to “oxidation of methionine”. Minimum identification criteria included 1 fragment ion per peptide, 3 fragment ions per protein, and a minimum of 2 peptides per protein. The false discovery rate for peptide and protein identification was determined based on the search of a reversed database

generated automatically when the global false discovery rate was set to 4%. The UniProtKB/SwissProt human database (5 February 2018) was used for protein identification.

### 10.5.3. Tissue Lysates Preparation and Western Blot

Validation of CEACAM6 expression in PDAC tissue samples was performed using the Western blot technique. Eight PDAC samples were used. As a negative control, 8 corresponding pancreatic tissue samples were used. Of them, 4 were CP and 4 were HC. From each tissue sample, a lysate was prepared. Pieces of tissue weighing 0.02 g were ground into smaller pieces and mixed with 240  $\mu$ L buffer containing TRIS/HCl pH 7.6 and sodium dodecyl sulphate. The solutions were then heated at 100  $^{\circ}$ C for 5 min. After heating, each sample was disintegrated for 1 min using ultrasound SONOPULS (BANDELIN, Germany) cycle  $4 \times 10\%$  power 20%. The cycles of heating and ultrasound disintegration were repeated one more time before final centrifugation at G at a temperature of 22  $^{\circ}$ C for 15 min. The transparent solutions were isolated from the remaining debris for further processing. From each of them, 210  $\mu$ L of the solution was taken, DTT was added to 0.1 M concentration, and the samples were stored at  $-20$   $^{\circ}$ C. The remainder left after centrifugation was used for the measurement of total protein concentrations using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and a BioPhotometer Spectrophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Using this information, all stored solutions were diluted to the same protein concentration of 50  $\mu$ g/ $\mu$ L.

For Western blot analysis, tissue lysates were resolved using 10% SDS-PAGE, and 30  $\mu$ L of lysate were loaded into each track. PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used as a marker. The proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and blocked in Blotto (0.9% NaCl, 8 mM Tris HCl, 2 mM Tris, 1% skimmed milk, 0.025% Tween-20, 0.05% NaN<sub>3</sub>) solution. Staining was done using primary antibodies: CEACAM6 mouse monoclonal antibody, clone 9A6, cat. Nr. sc-59899 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) and  $\beta$ -actin mouse monoclonal antibody, clone # 937215, cat. Nr. MAB8929 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, United States). As secondary antibodies, IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (LI-COR Biosciences, Lin-coln, NE, USA) were used with an effect time of 30 min. For scanning, the membrane scanner LI-COR

Odyssey 9120 was used together with its software package, Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

#### 10.5.4. Enzyme linked immunosorbent assay and chemiluminescent microparticle immunoassay

For quantitative analysis of CEACAM6, CEA, and CA19-9 in peripheral blood serum samples, two techniques were used. ELISA was used for the quantification of CEACAM6 and CMIA for CEA and CA19-9. Blood samples of 142 patients with PDAC, 66 patients with CP, and 31 patients as HC were analysed. For the quantitative analysis of CEACAM6 in the blood serum, CEACAM6 ELISA kits (catalog number: MBS7203989 (MyBiosource, San Diego, CA, USA)) were used. The manufacturer's recommendations were used for the preparation of samples and reagents, the assay procedure, and the calculation of the results. CEA and CA19-9 concentrations in blood serum samples were determined using the CMIA technique. The ARCHITECT iSystem with reagents ARCHITECT CA 19-9XR assay (Abbott, Chicago, IL, USA) and ARCHITECT CEA assay (Abbott, Chicago, IL, USA) were used. The manufacturer's recommendations were used for sample and reagent preparation, assay procedures, and the calculation of results.

#### 10.5.5. Statistics

Statistical analysis was performed using software: R statistical software package V 4.0.2 (© The R Foundation for Statistical Computing, <https://www.r-project.org/foundation/>), Rstudio Version 1.3.959 © 2009-2020 RStudio, Inc., IBM SPSS Statistics V.23, G\*Power V. 3.1.9.4 Universität Düsseldorf, Germany. Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov (K-S) tests were used to check the data for normality. Interval variables, which were not normally distributed, were described by medians and interquartile ranges (IQR). The nominal variables were characterized by their frequencies and percentage across the corresponding subset of the sample. For testing relationships between categorical variables, the chi-square ( $\chi^2$ ) tests of independence were used. When the frequencies of the values were below 5, for testing relationships between categorical variables, we used Fisher's exact test. To estimate a statistically significant relationship between groups of variables, we used the Kruskal-Wallis rank-sum test. The strength of the relationship was measured by the eta squared based on the H-statistic ( $\eta^2 [H]$ ) effect size. When  $\eta^2 [H] = 0.01 \leq 0.06$ , we had a small effect; when

$\eta^2 [H] = 0.06 \leq 0.14$ , we had a moderate effect; and when  $\eta^2 [H] \geq 0.14$ , we had a large effect. The Youden index was used to calculate optimal blood serum concentration cut-off values for each biomarker according to its prognostic capabilities. Kaplan-Meier analysis (log-rank test) was used for disease-free survival (DFS) and OS analysis excluding 90-day mortality (15 events) and non-cancer-related deaths (5 events). The relationships between variables were evaluated as statistically significant with a p-value less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) and a statistical test power equal to 0.95 ( $1 - \beta = 0.95$ ).

## 10.6. Results

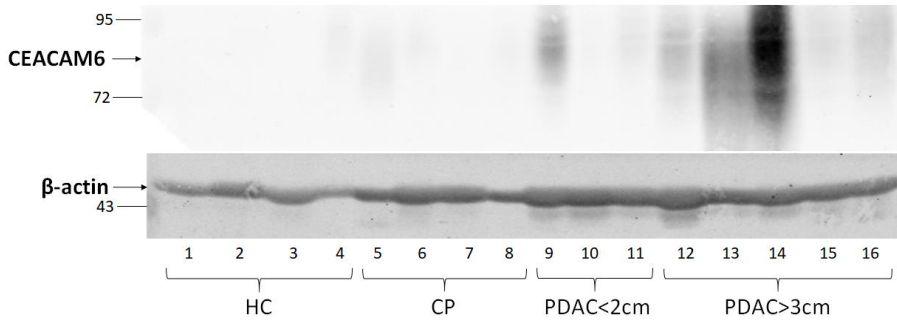
### 10.6.1. Proteomic Identification of CEACAM6 as Potential PDAC Biomarker

To identify potential PDAC biomarkers, we undertook an in-depth proteomic analysis of 19 tissue specimens surgically derived from healthy individuals (HC; 4 specimens), patients with CP (5 specimens), and patients with PDAC (10 specimens). In addition, specimens from PDAC patients were sorted into two groups: five specimens from smaller (<2 cm) tumours and five specimens from larger (>3 cm) tumours, aiming to identify biomarkers specific to the earlier or later stages of the disease. A total of 3627 proteins in all patient proteomes were identified and quantified, and 350 proteins were significantly increased in tumour proteomes ( $p$  value < 0.05; fold change > 1.5) (<https://www.mdpi.com/2075-1729/11/6/542/s1>; Supplementary Materials: Table S1). Ten proteins were unique for all PDAC, but not for HC or CP samples. Of them, only CEA and CEACAM6 have the possibility to be secreted into the blood serum, thus having the potential for clinical application. CEA is already used in clinical practice as a biomarker for several oncological diseases, including PDAC. CEACAM6 on the other hand does not yet have such use but is considered as a promising new PDAC biomarker by other researchers thus we further investigated it [13,16,23].

### 10.6.2. CEACAM6 Expression in PDAC Tissue Specimens

To validate the specificity of CEACAM6 to PDAC but not HC or CP tissue samples, we assayed the expression of CEACAM6 with specific antibodies. Western blot analysis and densitometry readings revealed that CEACAM6 is expressed in PDAC tissue samples with a tendency for increasing expression as the tumour diameter increases. Additionally, no

detectable expression of CEACAM6 was observed in HC tissue samples and only a trace of CEACAM6 expression was found in CP tissue samples (Figure 2, Table 1). These results confirm the predominant CEACAM6 expression in PDAC tissues.



CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; HC – healthy control; CP – chronic pancreatitis; PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma.

**Figure 2.** Western blot analysis of CEACAM6 expression in pancreatic HC, CP, and PDAC tissue lysates.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

**Table 1.** Densitometry readings representing relative intensity of CEACAM6 and  $\beta$ -actin at the Western blot analysis.

	<b>HC</b>				<b>CP</b>				<b>PDAC &lt; 2 cm</b>			<b>PDAC &gt; 3 cm</b>				
Line No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CEACAM6	1.0	0.6	0.5	2.4	11.7	1.8	1.4	1.1	19.9	1.2	6.4	15.6	69.4	110.3	14.9	24.0
$\beta$ -actin	1.0	1.8	1.9	0.7	1.3	2.3	2.2	1.4	2.8	2.7	2.3	3.8	2.4	2.8	2.1	2.2

CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; HC – healthy control; CP – chronic pancreatitis; PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma.

### 10.6.3. Evaluation of CEACAM6, CEA and CA19-9 Concentrations in Patients' Blood Serum, Diagnostic Capability of CEACAM6

According to a previous study, CEACAM6 is secreted into and can be detected in the blood serum [13]. To evaluate the ability of CEACAM6 to separate PDAC patients from those with CP and HC, we analysed CEACAM6 blood serum concentrations from 239 patients with ELISA. Before the analysis, patients were divided into three groups: patients with PDAC, patients with CP, and patients as HC. The demographics of the groups were analysed to evaluate general parameters and the overall health condition of each group (Table 2). Analysis revealed significant differences between the groups in all evaluated demographical parameters. These changes might have influenced further results, but they cannot be avoided due to the nature of each group.

**Table 2.** Demographical data of the study groups.

Parameter	PDAC	CP	HC	p
No. of patients	142	66	31	
Gender				<0.001
Female No. (%)	71 (50.0)	15 (22.7)	17 (54.8)	
Male No. (%)	71 (50.0)	51 (77.3)	14 (45.2)	
Age (years) Median (IQR)	66.0 (13.8)	49.0 (12.0)	56.0 (11.0)	<0.001
BMI Median (IQR)	25.4 (5.5)	22.5 (4.4)	27.3 (9.7)	<0.001
Diabetes mellitus				0.009
Present No. (%)	32 (22.5)	27 (40.9)	5 (16.1)	
Absent No. (%)	110 (77.5)	39 (59.1)	26 (83.9)	

PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma; CP – chronic pancreatitis; HC – healthy control; IQR – interquartile ranges; BMI – body mass index.

To compare the diagnostic capability of CEACAM6 with other biomarkers, we further analysed concentrations of already known PDAC biomarkers (CEA and CA19-9) in the same blood serum samples with CMIA. Differences in the median values of analysed biomarker concentrations between the three groups reached statistical significance and are shown in Table 3. The analysis confirmed that CEA and CA19-9 have diagnostic



potential, as their concentrations were significantly increased in the PDAC group. The concentration of CEACAM6 was significantly increased in one of the control groups, CP patients, thus restricting its diagnostic potential.

**Table 3.** Median blood serum concentrations of analysed biomarkers in the study groups.

<b>Biomarker</b>	<b>PDAC</b>	<b>CP</b>	<b>HC</b>	<b>p</b>
CEA (mkg/L) Median (IQR)	2.9 (3.8)	2.6 (2.7)	1.4 (0.8)	<0.001
CEACAM6 (ng/mL) Median (IQR)	2.1 (2.4)	3.3 (2.3)	1.1 (1.8)	<0.001
CA19-9 (kU/L) Median (IQR)	176.0 (1386.9)	7.6 (22.1)	3.6 (5.1)	<0.001

CEA – carcinoembryonic antigen; CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; CA19-9 – carbohydrate antigen 19-9; IQR – interquartile ranges; BMI – body mass index.

#### 10.6.4. Comparative Analysis of CEACAM6 as a Prognostic Biomarker

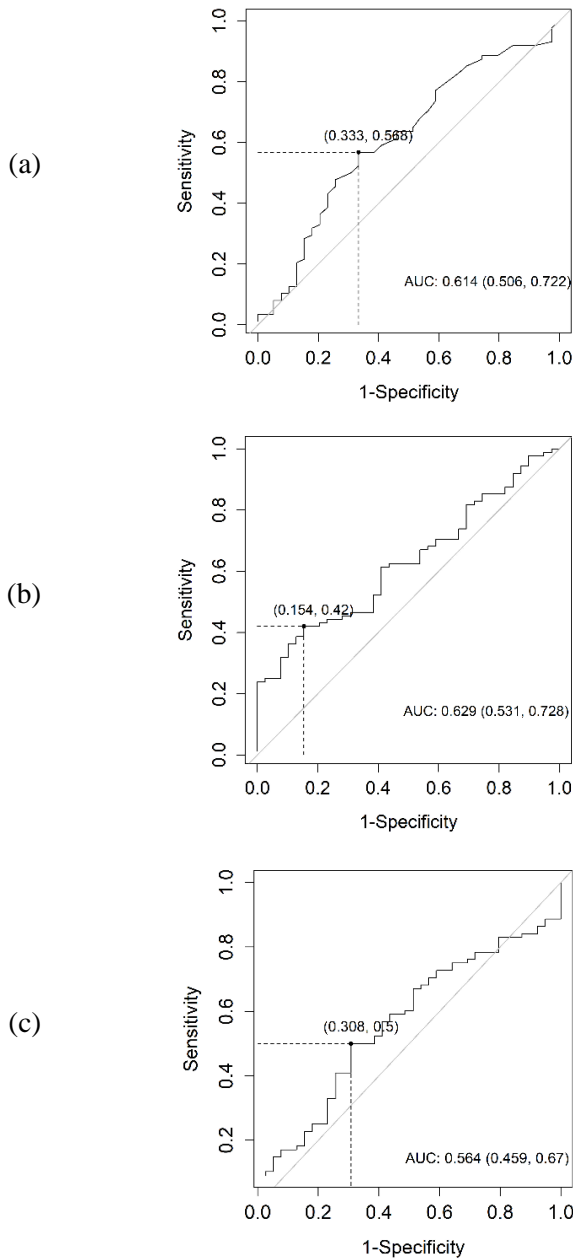
Finally, we investigated the prognostic potential of CEACAM6 and compared it to the prognostic capabilities of CEA and CA19-9. Aiming to evaluate the analysed biomarker associations to various oncological and demographical parameters, we evaluated the dependency of CEACAM6, CEA, and CA19-9 blood serum concentrations from these parameters in PDAC patients. The results of this analysis are represented in Table 4. Our study revealed that CEACAM6 blood serum concentration is the least dependent on the evaluated oncological and demographical parameters compared to CEA and CA19-9 concentrations. This makes CEACAM6 the most independent candidate biomarker for PDAC.

**Table 4.** The dependency on oncological and demographical parameters of biomarkers concentrations represented as effect sizes and p values.

Parameter	CEA Effect Size (p-value)	CEACAM6 Effect Size (p-value)	Ca19-9 Effect Size (p-value)
Demographical			
Gender	0.01 (0.1) **	-0.01 (0.8) **	0.00 (0.3) **
Age	0.04 (0.46) *	0.09 (0.13) *	-0.05 (0.42) *
Diabetes mellitus	0.01 (0.1) **	0.01 (0.06) **	0.00 (0.9) **
BMI	-0.04 (0.47) *	0.01 (0.85) *	0.04 (0.51) *
Oncological			
T	0.05 (0.001) **	0.04 (0.008) **	0.05 (0.001) **
N	-0.01 (0.9) **	0.00 (0.5) **	0.05 (0.002) **
M	0.07 (0.00005) **	0.02 (0.03) **	0.03 (0.004) **
G	-0.01 (0.9) **	0.00 (0.6) **	-0.01 (0.7) **
R	0.00 (0.5) **	0.00 (0.3) **	0.01 (0.1) **
Stage	0.06 (0.002) **	0.00 (0.3) **	0.04 (0.01) **
LNR	-0.05 (0.59) *	-0.05 (0.56) *	0.13 (0.14) *
Perineural invasion	0.10 (0.000004) **	0.05 (0.0008) **	0.03 (0.02) **
Perivascular invasion	0.09 (0.000007) **	0.06 (0.0005) **	0.02 (0.02) **
Tumour diameter	0.1 (0.1) *	0.1 (0.09) *	0.2 (0.00) *
Tumour localization	0.00 (0.3) **	-0.02 (0.9) **	0.00 (0.4) **
Bilirubin concentration	0.05 (0.4) *	0.01 (0.83) *	-0.04 (0.46) *

\* Kendall correlation coefficient; \*\*  $\eta^2$ , based on the H-statistic effect size; CEA – carcinoembryonic antigen; CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; CA19-9 – carbohydrate antigen 19-9; BMI – body mass index; T – primary tumour; N – regional lymph nodes; M – distant metastasis; G – differentiation; R – resection status; LNR – lymph node ratio.

For the survival analysis, optimal cut-off values for each biomarker blood serum concentration needed to be determined. Since diagnostic CEACAM6 potential was rejected, cut-off values were calculated according to the prognostic capabilities of the biomarkers using the Youden index. The determined cut-off values were CEA 2.6 mkg/L; CEACAM6 3.018 ng/mL; CA19-9 308.85 kU/L. Receiver operating characteristic (ROC) curves for each biomarker are represented in Figure 3. The established cut-off values of all three biomarkers were applied in the subsequent survival analysis.



ROC – receiver operating characteristic; AUC – area under the curve; CEA – carcinoembryonic antigen; CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; CA19-9 – carbohydrate antigen 19-9.

**Figure 3.** The ROC curves for CEA (a), CEACAM6 (b), and CA19-9 (c) according to their prognostic capabilities.

PDAC patients in our study underwent different types of surgical treatments, which may have had an impact on their survival. For this reason, before survival analysis, we divided the PDAC patient group into two subgroups depending on the type of treatment patients received — radical or palliative. A total of 73 patients in the radical treatment subgroup underwent pancreaticoduodenectomy or hemipancreatectomy, while 69 patients in the palliative treatment subgroup underwent bypass operations and/or biopsies. The latter subgroup included patients with resectable stages of PDAC who refused surgery or could not undergo radical surgery due to comorbidities. The characteristics of each subgroup are represented in Table 5.

**Table 5.** The characteristics of the subgroups of pancreatic cancer patients.

<b>Parameter</b>	<b>Radical treatment</b>	<b>Palliative treatment</b>
No. of patients	73	69
Stage		
IA	4	4
IB	8	0
IIA	11	1
IIB	33	8
III	17	21
IV	0	35
Adjuvant chemotherapy	58	57
Gemcitabine	23	19
Folfirinox	13	8
Gemcitabine and Folfirinox	22	30
Refused/did not tolerate	11	11
Missing data	4	1

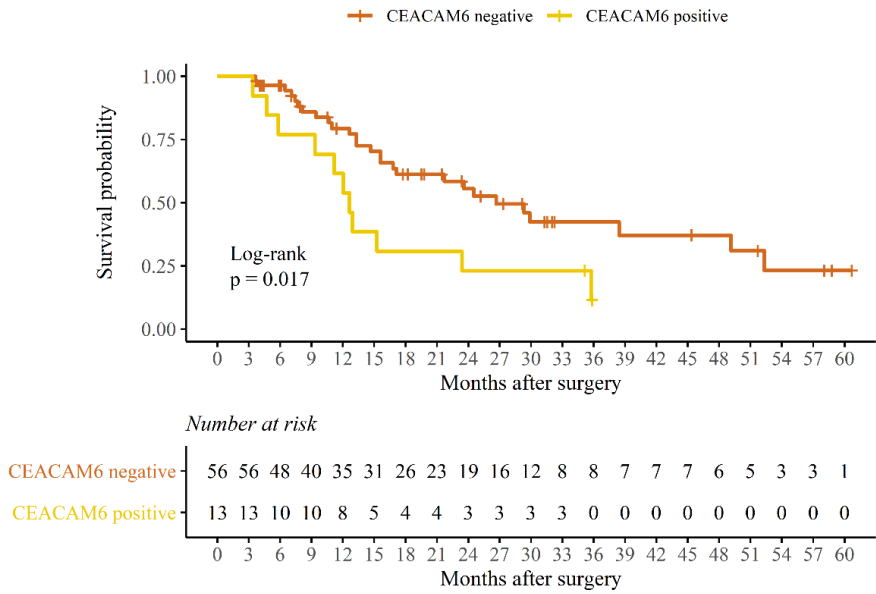
To evaluate the prognostic potential of CEACAM6 and to compare it with CEA and CA19-9, a Kaplan-Meier survival analysis was performed. This analysed the impact of these biomarker blood serum concentrations above the cut-off value on survival. Patients with 90-day mortality and non-cancer-related deaths were excluded to evaluate only cancer-related mortality. The median OS and median DFS were calculated for each biomarker in both PDAC subgroups (Table 6). No difference in DFS or OS for either biomarker was detected in the palliative treatment subgroup. However, in the radical treatment subgroup, only patients with CEACAM6 blood serum concentration above the cut-off value were characterized by statistically significant poorer median OS (12.6 months OS for CEACAM6-positive vs. 17.0 months OS for CEACAM6-negative,  $p = 0.017$ ) (Figure 4). No statistically significant

dependencies on DFS or OS from either CEA or CA19-9 biomarkers were obtained in the latter subgroup. Because OS, but not DFS, was dependent on CEACAM6 blood serum expression, this might indicate that CEACAM6 cannot predict the timing of disease relapse. However, as it occurs, the disease tends to become more aggressive. Since most of the radical treatment subgroup patients received adjuvant chemotherapy (Table 5), it can be concluded that the level of CEACAM6 in the blood serum has chemoresistance prediction properties in PDAC patients after radical treatment.

**Table 6.** Median survival dependencies of biomarker blood serum concentrations in radical and palliative treatment subgroups.

		Overall survival (months)			Disease-free survival (months)		
		Negative	Positive	p	Negative	Positive	p
Radical treatment	CEA median (IQR)	15.6 (22.8)	15.4 (16.6)	0.3	8.7 (17.3)	7.9 (11.0)	0.38
	CEACAM6 median (IQR)	17.0 (21.3)	12.6 (14.1)	0.017	8.7 (14.4)	7.0 (19.0)	0.094
	CA19-9 median (IQR)	16.4 (18.8)	13.3 (21.8)	0.64	8.1 (16.4)	9.2 (11.9)	0.23
Palliative treatment	CEA median (IQR)	11.7 (13.6)	13.6 (9.9)	0.71			
	CEACAM6 median (IQR)	11.8 (7.9)	13.5 (12.6)	0.87			
	CA19-9 median (IQR)	13.6 (16.4)	12.0 (10.5)	0.12			

Negative – biomarker concentrations below cut-off value; positive – biomarker concentrations above the cut-off value; CEA – carcinoembryonic antigen; CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; CA19-9 – carbohydrate antigen 19-9; IQR – interquartile ranges.



CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; negative – biomarker concentrations below cut-off value; positive – biomarker concentrations above the cut-off value.

**Figure 4.** Kaplan–Meier curve representing the dependency of CEACAM6 blood serum concentration values on overall survival in PDAC patients after radical treatment.

### 10.7. Discussion

The reason why PDAC has emerged as an increasingly significant healthcare issue might be due to the lack of relevant scientific research in the field. Despite the fact that mortality is rising and survival rates have remained unchanged for decades, pancreatic cancer still receives less than 2% of all cancer research funding in Europe [10,24]. From all treatment modalities available, only surgery offers the possibility of a cure if accessed at early stages. Early identification of this disease remains a major issue. Another important issue is the heterogeneity of PDAC, which is due to the nature of its oncogenesis [7–9]. This makes it difficult for clinicians to predict further disease development and prognosis, and thus the decision for the best treatment option for each individual patient remains debatable. A new biomarker could shed more light onto these issues; the current biomarkers for

PDAC (CA19-9 and CEA) are limited in diagnostic and prognostic capabilities.

In our study, we aimed to find a new advanced PDAC biomarker. After HDMS revealed candidate biomarkers, we determined that CEACAM6 has the highest potential to become a novel biomarker for PDAC. After its validation solely in PDAC tissue, we further analysed blood serum samples for its expression. To evaluate the clinical significance of CEACAM6, we also measured blood serum concentrations of other biomarkers already in use for PDAC (CEA and CA19-9). Although its diagnostic capabilities were insufficient, survival analysis revealed that it has significant prognostic potential and can help to predict chemoresistance. Similar properties of CEACAM6 were investigated and described by other scientists.

Various mechanisms of how CEACAM6 affects pancreatic cancer progression were already identified. Duxbury et al. in 2004 announced a number of publications regarding CEACAM6 and its role in PDAC development. This team noted that CEACAM6 gene silencing reduces the metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells by impairing anoikis resistance in PDAC cell lines and tested it with a nude mouse orthotopic xenograft model [25]. Another research group led by Duxbury determined that the antibody-mediated cross-linking of CEACAM6 induced a significant increase in cellular resistance to anoikis [26]. Anoikis is a subset of apoptosis normally induced by inadequate cell-substrate adhesion, while resistance to anoikis is a feature of malignancy and determines metastatic potential and tumorigenesis. It was proved that CEACAM6 overexpression has an effect on cellular invasiveness towards insulin-like growth factor I, which has a critical role in the malignant behaviour of pancreatic cancer cells [27]. CEACAM6 was identified to promote PDAC cell interactions with the extracellular matrix via its cross-talk with  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, thus contributing to the invasive and metastatic potential of the cells [28]. Another published study investigated two PDAC cell lines (Capan2 and BxPC3) with modified CEACAM6 expression and their effect on subcutaneously xenografted mice. It was concluded that CEACAM6 expression can modulate the invasive PDAC phenotype through alterations in cellular MMP-9 activity [29]. Gebauer et al. [13] also performed *in vivo* experiments with mice inoculated with CEACAM knock-down cells. Experimental animals showed a prolonged overall survival in comparison to the control group. On the other hand, the same group showed an increased incidence of pulmonary metastasis. Epithelial–mesenchymal transition is a process which involves the loss of cell–cell adhesions and in PDAC leads to the gain of invasive and metastatic capabilities together with chemoresistance. Chen et al. [20] suggested that CEACAM6 promotes PDAC



spread by means of this process via the ZEB1/ZEB2 pathway. CEACAM6 modulation of PDAC cell proliferation via the expression of cyclin D1/CDK4 was also determined by Yan et al. [30].

It is very likely that these oncogenic mechanisms associated with CEACAM6 start to take effect very early, since this protein is confirmed to be expressed even at the preneoplastic state of PDAC, pancreatic intraepithelial neoplasia [13,16–18]. Some of these preneoplastic changes are present in patients with CP [17,31–33]. This is one of the reasons why CP is considered as a precancerous state by some specialists. CEACAM6 expression was already reported in CP tissue samples in several publications, but the number of analysed samples was low [17,34]. It was also identified in CP patients' bile and blood serum [13,35]. These findings are similar to our determination that CEACAM6 blood serum concentrations were higher in CP patients than in PDAC patients (Table 3). The diagnostic value of CEACAM6 could be considered to be poor because differentiation between these two conditions is very important in clinical work. In fact, our results may support the results of Sharma et al., who found that the expression of CEACAM6 in the tissue samples of the precancerous state of esophageal cancer was higher than in the actual esophageal cancer [36]. On the other hand, CEACAM6 could have an additional role as a biomarker for the management of CP patients. To this day, no research regarding such clinical utility of CEACAM6 has been done.

Since CEACAM6 possesses significant features for pancreatic cancer development, it was investigated as a potential treatment target. Cheng et al. determined that antibodies targeting CEACAM6 can reduce PDAC cell line angiogenesis, invasion, and MMP-9 activity, three properties important for tumour growth and metastasis [23]. The same research also compared their effect with standard chemotherapy and proved that these antibodies are superior to gemcitabine in terms of their ability to reduce angiogenesis and MMP-9 activity. CEACAM6 demonstrated the potential to be used as a therapeutic target for PDAC using an antibody–drug conjugate-based therapy approach [18]. In vitro analysis made by Duxbury et al. [19] determined that the expression of CEACAM6 is associated with the gemcitabine chemoresistance of PDAC cells, as in our results, where patients with higher CEACAM6 blood serum concentrations did not have a significant therapeutic impact from adjuvant chemotherapy, as shown by poorer OS (Table 6, Figure 4). These findings could mean that CEACAM6 may help clinicians to identify a group of patients with chemoresistant but targeted therapy- and/or immunotherapy-responsive PDAC. One ongoing clinical trial is analysing the effect of CAR2Anti-CEA CAR-T cell infusion to the hepatic artery for patients with pancreatic cancer and CEA+ liver metastases that are resistant

to standard therapy [37]. The results of this trial will hopefully shed even more light on this possible clinical role of CEACAM6.

Our analysis revealed that CEACAM6 blood serum concentrations are the least dependent on various oncological and demographic parameters compared to CEA and CA19-9 (Table 4). CEACAM6 was only significantly correlated with oncological parameters T, M, perineural invasion, and perivascular invasion. CEA significantly correlated with the same parameters, but also with the tumour stage. CA19-9 significantly correlated with the same parameters as CEA, but also with parameter N and tumour diameter. A similar analysis done by Gebauer et al. concluded CEACAM6 blood serum concentrations significantly correlate with parameters G and M, while CEA did not correlate with any of analysed parameters [13]. However, the latter study analysed fewer parameters, and patient groups were smaller.

In our research, we compared patients' demographical parameters between different groups: PDAC, CP and HC. We concluded that there were significant differences between the groups in all evaluated parameters (Table 2). This might have had an effect on biomarker expression, but we could not adjust the study accordingly due to the limited number of patients available. We understand that other studies with a similar study design might run into the same issue, since each patient group has a tendency to experience certain changes in their health condition or demographical parameters (e.g., median BMI, median age, gender ratio, incidence of diabetes mellitus). While analysing CEACAM6 blood serum expression with a similar study structure, Gebauer et al. reported the gender ratio only for PDAC and HC patients, but for CP patients, these data are missing [13]. In the same study, the median age was reported only for PDAC and CP patients, but for HC patients, information about age is also missing.

CEACAM6 was reported to be overexpressed not only in the cancer tissue and blood serum of PDAC patients, but also in their bile. Farina et al. [35] concluded that

CEACAM6's concentration is conspicuously elevated in bile samples from patients with PDAC and cholangiocarcinoma, but not in those from chronic pancreatitis or gallstone-induced stenosis. This makes it a possible biomarker for differentiation between benign and malignant strictures, a subject that still remains a major clinical issue.

Although a significant number of studies have been conducted already, reporting a link between higher CEACAM6 concentration and the more aggressive type of PDAC, few trials have investigated its prognostic capabilities. Two trials available on this subject have analysed immunohistochemically stained tissue microarray specimens [13,16]. In these

studies, positive CEACAM6 expression was associated with unfavourable OS and DFS. One additional trial analysed The Cancer Genome Atlas data from PDAC patients [38]. It also linked high CEACAM6 expression to poor OS. To our knowledge, so far, only one study has evaluated the link from CEACAM6 concentration in blood serum to OS and DFS, but it failed to show statistically significant dependency. This is perhaps because of the smaller group of PDAC patients [13]. To our knowledge, our study is the first report on CEACAM6 blood serum expression as a statistically significant PDAC prognostic biomarker. As CEACAM6 has universal oncogenic features, it has been reported as a relevant prognostic biomarker in other malignancies: cholangiocarcinoma, osteosarcoma, renal cancer, colorectal cancer, gastric cancer [39–45].

## 10.8. Conclusions

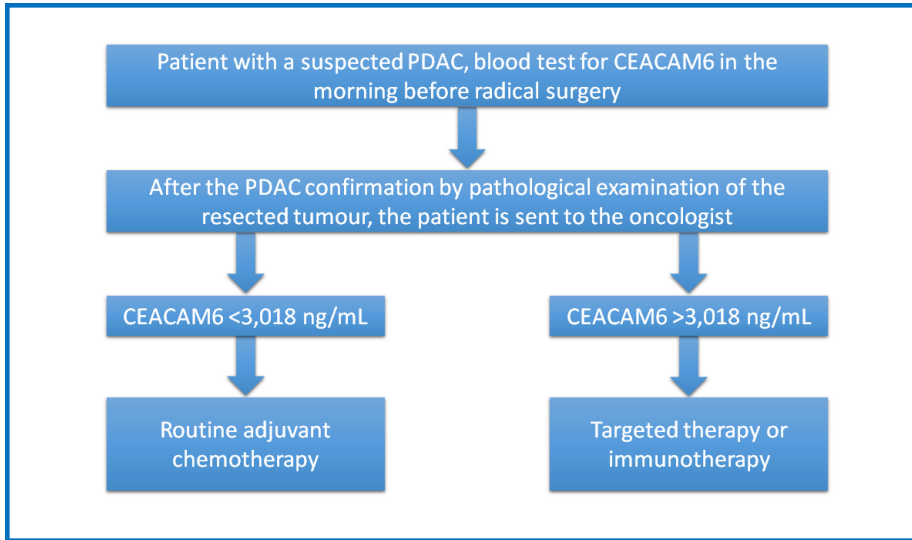
1. A biobank was created with 267 samples of biological material from the study subjects.
2. CEACAM6 was identified as a potential PDAC biomarker in pancreatic tissue samples.
3. CEACAM6 verification revealed the dominance of its expression in PDAC tissue compared to CP and HC tissues.
4. Optimal CEACAM6 blood serum concentration cut-off value is 3.018 ng/mL; CEA 2.6 mkg/L; CA19-9 308.85 kU/L.
5. CEACAM6 blood serum concentrations do not have diagnostic capabilities for PDAC.
6. CEACAM6 blood serum concentrations have prognostic capabilities for PDAC. In PDAC patients with a serum CEACAM6 concentration >3.018 ng/mL, targeted therapy or immunotherapy could be offered instead of chemotherapy.

## 10.9. Practical recommendations

Based on the conclusions of this dissertation, we would suggest the following practical recommendations.

For patients undergoing radical surgery for suspected pancreatic cancer, we would recommend to evaluate CEACAM6 concentration in the blood serum at the morning before surgery. If the diagnosis of PDAC is confirmed after the surgery, the oncologist should take into account the pre-operative CEACAM6 concentration while deciding on further treatment tactics. If the

latter is  $<3.018$  ng/mL, we would recommend routine adjuvant chemotherapy. In case CEACAM6 concentration is  $>3.018$  ng/mL, the clinical situation should be discussed with the patient and, with his informed consent, refrain from routine chemotherapy with targeted therapy or immunotherapy as alternatives. While possible CEACAM6 or another protein of its family should be used as a target or immunotherapy element (Figure 5).



CEACAM6 – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma.

**Figure 5.** Practical recommendations for the examination and treatment of patients with suspected pancreatic cancer and planned radical treatment.

## REFERENCES

- [1] European Commission. European Cancer Information System. Available online: [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-0\\$1-All\\$2-All\\$4-1,2\\$3-0\\$6-0,14\\$5-2008,2008\\$7-7\\$CEstByCountry\\$X0\\_8-3\\$X0\\_19-AE27\\$X0\\_20-No\\$CEstBySexByCountry\\$X1\\_8-3\\$X1\\_19-AE27\\$X1\\_-1-1\\$CEstByIndiByCountry\\$X2\\_8-3\\$X2\\_19-AE27\\$X2\\_20-No\\$CEstRelative\\$X3\\_8-3\\$X3\\_9-AE27\\$X3\\_19-AE27\\$CEstByCountryTable\\$X4\\_19-AE27](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-0$1-All$2-All$4-1,2$3-0$6-0,14$5-2008,2008$7-7$CEstByCountry$X0_8-3$X0_19-AE27$X0_20-No$CEstBySexByCountry$X1_8-3$X1_19-AE27$X1_-1-1$CEstByIndiByCountry$X2_8-3$X2_19-AE27$X2_20-No$CEstRelative$X3_8-3$X3_9-AE27$X3_19-AE27$CEstByCountryTable$X4_19-AE27) (accessed on 15 February 2021).
- [2] Ferlay, J.; Partensky, C.; Bray, F. More Deaths from Pancreatic Cancer than Breast Cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol.* 2016, *55*, 1158–1160, doi:10.1080/0284186X.2016.1197419.
- [3] Canto, M.I.; Harinck, F.; Hruban, R.H.; Offerhaus, G.J.; Poley, J.-W.; Kamel, I.; Nio, Y.; Schulick, R.S.; Bassi, C.; Kluijdt, I.; et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium Summit on the Management of Patients with Increased Risk for Familial Pancreatic Cancer. *Gut* 2013, *62*, 339–347, doi:10.1136/gutjnl-2012-303108.
- [4] Yoneyama, T.; Ohtsuki, S.; Honda, K.; Kobayashi, M.; Iwasaki, M.; Uchida, Y.; Okusaka, T.; Nakamori, S.; Shimahara, M.; Ueno, T.; et al. Identification of IGFBP2 and IGFBP3 As Compensatory Biomarkers for CA19-9 in Early-Stage Pancreatic Cancer Using a Combination of Antibody-Based and LC-MS/MS-Based Proteomics. *PLoS ONE* 2016, *11*, e0161009, doi:10.1371/journal.pone.0161009.
- [5] Dutta, S.K.; Girotra, M.; Singla, M.; Dutta, A.; Otis Stephen, F.; Nair, P.P.; Merchant, N.B. Serum HSP70: A Novel Biomarker for Early Detection of Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2012, *41*, 530–534, doi:10.1097/MPA.0b013e3182374ace.
- [6] Tumas, J.; Baskirova, I.; Petrenas, T.; Norkuniene, J.; Strupas, K.; Sileikis, A. Towards a Personalized Approach in Pancreatic Cancer Diagnostics Through Plasma Amino Acid Analysis. *Anticancer Res.* 2019, *39*, 2035–2042, doi:10.21873/anticancer.13314.
- [7] Peng, J.; Sun, B.-F.; Chen, C.-Y.; Zhou, J.-Y.; Chen, Y.-S.; Chen, H.; Liu, L.; Huang, D.; Jiang, J.; Cui, G.-S.; et al. Single-Cell RNA-Seq Highlights Intra-Tumoral Heterogeneity and Malignant Progression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Res.* 2019, *29*, 725–738, doi:10.1038/s41422-019-0195-y.

- [8] Pedersen, K.; Bilal, F.; Bernadó Morales, C.; Salcedo, M.T.; Macarulla, T.; Massó-Vallés, D.; Mohan, V.; Vivancos, A.; Carreras, M.-J.; Serres, X.; et al. Pancreatic Cancer Heterogeneity and Response to Mek Inhibition. *Oncogene* 2017, 36, 5639–5647, doi:10.1038/onc.2017.174.
- [9] Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Ragulan, C.; Cros, J.; Patil, Y.; Martinet, M.; Erkan, M.; Kleeff, J.; Wilson, J.; Apte, M.; et al. Inter- and Intra-Tumoural Heterogeneity in Cancer-Associated Fibroblasts of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Pathol.* 2019, 248, 51–65, doi:10.1002/path.5224.
- [10] United European Gastroenterology Report: Pancreatic Cancer Across Europe—Taking a United Stand. Available online: <https://ueg.eu/files/630/9cc138f8dc04cbf16240daa92d8d50e2.pdf> (accessed on 22 February 2021).
- [11] Beauchemin, N.; Draber, P.; Dveksler, G.; Gold, P.; Gray-Owen, S.; Grunert, F.; Hammarström, S.; Holmes, K.V.; Karlsson, A.; Kuroki, M.; et al. Redefined Nomenclature for Members of the Carcinoembryonic Antigen Family. *Exp. Cell Res.*, 1999, 252, 243–249. doi:10.1006/excr.1999.4610.
- [12] Kuespert, K.; Pils, S.; Hauck, C.R. CEACAMs: Their Role in Physiology and Pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006, 18, 565–571, doi:10.1016/j.ceb.2006.08.008.
- [13] Gebauer, F.; Wicklein, D.; Horst, J.; Sundermann, P.; Maar, H.; Streichert, T.; Tachezy, M.; Izbicki, J.R.; Bockhorn, M.; Schumacher, U. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* 2014, 9, e113023, doi:10.1371/journal.pone.0113023.
- [14] Horst, A.K.; Ito, W.D.; Dabelstein, J.; Schumacher, U.; Sander, H.; Turbide, C.; Brümmer, J.; Meinertz, T.; Beauchemin, N.; Wagener, C. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Modulates Vascular Remodeling in Vitro and in Vivo. *J. Clin. Investing.* 2006, 116, 1596–1605, doi:10.1172/JCI24340.
- [15] Obrink, B. CEA Adhesion Molecules: Multifunctional Proteins with Signal-Regulatory Properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9, 616–626, doi:10.1016/s0955-0674(97)80114-7.
- [16] Duxbury, M.S.; Matros, E.; Clancy, T.; Bailey, G.; Doff, M.; Zinner, M.J.; Ashley, S.W.; Maitra, A.; Redston, M.; Whang, E.E. CEACAM6 Is a Novel Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma and PanIN Lesions. *Ann. Surg.* 2005, 241, 491–496, doi:10.1097/01.sla.0000154455.86404.e9.

- [17] Zińczuk, J.; Zaręba, K.; Romaniuk, W.; Kamińska, D.; Nizioł, M.; Baszun, M.; Kędra, B.; Guzińska-Ustymowicz, K.; Pryczynicz, A. Expression of Chosen Carcinoembryonic-Related Cell Adhesion Molecules in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) Associated with Chronic Pancreatitis and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Int. J. Med. Sci.* 2019, 16, 583–592, doi:10.7150/ijms.32751.
- [18] Strickland, L.A.; Ross, J.; Williams, S.; Ross, S.; Romero, M.; Spencer, S.; Erickson, R.; Sutcliffe, J.; Verbeke, C.; Polakis, P.; et al. Preclinical Evaluation of Carcinoembryonic Cell Adhesion Molecule (CEACAM) 6 as Potential Therapy Target for Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Pathol.* 2009, 218, 380–390, doi:10.1002/path.2545.
- [19] Duxbury, M.S.; Ito, H.; Benoit, E.; Waseem, T.; Ashley, S.W.; Whang, E.E. A Novel Role for Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 as a Determinant of Gemcitabine Chemoresistance in Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res.* 2004, 64, 3987–3993, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0424.
- [20] Chen, J.; Li, Q.; An, Y.; Lv, N.; Xue, X.; Wei, J.; Jiang, K.; Wu, J.; Gao, W.; Qian, Z.; et al. CEACAM6 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Mediates Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Int. J. Oncol.* 2013, 43, 877–885, doi:10.3892/ijo.2013.2015.
- [21] Tuck, M.K.; Chan, D.W.; Chia, D.; Godwin, A.K.; Grizzle, W.E.; Krueger, K.E.; Rom, W.; Sanda, M.; Sorbara, L.; Stass, S.; et al. Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection: Early Detection Research Network Consensus Statement Standard Operating Procedure Integration Working Group. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 113–117, doi:10.1021/pr800545q.
- [22] Ger, M.; Kaupinis, A.; Nemeikaite-Ceniene, A.; Sarlauskas, J.; Cicenias, J.; Cenas, N.; Valius, M. Quantitative Proteomic Analysis of Anticancer Drug RH1 Resistance in Liver Carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta—Proteins Proteom.* 2016, 1864, 219–232, doi:10.1016/j.bbapap.2015.11.005.
- [23] Cheng, T.-M.; Murad, Y.M.; Chang, C.-C.; Yang, M.-C.; Baral, T.N.; Cowan, A.; Tseng, S.-H.; Wong, A.; Mackenzie, R.; Shieh, D.-B.; et al. Single Domain Antibody against Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) Inhibits Proliferation, Migration, Invasion and Angiogenesis of Pancreatic Cancer Cells. *Eur. J. Cancer* 2014, 50, 713–721, doi:10.1016/j.ejca.2012.07.019.
- [24] Roser, M.; Ritchie, H. *Cancer*. Available online: <https://ourworldindata.org/cancer> (accessed on 8 February 2021).

- [25] Duxbury, M.S.; Ito, H.; Zinner, M.J.; Ashley, S.W.; Whang, E.E. CEACAM6 Gene Silencing Impairs Anoikis Resistance and in Vivo Metastatic Ability of Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Oncogene* 2004, 23, 465–473, doi:10.1038/sj.onc.1207036.
- [26] Duxbury, M.S.; Ito, H.; Ashley, S.W.; Whang, E.E. CEACAM6 Cross-Linking Induces Caveolin-1-Dependent, Src-Mediated Focal Adhesion Kinase Phosphorylation in BxPC3 Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 23176–23182, doi:10.1074/jbc.M402051200.
- [27] Duxbury, M.S.; Ito, H.; Benoit, E.; Zinner, M.J.; Ashley, S.W.; Whang, E.E. Overexpression of CEACAM6 Promotes Insulin-like Growth Factor I-Induced Pancreatic Adenocarcinoma Cellular Invasiveness. *Oncogene* 2004, 23, 5834–5842, doi:10.1038/sj.onc.1207775.
- [28] Duxbury, M.S.; Ito, H.; Ashley, S.W.; Whang, E.E. C-Src-Dependent Cross-Talk between CEACAM6 and Alpha5beta3 Integrin Enhances Pancreatic Adenocarcinoma Cell Adhesion to Extracellular Matrix Components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 317, 133–141, doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.018.
- [29] Duxbury, M.S.; Ito, H.; Benoit, E.; Ashley, S.W.; Whang, E.E. CEACAM6 Is a Determinant of Pancreatic Adenocarcinoma Cellular Invasiveness. *Br. J. Cancer* 2004, 91, 1384–1390, doi:10.1038/sj.bjc.6602113.
- [30] Yan, L.; Wang, Y.; Wang, Z.-Z.; Rong, Y.-T.; Chen, L.-L.; Li, Q.; Liu, T.; Chen, Y.-H.; Li, Y.-D.; Huang, Z.-H.; et al. Cell Motility and Spreading Promoted by CEACAM6 through Cyclin D1/CDK4 in Human Pancreatic Carcinoma. *Oncol. Rep.* 2016, 35, 418–426, doi:10.3892/or.2015.4338.
- [31] LeBlanc, J.K.; Chen, J.-H.; Al-Haddad, M.; Luz, L.; McHenry, L.; Sherman, S.; Juan, M.; Dewitt, J. Can Endoscopic Ultrasound Predict Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Lesions in Chronic Pancreatitis?: A Retrospective Study of Pathologic Correlation. *Pancreas* 2014, 43, 849–854, doi:10.1097/MPA.0000000000000142.
- [32] Rosty, C.; Geradts, J.; Sato, N.; Wilentz, R.E.; Roberts, H.; Sohn, T.; Cameron, J.L.; Yeo, C.J.; Hruban, R.H.; Goggins, M. P16 Inactivation in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (PanINs) Arising in Patients with Chronic Pancreatitis. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003, 27, 1495–1501, doi:10.1097/00000478-200312000-00001.
- [33] Sindhu, R.S.; Parvathy, G.; Fysal, K.; Jacob, M.K.; Geetha, S.; Krishna, B.; Natesh, B.; Rajan, R. Clinical Profile of PanIN Lesions in



- Tropical Chronic Pancreatitis. *Indian J. Gastroenterol. Off. J. Indian Soc. Gastroenterol.* 2015, 34, 436–441, doi:10.1007/s12664-015-0609-9.
- [34] Ludwig, O.J.; Cortese, C.M.; Collins, B.T.; Agarwal, B. Immunostaining As Adjunct to Cytologic Assessment of Endoscopic Ultrasound Guided Fine Needle Aspiration (EUS-FNA) Specimens for Diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma. *Gastrointest. Endosc.* 2007, 65, AB119, doi:10.1016/j.gie.2007.03.058.
- [35] Farina, A.; Dumonceau, J.-M.; Frossard, J.-L.; Hadengue, A.; Hochstrasser, D.F.; Lescuyer, P. Proteomic Analysis of Human Bile from Malignant Biliary Stenosis Induced by Pancreatic Cancer. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 159–169, doi:10.1021/pr8004925.
- [36] Sharma, N.; Srivastava, S.; Kern, F.; Xian, W.; Yeoh, K.G.; Ming, T.; McKeon, F.; Ho, K.Y. CEACAM 6, a Novel Marker for the Diagnosis of Barrett’s Esophagus. *Dis. Esophagus Off. J. Int. Soc. Dis. Esophagus* 2017, 30, 1–5, doi:10.1093/dote/dox026.
- [37] Katz, S.C. Phase 1b Study of CAR2Anti-CEA CAR-T Cell Hepatic Infusions for Pancreatic Carcinoma Patients With CEA + Liver Metastases (AntiCEA\_CART). *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03818165*. Sponsor: Sorrento Therapeutics, Inc. Start Date: 1 February 2019. Available at <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03818165> (Accessed on 7 June 2021)
- [38] Pandey, R.; Zhou, M.; Islam, S.; Chen, B.; Barker, N.K.; Langlais, P.; Srivastava, A.; Luo, M.; Cooke, L.S.; Weterings, E.; et al. Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDA): An Integrative Analysis of a Novel Therapeutic Target. *Sci. Rep.* 2019, 9, 18347, doi:10.1038/s41598-019-54545-9.
- [39] Ieta, K.; Tanaka, F.; Utsunomiya, T.; Kuwano, H.; Mori, M. CEACAM6 Gene Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer* 2006, 95, 532–540, doi:10.1038/sj.bjc.6603276.
- [40] Wang, Z.; Luo, C.; Wang, H.; Yan, X.; Liu, W.; Meng, Z. CEACAM6 Is Associated with Osteosarcoma Metastasis and Facilitates Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells. *Onco. Targets. Ther.* 2018, 11, 3159–3166, doi:10.2147/OTT.S161807.
- [41] Zhu, R.; Ge, J.; Ma, J.; Zheng, J. Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 6 Promotes the Proliferation and Migration of Renal Cancer Cells through the ERK/AKT Signaling Pathway. *Transl. Androl. Urol.* 2019, 8, 457–466, doi:10.21037/tau.2019.09.02.

- [42] Jantscheff, P.; Terracciano, L.; Lowy, A.; Glatz-Krieger, K.; Grunert, F.; Micheel, B.; Brümmer, J.; Laffer, U.; Metzger, U.; Herrmann, R.; et al. Expression of CEACAM6 in Resectable Colorectal Cancer: A Factor of Independent Prognostic Significance. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2003, 21, 3638–3646, doi:10.1200/JCO.2003.55.135.
- [43] Kim, K.S.; Kim, J.-T.; Lee, S.-J.; Kang, M.A.; Choe, I.S.; Kang, Y.H.; Kim, S.-Y.; Yeom, Y. Il; Lee, Y.-H.; Kim, J.H.; et al. Overexpression and Clinical Significance of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 in Colorectal Cancer. *Clin. Chim. Acta.* 2013, 415, 12–19, doi:10.1016/j.cca.2012.09.003.
- [44] Ru, G.-Q.; Han, Y.; Wang, W.; Chen, Y.; Wang, H.-J.; Xu, W.-J.; Ma, J.; Ye, M.; Chen, X.; He, X.-L.; et al. CEACAM6 Is a Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target for Gastric Carcinoma. *Oncotarget* 2017, 8, 83673–83683, doi:10.18632/oncotarget.19415.
- [45] Deng, X.; Liu, P.; Zhao, Y.; Wang, Q. Expression Profiling of CEACAM6 Associated with the Tumorigenesis and Progression in Gastric Adenocarcinoma. *Genet. Mol. Res.* 2014, 13, 7686–7697, doi:10.4238/2014.September.26.6.

## 11. GYVENIMO, KŪRYBINĖS IR MOKSLINĖS VEIKLOS APRAŠYMAS

**Vardas ir pavardė:** Benediktas Kurlinkus.

**Gimimo data ir vieta:** 1989-02-12, Kelmė.

**Veiklos sritis:** gydytojas gastroenterologas.

### **Išsilavinimas:**

1996-09-01 – 2008-06-30 Vidurinis išsilavinimas, Kelmės „Aukuro“ vidurinė mokykla.

2002-09-01 – 2006-06-30 Kelmės meno mokykla, Choreografijos skyrius.

2008-09-01 – 2014-06-30 Medicinos magistras, gydytojo kvalifikacija, Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas.

2014-09-01 – 2018-06-30 Gastroenterologijos rezidentūra, gydytojo gastroenterologo

kvalifikacija, Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas.

### **Darbo patirtis:**

2018-07-01 – iki dabar dirba gydytoju gastroenterologu Hepatologijos, gastroenterologijos ir dietologijos centre, Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos.

2016-10-21 – 2017-12-31 dirbo specialistu Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinikoje Lietuvos mokslų tarybos finansuotame projekte „Naujo multifunkcinio nanobiosensoriaus sukūrimas ankstyvajai kasos vėžio diagnostikai SEN-01/2016“.

2020-03-03 – 2021-12-31 dirbo jaunesnioju mokslo darbuotoju Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre Biochemijos institute Lietuvos mokslų tarybos finansuotame projekte „Kasos vėžio individualizuotas gydymas: inovatyvaus, proteomine analize pagrįsto, vaistų parinkimo metodo sukūrimas Nr. SEN-20-16“.

2019-10-01 – iki dabar dirba jaunesnioju asistentu Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinikoje.

2016 m. – iki dabar tarnauja Lietuvos kariuomenės Dr. Jono Basanavičiaus karo medicinos tarnyboje aktyviajame rezerve kaip karo medicinos gydytojas.

### **Draugijos:**

Lietuvos gastroenterologų draugijos narys.

Europos kasos klubo narys.

Vilniaus chirurgų draugijos narys.

### **Stažuotės / mokymosi programos:**

2018-03-16 – 2018-03-18 United European Gastroenterology Young Investigators Meeting, Viena, Austrija.

2018-09-01 – 2020-11-20 Pancreas 2000 program, Course 9 (Meeting 1, Malmö, Sweden 2018; Meeting 2, Bucharest, Romania 2018; Meeting 3, Assmannshausen, Germany 2019; Meeting 4, Amsterdam, Netherlands, 2019; Meeting 5, Istanbul, Turkey, 2020).

2019-09-01 – 2019-09-30 United European Gastroenterology Visiting Fellowship, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italija. Gastroenterologijos ir endoskopijos skyrius. Vadovas – doc. Roberto Penagini.

2021-11-01 – 2021-12-03 United European Gastroenterology Masterclass on Chronic Pancreatitis, Viena, Austrija.

### **Publikacijos:**

A. Šileikis, B. Kurlinkus, M. Petrulionis, D. Šeinin, S. Jurevičius, K. Strupas. Prognostinių rodiklių vertinimas ir reikšmė išgyvenamumui po kasos duktalinės adenokarcinomos radikalaus chirurginio gydymo. *Medicinos teorija ir praktika*. 2013. 19 (4), 322–326.

A. Šileikis, B. Kurlinkus, M. Kryžauskas, K. Strupas. Stage II Pancreatic Cancer: Radical, Palliative Surgery or Stenting? *Surgical Science*. 6 (12), December 2015. doi: 10.4236/ss.2015.612079.

A. Šileikis, M. Petrulionis, B. Kurlinkus, M. Ger, A. Kaupinis, J. Cienas, M. Valius, K. Strupas. Current Role of Proteomics in Pancreatic Cancer Biomarkers Research. *Curr. Proteomics*, 2016, 13 (1), 68–75. doi.org/10.2174/1570164613666160413130201.

- J. Tumas, K. Kvederaviciute, M. Petrulionis, B. Kurlinkus, A. Rimkus, G. Sakalauskaite, J. Cienas, A. Sileikis. Metabolomics in Pancreatic Cancer Biomarkers Research. *Med. Oncol.*, 2016, 33 (12), 133. doi.org/10.1007/s12032-016-0853-6.
- M. Petrulionis, B. Kurlinkus, A. Sileikis, K. Strupas. Trends of Molecular Research for Pancreatic Cancer Diagnostics: Insights of Clinician. *Clin Oncol.* 2017, 2, 1223.
- M. Ger, A. Kaupinis, M. Petrulionis, B. Kurlinkus, J. Cienas, A. Sileikis, M. Valius, K. Strupas. Proteomic Identification of FLT3 and PCBP3 as Potential Prognostic Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2018 Oct; 38(10), 5759–5765. doi: 10.21873/anticancer.12914.
- M. Ger, E. Zalyte, A. Kaupinis, B. Kurlinkus, M. Petrulionis, A. Sileikis, K. Strupas, M. Valius. Primary pancreatic ductal adenocarcinoma cell cultures represent the features of native tumours. *BIOLOGIJA.* 2019, 65 (1), 20–33.
- B. Kurlinkus, R. Ahola, E. Zwart, A. Halimi, B. S. Yilmaz, G. O. Ceyhan, J. Laukkarinen. In the Era of the Leeds Protocol: A Systematic Review and A Meta-Analysis on the Effect of Resection Margins on Survival Among Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients. *Scand J Surg.* 2020 Mar; 109(1),11–17. doi: 10.1177/1457496920911807.
- E. Zalyte, V. Dedonyte, B. Kurlinkus, A. Sileikis, P. Schemmer, M. Valius. Establishment and Characterization of a New Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line Capan-26. *Anticancer Res.* 2021 Mar;41(3),1401–1406. doi: 10.21873/anticancer.14897.
- B. Kurlinkus, M. Ger, A. Kaupinis, E. Jasiunas, M. Valius, A. Sileikis. CEACAM6's Role as a Chemoresistance and Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer: A Comparison of CEACAM6's Diagnostic and Prognostic Capabilities with Those of CA19-9 and CEA. *Life* 2021, 11, 542. doi.org/10.3390/life11060542.
- S. Strainienė, A. Zuzo, A. Dikčiūtė, B. Kurlinkus, I. Stundienė, I. Savlan, T. Strainys, J. Valantinas. Prieskydinių liaukų adenoma – reta pankreatito priežastis: klinikinis atvejis ir literatūros apžvalga. *Laboratorinė medicina.* 2021, 23, 1(87), 18–25.

## 12. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

- Marija Ger, Algirdas Kaupinis, Marius Petrulionis, Benediktas Kurlinkus, Jonas Cicėnas, Audrius Šileikis, Mindaugas Valius, Kęstutis Strupas. Proteomic Identification of FLT3 and PCBP3 as Potential Prognostic Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2018 Oct; 38(10), 5759–5765. doi: 10.21873/anticancer.12914.
- Marija Ger, Eglė Žalytė, Algirdas Kaupinis, Benediktas Kurlinkus, Marius Petrulionis, Audrius Šileikis, Kęstutis Strupas, Mindaugas Valius. Primary pancreatic ductal adenocarcinoma cell cultures represent the features of native tumours. *BIOLOGIJA.* 2019. 65(1), 20–33. <https://doi.org/10.6001/biologija.v65i1.3983>.
- Eglė Žalytė, Veronika Dedonytė, Benediktas Kurlinkus, Audrius Šileikis, Peter Schemmer, Mindaugas Valius. Establishment and Characterization of a New Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line Capan-26. *Anticancer Res.* 2021 Mar; 41(3),1401–1406. doi: 10.21873/anticancer.14897.
- Benediktas Kurlinkus, Marija Ger, Algirdas Kaupinis, Eugenijus Jasiūnas, Mindaugas Valius, Audrius Šileikis. CEACAM6's Role as a Chemoresistance and Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer: A Comparison of CEACAM6's Diagnostic and Prognostic Capabilities with Those of CA19-9 and CEA. *Life* 2021, 11, 542. P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/life11060542>.

## 13. PRANEŠIMAI TARPTAUTINĖSE KONFERENCIJOSE

- Žodinis ir stendinis pranešimas „Proteomic analysis of cancerous, inflammatory and healthy pancreatic tissues: discovery of potential biomarker to improve pancreatic cancer diagnostics“. The 4th International Conference „Evolutionary medicine: Health and Diseases in Changing Environment“. Vilnius, Lietuva, 2018.
- Stendinis pranešimas „Novel nanobiosensor for pancreatic cancer protein biomarkers concentration and visualization“. *Life Sciences Baltics* 2018. Vilnius, Lietuva, 2018.
- Stendinis pranešimas „Comprehensive proteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma“. 15th International conference of the Lithuanian Biochemical Society. Dubingiai, Lietuva, 2018.

- Stendinis pranešimas „Proteomic analysis of cancerous, inflammatory and healthy pancreatic tissues: discovery of potential biomarkers to improve pancreatic cancer diagnostics and prognostics“. The third World Pancreas Forum. Bernas, Šveicarija, 2020.
- Stendinis pranešimas „Novel nanobiosensor for pancreatic cancer protein biomarkers concentration and visualization“. The third World Pancreas Forum. Bernas, Šveicarija, 2020.
- Stendinis pranešimas „Proteomic analysis of cancerous, inflammatory and healthy pancreatic tissues: discovery of potential biomarkers to improve pancreatic cancer diagnostics and prognostics“. 52nd European Pancreatic Club meeting. Paryžius, Prancūzija, 2020.
- Stendinis pranešimas „Novel nanobiosensor for pancreatic cancer protein biomarkers concentration and visualization“. 52nd European Pancreatic Club meeting. Paryžius, Prancūzija, 2020.
- Stendinis pranešimas „CEACAM6's Role as a Chemoresistance and Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer: A Comparison of CEACAM6's Diagnostic and Prognostic Capabilities with Those of CA19-9 and CEA“. Life Sciences Baltics 2021. Vilnius, Lietuva, 2021.

## PADĖKA

Šioje disertacijoje aprašytas mokslinis tyrimas buvo atliktas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinikoje, Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Proteomikos centre ir Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Pilvo chirurgijos bei Hepatologijos, gastroenterologijos ir dietologijos centruose.

Visų pirma esu labai dėkingas disertacijos vadovui prof. Audriui Šileikiui už sudominimą mokslo tiriamuoju darbu nuo pirmųjų medicinos studijų kursų, mokslinių idėjų ir įžvalgų generavimą, vertingus patarimus, pagalbą ir pastabas rengiant šią disertaciją.

Labai ačiū visam Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Pilvo chirurgijos bei Hepatologijos, gastroenterologijos ir dietologijos centrų kolektyvui už pagalbą renkant audinių ir kraujo serumo mėginius. Ypač dėkoju prof. Kęstučiui Strupui, prof. Jonui Valantinui, dr. Mariui Petrulioniui už pagalbą sprendžiant administracinius iššūkius.

Nuoširdžiai dėkoju Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinikos reikalų tvarkytojai Reginai Valentėlienei už greitą pagalbą administraciniais klausimais bei prof. Algimantui Irniui už nepailstamą domėjimąsi mano moksliniu darbu ir patarimus bei padaršinimą einant šiuo keliu.

Esu labai dėkingas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro kolektyvui už surinktų mėginių saugojimą, atliktus tyrimus ir pagalbą interpretuojant tyrimų rezultatus: doc. dr. Daliui Vitkui, dr. Dovilei Karčiauskaitei, Aldonai Jurevičienei, Laimai Gogelienei.

Širdingai dėkoju VUL SK Biomedicininų tyrimų vykdymo skyriaus ir VRBTEK personalui už pagalbą prižiūrint tyrimo dokumentaciją, tvarkantis su griežtais duomenų apsaugos reikalavimais.

Labai dėkui Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Medicinos biologijos magistro studijų programos studentui Tomui Bukiui už pagalbą atliekant kraujo serumo mėginių ELISA tyrimus ir gautų rezultatų interpretavimą.

Labai ačiū Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Proteomikos centro kolektyvui: dr. Mindaugui Valiui, dr. Marijai Ger, dr. Algirdui Kaupiniui, dr. Eglei Žalytei ir dr. Silvijai Urnikytei už aukštos raiškos masių spektrometrijos



ir tolesnės proteominės analizės atlikimą, pagalbą interpretuojant jos rezultatus. Taip pat už pagalbą ir patarimus atliekant *Western-blot* analizę ir interpretuojant jos rezultatus. Šio centro darbuotojai taip pat organizavo itin didelio kiekio surinktų mėginių tinkamą saugojimą, dėkui už tai. Galiausiai, ačiū šiam kolektyvui už bendradarbiavimą ir profesionalumą rengiant straipsnių rankraščius tarptautiniams žurnalams.

Mano nuoširdi padėka biostatistikui Eugenijui Jasiūnui už reikšmingą pagalbą atliekant surinktų duomenų statistinę analizę.

Mano ypatinga padėka šios disertacijos recenzentams: prof. Gintarui Simučiuui, doc. Godai Sadauskaitei, dr. Albertui Čekauskui. Labai ačiū už vertingas pastabas ir patarimus, be kurių ši disertacija būtų nepilna.

Galiausiai, šis darbas nebūtų buvęs įmanomas be didžiulės pagalbos, paramos ir nuolatinio įkvėpimo, kurį man suteikė mano širdies dama Ieva ir šeima: tėvai Alfredas ir Ramutė, sesės Viktorija ir Ingrida. Esu be galo dėkingas už Jūsų meilę ir kantrybę!

## UŽRAŠAMS

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 30 egz.