



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL
DAVILA" din BUCUREȘTI**



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

DIAGNOSTICUL PRECOCE AL CANCERULUI PANCREATIC

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Habil. DIACONU CAMELIA CRISTINA

Student-doctorand:

GHEORGHE GINA

2023

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București
Strada Dionisie Lupu nr. 37 București, Sector 2, 020021 România, Cod fiscal: 4192910 Cont:
RO57TREZ70220F330500XXXX, Banca: TREZORERIE sect. 2
+40.21 318.0719; +40.21 318.0721; +40.21 318.0722
www.umfcd.ro

Cuprins

Introducere

I. Partea generală.....	1
1. Date epidemiologice și etiopatogenice.....	1
1.1. Epidemiologia cancerului pancreatic.....	1
1.2. Clasificarea histopatologică a tumorilor pancreatice.....	2
1.3. Factori de risc pentru cancerul pancreatic.....	3
2. Diagnosticul cancerului pancreatic.....	11
2.1 Diagnosticul clinic și imagistic al cancerului pancreatic.....	11
2.2 Rolul diagnosticului molecular în evaluarea pacienților cu cancer pancreatic.....	17
II. Contribuții personale.....	26
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării.....	26
4. Metodologia generală a cercetării.....	35
5. Date clinice și biologice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică.....	39
5.1. Introducere.....	39
5.2. Material și metodă.....	42
5.3. Rezultate.....	43
5.4. Discuții.....	47
5.5. Concluzii.....	53
6. Rolul analizei proteomice în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic.....	54
6.1. Introducere.....	54
6.2. Material și metodă.....	59
6.3. Rezultate.....	65
6.4. Discuții.....	69
6.5. Concluzii.....	90
7. Rolul microARN-ului în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic.....	92
7.1. Introducere.....	92
7.2. Material și metodă.....	95
7.3. Rezultate.....	99
7.4. Discuții.....	101
7.5. Concluzii.....	110

8. Concluzii și contribuții personale.....112

Bibliografie

Anexe

Introducere

Cancerul pancreatic este una dintre cele mai agresive afecțiuni maligne, cu rate de supraviețuire la 5 ani care nu depășesc 10% [1,2]. Prognosticul negativ se datorează în principal diagnosticului tardiv, în stadii depășite terapeutic, dar și răspunsului slab la tratamentele oncologice [1,2]. Cancerul pancreatic este o afecțiune cu rate de incidență și prevalență reduse. În aceste condiții, implementarea unor strategii de screening nu este fezabilă din punct de vedere al raportului cost-eficiență [3,4]. Cu toate acestea, ultimul ghid al Societății Americane de Gastroenterologie și Endoscopie, din anul 2022, recomandă screening pentru cancerul pancreatic la pacienții cu risc crescut, respectiv cei cu susceptibilitate genetică [5]. La această subpopulație se recomandă evaluare anuală prin ecoendoscopie sau rezonanță magnetică nucleară, vârsta de implementare a strategiei de screening variind între 35-50 ani în funcție de afecțiunea subiacentă [5]. Proporția pacienților cu susceptibilitate genetică pentru cancerul pancreatic, raportată la numărul total de pacienți diagnosticați cu această neoplazie, este însă mică, respectiv aproximativ 10% [5].

Cercetările ultimilor ani s-au focusat pe identificarea unor potențiali biomarkeri non-invazivi cu rol în stabilirea precoce a diagnosticului și evaluarea prognosticului acestor pacienți [6,7]. Obiectivul principal al acestor studii este reprezentat de creșterea procentului de pacienți diagnosticați într-un stadiu ce se pretează tratamentului chirurgical, în prezent aceasta fiind singura metodă terapeutică cu scop curativ. S-a demonstrat astfel potențialul diagnostic și prognostic al unor markeri proteomici, al ADN-ului liber circulant sau microARN-ului [6,7].

Una dintre afecțiunile cu risc de evoluție către cancer pancreatic este pancreatita cronică [8]. De asemenea, similitudinea între tablourile clinice, modificările imagistice și biochimice poate conduce la întârzierea diagnosticului de cancer pancreatic, catalogat inițial greșit drept pancreatită cronică [8].

Având în vedere toate aceste aspecte, ne-am propus identificarea unor biomarkeri non-invazivi cu rol în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic și, secundar, ameliorarea prognosticului acestor pacienți. În urma cercetării efectuate, am elaborat teza de doctorat intitulată **“Diagnosticul precoce al cancerului pancreatic”**. Aceasta este structurată în două părți principale: o parte generală, ce prezintă date cu privire la stadiul actual al cunoașterii în acest domeniu și o parte specială, ce prezintă contribuțiile personale.

Partea generală este subdivizată în două capitole care prezintă date epidemiologice și

etiopatogenice, respectiv managementul diagnostic al cancerului pancreatic. Aceste date au fost publicate în reviste ISI cu factor de impact, sub formă de articole tip review [7,9].

Capitolul 1 prezintă ratele de incidență, prevalență și mortalitate ale cancerului pancreatic la nivel mondial, clasificarea histopatologică a cancerului pancreatic, principalii factori de risc pentru această afecțiune malignă și mecanismele fiziopatologice ce justifică implicarea acestora în oncogeneza pancreatică.

Capitolul 2 prezintă date cu privire la diagnosticul clinic și imagistic al cancerului pancreatic, dar și rolul diagnosticului molecular în evaluarea pacienților cu această tip de cancer. Se evidențiază, de asemenea, provocările cu care se confruntă cercetarea din acest domeniu, respectiv, incidența redusă a adenocarcinomului pancreatic și necesitatea de colaborări mari naționale și internaționale pentru obținerea unui număr suficient de probe biologice, necesare identificării de noi biomarkeri [10]. O meta-analiză publicată în anul 2021 evidențiază heterogenitatea tumorilor pancreatice și necesitatea dezvoltării unor paneluri de biomarkeri pentru a crește sensibilitatea, specificitatea și acuratețea diagnostică a acestora [10].

Secțiunea dedicată contribuțiilor personale este structurată în cinci capitole principale. Primele două capitole prezintă ipoteza de lucru și obiectivele generale, respectiv metodologia generală a cercetării, iar ultimele trei capitole, rezultatele studiilor clinice și experimentale, desfășurate pe parcursul cercetării doctorale. La finalul tezei de doctorat sunt evidențiate concluziile și contribuțiile personale, iar într-o secțiune separată sunt prezentate referințele bibliografice și anexele.

Contribuții personale

Capitolul 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării

Cancerul pancreatic este una dintre cele mai agresive forme de cancer, cu rate foarte mari de deces. Prognosticul negativ se datorează în principal diagnosticului tardiv, în stadii avansate, depășite terapeutic, dar și răspunsului slab la tratamente oncologice. Pe de altă parte, implementarea unor strategii de screening pentru cancerul pancreatic nu este fezabilă din punct de vedere al raportului cost-eficiență.

Metodologiile de cercetare care implică utilizarea unor probe biologice de la pacienți deja diagnosticați cu adenocarcinom pancreatic pot conduce la identificarea unor biomarkeri ce vor indica însă prezența bolii simptomatice [10]. O strategie alternativă este reprezentată

de utilizarea unor probe biologice de la pacienți cu leziuni premaligne (neoplazie intraepitelială pancreatică, neoplasm mucinos papilar intraductal sau neoplasm chistic mucinos) sau de la pacienți ce prezintă afecțiuni pancreatice, cu potențial dovedit de transformare malignă (pancreatită cronică) [10].

Cercetarea modificărilor moleculare care au loc în timpul progresiei secvențiale de la leziunea inițială către cancer pancreatic poate genera o mai bună înțelegere a procesului de oncogeneză pancreatică [10]. De asemenea, ne poate oferi o bază pentru proiectarea unor viitoare strategii de cercetare, cu scopul identificării unor biomarkeri cu rol în diagnosticul precoce al acestei malignități [10]. Mai mult, utilizarea grupurilor de risc ca martori și combinarea markerilor moleculari cu caracteristicile clinice pot conduce la identificarea unor biomarkeri capabili să selecteze populațiile cu risc crescut de evoluție către cancer pancreatic [10]. Scopul final este reprezentat de extensia subgrupelor de pacienți la care este fezabilă implementarea unor strategii de screening pentru detectarea precoce a cancerului pancreatic. Cea mai frecvent utilizată probă biologică pentru identificarea de noi biomarkeri este sângele, datorită accesibilității și costurilor mici pe care le implică [11].

Există astfel, o nevoie urgentă de identificare a grupurilor din populația generală care au risc crescut de cancer pancreatic în vederea implementării unor strategii de urmărire atentă a acestora [12]. O serie de studii clinice au raportat, la pacienții cu adenocarcinom ductal pancreatic, în special la cei cu formațiuni tumorale subcentimetrice, rate mai bune de supraviețuire, comparativ cu pacienții cu boală avansată [13]. Pe de altă parte, opțiunile de tratament pentru pacienții cu cancer rezecabil continuă să se îmbunătățească, incluzând aici disponibilitatea terapiei neoadjuvante multimodale, dar și dezvoltarea regimurilor chimioterapice adjuvante [13]. În aceste condiții, creșterea procentului de pacienți diagnosticați într-un stadiu precoce, de la 15-20% în prezent, la 50% ar putea conduce la o ameliorare substanțială a ratelor de supraviețuire a acestora [13].

Având în vedere toate aspectele menționate mai sus, ne-am propus să studiem potențiali biomarkeri non-invazivi, utili în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic, care s-ar putea aplica pe scară largă pentru ameliorarea prognosticului acestora. Având în vedere corelația dintre pancreatita cronică și riscul de evoluție către cancer pancreatic, precum și numărul limitat de studii existente în prezent, care să evalueze comparativ cele două loturi de pacienți, am decis urmărirea unor biomarkeri cu potențial în selecția mai avansată a pacienților cu risc de transformare malignă. Am definit astfel, trei cohorte de studiu: pacienți cu pancreatită cronică, pacienți cu cancer pancreatic și subiecți sănătoși distribuiți pe grupe de vârstă și sex similare cu ale pacienților din primele două loturi. Un alt

aspect important urmărit în studiul nostru a fost raportul cost-eficiență. În aceste condiții, ne-am concentrat pe utilizarea unor probe de sânge, ușor de recoltat, fără riscuri semnificative pentru pacient și implicând totodată, costuri mici.

Scopul principal al studiului constă în identificarea unor potențiali biomarkeri non-invazivi, cost-eficienți, cu rol în detectare precoce a cancerului pancreatic. Astfel, am analizat expresia unor paneluri de proteine plasmatică, citokine, chemokine, factori de creștere, markeri de angiogeneză și alte proteine solubile, dar și expresia micro-ARN-urilor ce țintesc cele mai relevante căi de semnalizare și gene asociate specific cu afecțiuni oncologice.

Printre obiectivele secundare, menționăm:

- a. Identificarea unor factori de risc pentru transformare malignă în rândul pacienților cu pancreatită cronică.
- b. Evaluarea comparativă a profilului plasmatic de citokine, chemokine, factori de creștere și alte proteine solubile la trei categorii de pacienți: pacienți diagnosticați cu pancreatită cronică, pacienți diagnosticați cu cancer pancreatic, și un lot martor alcătuit din subiecți sănătoși, cu distribuție pe grupe de vârstă și sex similară cu cea a pacienților din primele două loturi.
- c. Evaluare comparativă a profilului plasmatic al microARN la pacienții cu cancer pancreatic versus subiecții sănătoși.
- d. Evaluarea cost-eficienței implementării acestor biomarkeri în strategia de urmărire pe termen lung a pacienților cu pancreatită cronică, raportat la morbi-mortalitatea pacienților cu cancer pancreatic.

Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării

Designul studiului: studiu prospectiv, nerandomizat.

Alegerea subiecților: au fost înrolați 120 pacienți ai Spitalului Clinic de Urgență București, 60 cu pancreatită cronică, 60 cu cancer pancreatic, pe o perioadă de 2,5 ani (ianuarie 2020 – mai 2023). Diagnosticul de certitudine s-a stabilit în urma examenului histopatologic pe probe tisulare obținute prin biopsie cu ac fin ghidată ecoendoscopic (EUS-FNB). Toți pacienții incluși în studiu au semnat un consimțământ informat prin care și-au exprimat acordul pentru prelucrarea unor date cu caracter personal, precum și pentru recoltarea unor probe biologice (sânge).

Studiul a primit acordul comisiei de etică a cercetării a Spitalului Clinic de Urgență București (nr 3929/12.04.2021). De asemenea, s-a stabilit un acord (contract-cadru) de

colaborare în activitatea de cercetare, între Spitalul Clinic de Urgență București și Institutul de Virusologie Ștefan S. Nicolau București (nr 560/12.04.2022) ce a permis prelucrarea probelor biologice în cadrul Institutului de Virusologie Ștefan S. Nicolau.

Criteriile de includere:

- Lotul 1: 60 pacienți cu diagnostic histopatologic de cancer pancreatic.
- Lotul 2: 60 pacienți cu diagnostic histopatologic de pancreatită cronică, cunoscută a fi un factor de risc major pentru dezvoltarea cancerului pancreatic.
- Lotul 3: 10 subiecți sănătoși, cu distribuție pe grupe de vârstă și sex similară cu cea a pacienților din primele două loturi.

Criteriile de excludere:

- Refuzul semnării consimțământului informat privind participarea la studiu.
- pacienți care au asociat malignități cu altă localizare, pentru a reduce ratele de eroare.
- pacienți la care nu s-au putut identifica o serie de variabile paraclinice urmărite în cadrul studiului.
- pacienți cu probe de sânge neconforme (hemolizate), ce nu au permis prelucrarea corectă ulterioară.
- pacienți la care nu s-a putut recolta o cantitate suficientă de sânge (deshidratați/sub chimioterapie).
- pacienți la care cantitatea de plasmă nu a fost suficientă pentru determinările biologice și moleculare incluse în metodologia de cercetare.

Pentru analiza statistică a datelor epidemiologice, clinice și paraclinice am utilizat programul R, cu următoarele pachete încărcate: effects, ggplot2, ggpubr, gtsummary, logisticRR. Am stabilit nivelul de semnificație α 0.05, astfel că valorile $p < 0.05$ au fost considerate cu semnificație statistică. Pentru analiza statistică a rezultatelor studiului proteomic am utilizat programul GraphPad-Prism 9.0.

Capitolul 5. Date clinice și biologice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică

Introducere. În ciuda progreselor înregistrate în diagnosticul imagistic, diferențierea adenocarcinomului ductal pancreatic de pancreatita cronică rămâne o provocare [14]. Pancreatita cronică se poate prezenta imagistic ca o masă tumorală, fiind în același timp un factor de risc major pentru cancerul pancreatic [14]. Diferențierea dintre cele două afecțiuni este esențială pentru evaluarea prognosticului pacienților și stabilirea managementului terapeutic optim. Mai mult, au existat situații în care examenul histopatologic al piesei de

rezeecție chirurgicală a relevat diagnosticul inițial eronat între o leziune pancreatică benignă și una malignă [14]. Având în vedere prognosticul negativ al pacienților cu cancer pancreatic, datorat, în principal, diagnosticului tardiv, în stadii depășite terapeutic, ne-am propus efectuarea unui studiu al cărui scop principal a fost reprezentat de identificarea unor elemente clinice și paraclinice care să contribuie la stabilirea diagnosticului diferențial dintre pancreatita cronică și cancerul pancreatic. Evitarea unei confuzii diagnostice între cele două afecțiuni, ar permite evitarea unei întârzieri în diagnosticul cancerului pancreatic. Detectarea precoce a acestei malignități este extrem de importantă deoarece poate crește procentul pacienților eligibili pentru tratament chirurgical, singura metodă terapeutică cu potențial curativ, în prezent.

Material și metodă. Am realizat un studiu prospectiv, observațional, nerandomizat în care au fost înrolați 120 pacienți ai Spitalului Clinic de Urgență București, pe o perioadă de 2,5 ani.

Criteriile de includere au fost reprezentate de:

Lotul 1: pacienți cu cancer pancreatic în stadiile III-IV.

Lotul 2: pacienți cu pancreatită cronică.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de:

- prezența la momentul înrolării a antecedentelor personale patologice de cancer cu altă localizare sau cancere sincrone (pentru evitarea unor factori de eroare).
- lipsa consimțământului informat.
- pacienți ale căror documente medicale au prezentat vicii de completare.

Analiza statistică. Datele colectate au fost centralizate într-o bază de date Microsoft Excel. Ulterior, pentru analiza statistică, am folosit programul R cu următoarele pachete încărcate: effects, ggplot2, ggpubr, gtsummary, logisticRR. Nivelul de semnificație α a fost de 0.05, astfel că valorile p mai mici de 0.05 au fost considerate cu semnificație statistică. Distribuția gaussiană a fost verificată prin utilizarea testului Shapiro-Wilk și a graficelor de quantila-quantila (qq plots).

Rezultate și discuții. Analizată comparativ, rata de risc relativ de cancer pancreatic versus pancreatită cronică s-a dovedit a fi de două ori mai mare la sexul feminin comparativ cu sexul masculin (95% CI 0,27-0,83), iar creșterea vârstei pacientului cu 1 an a condus la o creștere a odds ratio de cancer pancreatic cu 12% (95% CI 2,94 – 31,2). Aceste rezultate corespund cu cele din literatura de specialitate. Wang *et al.* subliniază un raport al riscului de pancreatită cronică la bărbați versus femei egal cu 4:5 [15]. Studiile pe animale au demonstrat implicarea estradiolului în patogeneza pancreatitei cronice [16]. Astfel,

tratamentul cu estradiol se pare că atenuază apoptoza celulelor acinare, independent de unii factori precum modificările mediate de celulele T sau nivelurile de corticosteron sau testosteron [16]. În ceea ce privește indicele de masă corporală (IMC), consumul de alcool și fumatul, nu s-au identificat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri de pacienți, ceea ce se poate explica prin faptul că atât fumatul cât și consumul de alcool sunt factori de risc cunoscuți pentru ambele afecțiuni. De asemenea, pacienții cu pancreatită cronică dezvoltă de obicei, în evoluție sindroame de malabsorbție, ca urmare a insuficienței pancreatice exocrine și inflamației cronice, iar pacienții cu cancer pancreatic asociază sindrom consumptiv, rezultatul final fiind scăderea ponderală. În ceea ce privesc antecedentele personale patologice și cele heredocolaterale, studiul nostru a identificat o singură corelație cu semnificație statistică, respectiv între istoricul de pancreatită acută și riscul de evoluție către pancreatită cronică ($p < 0,001$). În a doua etapă a acestui studiu am analizat o serie de parametri biologici, determinați de obicei, de rutină, la prima vizită la medic. Am identificat astfel, în rândul pacienților cu cancer pancreatic, valori mai mari ale aspartat aminotransferazei ($p = 0,005$), alanin aminotransferazei ($p = 0,006$), bilirubinei totale ($p < 0,001$), bilirubinei directe ($p < 0,001$), fosfatazei alcaline ($p = 0,030$), proteinei C reactive ($p = 0,049$) și acidului uric ($p = 0,001$) [8]. În contrast, pacienții cu pancreatită cronică, comparativ cu cei cu cancer pancreatic, au avut valori serice mai mari ale amilazei ($p = 0,020$) și lipazei ($p = 0,029$). O altă categorie de markeri evaluați au fost markerii tumorali antigenul carbohidrat 19-9 (CEA19-9) și antigenul carcinoembrionar (CEA). Numărul de pacienți, la care au fost determinați acești markeri, a fost însă mic, motiv pentru care diferențele nu s-au dovedit semnificative statistic. Cu toate acestea, pacienții cu cancer pancreatic au avut valori ale CEA de aproximativ două ori mai mari comparativ cu cei cu pancreatită cronică, iar ale CA-19-9 de aproximativ 70 ori mai mari [8].

Capitolul 6. Rolul analizei proteomice în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic

Introducere. Pentru ameliorarea prognosticului pacienților cu cancer pancreatic, cercetările ultimilor ani s-au focusat pe identificarea unor biomarkeri cu rol în diagnosticul precoce al acestei neoplazii. Progresele înregistrate în domeniul diagnosticului molecular, incluzând detectarea de proteine, ADN liber circulant sau microARN, s-au dovedit a fi promițătoare pentru diagnosticul precoce al cancerului pancreatic [7]. Un avantaj important al acestor tehnici moleculare este caracterul lor non-invaziv [7].

Scopul studiului nostru este reprezentat de identificarea unor potențiali biomarkeri

non-invazivi cu rol în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic. Am realizat astfel o analiză proteomică de screening, pe pooluri de plasmă, de la pacienți cu cancer pancreatic versus pacienți cu pancreatită cronică, utilizând un kit multianalit. În urma acestei analize am identificat o singură proteină plasmatică cu valori semnificativ crescute la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică, respectiv leptina. Ulterior, am urmărit validarea acestor rezultate prin determinarea cantitativă a concentrațiilor leptinei în probe individuale de plasmă, utilizând tehnica ELISA. Dovezile privind rolul potențial al Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 (CEACAM1) în detectarea precoce a cancerului pancreatic, precum și corelația pozitivă dintre acest biomarker și indicele de masă corporală, similar leptinei, ne-au determinat să evaluăm simultan cu expresia leptinei, și expresia CEACAM1 [17,18]. Mai mult, CEACAM1 pare a regla expresia leptinei, prin interferența cu anumite căi de semnalizare implicate și în oncogeneză.

Material și metodă. Am realizat un studiu prospectiv, experimental, pe o durată de 2,5 ani, în care am definit trei loturi de subiecți: lotul 1 alcătuit din 30 pacienți cu cancer pancreatic, lotul 2 alcătuit din 30 pacienți cu pancreatită cronică și lotul 3, alcătuit din 10 subiecți sănătoși, distribuiți pe grupe de vârstă și sex similare cu ale pacienților din primele două loturi. Acest studiu a fost aprobat de către comisia de etică a Spitalului Clinic de Urgență București (nr 3929/12.04.2021) și condus după principiile Declarației de la Helsinki. Toți subiecții incluși în studiu au semnat un consimțământ informat prin care și-au dat acordul cu privire la prelucrarea unor date cu caracter personal și recoltarea unor probe de sânge. Diagnosticul de certitudine s-a stabilit în urma examenului histopatologic. Probele biologice au fost obținute prin EUS-FNB.

De la fiecare subiect inclus în studiu am recoltat 6 ml sânge (câte 2 eprubete cu acid etilendiaminotetraacetic-EDTA). Am transportat probele de sânge în maxim două ore la Institutul de Virusologie Ștefan S. Nicolau, unde le-am centrifugat pentru a izola plasmă (două tuburi Eppendorf cu câte 1,5 ml plasmă de la fiecare pacient). Ulterior, am depozitat plasma în congelatoare, la -80 grade Celsius.

Analiza proteomică comparativă pe pool-uri de plasmă la cele trei loturi de pacienți. În etapa de screening a analizei proteomice am folosit Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, R&D Systems, Abingdon, UK) bazat pe tehnica dot-blot, pentru determinarea semicantitativă simultană a 105 analiți (citokine, chemokine, markeri de angiogeneză, factori de creștere și alte proteine solubile) în pooluri de plasmă de la cele trei categorii de subiecți.

Determinarea cantitativă a concentrațiilor plasmatice ale leptinei și CEACAM1

utilizând tehnica *ELISA*. Pentru validarea rezultatelor pe probe individuale, am utilizat kiturile *ELISA* Invitrogen KAC2281 și ab215540 Human CEACAM1 Simple Step.

Rezultate și discutii. Analiza statistică a identificat o similitudine relativă între expresia proteinelor plasmatice la pacienții cu cancer pancreatic și cei cu pancreatită cronică, comparativ cu subiecții sănătoși. Astfel, proteinele cu expresie crescută la ambele categorii de pacienți, au fost: apolipoproteinele A-I, B-cell activating factor (BAFF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), componentele complementului C5/C5a, ligandul CD 40 /TNFSF5, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), growth differentiation factor 15 (GDF-15), Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3), IL-1alfa (IL-1F1), vitamina D BP, T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), mieloperoxidaze, MIG, matrix metaloproteinaza 9 (MMP-9), platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA), platelet-derived growth factor AB/BB (PDGF AB/BB), pentraxina 3/TSG-14, suppression of tumorigenicity 2 protein ST2 (IL2 R4) și trefoil factor 3 (TFF3). În contrast, adiponectina, DPP-IV, IL-1ra și leptina au avut expresie crescută doar la pacienții cu cancer pancreatic (comparativ cu subiecții sănătoși) iar angiopoietina-2, kallikrein 3 și lipocalin 2, doar la pacienții cu pancreatită cronică.

Analiza comparativă a expresiei proteinelor plasmatice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică a identificat o singură proteină cu expresie crescută, respectiv leptina ($\times 6,3$ FC). Am validat aceste rezultate prin tehnica *ELISA*, pe probe individuale de plasmă, dovedind concentrații plasmatice mai mari la pacienții cu cancer pancreatic versus cei cu pancreatită cronică (59,41 ng/ml versus 17,96 ng/ml; $p=0,0405$). Această diferență s-a menținut semnificativă statistic, independent de alți factori, precum IMC-ul, sexul, vârsta, fumat, consumul de alcool, istoricul de diabet zaharat, nivelul seric al trigliceridelor și colesterolului.

Pentru întărirea acestor rezultate, am continuat experimentele cu determinarea cantitativă, prin metoda *ELISA*, a CEACAM1. Motivul care ne-a condus la determinarea CEACAM1 a fost reprezentat de dovezile implicării acestuia în oncogeneza pancreatică, dar și în reglarea expresiei leptinei. Am identificat astfel valori plasmatice ale CEACAM1 semnificativ statistic mai mari la pacienții cu cancer pancreatic comparativ cu cei cu pancreatită cronică (12,75 ng/ml versus 9,89 ng/ml, $p=0,0282$). Cu toate acestea, rezultatele privind corelația dintre expresia plasmatică a celor doi biomarkeri nu au fost semnificative statistic.

În continuare am urmărit identificarea altor parametri care pot influența expresia

leptinei și CEACAM1 la cele două categorii de pacienți, prin analize de regresie lineară simplă și ulterior, multiplă. Am identificat astfel, creșterea nivelului plasmatic al leptinei, independent de alți parametri precum vârstă, sex, IMC, fumat, consumul de alcool, istoricul de diabet zaharat, nivelul seric al trigliceridelor și colesterolului. În contrast, concentrația plasmatică a CEACAM1 s-a dovedit a fi dependentă de parametri multipli, precum diagnosticul de cancer pancreatic sau pancreatită cronică (p 0,029, 95%CI 24,67 – 460,1), sex (p 0,001, 95% CI -588,1 - -157,3) IMC (p 0,0077, 95%CI 8,73 – 54,27) și nivelul seric al trigliceridelor (p 0,0002, 95%CI 1,11 – 3,39). Putem astfel să explicăm lipsa de corelație dintre expresia plasmatică a celor doi biomarkeri, în ciuda nivelurilor serice mai mari ale ambilor, la pacienții cu cancer pancreatic. De asemenea, ridicăm ipoteza utilității monitorizării concentrațiilor serice ale leptinei la pacienții cu pancreatită cronică, în vederea detectării precoce a transformării maligne a leziunilor pancreatice.

Leptina este o adipokină, codificată de gena LEP, sintetizată la nivelul țesutului adipos, cu rol în reglarea apetitului, metabolismului lipidelor, homeostaziei glucozei și greutateii corporale [19,20]. Leptina acționează prin intermediul unui receptor transmembranar respectiv, Ob-R [20]. Expresia receptorului Ob-R s-a identificat la nivelul multor țesuturi gastrointestinale și linii celulare tumorale [21,22]. Mai mult, unele tumori pot exprima atât leptina, cât și receptorul Ob-R, permițând astfel semnalizarea autocrină [23]. Implicarea leptinei în oncogeneză poate fi explicată prin efecte precum promovarea proliferării, migrării, invaziei celulare și angiogenezei tumorale sau inhibarea apoptozei celulelor tumorale [22]. Mai mult, leptina poate inhiba activitatea celulelor T reglatoare, influențând procesul de supraveghere imună a cancerelor gastrointestinale [24]. În teza de doctorat sunt prezentate pe larg căile de semnalizare cu care interferă leptina în procesul de oncogeneză.

Moleculele CEACAM aparțin familiei de imunoglobuline legate de glicozilfosfatidilinositol și se găsesc la suprafața a numeroase tipuri de celule, inclusiv celulele epiteliale și endoteliale [25]. Aceste molecule sunt implicate în reglarea ciclului celular și adeziunii celulare, semnalizării intercelulare și intracelulare, proceselor inflamatorii, angiogenezei, progresiei proceselor tumorale și metastazării [25]. CEACAM1, poate acționa ca un senzor molecular la suprafața celulei, reglând semnalizarea celulară [25]. Acest biomarker este, de asemenea, un ligand al receptorului de insulină, iar activarea sa de către tirozin kinaza acestui receptor inițiază o cascadă de căi de semnalizare, implicate în creșterea și proliferarea celulară [26]. Wei *et al.* au raportat supraexpresia receptorului DcR3 în plasma pacienților cu cancer pancreatic, dar și la nivelul țesutului tumoral [27]. DcR3 s-a

asociat cu o intensificare a fosforilării signal transducers and activators of transcription (STAT1) și secundar, stimularea expresiei și activității factorului 1 de reglare al interferonului (IRF1) [27]. DcR3/STAT1/IRF1 au creat o buclă de feedback pozitiv, care a crescut activitatea transcripțională a CEACAM1 în cancerul pancreatic [27]. Pinkert *et al.* au demonstrat recent rolul CEACAM6 în supresia unor răspunsuri antitumorale precum moartea celulară mediată de celulele T sau secreția de citokine [28]. Activitatea imunosupresoare a CEACAM6 este mediată de legarea la CEACAM1, de la nivelul celulelor T activate [28].

Studiul nostru formulează concluzia conform căreia identificarea unor valori serice crescute ale leptinei, la pacienții cu pancreatită cronică, ar trebui să conducă la ridicarea suspiciunii de transformare malignă și extensia managementului diagnostic. Scopul final este reprezentat de detectarea cancerului pancreatic într-un stadiu incipient, eligibil pentru tratament chirurgical în scop curativ.

Capitolul 7. Rolul microARN-ului în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic

Introducere. MicroARN-urile sunt molecule mici de ARN, formate din 19-24 de nucleotide, care joacă un rol vital în expresia genetică posttranscripțională [29]. Natura agresivă a neoplasmelor maligne pancreatice și absența unor biomarkeri cu rol diagnostic au condus la cercetarea microARN-urilor ca instrument promițător pentru dezvoltarea unor scoruri de predicție, precum și pentru ameliorarea managementului terapeutic al acestor pacienți [30,31]. Rolul cardinal al microARN-urilor în procese biologice cheie precum, supraviețuirea, apoptoza și proliferarea celulară, invazia, metastazarea și răspunsul la medicamente evidențiază potențialul lor ca ținte diagnostice, prognostice și terapeutice [29,32]. De asemenea, se cunosc puține date cu privire la comunicarea intercelulară mediată de microARN în cancerul pancreatic [29,32]. Restabilirea nivelurilor unor microARN-uri supresoare tumorale și inhibarea microARN-urilor oncogenice la nivelul țesutului sănătos, ar putea fi benefică în menținerea mecanismelor endogene de reglare anti-tumorală [29,32]. În ciuda progreselor extraordinare în acest domeniu, utilizarea microARN-urilor ca țintă terapeutică în cancerul pancreatic, se confruntă cu limitări majore [29,32]. Una dintre cele mai importante este reprezentată de necunoașterea potențialelor efecte și nivelurilor de toxicitate ale acestor molecule, modificate chimic, asupra celulelor sănătoase [29,32]. În concluzie, cancerul pancreatic rămâne o cauză principală de deces la nivel mondial, iar rolul microARN-urilor în managementul acestor pacienți reprezintă o speranță pentru ameliorarea prognosticului lor.

Având în vedere numărul limitat de studii cu privire la expresia plasmatică a microARN-urilor la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu subiecții sănătoși, am ales această temă ca obiectiv principal pentru următorul studiu. Am definit, astfel, două loturi de studiu: lotul 1- 23 pacienți cu cancer pancreatic, lotul 2 – 10 subiecți sănătoși distribuiți pe grupe de vârstă și sex similare cu ale pacienților din primul lot. Utilizând tehnica real time PCR am efectuat initial o etapă de screening în pool-uri de plasmă de la cele două grupuri de studiu pentru un panel de 176 microARN. În urma acestei etape, am identificat 23 microARN-uri supraexprimate la pacienții cu cancer pancreatic versus lotul control, rezultate pe care le-am validat, ulterior, prin determinări cantitative în probe individuale de plasmă.

Material și metodă. Am realizat un studiu experimental, în care am inclus 23 de pacienți cu cancer pancreatic în stadiile III sau IV de boală și 10 subiecți sănătoși distribuiți pe grupe de vârstă și sex similare. De la fiecare pacient am recoltat 6 ml de sânge în eprubete cu EDTA, pe care le-am transportat în maxim două ore la Institutul de Virusologie Ștefan S. Nicolau, București. Menționăm semnarea unui consimțământ informat de către fiecare pacient, anterior includerii în studiu, prin care și-au dat acordul cu privire la utilizarea unor date cu caracter personal și la recoltarea unor probe de sânge, pentru analiza genomică.

În prima etapă, am centrifugat probele și am izolat plasmă în tuburi Eppendorf, pe care le-am depozitat la -80 grade Celsius. În etapa a doua am efectuat un screening pentru 176 de microARN la pacienții cu cancer pancreatic versus subiecții control, în pool-uri de plasmă. Ulterior, micro-ARN-urile identificate în această etapă ca având expresie crescută la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu subiecții sănătoși, au fost evaluate în probe individuale de plasmă, utilizând tehnica real time PCR.

Datele au fost introduse într-o bază de date Microsoft Excel, iar pentru analiza statistică am utilizat programul GraphPad Prism 9.

Rezultate și discuții. În urma etapei de screening, am identificat supraexpresia a 23 dintre acestea, la pacienții cu cancer pancreatic versus subiecții sănătoși. În etapa a doua a studiului am validat supraexpresia miR-34a-5p, miR-100-5p, miR-193-5p, miR-122-5p și miR-885-5p în probe individuale de plasmă. Prin utilizarea testului Mann-Whitney am evidențiat o creștere semnificativă statistic pentru toate aceste cinci microARN-uri, în plasma pacienților cu cancer pancreatic, comparativ cu subiecții control.

În vederea identificării altor parametri care puteau influența expresia acestor microARN-uri la pacienții cu cancer pancreatic, am continuat analiza statistică cu o regresie lineară simplă, în care variabila dependentă a fost concentrația plasmatică a microARN, iar

variabilele independente, stadiul tumoral, fumatul, consumul de alcool, istoricul de pancreatită acută/cronică, diabetul zaharat, dar și concentrațiile plasmatiche ale leptinei și CEACAM1, determinate prin metoda ELISA în studiul anterior. Am identificat astfel, un singur factor care a influențat variația expresiei miR-34a-5p, miR-100-5p, miR-193-5p, miR-122-5p și miR-885-5p la pacienții cu cancer pancreatic, respectiv stadiul tumoral. Subliniem astfel, nu doar supraexpresia acestor cinci microARN-uri la pacienții cu cancer pancreatic, dar și rolul lor prognostic.

Sunt necesare însă studii viitoare, pe cohorte mai mari de pacienți care să valideze aceste rezultate. De asemenea, subliniem necesitatea evaluării expresiei acestor microARN-uri la pacienți cu cancer pancreatic în stadiu incipient sau cu leziuni premaligne.

Capitolul 8. Concluzii și contribuții personale

În cadrul cercetării doctorale am identificat o serie de variabile clinice și biologice ce pot contribui la diagnosticul precoce al cancerului pancreatic, atingând astfel, obiectivele propuse.

În prima etapă a cercetării doctorale am efectuat un studiu prospectiv, observațional, în care am urmărit identificarea unor markeri clinici și paraclinici, evaluați de rutină, care să contribuie la diagnosticul diferențial între pancreatita cronică și cancerul pancreatic, evitând astfel întârzieri în detectarea transformării maligne. Am identificat, astfel la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu cei cu pancreatită cronică, valori serice mai mari ale transaminazelor, bilirubinei totale, bilirubinei directe, fosfatazei alcaline, proteinei C reactive și acidului uric. De asemenea, la această subpopulație de pacienți a dominat sexul feminin ($p=0,001$) și vârsta peste 60 ani ($p<0,001$). În contrast, pacienții cu pancreatită cronică, comparativ cu cei cu cancer pancreatic, au prezentat valori ușor mai crescute ale amilazei și lipazei serice. Având în vedere faptul că toți acești parametri sunt evaluați de rutină, la prima vizită la medic, o analiză atentă ne poate orienta preferențial către una dintre cele două afecțiuni, ghidând managementul diagnostic ulterior.

În a doua etapă a cercetării doctorale, pornind de la o analiză extensivă a expresiei plasmatiche a 105 citokine, chemokine, factori de creștere, markeri de angiogeneză și alte proteine solubile, la pacienți cu cancer pancreatic, pacienți cu pancreatită cronică și subiecți sănătoși, am identificat supraexpresia leptinei în cancerul pancreatic. Am validat aceste rezultate prin determinarea cantitativă, prin metoda ELISA, în probe individuale de plasmă, a concentrației leptinei. Am identificat astfel, valori plasmatiche mai mari ale acestui biomarker la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu cei cu pancreatită cronică,

diferența fiind cu semnificație statistică.

Un alt biomarker care s-a dovedit a fi implicat în oncogeneza pancreatică este CEACAM1. Mai mult, atât CEACAM1 cât și leptina inhibă activitatea celulelor T și a celulelor NK, influențând procesul de supraveghere imună. Studiul nostru demonstrează, de asemenea, concentrații mai mari ale CEACAM1 la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu cei cu pancreatită cronică. Cu toate acestea, expresia plasmatică a CEACAM1 s-a dovedit a fi dependentă de mai mulți parametri respectiv, diagnosticul de cancer pancreatic versus pancreatită cronică, sexul, IMC-ul și nivelul seric al trigliceridelor. Putem explica astfel, lipsa de corelație dintre variația expresiei plasmatice a CEACAM1 și variația expresiei leptinei (dependentă doar de diagnostic). Toate aceste rezultate întăresc ipoteza utilității leptinei în diagnosticul diferențial dintre cele două afecțiuni. Sugerăm astfel, eficacitatea monitorizării nivelurilor serice ale leptinei la pacienții cu pancreatită cronică, în vederea identificării transformării maligne.

Caracterul de noutate al studiului nostru derivă din evaluarea comparativă atât a concentrațiilor plasmatice ale leptinei, cât și ale CEACAM1, specific la pacienți cu cancer pancreatic versus pacienți cu pancreatită cronică. În prezent, există date care susțin implicarea acestor doi biomarkeri în carcinogeneza pancreatică, dar nu se cunoaște rolul lor în diferențierea cancerului pancreatic de pancreatita cronică. Limitarea studiului nostru este reprezentată de faptul că toți pacienții cu cancer pancreatic au prezentat stadii III sau IV de boală. Sunt necesare astfel, studii viitoare care să evalueze variația concentrațiilor serice ale leptinei și CEACAM1 între pancreatita cronică și stadiile incipiente ale cancerului pancreatic. De asemenea, o altă limitare a cercetării noastre este reprezentată de dimensiunea relativ mică a coortei de studiu. O provocare bine cunoscută cu care se confruntă cercetarea în acest domeniu este incidența scăzută a cancerului pancreatic și necesitatea unor colaborări naționale și internaționale, pentru a obține un număr suficient de probe biologice necesare pentru identificarea de noi biomarkeri.

În ultima etapă a cercetării doctorale am elaborat un studiu experimental în care am efectuat un screening, în pool-uri de plasmă, utilizând tehnica real time PCR, pentru 176 microARN. Dintre acestea, 23 s-au dovedit a fi supraexprimate la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu subiecții control. Ulterior am validat supraexpresia miR-34a-5p, miR-100-5p, miR-193-5p, miR-122-5p și miR-885-5p în probe individuale de plasmă. Am identificat astfel, prin utilizarea testului Mann-Whitney, o creștere semnificativă statistic pentru toate aceste cinci microARN-uri, în plasma pacienților cu cancer pancreatic, comparativ cu subiecții control. De asemenea, în urma unei analize de regresie simplă, am

identificat un singur factor care a influențat variația expresiei miR-34a-5p, miR-100-5p, miR-193-5p, miR-122-5p și miR-885-5p la pacienții cu cancer pancreatic, respectiv stadiul tumoral. Subliniem astfel, nu doar supraexpresia acestor cinci micro-ARN-uri la pacienții cu cancer pancreatic, dar și rol lor prognostic.

În concluzie, am identificat doi biomarkeri proteomici care pot contribui la detectarea precoce a cancerului pancreatic în rândul pacienților cu pancreatită cronică, respectiv leptina și CEACAM1. De asemenea, am validat cinci microARN-uri cu expresie crescută la pacienții cu cancer pancreatic, comparativ cu subiecții control, respectiv miR-34a-5p, miR-100-5p, miR-193-5p, miR-122-5p și miR-885-5p. Extrapolând aceste rezultate, sunt necesare studii viitoare care să vizeze elucidarea mecanismelor prin care acești biomarkeri sunt implicați în oncogeneza pancreatică. Dincolo de rolul lor diagnostic, acești biomarkeri pot reprezenta potențiale ținte terapeutice pentru dezvoltarea unor tratamente noi în vederea reducerii riscului de transformare malignă a unor afecțiuni pancreatice benigne, sau tratamentul cancerului pancreatic.

Bibliografie selectivă

1. Eissa MAL, Lerner L, Abdelfatah E, Shankar N, Canner JK, Hasan NM, Yaghoobi V, Huang B, Kerner Z, Takaesu F, et al. Promoter methylation of ADAMTS1 and BNC1 as potential biomarkers for early detection of pancreatic cancer in blood. *Clin Epigenetics*, 11, 59, 2019.
2. van Roessel S, Kasumova GG, Verheij J, Najarian RM, Maggino L, de Pastena M, Malleo G, Marchegiani G, Salvia R, et al. International validation of the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system in patients with resected pancreatic cancer. *JAMA Surg*, 153, e183617, 2018.
3. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 63, 318-348, 2013
4. Lennon AM, Wolfgang CL, Canto MI, Klein AP, Herman JM, Goggins M, Fishman EK, Kamel I, Weiss MJ, Diaz LA, et al. The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? *Cancer Res*, 74, 3381-3389, 2014
5. Sawhney MS, Calderwood AH, Thosani NC, Rebbeck TR, Wani S, Canto MI, Fishman DS, Golan T, Hidalgo M, Kwon RS, et al. ASGE Standards of Practice Committee. ASGE guideline on screening for pancreatic cancer in individuals with genetic susceptibility: summary and recommendations. *Gastrointestinal Endoscopy*, 95, 817-826, 2022.
6. Kaur S, Baine MJ, Jain M, Sasson AR, Batra SK. Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments. *Biomark Med*, 6, 597-612, 2012.
7. Gheorghe G, Bungau S, Ilie M, Behl T, Vesa CM, Brisc C, Bacalbasa N, Turi V, Costache RS, Diaconu CC. Early diagnosis of pancreatic cancer: the key for survival. *Diagnostics*, 10, 869, 2020.
8. Gheorghe G, Ionescu VA, Moldovan H, Diaconu CC. Clinical and biological data in patients with pancreatic cancer vs. chronic pancreatitis – a single center comparative analysis. *Diagnostics*, 13, 369, 2023.
9. Diaconu CC, Gheorghe G, Hortopan A, Enache V, Ceobanu G, Jinga V, Adrian C, Ionescu VA. Pancreatic tuberculosis- a condition that mimics pancreatic cancer. *Medicina*, 58, 1165, 2022.
10. Pereira SP, Oldfield L, Ney A, Hart PA, Keane MG, Pandol SJ, Li D, Greenhalf W, Jeon CY, Koay EJ, Almario CV, Halloran C, Lennon AM, Costello E. Early detection of

- pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 5, 698-710, 2021.
11. Ansari D, Torén W, Zhou Q, Hu D, Andersson R. Proteomic and genomic profiling of pancreatic cancer. *Cell Biol. Toxicol*, 35, 333–343, 2019.
 12. Soreide K, Ismail W, Roalso M, Ghotbi J, Zaharia C. Early Diagnosis of Pancreatic cancer: clinical premonitions, timely precursor detection and increased curative-intent surgery. *Cancer Control*, 30, 10732748231154711, 2023.
 13. Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. Early detection of pancreatic cancer: opportunities and challenges. *Pancreatic Cancer*, 156, 2024-2040, 2019.
 14. Hamsen FJ, Domagk D, Dietrich CF, Hocke M. Discriminating chronic pancreatitis from pancreatic cancer: contrast enhanced EUS and multidetector computed tomography in direct comparison. *Endosc Ultrasound*, 7, 395-403, 2018.
 15. Wang M, Gorelick F, Bhargava A. Sex differences in the exocrine pancreas and associated diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 12, 427-441, 2021.
 16. Nakamura S, Yamada T, Hashimoto T, Takahashi S, Sogawa M, Ohara H, Nakazawa T, Sano H, Kuno A, Joh T, Nomura T, Arakawa T, Itoh M. Estradiol alleviates acinar cell apoptosis and chronic pancreatitis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Pancreas*, 26, e59–e66, 2003.
 17. Simeone SM, Ji B, Banerjee M, Arumugam T, Li D, Anderson M, Bamberger AM, Greenon J, Brand R, Ramachandran V, et al. CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas*, 34, 436-443, 2007.
 18. Najjar S, Russo L. CEACAM1 loss links inflammation to Insulin Resistance in obesity and Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Semin Immunopathol*, 36, 55-71, 2013.
 19. Stolzenberg-Solomon RZ, Newton CC, Silverman DT, Pollak M, Nogueira LM, Weinstein SJ, Albanes D, Mannisto S, Jacobs EJ. Circulating Leptin and Risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis From 3 Cohorts. *Am J Epidemiol*, 182, 187-197, 2015.
 20. Marroquí L, Gonzalez A, Ñeco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol*, 491, R9–R17, 2012.
 21. Chan JL, Blüher S, Yannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes*, 51, 2105-12, 2002.
 22. Alemán JO, Eusebi LH, Ricciardiello L, Patidar K, Sanyal AJ, Holt PR. Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. *Gastroenterology*, 1462, 357–373, 2002.

23. Sennello JA, Fayad R, Morris AM, Eckel RH, Asilmaz E, Montez J, Friedman JM, Dinarello CA, Fantuzzi G. Regulation of T cell-mediated hepatic inflammation by adiponectin and leptin. *Endocrinology*, 146, 2157–64, 2005.
24. Hoda MR, Keely SJ, Bertelsen LS, Junger WG, Dharmasena D, Barrett KE. Leptin acts as a mitogenic and antiapoptotic factor for colonic cancer cells. *Br J Surg*, 94, 346–54, 2007.
25. Zinczuk J, Zareba K, Romaniuk W, Kaminska D, Niziol M, Baszun M, Kedra B, Guzinska-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*, 16, 583-592, 2019.
26. Ling Y, Wang J, Wang L, Hou J, Qian P, Xiang-Dong W. Roles of ceacam1 in cell communication and signaling of lung cancer and other diseases. *Cancer Metastasis Rev*, 34, 347–57, 2015.
27. Wei Y, Chen X, Yang J, Yao J, Yin N, Zhang Z, Li D, Zhu D, Zhou J. DcR3 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer via a DcR3/STAT1/IRF1 feedback loop. *Am J cancer Res*, 9, 2618-2633, 2019.
28. Pinkert J, Boehm HH, Trautwein M, Doecke WD, Wessel F, Ge Y, Gutierrez EM, Carretero R, Freiberg C, Gritzan U, et al. T cell-mediated elimination of cancer cells by blocking CEACAM6–CEACAM1 interaction. *Oncoimmunology*, 11, 2008110, 2022.
29. Rawat M, Kadian K, Gupta Y, Kumar A, Chain PSG, Kovbasnjuk O, Kumar S, Parasher G. MicroRNA in pancreatic cancer: from biology to therapeutic potential. *Genes*, 10, 752, 2019.
30. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843–854, 1993.
31. Daoud AZ, Mulholland EJ, Cole G, McCarthy HO. MicroRNAs in pancreatic cancer: biomarkers, prognostic and therapeutic modulators. *BMC Cancer*, 19, 1130, 2019.
32. Li Y, Sarkar FH. MicroRNA targeted therapeutic approach for pancreatic cancer. *Int J Biol Sci*, 12, 326–337, 2016.

Listă cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI Clarivate Analytics cu factor de impact

1. **Gheorghe G**, Bungau S, Ilie M, Behl T, Vesa CM, Brisc C, Bacalbasa N, Turi V, Costache RS, Diaconu CC. Early diagnosis of pancreatic cancer: the key for survival. *Diagnostics*, 10(11), 869, 2020. <https://doi.org/10.3390%2Fdiagnostics10110869>. IF 3.6. (Capitol 2: Diagnosticul cancerului pancreatic, paginile 11-25).
2. **Gheorghe G**, Bacalbasa N, Ceobanu G, Ilie M, Enache V, Constantinescu G, Bungau SG, Diaconu C. Gastrointestinal Stromal Tumors – a mini Review. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 694, 2021. <https://doi.org/10.3390%2Fjpm11080694>. IF 3.508. (Capitolul 1: Date epidemiologice și etiopatogenice, paginile 1-10; Capitolul 2: Diagnosticul cancerului pancreatic, paginile 11-25).
3. **Gheorghe G**, Diaconu CC, Ionescu V, Constantinescu G, Bacalbasa N, Bungau S, Gaman MA, Stan-Ilie M. Risk factors for pancreatic cancer: emerging role of viral hepatitis. *J Pers Med*, 12(1), 83, 2022. <https://doi.org/10.3390/jpm12010083>. IF 3.508. (Capitolul 1: Date epidemiologice și etiopatogenice, paginile 1-10).
4. Diaconu CC, **Gheorghe G**, Hortopan A, Enache V, Ceobanu G, Jinga V, Adrian C, Ionescu VA. Pancreatic tuberculosis- a condition that mimics pancreatic cancer. *Medicina*, 58(9), 1165, 2022. <https://doi.org/10.3390/medicina58091165>. IF 2.948. Autor corespondent. (Capitolul 5: Date clinice și biologice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică, paginile 41-56).
5. **Gheorghe G**, Ionescu VA, Moldovan H, Diaconu CC. Clinical and biological data in patients with pancreatic cancer vs. chronic pancreatitis – a single center comparative analysis. *Diagnostics*, 13(3), 369, 2023. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13030369>. IF 3.992. (Capitolul 5: Date clinice și biologice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică, paginile 41-56).
6. **Gheorghe G**, Diaconu CC, Mambet C, Bleotu C, Ionescu VA, Diaconu CC. Comparative Analysis of Leptin and Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Plasma Expression in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis Patients. (Capitolul 6: Rolul analizei proteomice în diagnosticul precoce al cancerului pancreatic, paginile 57-96).

Articole publicate în reviste indexate ISI Clarivate Analytics fără factor de impact

7. Ionescu VA, **Gheorghe G**, Oprita R, Ilie M, Dascalu RI, Zaharia O, Jinga V, Diaconu CC, Constantinescu G. The outcomes of nutritional support techniques in patients with gastrointestinal cancers. *Gastroenterology Insights*, 13(3), 145-257, 2022. <https://doi.org/10.3390/gastroent13030025>. Autor corespondent. (Capitolul 5: Date clinice și biologice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică, paginile 41-56).

Articole publicate în reviste indexate în alte BDI

8. Ionescu VA, Gherghiceanu F, Gheorghe F, **Gheorghe G**. Initial approach to the patients with abdominal pain. *Annals of the Academy of Romanian Scientists. Series on Medical Sciences*, 3(1), 21, 2022. <https://doi.org/10.56082/annalsarscimed.2022.1.21>. (Capitolul 2: Diagnosticul cancerului pancreatic, paginile 11-25).
9. Ionescu VA, **Gheorghe G**, Constantinescu G, Sandru V, Ilie M, Oprita R, Plotogea O, Constantinescu A, Gherghiceanu F, Diaconu C. Endoscopic radiofrequency ablation in biliopancreatic tumours. *Archives of the Balkan Medical Union* 56(4), 488-493, 2021. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.4.13>. Autor corespondent. (Capitolul 2: Diagnosticul cancerului pancreatic, paginile 11-25; Capitolul 5: Date clinice și biologice la pacienții cu cancer pancreatic versus pancreatită cronică, paginile 41-56).
10. Ceobanu G, **Gheorghe G**, Ionescu VA. Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas – risk of malignancy. *Annals of the Academy of Romanian Scientists. Series on Medical Sciences*, 2(2), 14-20, 2021. <https://doi.org/10.56082/annalsarscimed.2021.1.14>. (Capitolul 1: Date epidemiologice și etiopatogenice, paginile 1-10).