

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní obor: Zobrazovací metody



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

MUDr. Bohuš Bunganič

Diagnostika karcinomu pankreatu

Pancreatic Cancer Diagnosis

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Miroslav Zavoral, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Přemysl Frič, DrSc.

Praha 2021

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla k dispozici pro studijní účely dle platných předpisů 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy

Praha, 2021

MUDr. Bohuš Bunganič

Identifikační záznam

BUNGANIČ, Bohuš. Diagnostika karcinomu pankreatu. [Pancreatic Cancer Diagnosis]. Praha, 2021. 88 s, 5 příloh. Disertační práce (PhD.) Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Interní klinika Vojenské fakultní nemocnice a ÚVN, vedoucí práce Zavoral, Miroslav.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Miroslavu Zavoralovi, Ph.D. a pomocnému školiteli prof. MUDr. Přemyslu Fričovi, DrSc. za pomoc a čas, který mi věnovali v průběhu studia i mimo něj. Děkuji vedoucímu katedry, spoluautorům a kolegům za odbornou pomoc v průběhu studia. Dále děkuji celému vedení Interní kliniky 1. LF UK, kde jsem mohl vlastní klinickou část práce vykonávat. V neposlední řadě děkuji svým blízkým a rodině, kteří při mně stáli po celou dobu studia.

Práce vznikla díky podpoře grantové agentury Ministerstva obrany ČR (MO 1012).

OBSAH	5
1 ÚVOD A PŘEHLED DANÉ PROBLEMATIKY	7
1.1 EPIDEMIOLOGIE KARCINOMU PANKREATU	7
1.2 VZNIK A VÝVOJ KARCINOMU PANKREATU	8
1.3 DIAGNOSTIKA A PROGNÓZA KARCINOMU PANKREATU	8
1.4 KLINICKÉ PROJEVY KARCINOMU PANKREATU	9
1.4.1 Časný symptomy	9
1.4.2 Pozdní symptomy	9
1.5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	10
1.5.1 Karbohydrát antigen 19-9	10
1.5.2 Další molekulární markery	11
1.6 MODERNÍ MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTICKÉ METODY	11
1.6.1 Polarizované a nepolarizované spektroskopické metody	11
1.6.2 Metabolomické studie	12
1.7 ZOBRAZOVACÍ METODY	12
1.7.1 Abdominální ultrasonografie	12
1.7.2 Endoskopická ultrasonografie	13
1.7.3 Endosonograficky navigovaná tenkojehlová aspirace	14
1.7.4 Kontrastní endosonografie	15
1.7.5 Výpočetní tomografie	16
1.7.6 Magnetická rezonance	17
2 CÍLE	18
3 VLASTNÍ PRÁCE	19
3.1 BUNGANIČ B, LACLAV M, DVOŘÁKOVÁ T ET AL.: ACCURACY OF EUS AND CEH EUS FOR THE DIAGNOSIS OF PANCREATIC TUMOURS. SCAND J GASTROENTEROL. 2018; 53(10–11):1411–1417.	19
3.1.1 Cíle	19
3.1.2 Metodika	19
3.1.3 Statistické zpracování a hodnocení výsledků	20
3.1.4 Výsledky	20
3.1.5 Diskuze	21
3.2 BUNGANIČ B, HÁLKOVÁ T, BENEŠOVÁ L ET AL. VYŠETŘENÍ MUTACE KRAS V EUS-FNA PREPARÁTECH PACIENTŮ S TUMOREM PANKREATU [KRAS MUTATION ASSAY ON EUS-FNA SPECIMENS FROM PATIENTS WITH PANCREATIC MASS]. CAS LEK CESK. 2016;155(1):48–51.	23
3.2.1 Cíle	23
3.2.2 Materiál a metody	23
3.2.3 Výsledky	24
3.2.4 Diskuze	25
3.2.5 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce	26
3.3 BENEŠOVÁ L, HALKOVA T, BUNGANIČ B ET AL. COMPARISON OF NATIVE ASPIRATES AND CYTOLOGICAL SMEARS OBTAINED BY EUS-GUIDED BIOPSIES FOR EFFECTIVE DNA/RNA MARKER TESTING IN PANCREATIC CANCER. PATHOL ONCOL RES. 2020 JAN;26(1):379–385.	27
3.3.1 Cíle	27
3.3.2 Metodika	27
3.3.3 Statistická analýza	27
3.3.4 Výsledky	28
3.3.5 Diskuze, závěr a zhodnocení výsledků cílů a hypotéz práce	28
3.4 BUNGANIČ B, ŠTOVÍČKOVÁ L, TATARKOVIČ M ET AL. MOLEKULÁRNĚ SPEKTROSKOPICKÁ ANALÝZA KREVNÍ PLASMY: CESTA K DIAGNOSTICE KARCINOMU PANKREATU? GASTROENT HEPATOL 2015, 69(6): 518-524.	30
3.4.1 Cíle	30
3.4.2 Materiál a metody	30
3.4.3 Statistické zpracování	30
3.4.4 Výsledky	31

3.4.5	<i>Diskuze</i>	34
3.4.6	<i>Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce</i>	35
3.5	HABARTOVÁ L, BUNGANIČ B, TATARKOVIČ M ET AL. CHIROPTICAL SPECTROSCOPY AND METABOLOMICS FOR BLOOD-BASED SENSING OF PANCREATIC CANCER. CHIRALITY. 2018 MAY;30(5):581-591.	37
3.5.1	<i>Cíle</i>	37
3.5.2	<i>Metodika</i>	37
3.5.3	<i>Výsledky a diskuze</i>	37
3.5.4	<i>Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce</i>	40
4	SOUHRN	41
5	SUMMARY	42
6	SEZNAM ZKRATEK	43
7	BIBLIOGRAFIE	45
8	PŘÍLOHY	52

1 Úvod a přehled dané problematiky

Karcinom pankreatu patří mezi nádory s nejvyšší mortalitou a v příštích letech bude dle odhadů dále narůstat. (Siegel RL 2020, Pourshams A 2019) Proto je důležité hledání nových diagnostických metod s potenciálem přesnější selekce kandidátů definitivní chirurgické resekční léčby. Pro účely přesnější diagnostiky je možné využít moderních aplikací zavedených zobrazovacích metod a další technologicky pokročilé metody vyšetření odebíraného materiálu - plazmy a samotných vzorků nádoru. Dosáhnout vyšší přesnosti lze pomocí kontrastní endosonografie. Kromě samotného zobrazení je důležitá adekvátní analýza odebíraného materiálu, jak genetická, tak molekulární, s přihlédnutím k faktu, že je prokázán růst a vývoj maligního karcinomu řadu let před objevením symptomů. (Yachida S 2010) Cílem moderní diagnostiky by měla být definice metod, které jsou mnohem citlivější k diskrétním změnám v procesu karcinogeneze než doposud používané metody.

V této kapitole je souhrnem popsán současný stav diagnostiky karcinomu pankreatu, nejčastěji používaných modalit a dále nových a potenciálních vyšetřovacích možností, které zatím nenašly uplatnění v praxi, ale mají potenciál stát se součástí dalšího výzkumu a moderního diagnosticko-terapeutického algoritmu.

1.1 Epidemiologie karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu (KP) se vyznačuje nepříznivou mortalitou téměř srovnatelnou s incidencí. Incidence KP dosahuje v České republice 9,25, prevalence 12,7 a mortalita 8,3 na 100 000 obyvatel (Bray F 2018). V současnosti je KP na 11. místě mezi nádory, přičemž celosvětově bylo zaznamenáno 458 918 nových případů a 432 242 úmrtí za rok 2018, což znamená 4,5 % všech úmrtí z důvodu malignity. Prognóza podle GLOBOCAN (Bray F 2018) ukazuje i nadále na pokračující růst incidence a mortality. (Rahib L 2014) Karcinom pankreatu je velmi vzácný před dosaženým 45. rokem života, mírně vyšší incidence a prevalence je pozorována s narůstajícím věkem a u mužů než u žen. (Bray F 2018)

1.2 Vznik a vývoj karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu se vyvíjí řadu let skrz postupnou transformaci pankreatické buňky a většinou prostřednictvím prekursorových lézí. (Frič P 2017) Různé prekurzory mají odlišný maligní potenciál. Postupná transformace je spojena s četnými mutacemi a lze ji rozdělit na fázi vzniku a transformace prekursorové léze po invazivní karcinom, dále fázi, kdy vzniká metastatický klon původního karcinomu, a poslední fáze generalizace maligních buněk. První dvě fáze jsou jistě dostatečně dlouhé k detekci operabilních stádií karcinomu. Yachida například provedl kalkulaci trvání jednotlivých fází na 11,7 roku, 6,8 roku a 2,7 roku. (Yachida S 2010) Z toho plyne možnost aplikace diagnostických metod mnohem dřív než v současnosti, nejlépe s použitím molekulárních metod jejichž potenciál je známý. (Stolzenberg-Solomon R 2020, Sah RP 2019)

1.3 Diagnostika a prognóza karcinomu pankreatu

V diagnostice karcinomu pankreatu se kromě anamnézy a laboratorních metod v každodenní praxi uplatňují zejména zobrazovací diagnostické metody: abdominální ultrasonografie, endoskopická ultrasonografie (EUS), výpočetní tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR).

Lokalizované neinvazivní stadium onemocnění je diagnostikováno pouze u 9,7 % pacientů s KP s celkovým přežitím 32 %. (Siegel RL 2021) V praxi jsou však nejčastěji diagnostikována pokročilá stadia invazivního karcinomu stupně III a IV. Z této skupiny je obvykle k chirurgickému výkonu s cílem kurativní resekce indikováno méně než 15 % pacientů s přežitím 23 %, u pokročilého stadia IV je přežití méně než 3 %. (Siegel R 2013) Tyto statistické údaje se za posledních 40 let změnily jen minimálně. (NCI 2018)

Jedním z hlavních důvodů nepříznivé prognózy je neefektivní diagnostika časného neinvazivního karcinomu, tedy klinických stádií 0 a I. Neinvazivní karcinom pankreatu je často asymptomatický či oligosymptomatický, navíc nejsou známy specifické rizikové faktory, vyjma kouření (Bosetti C 2012) a rodinné anamnézy (Klein AP 2004), i proto je časná diagnostika a potažmo skrínig KP tak náročným a stále nedokončeným úkolem. (Poruk KE 2013, Singhi AD 2019)

1.4 Klinické projevy karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu se svými symptomy liší zejména v závislosti na stádiu a lokalizaci tumoru. Na základě těchto rozdílů lze rozdělit symptomy na časné, jimž je věnována stále větší pozornost a pozdní, které jsou ve většině případů již známkou invazivního KP.

1.4.1 Časné symptomy

Dlouhotrvající porucha glukózové tolerance (IGT) je sice rizikovým faktorem KP, ale recentně vzniklá IGT, jež trvá méně než 3 roky, je jeho časným symptomem. Prevalence poruchy glukózové tolerance u KP je mnohem četnější než u běžné populace (Muniraj T 2012), a to nejčastěji v rozmezí přes 75–80 %. (Warshaw AL 1992, Singhi AD 2019, Pannala R 2008)

Asi pětina pacientů s KP nemá v čase stanovení IGT žádný symptom typický pro KP. Diagnostikovaný podtyp diabetu (IGT) má velmi podobné rysy s diabetem mellitem 2. typu (T2DM), ale není s ním totožný. Porucha glukózové tolerance klasifikovaná jako diabetes typu 3c (T3cDM) tvoří asi 10 % ze všech nemocných s diabetem a její vývoj je podle Americké diabetické asociace pozvolný (ADA 2010). Nejprve se objeví zvýšená inzulinová rezistence periferních tkání a hyperinzulinémie u normoglykemických pacientů s KP. U nemocných dochází k rozvoji poruchy glukózové tolerance a k tomu přistupuje funkční porucha beta buněk pankreatu; později dochází k dalšímu významnému zvýšení periferní tkáňové rezistence. Taková porucha glukózové tolerance je potom klasifikována jako T3cDM a je mimo jiné spojena s deficitem glukoregulačních hormonů. (Cui YF 2012) U KP se navíc vyskytují různé poruchy glukózové tolerance, z nichž nejčastější je právě recentně vzniklý DM. (Singhi AD 2019)

1.4.2 Pozdní symptomy

Bezbolestný ikterus je typický pro tumory lokalizované v hlavě pankreatu v souvislosti s infiltrací intrapankreatické části choledochu. Kachexie, horní dyspepsie a bolesti břicha a zad jsou typické pro tumory lokalizované v oblasti těla a kaudy pankreatu. Zmíněné symptomy jsou patognomické pro pozdní stádium, kdy je onemocnění již invazivní a systémové. Lze pozorovat určité rozdíly v symptomech u pacientů, kteří podstoupili paliativní a resekční léčbu (Tab. 1), kdy po resekci například dochází ke snížení četnosti bolestí břicha, zad či nauzey a zvracení. (Sohn TA 1999)

Tab. 1 Demografická data a symptomy operovaných a neoperovaných pacientů s KP (Sohn TA 1999)

	Paliativní léčba (<i>n</i> = 256)	Resekční léčba (<i>n</i> = 512)
Demografická data		
Věk (průměr, roky)	64,0	65,8
Muži / Ženy (%)	57 / 43	55 / 45
Symptomy (%)		
Bolesti břicha	64	36
Ikterus	57	72
Ztráta hmotnosti	48	43
Nauzea a zvracení	30	18
Bolesti zad	26	2

1.5 Laboratorní diagnostika

1.5.1 Karbohydrát antigen 19-9

U symptomatických pacientů s karcinomem pankreatu je senzitivita karbohydrát antigenu 19-9 (CA 19-9) 79–81 % a specificita 82–90 %. (Molina V 2012) Výzkum časného KP bez typických symptomů prokázal, že CA 19-9 není vhodný detekční nástroj časného KP, zejména pro jeho nízkou pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) 0,5–0,9 %. (Kim JE 2004, Ballehaninna UK 2012) V rozsáhlém retrospektivním hodnocení 37 studií s 1882 případů KP a kontrolní skupiny byla specificita CA 19-9 na úrovni 82,8 %. (Poruk KE 2013) Bohužel se v praxi také často setkáváme s falešně negativní hodnotou CA 19-9. Jedním z důvodů časté chybovosti je, že protilátka je vázána na oligosacharid, krevní antigen Lewis A, tudíž u 5–10 % pacientů s krevní skupinou A a antigenem Lewis A-/B- je hladina CA 19-9 u KP nižší než 1,0 U/ml. (Itzkowitz SH 1986) Příčinou falešné negativity CA 19-9 mohou být i jiné patologické stavy, například jaterní cirhóza, cholangitida, chronická pankreatitida a další gastrointestinální tumory. (Duffy MJ 2010)

1.5.2 Další molekulární markery

Recentně bylo testováno mnoho kandidátů, zejména ze skupiny molekul, které souvisí s poruchou glukózové tolerance, přičemž jsou posuzovány jejich vzájemné vztahy: proinzulin/C-peptid, amylin/inzulin, glukagon/inzulin a cytokiny adiponektin/leptin. Většina z nich však i nadále zůstává nevysvětlena či nedostatečně prozkoumána. (Frič P 2016) Na základě zjištění vyšší aktivity povrchových proteáz v nádorovém prostředí dochází ke vzniku mnoha aberantních peptidů, které by mohly sloužit jako časné biomarkery KP. (Busek P 2016) V současnosti je také věnována velká pozornost mikroRNA (miRNA). Molekuly miRNA jsou velmi stabilní ve tkáni i v tělesných tekutinách ve srovnání s jinými proteiny a mRNA, a jsou pro jednotlivé lokalizace specifické. Pro kvantifikaci navíc postačuje malé množství biologického materiálu (sérum, plazma, biopsie, pankreatický sekret a sliny). (Ishige F 2020)

1.6 Moderní molekulární diagnostické metody

1.6.1 Polarizované a nepolarizované spektroskopické metody

Obecnou podstatou spektroskopických metod je interakce elektromagnetického záření a studované látky s cílem využít pozorovaných jevů (absorpce, emise a rozptylu) za účelem její identifikace, studia její struktury a konformace nebo stanovení její koncentrace. (Berova N 2012, Baker MJ 2018)

Podle použitého typu interagujícího záření jsou spektroskopické metody klasifikovány na metody pracující s nepolarizovaným či polarizovaným zářením. Z nepolarizovaných metod se jedná například o Ramanovu a infračervenou spektroskopii. Obě tyto metody umožňují sledovat strukturu a konformaci molekul prostřednictvím specifických funkčních skupin. Naproti tomu metody elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) a Ramanovy optické aktivity (ROA), jakožto polarizované techniky, využívají kruhově polarizovaného záření a umožňují tak sledovat projevy optické aktivity chirálních molekul v závislosti na jejich prostorové struktuře. Zatímco ECD umožňuje studium konformace chirálních molekul prostřednictvím projevů chromoforů, ROA se zaměřuje na konkrétní vazby jednotlivých funkčních skupin a strukturní detaily. (Tatarkovič M 2015)

1.6.2 Metabolomické studie

Metabolomika je definována jako komplexní měření celé sady metabolitů, přítomných v určitém biologickém systému, například ve tkáni či plazmě. (Wishart DS 2018)

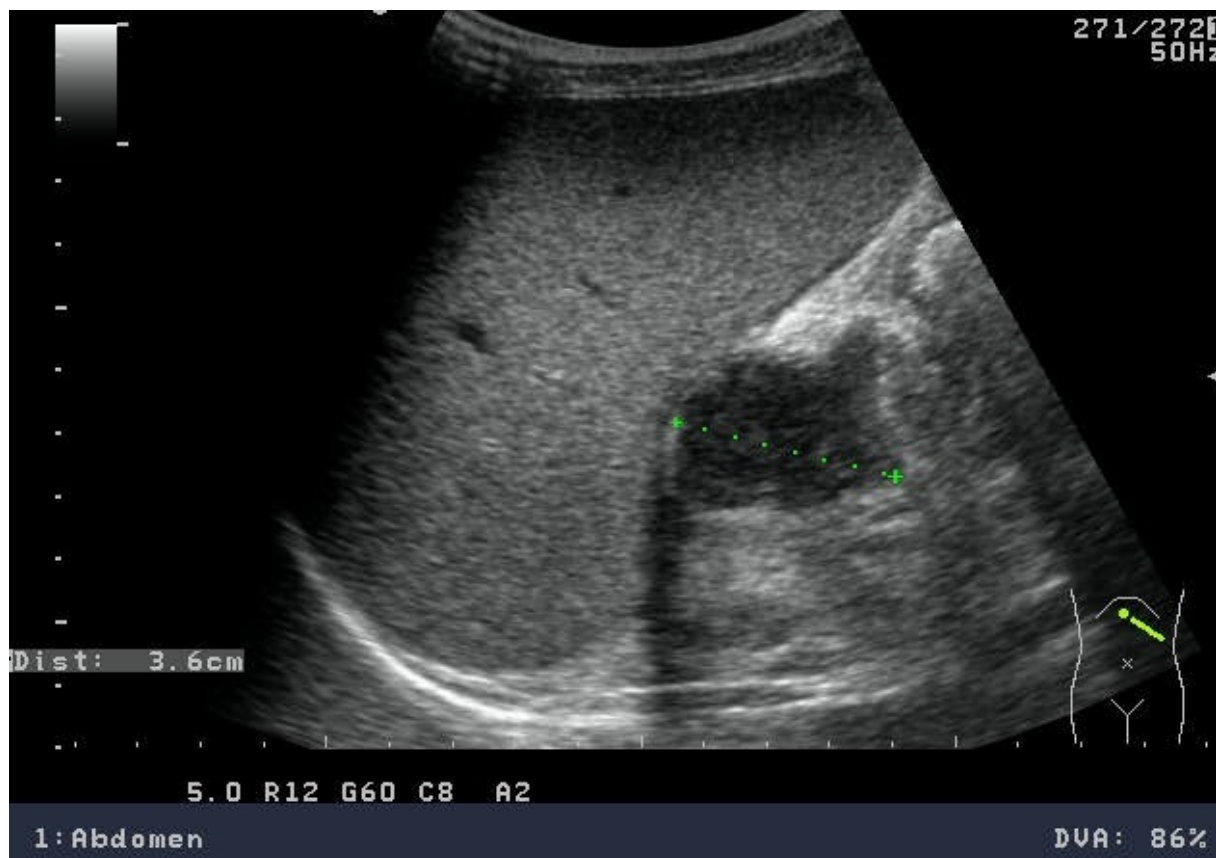
Metabolom je dynamická entita, kterou lze považovat za následný konečný produkt interakce genetické exprese, transkripčních změn, posttranslační modifikace proteinů a dalších vnějších faktorů. (Nannini G 2020) V rámci metabolomiky existují dvě základní analytické techniky, a to hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická rezonance (NMR). Obě techniky se vzájemně doplňují, obě mají své výhody i omezení. MS je v metabolomické analýze dobře zavedenou technikou, hlavně díky své vysoké citlivosti, zatímco méně citlivá spektroskopie NMR poskytuje vysokou reprodukovatelnost, je kvantitativní a nenáročná na přípravu a následnou analýzu vzorků. Metabolomika založená na NMR byla použita v mnoha oblastech biomedicínského výzkumu (Nannini G 2020), například k charakterizaci metabolomického profilu pro diagnostické a prognostické účely anebo k odhalení konkrétních biomarkerů. (Xie G 2015)

1.7 Zobrazovací metody

1.7.1 Abdominální ultrasonografie

Abdominální ultrasonografie (USG) je nejčastěji jednou z prvních diagnostických metod ve vyšetřovacím procesu bolestí břicha či nevolnosti a dalších symptomů typických u KP. Vyšetření je prováděno po adekvátní přípravě, optimálně po 5hodinovém lačnění. Přínos vyšetření závisí na zkušenosti vyšetřujícího, kvalitě přístrojového vybavení, připravenosti ale i na tělesné konstituci pacienta. V případě nedostatečné přehlednosti je možné použít speciální pozice (Fowlerova pozice v polosedě) s vodní kontrastní látkou perorálně, což díky vzniklému akustickému oknu umožňuje detailnější vyšetření celého parenchymu. (Nakao M 2017) U pacientů s mírnou dilatací pankreatického vývodu ($\geq 2,5$ mm), anebo se záchytem pankreatických cyst (≥ 5 mm) je riziko vzniku KP vyšší, proto je nutná důkladná dispenzarizace. Dispenzarizace těchto rizikových pacientů pomocí speciální USG je přesná a efektivní. (Tanaka S 2010)

V ultrasonografickém obraze má karcinom pankreatu vzhled hypoechogenní neostře ohraničené léze (Obr.1) s nízkou vaskularizací, ale přesnost běžného USG je nižší ve srovnání s pokročilejšími zobrazovacími metodami.



Obr. 1 Sonografický obraz karcinomu hlavy pankreatu (*vlastní zdroj, ÚVN*)

1.7.2 Endoskopická ultrasonografie

Od zavedení do praxe v r. 1980 byla endoskopická ultrasonografie (EUS) akceptována a dnes je široce využívána v diagnostice pankreatických lézí. (Gonzalo-Marin J 2014) EUS má vysokou senzitivitu, medián dosahuje 94 %, za maligní je považován tumor hypoechoenní a nepstře ohraničený. (Obr. 2) V diagnostice pankreatických solidních lézí a ve srovnání 20 komparativních studií téměř u 1000 pacientů bylo srovnání EUS a CT senzitivity 98 % vs. 74 %. (Kitano M 2019) Obdobné výsledky platí pro vysokou NPV ve prospěch EUS. (Săftoiu A 2009) Endosonografie má podobnou senzitivitu v hodnocení uzlinového postižení jako CT, tj. 80 %. (Yasuda K 1993) Zároveň je přesnější v posuzování peripankreatické a periceliakální lymfadenopatie, kdy dosahuje správnosti 87,5 %, resp. 90 %. (Kala Z 2007) V hodnocení cévní a zejména pak arteriální invaze je potom PPV rovna 100 %. (Tellez-Avila FI 2012) EUS je ideální nástroj i pro diagnostiku malých pankreatických nádorů s dilatací pankreatického vývodu zachycených jinou modalitou. (Yasuda I 2011) Například u tumorů menších než 10 mm dosahuje senzitivity přes 90 %. (Uehara H 2011) Díky těmto výsledkům byla EUS

doporučena japonskou pankreatickou společností jako vyšetřovací modalita při podezření na KP spolu s MR a CT. (Yamaguchi K 2017)



Obr. 2 EUS obraz karcinomu pankreatu s invazí do splenomesenterického konfluens (*vlastní zdroj, ÚVN*)

1.7.3 Endosonograficky navigovaná tenkojehlová aspirace

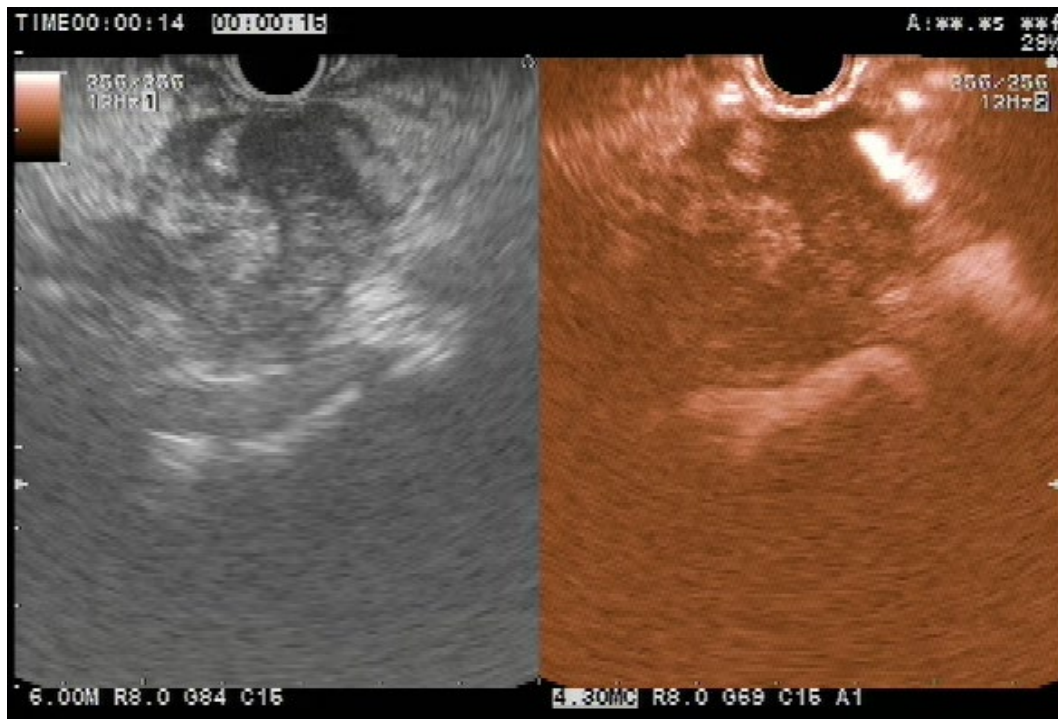
Jednou z dalších výhod endosonografie je možnost provedení tenkojehlové aspirace (FNA) umožňující při použití lineárního přístroje odběr materiálu k cytologickému vyšetření. Zcela nahradila dříve prováděnou kartáčkovou biopsii v průběhu endoskopické retrográdní cholangiopankreatikografie (ERCP). Při EUS FNA je dosaženo vyšší přesnosti a méně komplikací než při ERCP. (Wang KX 2011) Senzitivita EUS FNA obvykle přesahuje 90 %. (Chen J 2012), což značí, že EUS a zejména EUS FNA v posledních letech výrazně zvýšila přesnost diagnostiky a je pokládána za metodu „zlatého standardu“. (Fusaroli P 2010) Použití FNA má zcela zásadní význam, protože EUS samotná, může rozlišovat jednotlivé typy hypoechogenních tumorů jen s nízkou senzitivitou. (N. B. Fusaroli P 2016) K provedení EUS FNA je k dispozici celá řada jehel, nejčastěji v rozsahu 19 G až 25 G. Moderní jehly umožňují odběr tkáně, který vyhovuje požadavkům kladeným na kvalitní histologické vyšetření. Materiál může být řádně vyšetřen a vzorky je možné podrobit imunohistochemickému a taktéž genetickému vyšetření. Metoda EUS FNA nicméně není zatím rutinně používána k molekulární

genetické analýze získaných vzorků. V rámci výzkumu byla EUS FNA využita pro získání vzorků pro genetické testování mutace *KRAS*. To se spolu s dalšími genetickými testy uplatňuje v diagnostice již řadu let. (Tada M 2002) Specificita samotného *KRAS* testu je natolik vysoká, že pozitivita s vysokou přesností signalizuje malignitu. (Salek C 2007) Mutace *KRAS* byla opakovaně detekována u 74 - 92 % karcinomů pankreatu. (Khalid A 2011) Prognostický význam *KRAS* byl hodnocen v několika recentních studiích, avšak výsledky jsou značně rozporuplné. Mutace *KRAS* je prokazatelně asociovaná s horším přežíváním ve srovnání s wt *KRAS*, nicméně se jedná o statisticky hraničně významnou asociaci. Práce, které hodnotily prognostický význam mutace *KRAS* z EUS FNA, neidentifikovaly studované molekulární markery jako prognostické ukazatele. Naproti tomu jsou známé závěry studií genetické analýzy resekátů karcinomu pankreatu, které naznačují, že obzvláště některé typy mutací *KRAS*, např. G12D jsou asociovány s horším přežíváním. (Rachakonda PS 2013) Pravděpodobně proto jsou v současnosti většinou geneticky vyšetřovány zejména tkáně tumoru z resekátů, i přes to, že jsou k dispozici jen u omezeného množství pacientů.

1.7.4 Kontrastní endosonografie

Technický rozvoj hardwarového vybavení endosonografie umožnil vznik a rozvoj nové koncepce s podáním kontrastu v průběhu vyšetření – kontrastní endosonografie (CEH EUS). Při CEH EUS je intravenózně aplikována echokontrastní látka a v případě maligní etiologie léze dochází k úbytku sycení (hypoenhancementu) po její aplikaci. (Obr. 3) PPV tak z 88,1 % při konvenční EUS roste na 90,3 % při užití CEH EUS. Kontrast používaný při CEH EUS je tvořený mikrobublinami fluoridu sírového smíchaného s fyziologickým roztokem. Mikrobulbliny oscilují a zvýrazňují ultrazvukový signál, přičemž následkem je vylepšení obrazu bez artefaktů často přítomných při Dopplerovském vyšetření. (Dietrich CF 2005) V současnosti se používají látky Sonovue dostupný v Evropě a Sonazoid a Definity dostupné v USA. (Teoh AY 2015, Hirooka Y 2012) Mikrovaskulární vzorec a jeho hodnocení pomocí CEH EUS u karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy (CHP), má zcela odlišný charakter, kdy u chronické pankreatitidy jsou cévy četné, a naopak u KP zřídka. Rozlišení těchto dvou chorob pankreatu ale i tak činí diferenciací diagnostické potíže. (Hocke M 2007) Výše uvedené kontrastní látky nové generace po aplikaci difundují do parenchymu pankreatu a pankreatický vývod a společný žlučovod zůstává nezvýrazněný, proto lépe viditelný. Pomocí moderního softwaru je možné po aplikaci kontrastu provádět kvantitativní analýzu perfuze kontrastní látky, poté dle charakteru konstruované křivky intenzity závislé na čase (TIC) lze

rozlišovat různé typy postižení, minimálně určit maligní a benigní etiologii ložiska. (Gheonea DI 2013) Stupeň vaskularizace tumoru navíc koreluje s diferenciací karcinomu. (Yamashita Y 2015) CEH EUS vyšetření se používá i v časně diagnostice KP například při hodnocení nodulárních struktur v IPMN. Ve srovnání je senzitivita při EUS 98 % proti senzitivitě u CT 72 %. (Yamamoto N 2016, Harima H 2015) Kromě jiných výhod je kombinací CEH EUS a FNA je možné ještě vylepšit detekci a hodnocení pankreatických tumorů ve včasnějším stádiu. (Hou X 2015)



Obr. 3 Heterogenní hypoechogenní ložisko maligního vzhledu zobrazeno pomocí EUS (vlevo), hypoenhancement v arteriální fázi po aplikaci kontrastní látky při CEH EUS (vpravo). (vlastní zdroj, ÚVN)

1.7.5 Výpočetní tomografie

Multidetektorová výpočetní tomografie (CT) je metoda volby v diagnostice KP. Měla by být prováděna preferenčně s použitím novějších přístrojů, které umožňují konstrukci submilimetrových obrazů a následných podrobných rekonstrukcí nutných k přesnému stagingu KP. Senzitivita CT v detekci tumoru pankreatu menšího než 20 mm je 70–80 %, NPV pro hodnocení resekability je 87 % a celková přesnost 85–90 %. (Shin EJ 2012) Karcinom pankreatu má totiž při vyšetření CT odlišný vzhled v časně a pozdní fázi díky rozdílné distribuci

intravenózně podané jódované kontrastní látky. CT je tak jako komplexní diagnostická metoda nejvhodnější k provedení kompletního předoperačního stagingu KP - k posouzení vaskulární invaze tumoru i k predikci resekability. (Hijioka S 2007, Zamboni GA 2007) Speciální pankreatický protokol zahrnuje 3 fáze: prekontrastní vyšetření a časná arteriální fáze, pankreatická fáze a portální venózní fáze. (Tempero MA 2010) Pankreatická fáze je dána maximálním zesílením pankreatického parenchymu. Portální fáze je nutná na srovnání s arteriální fází a umožňuje tak odlišit etiologii jaterních ložisek a posoudit žilní postižení. (Tamm EP 2009) Karcinom pankreatu má v CT obraze vzhled hypoatenuující masy. Přibližně 10 % všech KP vykazuje isoatenuaci ve srovnání s okolním parenchymem. Proto jsou v diagnostice důležité i nepřímé známky KP, jako například dilatace pankreatického vývodu směrem do kaudy, příznak dvojí infiltrace vývodů neboli tzv. double duct sign a atrofie parenchymu pankreatu distálně od tumoru. (Francis IR 2007) V posledních letech je přesnost CT s technickým pokrokem vyšší a objevují se tak nové možnosti diagnostiky časného karcinomu pomocí sledování nepřímých známek KP, jako jsou stenóza pankreatického vývodu a fokální atrofie parenchymu. (Miura S 2020)

1.7.6 Magnetická rezonance

Kombinované vyšetření MR pankreatu a MR cholangiopankreatikografie (MRCP) je pokládáno za metodu přesností srovnatelnou s CT. (Koelblinger C 2011) Lačnění alespoň 4 hodiny před vyšetřením může zvýraznit distenzi žlučníku a potlačit signál z duodena a žaludku. Diagnostický efekt zároveň závisí na protokolu, který je aplikován. Karcinom pankreatu má hypointenzivní vzhled v T1 váženém obraze a různé podoby v T2 váženém obraze. Existují časově odložené sekvence k detailnějšímu zobrazení žlučových cest a je možné využít stimulaci sekretinem k detailnějšímu zobrazení komunikace léze s pankreatickým vývodem. (Rastegar N 2015) MR pankreatu a MRCP nacházejí největší uplatnění v detekci a sledování malých cystických prekurzorových lézí. (Fukukura Y 2012) Senzitivita detekce tumoru pomocí CT vyšetření je 90 %, pro TNM staging 60–90 %. (Schima W 2007) Vyšetření CT má 100% negativní prediktivní hodnotu pro stanovení vaskulární invaze a 87% negativní prediktivní hodnotu v hodnocení resekability; podobné výsledky byly dosaženy u MR. (Vargas R 2004) Senzitivita a specificita 64řadého CT a 3.0T MR pro detekci KP byly 95 %, resp. 96 %, a pro CT i MR byla dosažena stejná specificita 96 % (Koelblinger C 2011)

2 Cíle

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

1. Diagnostika karcinomu pankreatu pomocí endosonografie

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

2. Diagnostika KP a využití materiálu získaného pomocí EUS FNA

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

3. Diagnostika KP na základě analýzy biomolekul krevní plazmy

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

Disertační práce přináší pohled na současné metody diagnostiky a jejich alternativy a rovněž na zcela moderní a zatím nezavedené metody s potenciálem diagnostiky časného karcinomu pankreatu.

3 Vlastní práce

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

3.1.1 Cíle

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

3.1.2 Metodika

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

Finální diagnóza byla stanovena na základě pozitivního cytologického vyšetření anebo z resektátu. K samotnému vyšetření byl použit lineární echoendoskop (GF UCT 180 Olympus, Japonsko) a sonografický systém Aloka (Pro Sound alfa 10, Japonsko) vybavený softwarem umožňujícím speciální režim CEH EUS ExPHD (Hitachi Medical Systems Europe, Německo). Endosonografické vyšetření a zároveň iniciální hodnocení bylo provedeno jediným endoskopistou, druhý endosonografista prováděl hodnocení nezávisle na primárním, „na slepo“ bez znalosti finální diagnózy, anamnézy a klinického stavu pacienta.

První část vyšetření probíhala ve standardním B-mode, kdy byl dodržen zavedený protokol s cílem detekce ložiska, určení jeho velikosti a zejména posouzení echogenity tumoru. Ložisko bylo popsáno jako anechogenní, hypoechogenní, isoechogenní a hyperechogenní. Dále byla hodnocena pravidelnost okrajů tumoru. Jako karcinom byl tumor popsán v případě, že byl hypoechogenní a současně měl nepravidelné okraje (EUS marker pro karcinom). Tumor s okraji pravidelnými, navíc hypervaskularizovaný byl označen jako neuroendokrinní (EUS marker pro neuroendokrinní tumor (NET)).

Druhá část vyšetření probíhala ve speciálním režimu určeném pro kontrastní vyšetření s frekvencí 4,7 MHz a mechanickým indexem 0,38. Nahrávaná 120vteřinová sekvence byla rozdělena na časnou a pozdní fázi. Iniciální arteriální fáze trvá v rozmezí 15–30 vteřin od aplikace kontrastního média do cirkulace pacienta, žilní pozdní fáze trvala 60–120 vteřin.

Kvalitativní hodnocení rozdílu vnitřní struktury tumoru ve srovnání s okolním parenchymem bylo popsáno jako hyperenhancement, isoenhancement a hypoenhancement. Diagnóza karcinomu byla stanovena, pokud byl zaznamenán hypoenhancement v obou fázích (CEH EUS marker pro karcinom). Za neuroendokrinní tumor byl považován tumor, kde byl zaznamenán iso- či hyperenhancement v arteriální či venózní fázi (EUS marker pro NET). Kontrast Sono Vue (Bracco, Itálie) byl aplikován nitrožilně v dávce 2,4 ml na každé vyšetření.

Jako poslední část vyšetření byla provedena punkce tumoru pomocí tenké jehly 22 nebo 25 G (EZ shot 2 Olympus a Boston, Echo tip pro core, Cook medical). Každé vyšetření bylo zaznamenáno a s ohledem k cílům studie bylo prostřednictvím nezaujatého endosonografistu provedeno hodnocení a popis 1. a 2. fáze vyšetření, tedy s kontrastem i bez.

3.1.3 Statistické zpracování a hodnocení výsledků

Byla použita deskriptivní statistika k hodnocení populace pacientů. Senzitivita, specificita, PPV a NPV EUS a CEH EUS pro diagnózu karcinomu a neuroendokrinního tumoru byly vypočteny spolu s binomickými konfidenční intervaly. Stupeň korelace mezi EUS a CEH EUS byl hodnocen s použitím kappa statistiky a Spearmanova korelačního koeficientu. Míra shody hodnocení jednotlivých endosonografistů byla hodnocena s využitím kappa statistiky, v softwarovém prostředí STATISTICA 13.2 (TIBCO Software, USA).

3.1.4 Výsledky

3.1.4.1 Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí EUS

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

3.1.4.2 Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí CEH EUS

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

3.1.4.3 Diagnóza karcinomu pankreatu pomocí EUS FNA

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

3.1.4.4 Interobservační shoda

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

3.1.5 Diskuze

Celkově bylo ze 73 případů karcinomu správně identifikováno 69 pacientů. Nesprávně identifikované 4 případy byly označeny markerem jako negativní pro popsany isoenhancement v arteriální fázi. Falešná pozitivita CEH EUS markeru byla pozorována u 13 případů. Byly to případy duodenálního karcinomu, žaludečního karcinomu, metastáza plicního karcinomu, a metastáza renálního karcinomu, u kterých je CEH EUS jen relativně falešně pozitivní. Další falešná pozitivita byla zachycena u případu NET, přičemž důvodem by mohl být jeho maligní potenciál. Mezi další relativně falešně pozitivní patří plasmocytom a solitární papilární neoplazie (SPN), které mohou mít také maligní potenciál, což vysvětluje zařazení mezi maligní léze. Vysoká hodnota NPV kolem 85 % pro CEH EUS je z praktického hlediska velmi důležitá. I když nemůže CEH EUS marker nahradit cytologii před aplikací chemoterapie, může urychlit indikační rozhodování o operaci ve skupině resektabilních tumorů. Další možnost praktického využití CEH EUS je opět u skupiny kandidátů chirurgického výkonu, kde FNA je kontraindikována anebo se předpokládá její nižší výtěžnost a operatér požaduje bližší informace o charakteru tumoru, než jsou dostupné na základě EUS. Hodnocení interobservační shody je u CEH EUS ve prospěch venózní fáze, kde dosahuje vysoké shody mezi dvěma vyšetřujícími. Z praktického hlediska se jedná o dostatečnou eliminaci klinického „bias“, kdy je endosonografista v kontaktu s pacientem a je ovlivněn typickými projevy maligního onemocnění.

3.1.5.1 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz

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

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

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

3.2.1 Cíle

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

3.2.2 Materiál a metody

Do studie bylo zahrnuto celkem 147 pacientů s tumorem pankreatu, kteří podstoupili vyšetření EUS s FNA a následný odběr krve. V souboru bylo 118 pacientů s karcinomem pankreatu, 26 pacientů s chronickou pankreatitidou a 3 pacienti s neuroendokrinním tumorem. Skupinu pacientů s karcinomem tvořilo 64 mužů ve věku průměrně 69 ± 9 let (rozmezí 44 až 92 let) a 54 žen ve věku průměrně 66 ± 9 let (rozmezí 44 až 87 let) s KP ve stádiu II ($n = 3$), III ($n = 53$) a IV ($n = 58$). Studie byla provedena ve spolupráci s genetickou laboratoří Genomac výzkumný ústav, s.r.o., Praha.

K vyšetření byl použit lineární echoendoskop GF-UCT 180 (Olympus, Německo) a ultrazvukový přístroj Prosound Alpha 10 (Aloka Co., Ltd., USA). K EUS FNA byly použity jehly Pro-Core 19G a 22G (Cook Medical, USA), Expect 19G a 22G (Boston Scientific, USA) a standardní jehly Olympus 22G (Olympus, Německo). Část bioptického vzorku byla uchována nativní ve stabilizačním roztoku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, část byla zpracována do cytologického nátěru. Suché cytologické nátěry byly doručeny na patologii, kde byly vzorky fixovány a barveny roztokem Giemsa Romanovski (Penta, ČR). Na cytologických preparátech byla cytopatologem vyznačena oblast s majoritním výskytem nádorových buněk (minimálně 80 %) a vzorky byly poté odeslány na genetickou analýzu.

Z cytologických preparátů byl mikrodisekovan materiál z vyznačené oblasti nádorových buněk a přenesen do mikrozkuhavky. DNA pak byla z obou typů materiálu izolována kitem RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion, USA). Ze vzorku krve byla nejprve dvojí centrifugací separována plazma a bezprostředně zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ve zmraženém stavu byla dopravena do genetické laboratoře, kde byla z plazmy izolována cirkulující tumorová DNA

(ctDNA) kitem NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Německo). Detekce somatických mutací genu *KRAS* byla ve všech třech typech vzorků provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) s následnou heteroduplexní analýzou pomocí kapilární gelové elektroforézy při teplotním gradientu na přístroji ABI Prism 3100 (Applied Biosciences, USA), stejně jako v předchozích studiích. (Salek C 2007, Salek C 2009) Výsledky heteroduplexní analýzy byly vizualizovány pomocí softwaru Gene Marker v2.4.2.

K testu prognostické role mutace *KRAS* byly využity pouze cytologické preparáty, u kterých byla dosažena nejvyšší senzitivita. Pacienti byli rozděleny do skupiny s *KRAS* mutací a bez *KRAS* mutace. Byla stanovena korelace přítomnosti *KRAS* mutace s prognózou (celkovým přežitím) pomocí Kaplan-Meierovy metody a křivky přežití obou skupin pacientů byly porovnány pomocí log-rank testu. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$.

3.2.3 Výsledky

3.2.3.1 Diagnostika pomocí endosonografie

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

3.2.3.2 Diagnostika pomocí EUS FNA

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

3.2.3.3 Genetická analýza

Celkem bylo na přítomnost *KRAS* mutace testováno 147 nativních aspirátů všech pacientů podstupujících EUS FNA, 118 cytologických preparátů a 94 vzorků plazmy pacientů s karcinomem pankreatu. U pacientů s NET a CHP byly ke *KRAS* testu použity pouze nativní buněčné aspiráty se záchytem 0/3 (0 %) respektive 4/26 (15 %). Pro skupinu pacientů s karcinomem pankreatu byly k dispozici všechny 3 typy vzorků, přičemž nejvyšší senzitivity detekce *KRAS* mutace bylo dosaženo při použití cytologických preparátů (90 %, Tab. 2). V nativních aspirátech, byla mutace detekována pouze v 78 %, tedy výsledky vyšetření v těchto vzorcích byly z 22 % falešně negativní. Nejnižšího záchyty bylo dosaženo při detekci z plazmy (Tab. 2), kde bývá DNA pocházející z nádoru (ctDNA) obecně přítomna ve velmi nízkých koncentracích. Výsledný záchyt *KRAS* mutace v ctDNA byl pouze 27 %. U 4 z 28 pacientů s CHP detekována mutace *KRAS*. U žádného nebyl karcinom iniciálně cytologicky

diagnostikován. V průběhu klinického sledování byl potvrzen karcinom pankreatu u 2 pacientů, 1 pacient předčasně zemřel pro komplikace alkoholového deliria, 1 pacient byl aktuálně indikován k resekcčnímu výkonu, který však odmítl. Srovnání přežití pacientů s mutovaným *KRAS* oproti nemutovanému (wt *KRAS*) nepřineslo statisticky významný rozdíl v prognóze.

Tab. 2 Úspěšnost stanovení a senzitivita detekce *KRAS* mutace

Typ vzorku	Úspěšnost stanovení <i>KRAS</i>	Senzitivita detekce <i>KRAS</i>
Nativní aspiráty	100 %	78 %
Cytologická skla	100 %	90 %
Plazma	96 %	27 %

3.2.4 Diskuze

Samotný fakt, že v terénu chronické pankreatitidy byl v naší studii detekován *KRAS* bez náležité cytopatologické verifikace, je velmi zajímavý. V doposud publikovaných pracích byl zaznamenán pouze jeden případ pozitivita *KRAS* mutace v terénu chronického zánětu pankreatu (Tab. 3).

Tab. 3 Přehled studií vyšetření *KRAS* mutace vzorků získaných EUS FNA v rámci diferenciální diagnózy karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy

Studie/rok	Počet pacientů	Karcinom pankreatu % (počet pac.)	Chronická pankreatitida % (počet pac.)
(Tada M 2002)	34	77 (20/26)	0 (0/8)
(Pellisé M 2003)	57	73 (24/33)	0 (0/5)
(Zheng M 2003)	66	83 (45/54)	0 (0/5)
(Takahashi K 2005)	77	74 (46/62)	0 (0/15)
(Khalid A 2011)	21	73 (11/15)	0 (0/2)
(Maluf-Filho F 2007)	74	63 (34/57)	9 (1/11)
(Bournet B 2009)	178	67 (86/129)	0 (0/27)
Celkový počet pacientů v publikovaných studiích	507	71 (266/376)	1 (1/73)
Naše studie	118	90 (106/118)	14 (4/28)

V publikaci (Bournet B 2014) autoři doporučují zapojit do vyšetřovacího procesu nejasné pankreatické masy testování *KRAS* mutace. V případě klinické či radiologické prezentace pseudotumorózní formy chronické pankreatitidy, může identifikace *KRAS* bez mutace vyloučit maligní transformaci. (Bournet B 2014) V praxi může indikace resekcčního výkonu pouze na podkladě mutace *KRAS* činit jisté potíže, proto je vhodné před definitivním rozhodnutím o chirurgické léčbě opakovat EUS FNA. (Bournet B 2014)

Prognostický význam *KRAS* byl hodnocen v několika recentních studiích (Buscail L 2020), avšak výsledky jsou značně rozporuplné. Mutace *KRAS* je prokazatelně asociovaná s horším přežíváním ve srovnání s wt *KRAS*, nicméně se jedná o statisticky hraničně významnou asociaci. Práce, které hodnotily prognostický význam mutace *KRAS* z EUS FNA, neidentifikovaly studované molekulární markery jako prognostické ukazatele. Naproti tomu jsou známé závěry studií genetické analýzy resektátů KP, které naznačují, že obzvláště některé typy mutací *KRAS*, např. G12D, jsou asociovány s horším přežitím. (Rachakonda PS 2013) Pravděpodobně proto jsou v současnosti většinou geneticky vyšetřovány zejména tkáň tumoru z resektátů, a to i přes to, že jsou k dispozici jen u omezeného množství pacientů. V naší studii srovnání přežití pacientů s mutovaným *KRAS* oproti nemutovanému wt *KRAS* nepřineslo významný rozdíl v prognóze. Do hodnocení však nebyly zahrnuty výsledky mutací jednotlivých typů *KRAS*, které vyžadují podrobnější analýzu.

3.2.5 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

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

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

3.3.1 Cíle

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

3.3.2 Metodika

Pacienti a materiál použitý ve studii odpovídá metodice popsané v předchozí publikaci, přičemž ve výsledku bylo zpracováno 91 vzorků pomocí EUS FNC. Patologem byly po fixaci Giemsa Romanovski označeny nádorové buňky. Při hodnocení exprese miR-21 se postupovalo dle speciálního protokolu. Na reverzní transkripci miRNA na cDNA bylo použito 5 µl RNA pomocí qScript micro RNA cDNA syntetického kitu (Quanta Biosciences, USA) dle doporučení výrobce. Amplifikace a kvantifikace exprese miR-21 pomocí qRT-PCR byla provedena díky systému Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA), PerfeCTa SYBR green SuperMix (Quanta Biosciences, USA), a specifického univerzálního a miRNA primeru (Quanta Biosciences, USA). Údaje qRT-PCR byly analyzovány pomocí softwaru MxPro (Agilent Technologies, USA) s automatickým základním nastavením s prahovou hodnotou 0,4. Kalkulace relativní exprese miR-21 byla získána z průměru Ct hodnot. Studie byla provedena ve spolupráci s genetickou laboratoří Genomac výzkumný ústav, s.r.o., Praha.

3.3.3 Statistická analýza

Prognostická role miR-21 byla testována ve smyslu celkového přežívání s použitím Kaplan-Meierovy metody. Nejprve byl vypočítán medián relativní exprese miR-21 ve všech 118 vzorcích s KP. Každá hodnota vyšší, než medián byla považována za nadměrnou expresi a hodnoty nižší než medián za nízkou expresi. Celkové přežití pacientů bylo počítáno od doby stanovení diagnózy KP. Aby bylo možné hodnotit vzorek pacientů jako homogenní skupinu, ty, kteří zemřeli z důvodu jiné příčiny ($n = 7$) anebo byli operováni ($n = 13$), byli ze studie

exkludování. Ve zbývající skupině ($n = 91$) byla posuzována souvislost přežití mírou exprese miR-21. Celkové přežití pro vysoké i nízké hodnoty exprese miR-21 bylo vyhodnoceno Kaplan-Meierovou analýzou s použitím statistického softwaru MedCalc (MedCalc Software Ltd., Belgie). Křivky přežívání byly srovnávány pomocí long-run testu na 5% statistické hladině významnosti ($p > 0.5$).

3.3.4 Výsledky

3.3.4.1 Prediktivní role exprese miR-21

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

3.3.4.2 EUS FNC

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

3.3.4.3 EUS FNA

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

3.3.5 Diskuze, závěr a zhodnocení výsledků cílů a hypotéz práce

Metoda EUS FNC není zatím rutinně používána k molekulární genetické analýze získaných vzorků, ale dle dosažených výsledků je dostatečně přesná a do budoucna bude vhodnou metodou k odběru testovaného materiálu. Mohla by posloužit všem jedincům s KP, obzvláště skupině inoperabilních pacientů. Ve FNA je speciální médium, ale s malou frakcí maligních buněk a excesivním množstvím buněk stromatu (90 % celého materiálu). (Neesse A 2011) Pro tuto konkrétní analýzu exprese miR-21 se však zdá, že důležitější je primární zpracování a označení konkrétní nádorové populace „na skle“, které umožňuje provedení mikrodisekce, jak je tomu při FNC. Z důvodu, že bylo doposud hodnocení molekulárních markerů prováděno

pouze z resekátů, byly hodnocené výsledky efektu molekulární diagnostiky u KP sporné. Díky FNC je nyní průkazně dodáván selektovaný materiál zcela vhodný k další podrobné genetické a molekulární analýze. Podrobnější studium genetického pozadí stromatu je dalším výhledem do budoucna.

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

3.4.1 Cíle

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

3.4.2 Materiál a metody

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

Práce byla provedena ve spolupráci s Ústavem analytické chemie, VŠCHT Praha.

Po punkci žíly a odběru krve byla provedena centrifugace vzorků při $1500 \times g$ po dobu 10 minut; následně byly získané frakce krevní plazmy zamrazeny, transportovány v termoboxu při teplotě suchého ledu ($-78 \text{ }^\circ\text{C}$) na VŠCHT Praha, kde byly nadále skladovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Rozmrazené vzorky byly analyzovány kombinací různých spektroskopických metod. Ramanova spektra a spektra Ramanovy optické aktivity byla zaznamenávána simultánně na spektrometru ChiralRAMAN-2X (BioTools, Inc., USA), který je vybaven systémem Opus 2W/mpc6000 (Laser Quantum, VB) s excitační vlnovou délkou 532 nm. Metodika měření byla podrobně popsána (Tatarkovič M 2015). Analýzy ECD byly provedeny na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) pracujícím v UV/VIS oblasti za podmínek popsaných v předchozí publikaci. (Tatarkovič M 2012)

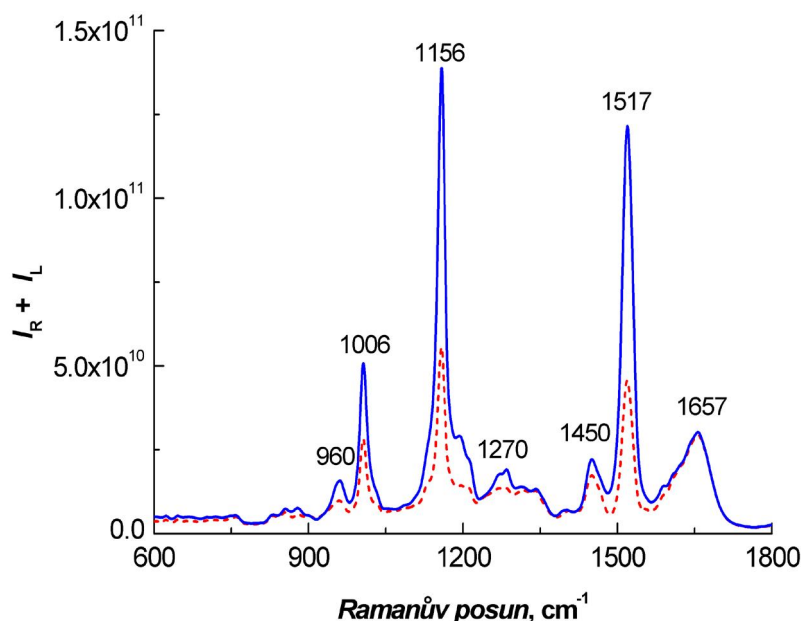
3.4.3 Statistické zpracování

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

3.4.4 Výsledky

3.4.4.1 Ramanova spektroskopie

V průměrných Ramanových spektrech pacientů s KP a kontrolních jedinců (Obr. 4) jsou patrné tři intenzivní pásy náležící především vibracím karotenoidů (1006 , 1156 a 1517 cm^{-1}), které jsou přítomny v plamě v nízkých koncentracích. Vysoká intenzita těchto pásů v Ramanově spektru je zapříčiněna rezonančním zesílením po excitaci ve viditelné oblasti (Withnall R 2003) (Parker SF 1999) U skupiny kontrolních jedinců byla pozorována několikanásobně vyšší intenzita těchto pásů v porovnání s pacienty, což naznačuje možnou roli karotenoidů v procesu kancerogeneze. Ve spektrech je zároveň možné pozorovat změnu intenzity pásů typických pro proteiny s vysokým obsahem alfa-helikální struktury, a to především u 1270 cm^{-1} v oblasti rozšířeného amidu III, který odpovídá vibracím peptidové vazby. (Synytsya A 2013) V krvi rovněž přítomné sacharidy a lipidy jsou zastoupeny pásy 960 a 1450 cm^{-1} (Synytsya A 2013), jejichž intenzita byla nižší v případě pacientů s KP.

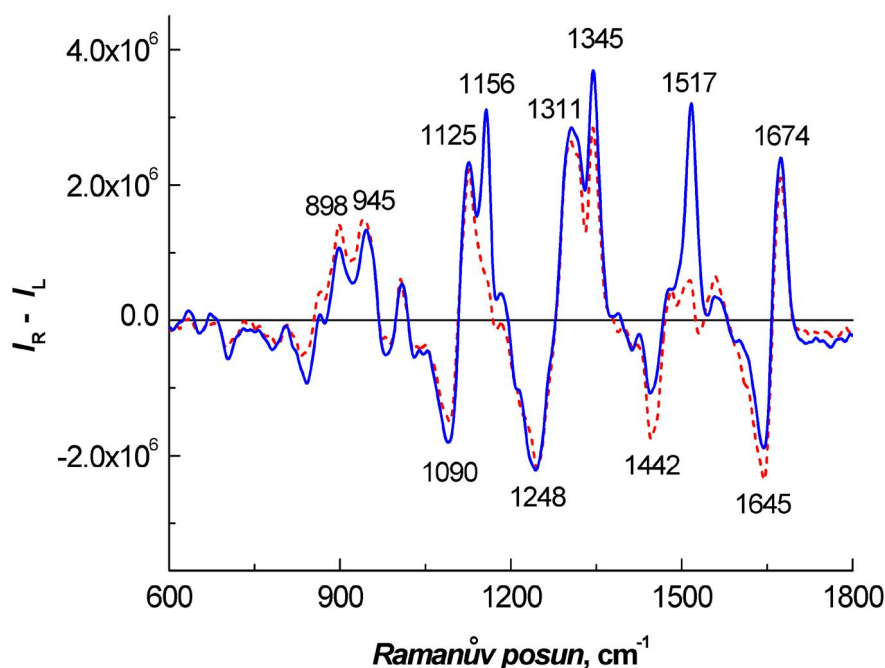


Obr. 1 Průměrná Ramanova spektra krevní plazmy pacientů s KP (červená čárkovaná čára) a kontrolních jedinců (modrá plná čára)

3.4.4.2 Ramanova optická aktivita

Ve spektrech Ramanovy optické aktivity (Obr. 5) byla zaznamenána skupina pásů proteinů v oblastech amidu I (1645 , 1674 cm^{-1}) a amidu III (1248 , 1311 , 1345 cm^{-1}). Spektrální průběh

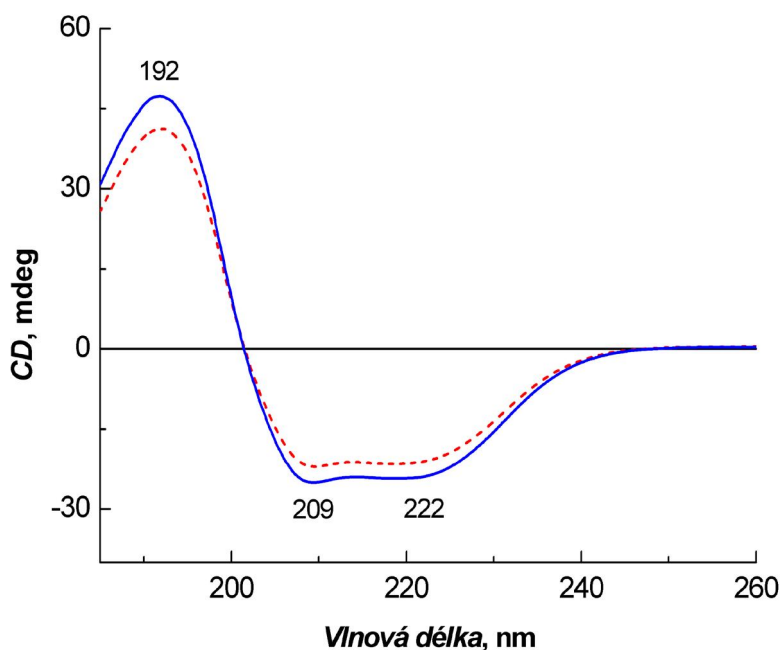
v těchto oblastech je opět typický pro proteiny s vysokým obsahem alfa-helikálních struktur (Synytsya A 2013, Zhu F 2005, Barron LD 2007). Výrazné pozitivní pásy 1156 a 1517 cm^{-1} vyskytující se ve spektrech kontrolních jedinců mohou být přiřazeny karotenoidům, přičemž některé z nich se překrývají s pásy aromatických aminokyselin. (Synytsya A 2013)



Obr. 2 Průměrná spektra ROA krevní plazmy pacientů s KP (červená čárkovaná čára) a kontrolních jedinců (modrá plná čára)

3.4.4.3 Elektronový cirkulární dichroismus

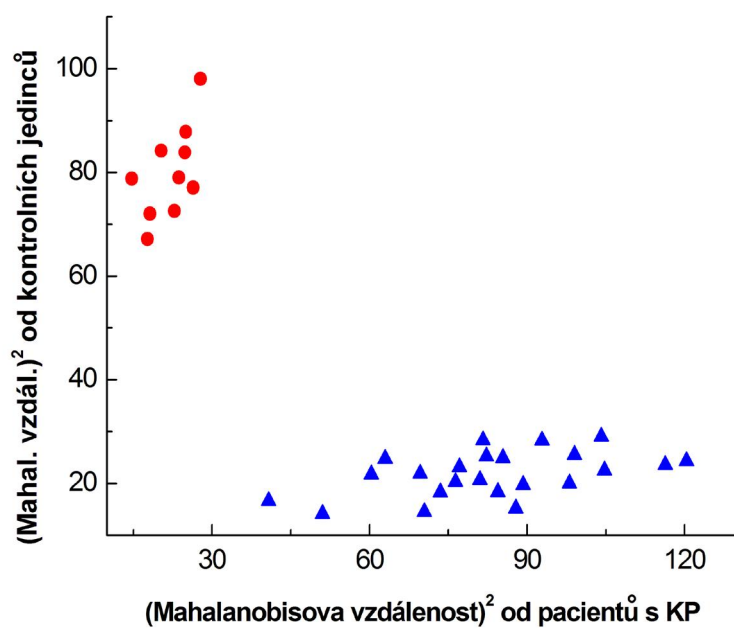
Ve spektrech ECD (Obr. 6) dominují tři pásy charakteristické pro sekundární strukturu proteinů. (Withnall R 2003, Berova N 2012) Pozitivní pás 192 nm a dva částečně se překrývající negativní pásy 209 a 222 nm jsou výsledkem elektronových přechodů v rámci peptidové vazby. Intenzita a tvar těchto pásů se mění v závislosti na sekundární struktuře peptidového řetězce. (Synytsya A 2013, Whitmore L 2008) Průběh spekter odpovídá proteinům s vysokým obsahem alfa-helikální struktury (Berova N 2012, Hirst JD 2003), které jsou v krvi zastoupeny převážně lidským sérovým albuminem. Je patrné, že v případě pacientů s KP mají všechny tři uvedené pásy nižší intenzitu než ve spektrech kontrolních jedinců.



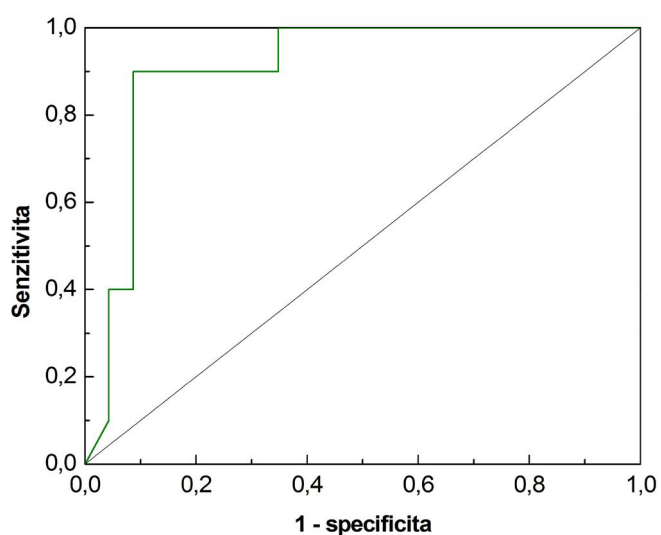
Obr. 3 Průměrná spektra ECD krevní plazmy pacientů s KP (čárkovaná čára) a kontrolních jedinců (plná čára)

3.4.4.4 Statistické vyhodnocení spektrálních dat

Jelikož byly některé změny ve spektrech pacientů s KP a kontrolních jedinců obtížně pozorovatelné, byla získaná spektrální data vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami. Cílem bylo odlišit pacienty od kontrolních jedinců na základě rozpoznání charakteristických spektrálních vzorů, určit senzitivitu a specifitu využitých spektroskopických metod a zároveň prokázat spolehlivost matematického modelu vytvořeného pro kombinaci všech tří použitých metod. Byla pozorována úplná separace skupiny pacientů s KP a kontrolních jedinců (Obr. 7), přičemž celková správnost přiřazení jednotlivých vzorků do příslušných skupin činila 100 %. Specifita a senzitivita vytvořeného modelu dosahovaly vysokých hodnot i po provedení křížové validace, a to 90 %, resp. 87 %. Zároveň byly z křížové validace vypočteny hodnoty pro křivku ROC, kde plocha pod křivkou (AUC) dosahovala hodnoty 0,907 (Obr. 8).



Obr. 4 Grafické znázornění výsledku LDA pro kombinaci chiroptických metod (ECD, ROA) a konvenční Ramanovy spektroskopie v analýze krevní plazmy pacientů s KP a kontrolních jedinců



Obr. 5 Křivka ROC po křížové validaci LDA modelu pro diskriminaci vzorků krevní plazmy pacientů s KP a kontrolních jedinců; AUC = 0,907

3.4.5 Diskuze

V pilotní studii byl pomocí kombinace pokročilých spektroskopických metod vytvořen klasifikační model, který dosahuje hodnot senzitivity a specifity $\sim 90\%$. Při předběžném hodnocení se zdá, že spektrální biomarkery sledované v našem pilotním projektu nejsou zatíženy chybovostí, a to bez ohledu na hladinu bilirubinu, CRP či krevní skupinu. V současnosti bylo publikováno několik studií zabývajících se detekcí prekursorů a premaligního stádia KP. Ze skupiny glykoproteinových mucinů, dosáhl vysoké senzitivity a specifity MUC5AC u prekursorových Pan-IN-1 lézí na myších modelech. (Kaur S 2013) MUC je v séru pacientů s KP jen v omezeném množství a snaha o jejich detekci pomocí klasické immunoanalýzy nepostačuje. Proto jsou testovány další techniky vhodné pro úpravy a měření vzorků (například povrchem zesílená Ramanova spektroskopie), které jsou 100 až 1000krát citlivější než konvenční metody. (Baine 2009, Wang G 2011) Mezi další aberantně exprimované muciny patří CA-50, CA-19-5, CA-125/MUC 16, CA-242, CAM 17.1, MUC4, MUC5AC, DUPAN 2, PAM4 a SPan-1. Pro sporné výsledky však zatím nejsou v klinické praxi využívány. (Horn A 2013, Carrara S 2011) V našem pilotním projektu byly potvrzeny předpokládané rozdíly v signálech charakterizujících odlišnosti 3D struktury plazmatických bílkovin a dalších plazmatických biomolekul. Hlavní rozdíly byly zjištěny nejen v sekundární struktuře proteinů krevní plazmy, ale i dalších molekul, jako lipidů, sacharidů, aromatických aminokyselin a karotenoidů. Zejména poslední zmiňovaná molekula byla v různých intenzitách zachycena v Ramanových spektrech i pomocí ROA. V plazmě pacientů s KP byla pozorována nízká intenzita karotenoidů. Účast karotenoidů v procesu onkogeneze zřejmě souvisí se změnou mikroprostředí a navozením desmoplastické reakce aktivací stellate cells. (Louvet C 2008) Tyto buňky jsou schopné se transformovat z klidového stádia do stádia aktivního, kdy se podílejí na fibroprodukcii. Retinoidy na modelech KP u transgenních myší indukovaly vznik klidového stádia stellate cells a tím navodily inhibici růstu KP. (Tollefsbol TO 2009) Karotenoidy jsou těsně propojeny s nádorovou progresí KP a jak se ve fázi pilotního projektu zdá, jsou dobře definovatelné pomocí citlivých spektroskopických metod.

3.4.6 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Časná diagnostika KP s cílem detekce operabilního stádia vyžaduje identifikaci efektivního biomarkeru. Je testováno několik kandidátů ze skupiny biomarkerů časného karcinomu pankreatu, ale zatím nejsou dostupné pro běžnou klinickou praxi. CA 19-9 je sice klinicky dostupný, ale jako marker časného karcinomu není vyhovující. V této studii byla testována specifita a senzitivita nového spektrálního biomarkeru, charakterizovaného vybranými

změnami všech biomolekul krevní plazmy. Pro obě sledované charakteristiky bylo dosaženo hodnot ~ 90 %, což je více než doposud publikované výsledky pro CA 19-9. Získané výsledky korespondují s patogenezi KP. Karotenoidy, jako ústřední regulační prvek funkce stelate cells, které se prokazatelně podílí na patogenezi KP, se jeví se jako příslib do budoucna vhodný k dalšímu testování na větším souboru pacientů. Jedním z dalších úkolů je spektroskopické vyšetření rizikových pacientů s recentně diagnostikovanou poruchou glukózové tolerance, pacientů s premaligním stádiem karcinomu a familiárními rizikovými syndromy.

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

3.5.1 Cíle

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

3.5.2 Metodika

Vzorky krevní plazmy byly odebrané náhodně 5 subjektům s KP a 5 zdravým kontrolám k obou zmíněným metabolomickým analýzám. K detekci markerů oxidativního stresu byl použit spektrometrický systém složený z pumpy Accela 1250, automatického vzorkovače Open Accela a hmotnostního spektrometru TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA). Analyty byly separovány na koloně Gemini C18-NX s mobilní fází tvořenou octanem amonným a acetonitrilem. Následně byla provedena kapalinová chromatografie a ke kvantifikaci byla použita hmotnostní spektrometrie. Získaná data byla zpracována v softwaru Xcalibur 2.2.0 (Thermo Scientific, USA). Detekované markery byly kvantifikovány za použití komerčně dostupných standardů zakoupených od Cayman Chemicals, USA a od Sigma-Aldrich, Německo. Pro účely identifikace potenciálních markerů KP byla využita databáze Human Metabolome Database. (Wishart DS 2018)

Práce byla provedena ve spolupráci s Ústavem analytické chemie a Ústavem organické technologie, VŠCHT Praha.

3.5.3 Výsledky a diskuze

3.5.3.1 Klinicky známé markery spojované s karcinogenezí

Prvním krokem metabolomické studie bylo stanovení hodnot klinicky známých markerů oxidativního stresu spojovaných s karcinogenezí (Syslová K 2014), které nebyly doposud využity v diagnostice KP (Tab. 4).

Tab. 4 Průměrné hodnoty metabolomických markerů

Marker	Klinický význam	Pacient pg mL ⁻¹	Zdravá kontrola pg mL ⁻¹
Ortho-tyrosin	Oxidativní poškození aminokyselin	120 ± 9	95 ± 8
3-chlorotyrosin	Myeloperoxidázou indukované poškození proteinů	87 ± 8	62 ± 6
3-nitrotyrosin	Nitrosativní stres (NO• radikálem indukované poškození proteinů)	89 ± 9	49 ± 5
8-iso-prostaglandin F _{2α}	Oxidativní stres, poškození fosfolipidových membrán	54 ± 5	34 ± 4
8-hydroxy-2'-deoxyguanosin	Poškození genetické informace v DNA	54 ± 5	49 ± 5
8-hydroxyguanosin	Poškození genetické informace v RNA	59 ± 5	48 ± 4
Kaskáda leukotrienů C/D/E ₄	Alergické reakce	41 ± 4	45 ± 4
Leukotrien B ₄	Záněť	52 ± 6	34 ± 2

Významné zvýšení hladin derivátů tyrosinu, tj. ortho-, chloro a nitro-tyrosinu, demonstruje podíl oxidativního a nitrosativního stresu (Syslová K 2014), nejpravděpodobněji způsobeného

vznikem vysoce reaktivních radikálů v průběhu růstu tumoru. Oxidativní stres spolu s narušením fosfolipidových membrán je také reflektován vyššími hodnotami 8-isoprostanu (Liou SH 2017, Loeffler DA 2017) u pacientů s KP. Navíc jsme ve skupině KP pozorovali možné poškození genetické informace indikované mírným zvýšením hladin 8-hydroxyguanosinu a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu. (Dąbrowska N 2017) I když byly rozdíly v rámci leukotrienové kaskády nevýrazné, aktivace imunitního systému (Coussens LM 2002) pacientů byla zřejmá z významně vyšších hladin leukotrienu B₄, primárního markeru zánětu. (Kim YR 2016)

3.5.3.2 Identifikace nových metabolitů typických pro KP

Druhým cílem metabolomické studie bylo identifikovat sloučeniny, jejichž pozměněné hladiny by byly typickým znakem KP. Zatím nebyly detekované metabolity kvantifikovány, pouze byly srovnávány intenzity jejich signálů. Převážná většina identifikovaných metabolitů je zapojena do procesů buněčné signalizace, spravování energetického metabolismu buněk a zajištění integrity a stability buněčných membrán, (Wishart DS 2013) tedy do procesů, které jsou při nádorovém růstu poškozené. Lysofosfatidylcholin je známý protinádorovou aktivitou (Ross T 2016), přičemž u pacientů s KP byl pozorován enormní pokles intenzity signálu zřejmě z důvodu nekontrované buněčné proliferace a růstu tumoru. (Akita H 2016) Navíc může tento pokles reflektovat zásadní narušení lipidového metabolismu primárně lecitin-cholesterol acetyltransferázový enzymatický systém v játrech. Až 20násobný nárůst intenzity kyseliny chenodeoxycholové u pacientů s KP potvrzuje změny metabolického stavu, zejména významnou poruchu transportního mechanismu sterolů a modulace sekrece lipidů.

Zvýšení intenzit kyseliny docosahexaenové a jejích metabolitů, kyseliny arachidonové, linolenové a gamma-linolenové, které bylo detekováno u pacientů s KP, může odrážet poruchu funkce buněčné membrány vedoucí k zánětu a aktivaci imunitní odpovědi. Kyselina docosahexaenová se podílí na redukci inzulinové rezistence, (Wishart DS 2013) jednoho z hlavních faktorů vzniku diabetu, který je těsně propojen z patogenezi KP. Kyselina arachidonová, linoleová a gamma-linoleová působí jako součásti prostaglandinového metabolismu a mají prozánětlivé a imunoaktivní vlastnosti. Produkce prostaglandinových a leukotrienových metabolitů skrz cytochrom p-450 je narušená u diabetu mellitu a je nejpravděpodobněji reflektovaná změnami hladin kyseliny arachidonové. (Wishart DS 2013) Zánětlivá odpověď u pacientů s KP byla také potvrzena díky výskytu sfingosin-1-fosfátu, který reguluje produkci eikosanoidů a indukci cyklooxygenázy-2. Sfingosin-1-fosfát je zapojen do metabolismu kalciové signální dráhy, která je přímo zodpovědná za buněčné přežívání, růst a

proliferaci. (Wishart DS 2013) Přibližně 3násobně vyšší intenzity signálu byly pozorovány u dekanoyl-karnitin a hexadec-2-enoyl-karnitinu ve skupině nemocných. To lze vysvětlit tím, že u KP je poškozen metabolismus mastných kyselin, karnitiny tak nemohou plnit svou biologickou funkci, proto zůstávají ve vyšších koncentracích v plazmě. Naproti tomu byly u pacientů s KP pozorovány více než 10násobně nižší hladiny intenzit signálu acetyl-L-karnitinu, dalšího z modulátorů metabolismu mastných kyselin. Ve skutečnosti byla dramatická deplece acetyl-L-karnitinu prokázána u diabetiků (Thorne Research Inc 1999), což podporuje koncepci poruchy glukózového metabolismu, asociovanou s KP. (Andersen DK 2017)

3.5.4 Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz práce

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

4 Souhrn

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

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

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

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

5 Summary

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

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

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

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

6 Seznam zkratek

ADA	Americká diabetologická asociace
AUC	area under curve (plocha pod křivkou)
CA 19-9	Karbohydrát antigen 19-9
CRP	C reaktivní protein
CT	multidetektorová výpočetní tomografie
ctDNA	cirkulující nádorová DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECD	elektronový cirkulární dichroismus
ERCP	endoskopická retrográdní cholangiopankreatikografie
EUS	endoskopická ultrasonografie
FNA	tenkojehlová aspirace
G	gauge
CHP	chronická pankreatitida
IGT	porucha glukózové tolerance
IPMN	intraduktální papilární mucinózní neoplazie
KP	karcinom pankreatu
KRAS	KRAS onkogen
LDA	lineární diskriminační analýza
LOOCV	křížová validace typu leave-one-out
miRNA	mikro-ribonukleová kyselina
MR	magnetická rezonance
MRCP	magnetická rezonanční cholangiopankreatikografie
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
NET	neuroendokrinní tumor

NMR	nukleární magnetická resonance
NPV	negativní prediktivní hodnota
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
ROA	Ramanova optická aktivita
ROC	receiver operating characteristics
SPN	solidní pseudopapilární neoplazie
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
T3cDM	diabetes mellitus typu 3c
USG	abdominální ultrasonografie
wt KRAS	nemutovaná forma <i>KRAS</i> onkogenu

7 Bibliografie

- ADA, American Diabetes Association. 2010. „Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.“ *Diabetes care* 62-69.
- Akita H, Ritchie SA, Takemasa I et al. 2016. „Serum Metabolite Profiling for the Detection of Pancreatic Cancer: Results of a Large Independent Validation Study.“ *Pancreas* (45(10)): 1418-1423.
- Andersen DK, Korc M, Petersen GM et al. 2017. „Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer.“ *Diabetes* (66(5)): 1103-1110.
- Arabul M, Karakus F, Alper E et al. 2012. „Comparison of multidetector CT and endoscopic ultrasonography in malignant pancreatic mass lesions.“ *Hepatogastroenterology* 59 (117): 1599-603.
- Baine, M. 2009. „Pancreatic cancer biomarkers. In: Encyclopedia of Cancer.“ *Heidelberg, Germany: Springer* 790–805.
- Baker MJ, Byrne HJ, Chalmers JM et al. 2018. „Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: state of play nad future challenges.“ *Analyst*, 1735-1757.
- Ballehaninna UK, Chamberlain RS. 2012 . „The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal.“ *J Gastrointest Oncol* (3(2)): 105-19.
- Barron LD, Zhu F, Hecht L, a et al. 2007. „Raman optical activity: An incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure.“ *J Mol Struct* 834-836.
- Berova N, Nakanishi K, Polavarapu PL et al. 2012. „Comprehensive Chiroptical Spectroscopy.“ *John Wiley & Sons Inc.: New Jersey* Vol. 2nd.
- Berova N, Polavarapu PL, Nakanishi K at al. 2012. „Comprehensive chiroptical spectroscopy.“ *Hoboken*, 3–35.
- Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT et al. 2012. „Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4).“ *Ann Oncol*. 23 (7): 1880-8.
- Bournet B, Gayral M, Torrisani J et al. 2014 . „Role of endoscopic ultrasound in the molecular diagnosis of pancreatic cancer.“ *World J Gastroenterol* (20(31)): 10758-68.
- Bournet B, Souque A, Senesse P et al. 2009 . „Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis.“ *Endoscopy* (41(6)): 552-7.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. 2018. „Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.“ *CA Cancer J Clin* (International Agency for Research on Cancer) 68 (6): 394-424.
- Brennan DD, Zamboni GA, Raptopoulos VD, Kruskal JB. 2007. „Comprehensive preoperative assessment of pancreatic adenocarcinoma with 64-section volumetric CT.“ *Radiographics* 27:1653–1666.
- Buscail L, Bournet B, Cordelier P. 2020. „Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer.“ *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, Mar: 153-168.
- Busek P, Vanickova Z, Hrabal P et al. 2016. „Increased tissue and circulating levels of dipeptidyl peptidase–IV enzymatic activity in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.“ *Pancreatology* 829-38.
- Cancer, Board Editorial. 2012. „Pancreatic Cancer - Statistics.“ *Cancer.net Articles*. American Society of Clinical Oncology (ASCO) - Cancer.Net. 25. Jun. <https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics>.
- Carrara S, Cangi MG, Arcidiacono PG et al. 2011. „Mucin expression pattern in pancreatic diseases: findings from EUS-guided fine-needle aspiration biopsies.“ *Am J Gastroenterol* (106): 1359–1363.

- Catalano MF, Sahai A, Levy M et al. 2009 . „EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification.“ *Gastrointest Endosc* (69(7)): 1251-61.
- Chen J, Yang R, Lu Y, Xia Y, Zhou H. 2012. „Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for solid pancreatic lesion: a systematic review.“ *J Cancer Res Clin Oncol* 138 (9): 1433-41.
- Coussens LM, Werb Z. 2002 . „Inflammation and cancer.“ *Nature* (420(6917)): 860-7.
- Cui YF, Andersen DK. 2012. „Diabetes and pancreatic cancer.“ *Endocrine related cancer* 9–26. nedatováno. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46, D608–d617.
- Dietrich CF, Ignee A, Frey H. 2005. „Contrast-enhanced endoscopic ultrasound with low mechanical index: a new technique.“ *Z Gastroenterol*, 1219–23.
- Dąbrowska N, Wiczowski A. 2017. „Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage.“ *Adv Clin Exp Med* 26(1): 155-166.
- Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R et al. 2010. „Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report.“ *Ann Oncol* (21): 441–447.
- Egawa S, Toma H, Ohigashi H, a et al. 2012. „Japan Pancreatic Cancer Registry; 30th year anniversary.“ *Pancreas* (41): 985–92.
- Frič P, Škrha J, Šedo A, et al. 2017 . „Precursors of pancreatic cancer.“ *Eur J Gastroenterol Hepatol*, Mar: e13-e18.
- Frič P, Škrha J, Šedo A et al. 2016. „Early detection of pancreatic cancer: impact of high-resolution imaging methods and biomarkers.“ *Eur J Gastroenterol Hepatol* e33-e43.
- Fukukura Y, Takumi K, Kamimura K et al. 2012. „Pancreatic adenocarcinoma: variability of diffusion-weighted MR imaging findings.“ *Radiology* 263 (3): 732-40.
- Fusari M, Maurea S, Imbriaco M et al. 2010. „Comparison between multislice CT and MR imaging in the diagnostic evaluation of patients with pancreatic masses.“ *Radiol Med* 115 (3): 453-66.
- Fusaroli P, Napoleon B, Gincul R et al. 2016 . „The clinical impact of ultrasound contrast agents in EUS: a systematic review according to the levels of evidence.“ *Gastrointest Endosc* (84(4)): 587-596.
- Fusaroli P, Spada A, Mancino MG, Caletti G. 2010. „Contrast harmonic echo-endoscopic ultrasound improves accuracy in diagnosis of solid pancreatic masses.“ *Clin Gastroenterol Hepatol* (8(7)): 629-34.
- Gao L, He SB, Li DC et al. 2014. „Effects of miR-16 plus CA19-9 detections on pancreatic cancer diagnostic performance.“ *Clin Lab* (60(1)): 73-7 .
- Gheonea DI, Streba CT, Ciurea T, Săftoiu A. 2013. „Quantitative low mechanical index contrast- enhanced endoscopic ultrasound for the differential diagnosis of chronic pseudotumoral pancreatitis and pancreatic cancer.“ *BMC Gastroenterol* 13: 2.
- Gonzalo-Marin J, Vila JJ, Perez-Miranda M. 2014. „Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of pancreatic cancer.“ *World J Gastrointest Oncol* 6 (9): 360-8.
- Hanada K, Okazaki A, Hirano N et al. 2015. „Diagnostic strategies for early pancreatic cancer.“ *J Gastroenterol* (50(2)): 147-54.
- Harima H, Kaino S, Shinoda S et al. 2015. „Differential diagnosis of benign and malignant branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm using contrast-enhanced endoscopic ultrasonography.“ *World J Gastroenterol*. 6252-60.
- Hijioka S, Ikari T, Kamei A et al. 2007. „CT and MRI findings with contrast enhancement of small pancreatic adenocarcinoma in the late phase.“ *Hepatogastroenterology* 54 (74): 389-392.
- Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Ohno E, Itoh Y, Nakamura Y, et al. 2012. „Contrast-enhanced endoscopic ultrasonography in digestive diseases.“ *J Gastroenterol* 47 (10): 1063-72.

- Hirst JD, Colella K, Gilbert ATB. 2003. „Electronic Circular Dichroism of Proteins from First-Principles Calculations.“ *J Phys Chem B* (107): 11813-11819.
- Hocke M, Ignee A, Topalidis T, Stallmach A, Dietrich CF. 2007. „Contrast-enhanced endosonographic Doppler spectrum analysis is helpful in discrimination between focal chronic pancreatitis and pancreatic cancer.“ *Pancreas* 35 (3): 286-8.
- Horn A, Chakraborty S, Dey P et al. 2013. „Immunocytochemistry for MUC4 and MUC16 is a useful adjunct in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma on fine-needle aspiration cytology.“ *Arch Pathol Lab Med* (137): 546–551.
- Hou X, Jin Z, Xu C et al. 2015. „Contrast-Enhanced Harmonic Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration in the Diagnosis of Solid Pancreatic Lesions: A Retrospective Study.“ *PLoS ONE* 10 (3): e0121236.
- Francis IR. 2007. „Pancreatic adenocarcinoma: diagnosis and staging using multidetector-row computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI).“ *Cancer Imaging* 160-165.
- Ishige F, Hoshino I, Iwatate Y et al. 2020. „MIR1246 in body fluids as a biomarker for pancreatic cancer.“ *Sci Rep*, 26. May: 8723.
- Itzkowitz SH, Kim YS. 1986 . „New carbohydrate tumor markers.“ *Gastroenterology* (90(2)): 491-4.
- Kala Z, Válek V, Hlavsa J et al. 2007. „The role of CT and endoscopic ultrasound in pre-operative staging of pancreatic cancer.“ *Eur J Radiol* 62 (2): 166-9.
- Karmazanovsky G, Fedorov V, Kubyshev V, Kotchatkov A. 2005. „Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability.“ *Abdom Imaging* 30:488–500.
- Kaur S, Kumar S, Momi N, a et al. 2013. „Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment.“ *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (10): 607–620.
- Kenner BJ, Chari ST, Maitra A et al. 2016. „Early Detection of Pancreatic Cancer-a Defined Future Using Lessons From Other Cancers: A White Paper.“ *Pancreas* 45 ((8)): 1073-9.
- Khalid A, Dewitt J, Otori NP et al. 2011 . „EUS-FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer.“ *Pancreatol* (11(5)): 482-6.
- Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW. 2004. „Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population.“ *J Gastroenterol Hepatol* (19): 182–186.
- Kim YR, Park MK, Kang GJ et al. 2016. „Leukotriene B4 induces EMT and vimentin expression in PANC-1 pancreatic cancer cells: Involvement of BLT2 via ERK2 activation .“ *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (115): 67-76.
- Kitano M, Kudo M, Yamao K et al. 2012 . „Characterization of small solid tumors in the pancreas: the value of contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography.“ *Am J Gastroenterol* (107(2)): 303-10.
- Kitano M, Yoshida T, Itonaga M et al. 2019. „Impact of endoscopic ultrasonography on diagnosis of pancreatic cancer.“ *J Gastroenterol* (54(1)): 19-32.
- Klein AP, Brune KA, Petersen GM et al. 2004. „Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds.“ *Cancer Res.* 64 (7): 2634-8.
- Koelblinger C, Ba-Ssalamah A, Goetzinger P et al. 2011. „Gadobenate dimeglumine-enhanced 3.0-T MR imaging versus multiphasic 64-detector row CT: prospective evaluation in patients suspected of having pancreatic cancer.“ *Radiology* 259 (3): 757-66.
- Liou SH, Wu WT, Liao HY et al. 2017 . „Global DNA methylation and oxidative stress biomarkers in workers exposed to metal oxide nanoparticles.“ *J Hazard Mater* (331): 329-335.

- Loeffler DA, Klaver AC, Coffey MP et al. 2017 . „Increased Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid from Healthy Subjects with Parkinson's Disease-Associated LRRK2 Gene Mutations.“ *Front Aging Neurosci* (9): 89.
- Louvet C, Philip PA. 2008. „Accomplishments in 2007 in the treatment of metastatic pancreatic cancer.“ *Gastrointest Cancer Res* (2(3 Suppl)): 37-41.
- Maluf-Filho F, Kumar A, Gerhardt Ret al. 2007 . „Kras mutation analysis of fine needle aspirate under EUS guidance facilitates risk stratification of patients with pancreatic mass.“ *J Clin Gastroenterol* (41(10)): 906-10.
- Miura S, Kume K, Kikuta K et al. 2020. „Parenchymal Atrophy and Fat Replacement Are Clues for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer with Abnormalities of the Main Pancreatic Duct.“ *Tohoku J Exp Med*, Sep: 63-71.
- Molina V, Visa L, Conill C et al. 2012. „CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer.“ *Tumour Biol* (33): 799.
- Muniraj T, Chari ST. 2012. „Diabetes and pancreatic cancer.“ *Minerva Gastroenterol Dietol* 331–345.
- NCI. 2018. „In: Pancreatic Cancer Cancer Stat Facts [Internet].“ *Available from: <https://seer.cancer.gov/>*.
- Nakao M, Katayama K, Fukuda J et al. 2017. „Evaluating the ability to detect pancreatic lesions using a special ultrasonography examination focusing on the pancreas.“ *Eur J Radiol*. (91): 10-14.
- Nannini G, Meoni G, Amedei A et al. 2020. „Metabolomics profile in gastrointestinal cancers: Update and future perspectives.“ *World J. Gastroenterol*, 2514–2532.
- Neesse A, Michl P, Frese KK et al. 2011 Jun. „Stromal biology and therapy in pancreatic cancer.“ *Gut* 60(6):861-8.
- Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR et al. 2008. „Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus.“ *Gastroenterology* 134:981–987.
- Parker SF, Tavender SM, Dixon NM et al. 1999. „Raman spectrum of beta-carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): Implications for the characterization of conjugated polyenes.“ *Appl Spectrosc* (53 (1)): 86-91.
- Pellisé M, Castells A, Gin s A et al. 2003. „Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy.“ *Aliment Pharmacol Ther* (17(10)): 1299-307.
- Poruk KE, Firpo MA, Adler DG et al. 2013. „Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? .“ *Ann Surg* (257): 17–26.
- Pourshams A, Sepanlou SG, Ikuta KS et al. 2019. „The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.“ *Lancet Gastroenterol*, 934–47.
- Rachakonda PS, Bauer AS, Xie H et al. 2013. „Somatic mutations in exocrine pancreatic tumors: association with patient survival.“ *PLoS One* (8(4)): e60870.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R et al. 2014. „Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States.“ *Cancer Res* (74(11)): 2913-21.
- Raman SP, Horton KM, Fishman EK. 2012. „Multimodality imaging of pancreatic cancer-computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography.“ *Cancer J* 18:511–522.
- Rastegar N, Matteoni-Athayde LG, Eng J et al. 2015. „Incremental value of secretin-enhanced magnetic resonance cholangiopancreatography in detecting ductal communication in a population with high prevalence of small pancreatic cysts.“ *Eur J Radiol* 84 (4): 575-80.

- Ross T, Jakubzig B, Grundmann M et al. 2016. „The molecular mechanism by which saturated lysophosphatidylcholine attenuates the metastatic capacity of melanoma cells.“ *FEBS Open Bio* (6(12)): 1297-1309.
- Schima W, Ba-Ssalamah A, Kölblinger C et al. 2007. „Pancreatic adenocarcinoma.“ *Eur Radiol* 17 (3): 638-49.
- Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV et al. 2014. „MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer.“ *JAMA* (311(4)): 392-404.
- Săftoiu A, Vilman P. 2009 . „Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis and staging of pancreatic cancer.“ *J Clin Ultrasound* 37 (1): 1-17.
- Sah RP, Sharma A, Nagpal S et al. 2019 . „Phases of Metabolic and Soft Tissue Changes in Months Preceding a Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.“ *Gastroenterology*, May: 1742-1752.
- Salek C, Benesova L, Zavoral M et al. 2007. „Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer.“ *World J Gastroenterol* (13(27)): 3714-20.
- Salek C, Minarikova P, Benesova L et al. 2009. „Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer.“ *Anticancer Res* (29(5)): 1803-10.
- Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P, ESMO Guidelines Working Group. 2012. „Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.“ *Ann Oncol* (23 Suppl 7): 33-40.
- Shin EJ, Canto MI. 2012. „Pancreatic cancer screening.“ *Gastroenterol Clin North Am.* 41 (1): 143-57.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2013. „Cancer statistics.“ *CA Cancer J Clin* 63:11–30.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE et al. 2021. „Cancer Statistics, 2021.“ *CA – Cancer J. Clin.* 7–33.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2020. „Cancer statistics 2020.“ *CA A Cancer J Clin.* 7–30.
- Singhi AD, Koay EJ, Chari ST et al. 2019. „Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges.“ *Gastroenterology*, May: 2024-2040.
- Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. 2019. „Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges.“ *Gastroenterology* 156 (7): 2024-2040.
- Sohn TA, Lillemoe KD, Cameron JL et al. 1999. „Surgical palliation of unresectable periampullary adenocarcinoma in the 1990s.“ *J Am Coll Surg* 188 (6): 658-66.
- Stolzenberg-Solomon R, Derkach A, Moore S et al. 2020. „Associations between metabolites and pancreatic cancer risk in a large prospective epidemiological study.“ *Gut*, Nov: 2008-2015.
- Synytsya A, Judexová M, Hrubý T et al. 2013. „Analysis of human blood plasma and hen egg-white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA) .“ *Anal Bioanal Chem* (405 (16)): 5441-5453.
- Syslová K, Böhmová A, Mikoška M et al. 2014. „Multimarker screening of oxidative stress in aging.“ *Oxid Med Cell Longev* 2014:562860.
- Tada M, Komatsu Y, Kawabe T et al. 2002. „Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor.“ *Am J Gastroenterol* (97(9)): 2263-70.
- Takahashi K, Yamao K, Okubo K et al. 2005. „Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA.“ *Gastrointest Endosc* (61(1)): 76-9 .
- Tamm EP, Balachandran A, Bhosale P, Szklaruk J. 2009. „Update on 3D and multiplanar MDCT in the assessment of biliary and pancreatic pathology.“ *Abdom Imaging* 34 (1): 64-74.

- Tanaka S, Nakao M, Ioka T et al. 2010. „Slight dilatation of the main pancreatic duct and presence of pancreatic cysts as predictive signs of pancreatic cancer: a prospective study.“ *Radiology* 254 (3): 965-72.
- Tatarkovič M, Fišar Z, Jiráček R et al. 2012. „Can Chiroptical Spectroscopy Be Used for the Analysis of Blood Plasma?“ *Chirality*, 951-955.
- Tatarkovič M, Synytsya A, Šťovíčková L et al. 2015. „The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma.“ *Anal Bioanal Chem* , 1335–42.
- Tatarkovič M, Synytsya A, Šťovíčková L et al. 2015. „The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma.“ *Anal Bioanal Chem* (407 (5)): 1335-1342.
- Tellez-Avila FI, Chavez-Tapia NC, López-Arce G et al. 2012. „Vascular invasion in pancreatic cancer: predictive values for endoscopic ultrasound and computed tomography imaging.“ *Pancreas* 41 (4): 636-8.
- Tempero MA, Arnoletti JP, Behrman S et al. 2010. „Pancreatic Adenocarcinoma: Clinical Practice Guidelines in Oncology.“ *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* (8(9)): 972-1017.
- Teoh AY, Tang RS. 2015. „Clinical evaluation of new diagnostic modalities of endoscopic ultrasound for pancreaticobiliary diseases.“ *Dig Endosc* 27 (1): 55-9.
- Thorne Research Inc.. 1999. „Monograph on acetyl carnitine.“ *Alt Med Rev* (4): 439.
- Tollefsbol, TO. 2009. „Cancer Epigenetics.“ Boca Raton: CRC Press.
- Uehara H, Ikezawa K, Kawada N et al. 2011. „Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for suspected pancreatic malignancy in relation to the size of lesions.“ *J Gastroenterol Hepatol* 26 (8): 1256-61.
- Vargas R, Nino-Murcia M, Trueblood W et al. 2004. „MDCT in Pancreatic adenocarcinoma: prediction of vascular invasion and resectability using a multiphasic technique with curved planar reformations.“ *AJR Am J Roentgenol* 182 (2): 419-25.
- Wang G, Lipert RJ, Jain M et al. 2011. „Detection of the potential pancreatic cancer marker MUC4 in serum using surface-enhanced Raman scattering.“ *Anal Chem* (83): 2554–2561.
- Wang KX, Ben QW, Jin ZD et al. 2011. „Assessment of morbidity and mortality associated with EUS-guided FNA: a systematic review.“ *Gastrointest Endosc* (73): 283–290.
- Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. 1992. „Pancreatic carcinoma.“ *N Engl J Med* 326 (7): 455-65.
- Whitmore L, Wallace BA. 2008. „Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases.“ *Biopolymers* (89 (5)): 392-400.
- Wishart DS, Feunang YD, Marcu A et al. 2018. „HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018.“ *Nucleic Acids Res*, 4. Jan: D608-D617.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC et al. 2013 . „HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013.“ *Nucleic Acids Res* (41): D801-7.
- Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J et al. 2003. „Raman spectra of carotenoids in natural products.“ *Spectrochim Acta* (59 (10)): 2207-2212.
- Xie G, Lu L, Qiu Y et al. 2015. „Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer.“ *J Proteome Res*, 1195–1202.
- Yachida S, Jones S, Bozic I et al. 2010 . „Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer.“ *Nature* (467(7319)): 1114-7.
- Yamaguchi K, Okusaka T, Shimizu K et al. 2017. „Clinical practice guidelines for pancreatic cancer 2016 from the Japan pancreas society a synopsis.“ *Pancreas* (46): 595–604.

- Yamamoto N, Kato H, Tomoda T et al. 2016. „Contrast- enhanced harmonic endoscopic ultrasonography with time-intensity curve analysis for intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.“ *Endoscopy* 26-34.
- Yamashita Y, Kato J, Ueda K et al. 2015. „Contrast-Enhanced Endoscopic Ultrasonography for Pancreatic Tumors.“ *Biomed Res Int* 491782.
- Yasuda I, Iwashita T, Doi S et al. 2011. „Role of EUS in the early detection of small pancreatic cancer.“ *Dig Endosc* 23 (1): 22-5.
- Yasuda K, Mukai H, Nakajima M, Kawai K. 1993. „Staging of pancreatic carcinoma by endoscopic ultrasonography.“ *Endoscopy* 25 (2): 151-5.
- Zamboni GA, Kruskal JB, Vollmer CM et al. 2007. „Pancreatic adenocarcinoma: value of multidetector CT angiography in preoperative evaluation.“ *Radiology* 245 (3): 770-8.
- Zheng M, Liu LX, Zhu AL et al. 2003 . „K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses.“ *World JGastroenterol* (9(1)): 188-91.
- Zhu F, Isaacs NW, Hecht L et al. 2005. „Raman optical activity: a tool for protein structure analysis.“ *Structure* (13 (10)): 1409-19.

8 Přílohy



Scandinavian Journal of Gastroenterology



ISSN: 0036-5521 (Print) 1502-7708 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/igas20>

Accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours

B. Bunganič, M. Laclav, T. Dvořáková, O. Bradáč, E. Traboulsi, Š. Suchánek, P. Frič & M. Zavoral

To cite this article: B. Bunganič, M. Laclav, T. Dvořáková, O. Bradáč, E. Traboulsi, Š. Suchánek, P. Frič & M. Zavoral (2018): Accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, DOI: [10.1080/00365521.2018.1524023](https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1524023)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1524023>



Published online: 05 Nov 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 18



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=igas20>

ORIGINAL ARTICLE



Accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours

B. Bunganič^a, M. Laclav^a, T. Dvořáková^a, O. Bradáč^b, E. Traboulsi^c, Š. Suchánek^c, P. Frič^a and M. Zavoral^a

^aDepartment of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Military University Hospital, Prague, Czech Republic;

^bDepartment of Neurosurgery and Neurooncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Military University Hospital, Prague, Czech Republic; ^cDepartment of Pathology, Military University Hospital, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Objectives: The main objective is to compare the accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic cancer (PC). The secondary objective is to evaluate the accuracy of EUS FNA and to determine to what extent EUS and CEH EUS findings are affected by endosonographer subjectivity.

Methods: A prospective single-centre study was conducted in patients with pancreatic lesions detected on CT. The patients were examined by EUS, CEH EUS and EUS FNA. The obtained results were compared with the final diagnosis that was based on cytology and further clinical findings and on histopathological findings from subjects who underwent surgery. A second reading of the EUS and CEH EUS images was performed by the endosonographer, who was blinded to clinical data of patients.

Results: We examined 116 patients, 73 had a final diagnosis of PC, 14 had NETs and 20 had other tumours. The sensitivity, specificity, NPV, PPV, and accuracy of EUS for diagnosis of PC were 83.1, 62.5, 83.1, 70.7 and 78.6%, for CEH EUS 94.5, 61.7, 84.1, 84 and 84.1% and for EUS FNA 87.6, 91.2, 95.5, 77.5 and 88.8, respectively. The inter-observer agreement for EUS marker of PC was good ($\kappa = 0.75$), and that for CEH EUS was average ($\kappa = 0.59$ for arterial phase and $\kappa = 0.68$ for washout in venous phase).

Conclusion: CEH EUS is a non-invasive method that allows more accurate identification of PC than EUS. The subjectivity of CEH EUS evaluation is worse than that of EUS but acceptable.

ARTICLE HISTORY

Received 1 July 2018
Revised 15 August 2018
Accepted 8 September 2018

KEYWORDS

Contrast-enhanced endosonography; FNA; pancreatic cancer

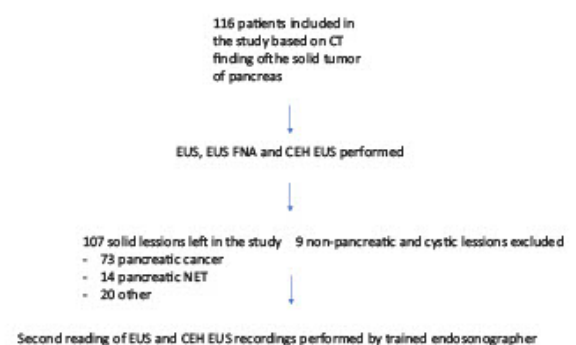
Introduction

Pancreatic cancer has an unfavourable prognosis in patients who are diagnosed during later stages [1], even though the long-term development of this cancer seems to offer a large diagnostic window [2]. At present, the main effort is diagnosing pancreatic cancer during early and curable stages [3]; therefore, it is necessary to introduce and test a new diagnostic method. Endoscopic ultrasonography (EUS) is a well-established, reliable and safe method that provides a detailed view of pancreatic tumours with comparable or better accuracy than other diagnostic modalities [4,5]. One of the drawbacks of EUS is that without the use of an invasive cytological examination (EUS FNA), it cannot distinguish between the carcinoma and other aetiologies because the majority of the pancreatic tumours, even those with benign aetiologies, have a hypoechoic appearance [6]. In addition, EUS FNA has limitations as well as significant diagnostic benefits [5]. The rate of complications is as low as 1% [7] but some complications, such as acute pancreatitis may have fatal consequences. Implementing FNA in patients with coagulopathies, unfavourable tumour locations in the uncinate protrusion or interposed vessels is risky [8]. The accuracy of FNA is significantly influenced by the evaluation of cytopathological specimens [9]. In addition, 10% of the patients must have the sampling procedure repeated [10] for a variety of reasons [11]. The development of non-invasive alternatives to EUS FNA is necessary. In recent years, contrast-enhanced endosonography

(CEH EUS) has been shown to be a useful minimally invasive diagnostic method [12–17]. The aims of the study are to compare the accuracy of EUS, EUS FNA and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours and to evaluate the inter-observer agreement among individual endosonographers in the interpretation of findings on EUS and CEH EUS.

Patients and methods

The study included 116 consecutive patients with pancreatic tumours, who were evaluated from January 2013 to February 2017. The patients underwent EUS examinations based on the finding of a solid tumour on CT, see flow chart.



CONTACT B. Bunganič bohusbunganic@uvn.cz Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Military University Hospital, Prague, Czech Republic

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

All patients signed informed consent to participate in the study, which was approved by the ethics committee of the Military University Hospital – UVN Praha. The final diagnosis was based on positive cytology after EUS or on histology of specimens obtained during surgical resection. All patients were followed up in a gastroenterological outpatient clinic for at least six months with repeated EUS examinations to rule out a false-negative diagnosis. A linear echo-endoscope (GF UCT 180 Olympus, Tokyo, Japan) and sonographic system (Aloka Pro Sound alpha 10, Tokyo, Japan) equipped with CEH EUS ExPHD (Hitachi Medical Systems Europe 1994) was used to perform EUS and CEH EUS examinations. EUS examinations were performed by single endosonographer, the second one was reviewing videos of the procedure without the knowledge of the final diagnosis or patient history. Patients were sedated with a combination of small doses of midazolam and fentanyl, and Buscopan was administered to relieve peristalsis. Throughout the examination, the patient was positioned in lateral recumbency on the left hip.

EUS standard mode

The EUS examination was initiated in B-mode, and a standard investigation protocol was performed including a description of the tumour location and size, an assessment of the echogenicity (anechoic, hypoechoic, isoechoic or hyperechoic) and an evaluation of the tumour margins (regular, irregular). A diagnosis of cancer was made if the tumour was hypoechoic and had irregular margins [Figure 1]. A diagnosis of a NET was made if the tumour was highly vascular with regular tumor margins on B-mode EUS. Any echogenicity could be present in the case of NET tumours.

EUS FNA

EUS FNA was performed using 25-gauge (EchoTip ProCore, Cook Medical, Bloomington, IN, USA) and standard 22-Gauge



Figure 1. EUS definition of malignancy. A positive EUS marker for cancer diagnosis was if the tumor had irregular margins and was hypoechoic at the same time. The picture shows venous and biliary duct infiltration of a malignant tumour.

needles (EZ Shot 2, Olympus, Tokyo, Japan and Expect needle, Boston Scientific, Natick, MA, USA). Samples were prepared by the endosonographer immediately following the EUS procedure and send to the pathology department for further processing. Samples were evaluated by a single cytopathologist expert in pancreatobiliary cytopathology. A standard protocol was used during FNA. The capillary technique with at least 7 passes of the needle through a hole in the tumour and so-called 'fanning technique' was used. The samples were prepared as smears, right after each procedure and within an hour sent for cytological processing. There was no cytopathologist present on site. Gathered samples were evaluated as invalid, partially valid or fully valid according to their quality, so samples were considered as positive only when the certain grade of atypia was observed and a smear was sufficiently valid.

CEH EUS

B-mode mode was changed to a special mode for CEH EUS with a frequency of 4.7 MHz and a mechanical index of 0.38. Each examination was recorded for 120 s after the administration of a contrast agent. Based on the differences between the internal appearance of a tumour and the surrounding pancreatic tissue, the pattern of contrast was classified as hyperenhancement, iso-enhancement or hypo-enhancement. Two phases were evaluated: the arterial phase between 15 and 30 s after contrast administration and the venous between 60 and 120 s after contrast administration. A diagnosis of cancer was made if hypo-enhancement was observed during the arterial and venous phases of the examination [Figure 2]. A diagnosis of a NET was made if iso-enhancement or hyperenhancement was observed during the arterial or venous phases of the examination [Figure 3].

Contrast agent

The contrast agents used are microbubbles of special gases with a diameter of less than 10 µm. They are administered into the systemic circulation, travel from the pulmonary capillaries into the arterial system and eventually remain within the capillaries in the organ parenchyma. These agents are non-emollient and non-toxic substances and side effects are uncommon if the contraindications for their use are appropriately respected. For CEH EUS, a second generation Sono Vue Contrast (Bracco, Italy) contrast agent was used. It was administered intravenously at a dose of 2.4 ml per patient. The use of this contrast agent was approved by the State Institute for Drug Control (SÚKL).

Video record review

Every examination was recorded. A video record was then reviewed by a second endosonographer without the knowledge of the final diagnosis or patient history. The secondary aim was to assess the inter-observer agreement in assessing the image obtained after the administration of the contrast

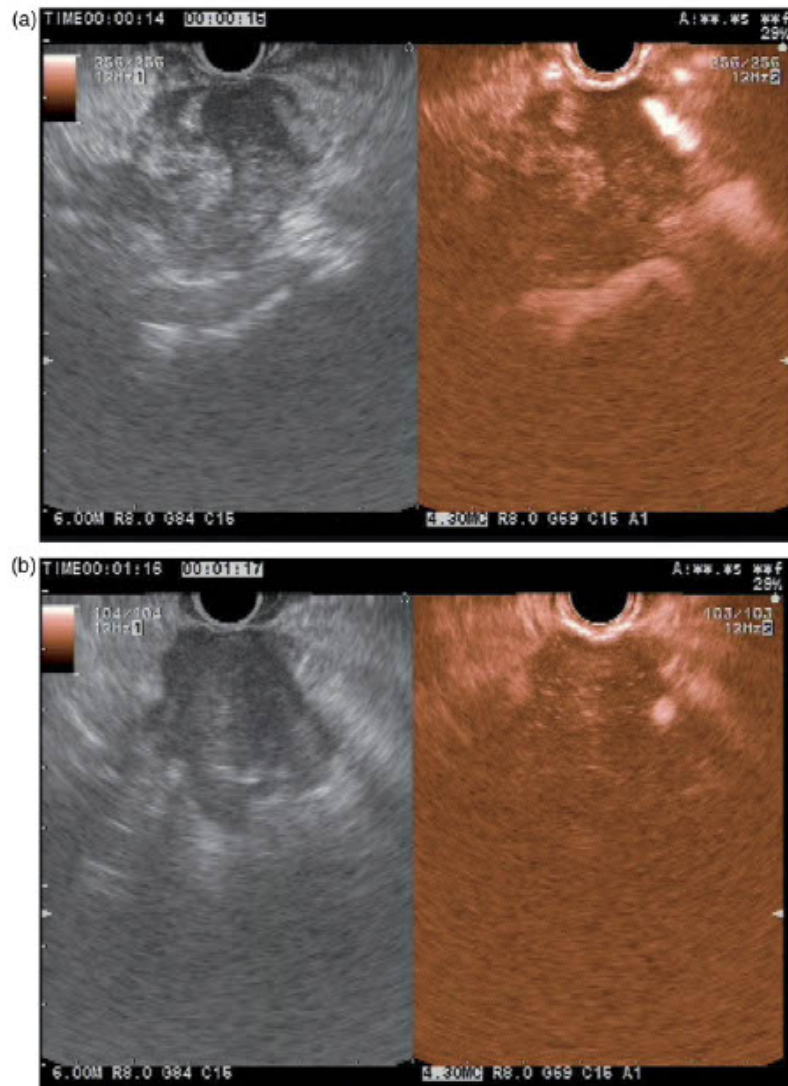


Figure 2. CEH EUS definition of malignancy. The CEH EUS marker was considered as positive if hypoenhancement of contrast flow during the arterial (A) and venous (V) phase was detected. Figure 2(a) shows arterial hypoenhancement. Figure 2(b) shows venous hypoenhancement.

medium. This was performed by another endosonographer, who was blinded to the clinical data of the patients.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to analyse the patient population. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of EUS and CEH EUS for diagnosing pancreatic carcinoma and neuroendocrine tumours were calculated along with their exact binomial confidence intervals. The degree of correlation between EUS and CEH EUS was performed using kappa statistics and Spearman's r . The agreement between the endosonographers was estimated with kappa statistics. The statistical analysis was

performed with the software tool STATISTICA 13.2 (TIBCO Software, PaloAlto, CA, USA).

Results

The study included 116 patients, with a median age of 67.5 years (minimum of 38 years, a maximum of 86 years), of which 54 were women and 62 were men. Of the 116 patients, 73 patients had a final diagnosis of pancreatic cancer, 14 patients had neuroendocrine tumours, and 20 had other tumours (pancreatitis 9, gastric and duodenal cancer infiltrating pancreas 2, metastatic lesions: renal conventional carcinoma 2, colorectal cancer 1 and pulmonary cancer 1, solid pseudopapillary neoplasia 1 and plasmacytoma 1).

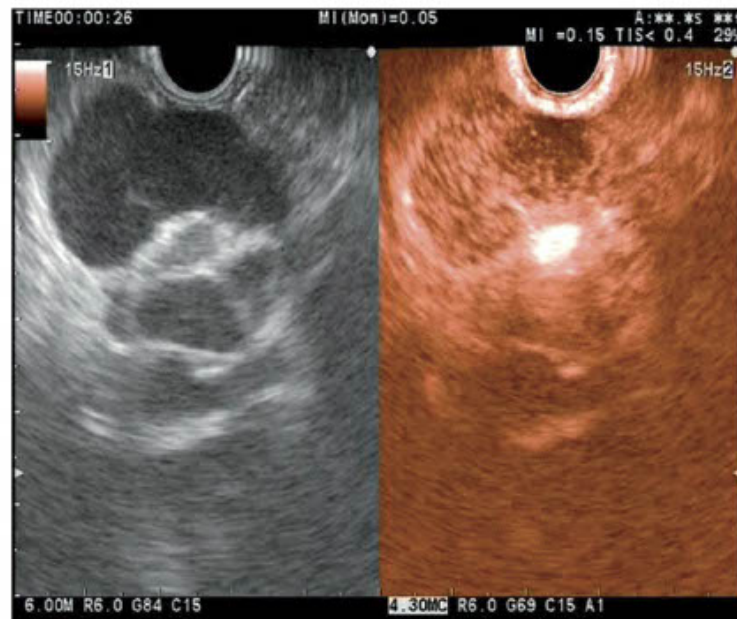


Figure 3. NET with typical hyperenhancement during the arterial phase.

Table 1. EUS marker for diagnosis of pancreatic cancer.

Pancreatic cancer (final diagnosis)	EUS marker negative	EUS marker positive	Total
No	20	12	32
Yes	12	59	71
Total	32	71	103

The result was significant, $\kappa = 0.45$, Spearman Rank $R = 0.45$ and $p < .001$. In total, 4 patients were excluded because of incomplete EUS video documentation.

Table 2. CEH EUS marker for diagnosis of pancreatic cancer.

Pancreatic cancer (final diagnosis)	CEH EUS marker negative	CEH EUS marker positive	Total
No	21	13	34
Yes	4	69	73
Total	25	82	107

The result was significant, $\kappa = 0.60$, Spearman Rank $R = 0.62$ and $p < .001$.

Table 3. EUS FNA marker for diagnosis of pancreatic cancer.

Pancreatic cancer (final diagnosis)	EUS FNA marker negative	EUS FNA marker positive	Total
No	31	3	34
Yes	9	64	73
Total	40	67	107

The result was significant, $\kappa = 0.75$, Spearman Rank $R = 0.76$ and $p < .001$.

Overall, 9 non-pancreatic lesions and cystic lesions were excluded from the study. Among the group of pancreatic cancer the lesion was located in the head of the pancreas (including the uncinate process) in 40 patients, in the neck of the pancreas in 1 patient, in the body of the pancreas in 21 patients and in the tail of the pancreas in 11 patients. The tumour was less than 15 mm big only in 10 patients with pancreatic cancer.

The sensitivity, specificity, NPV, PPV and accuracy of EUS marker for diagnosis of pancreatic cancer were 83.1% (CI 72.34–90.95%), 62.5% (CI 43.69–78.90%), 83.1% (CI 75.64–88.62%), 70.7% (CI 48.24–74.88%) and 78.6% (CI 67.34–84.46%) [Table 1]. The result was significant ($p < .001$). Even that accuracy was 78.6%, $\kappa = 0.45$ and Spearman Rank $R = 0.45$ is showing only limited capability of EUS in the differential diagnosis. The sensitivity, specificity, NPV, PPV and accuracy of CEH EUS marker for diagnosis of pancreatic cancer were 94.5% (CI 86.56–98.49%), 61.7% (CI 43.56–77.83%), 84.1% (CI 77.53–89.09%), 84% (CI 66.14–93.38%) and 84.1% (CI 75.79–90.46%). [Table 2] The result was significant ($p < .001$), $\kappa = 0.60$ and Spearman Rank $R = 0.62$ suggest greater accuracy than EUS alone. At last, the sensitivity, specificity, NPV, PPV and accuracy of FNA marker for diagnosis of pancreatic cancer were 87.6% (CI 77.88–94.20%), 91.2% (CI 76.32–98.14%), 95.5% (CI 87.83–98.44%), 77.5% (CI 64.93–86.50%) and 88.8% (CI 81.23–94.07%). [Table 3] The result was significant ($p < .001$), again $\kappa = 0.75$ and Spearman Rank $R = 0.76$ confirms the superiority of EUS FNA.

The sensitivity, specificity, NPV, PPV and accuracy of EUS marker for the diagnosis of NET were 64.3, 85.2, 40.9, 93.8 and 82.4% for CEH EUS marker 78.6, 84.9, 44, 96.3 and 84.1% and EUS FNA marker 71.4, 97.8, 83.3, 95.7 and 94.4%, respectively. Although the results look promising for NET, they are less statistically significant considering a small number of patients.

The inter-observer agreement (IA) for EUS marker of pancreatic cancer was good (for assessment of solid or cystic lesion $\kappa = 0.91$, for echogenity $\kappa = 0.75$ and for regularity of tumor borders $\kappa = 0.74$), and that for CEH EUS IA was average ($\kappa = 0.59$ for arterial phase and $\kappa = 0.68$ for washout in venous phase).

Discussion

Throughout the last several decades, the use of EUS, particularly EUS FNA, has generally improved the ability to diagnose pancreatic cancer. Therefore, it is considered the gold standard for the diagnosis of pancreatic cancer [12].

EUS alone can distinguish between the individual types of tumours with low sensitivity [13]. In our study, the sensitivity of EUS for the diagnosis of PC was rather good at 83.1%, but when used to diagnose NETs, sensitivity was as low as 64.3%.

In our study, EUS FNA had a sensitivity of 87.6% with a high kappa statistic of 0.75 indicating that 64 out of 73 cancer samples were correctly diagnosed. According to these results, EUS FNA is the perfect tool for the diagnosis of PC. Since the cytopathologists failed to confirm cancer in nine patients, repeated FNAs were necessary to obtain a diagnosis. In all of the three falsely negative cases, the cytological changes were highlighted as possible pancreatic cancer. It was the case of chronic pancreatitis and two cases of mets of pulmonary and duodenal cancer infiltrating pancreatic parenchyma.

Even CEH EUS is more accurate than EUS alone, the CEH EUS procedure seems to be useless in clinical medicine because FNA is still so precise and highly accurate. Even then, there are some possible implementations.

Among the cases in which cytology failed to confirm PC, CEH EUS was positive in 91.6%. Among 14 patients with NETs, EUS FNA failed to make a diagnosis in four patients. The sensitivity and specificity of CEH EUS markers were satisfactory at 78.6 and 84.9%. These results are in accordance with a study published by Leem et al. and others [5,18].

EUS and CEH EUS markers for cancer must be discussed before the statistical analysis. Different selections may modify the results to some extent. However, there are no standard recommendations for the setup of EUS or CEH EUS and those that have been reported vary in different works. For example, in Fusaroli's work [12], cancer is defined only by hypoechogenicity alone on EUS images. Similarly, Kamatu's work [16] defined cancer on EUS on the basis of hypoechogenicity alone, resulting in a sensitivity of 86%. With these different settings, the results may be significantly altered. In our study, the criteria for malignancy on EUS images included 'hypoechogenicity or heterogeneity and uneven tumour margins'. The criteria for malignancy on CEH EUS images were 'hypoenhancement during the venous and arterial phases'. The criteria for 'positive markers' for cancer diagnosis were similar to those used in Kitano's study [19].

A typical pattern for PC on CEH EUS images is hypoenhancement of a tumour during the arterial and venous phases. The sensitivity and specificity of this criterion for cancer are 89–96% and 64–88%, respectively. In addition, hyperenhancement has a high-negative predictive value of 90–100% [12,14]. In our study, similar results for CEH EUS were obtained. The sensitivity of the composite markers for cancer was 94.5% with a PPV of 84%. Out of a total of 73 cases of pancreatic cancer, the CEH EUS markers identified true positives in 69 cases. Four cases were missed because of isoenhancement during the arterial phase. On the other hand, CEH EUS marker was falsely positive in 13 cases.

In cases of post-acute pancreatitis or chronic pancreatitis, EUS and CEH EUS markers do not work well. Usually, the main problem is the number of artefacts. False-positive CEH

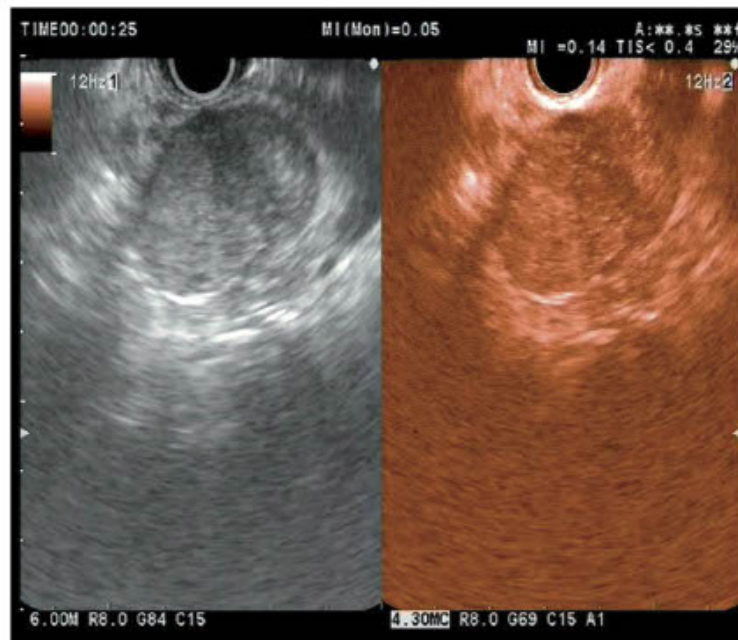


Figure 4. Solid pseudopapillary tumour with hypoenhancement and a hypervascular rim.

EUS markers found in cases of NETs may be due to the possible malignant potential of NETs. Metastatic pulmonary cancer, gastric cancer, duodenal cancer, and metastatic renal conventional cancer (Grawitz cancer) are malignant lesions, so CEH EUS has relatively few false positives. Plasmacytomas and SPNs can also potentially be malignant, so CEH EUS markers may sometimes be positive.

Published studies have reported a relatively high NPV of approximately 85% for identifying cancer with CEH EUS [12,14,15,20], suggesting that if a tumour appears hypovascular on CEH EUS but an FNA is negative, it is still likely that it is a malignant tumour. From a practical point of view, this is very important. Although CEH EUS cannot replace positive cytological findings before chemotherapy, it may at least facilitate decision-making in disputed cases. If a negative FNA is obtained but hypoenhancement is observed on CEH EUS, surgical revision or at least a repeat EUS FNA should be considered. In contrast, in cases with a negative EUS FNA with iso-enhancement or hyper-enhancement on CEH EUS, a more conservative approach should be taken [15].

The possibility of implementing CEH EUS seems to be meaningful in a subgroup of surgery candidates, who do not need to have FNA but the information about a tumour need to be more accurate before surgical resection with regards to a type of surgical procedure.

A rare finding in our study was a 42 mm SPN a tumour in a 41-year-old woman. EUS and CEH EUS images were false-positive for cancer. D'Onofrio also reported hyper-enhancement of the outer margin in these tumours, which was also observed in our case [Figure 4], but only during the setting of the second reading [21].

A very rare case of plasmacytoma was also detected in our study. The EUS appearance of a heterogeneous predominantly hypoechoic tumour was previously described in the literature [22, 23]. The EUS image of the tumour corresponds to the above-mentioned publication; it was hypoechoic and highly heterogeneous. After the administration of the contrast agent, hypoenhancement was evident during both phases.

Bias in this study may have occurred due to the contact of the patient and doctor before the procedure; thus, the doctor may have been influenced by the clinical status of the patient and by the patient's clinical history. These facts partially explain the significant differences in the reported accuracy of the EUS examinations. This problem was partially eliminated by evaluation by a second endosonographer, who was blinded to the clinical data of the patients. Inter-observer agreement showed that the best result of CEH EUS is reached in case of evaluation of late venous phase, where $\kappa = 0.68$, meaning if washout in late phase is present, one should consider cancer is present.

Conclusion

CEH EUS is a non-invasive method that allows more accurate identification of pancreatic cancer than conventional EUS. Mainly if hypoenhancement during the venous phase so-

called 'wash out' is present, a malignant aetiology of solid pancreatic lesions is highly suspicious. EUS and CEH EUS markers for NETs are less statistically significant. The highest accuracy reached EUS FNA, which should still be considered as a gold standard. In case where FNA is not indicated before a surgical resection, the CEH EUS could better specify the aetiology of the pancreatic lesion with higher accuracy than EUS alone. The inter-observer agreement and subjectivity for EUS alone were good and were acceptable for CEH EUS, mainly for late venous phase.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This project has been supported by the Czech Ministry of Defence [Grant No. MO 1012] and Ministry of Health of the Czech Republic [Grant No. 16-31028A].

ORCID

B. Bungančić  <http://orcid.org/0000-0002-2870-7003>

References

- [1] Haeno H, Gonen M, Davis MB et al. Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell*. 2012;148(1-2):362-375.
- [2] Yachida S, Jones S, Bozic I et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010; 467(7319):1114-1117.
- [3] Hanada K, Okazaki A, Hirano N et al. Diagnostic strategies for early pancreatic cancer. *J Gastroenterol*. 2015;50(2):147-154.
- [4] Dewitt J, Devereaux BM, Lehman GA, et al. Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(6):717-725.
- [5] Pulji SR, Bechtold ML, Buxbaum JL. et al. 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.
- [6] Lee TY, Cheon YK, Shim CS. Clinical role of contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasound in differentiating solid lesions of the pancreas: a single-center experience in Korea. *Gut Liver*. 2013;7(5):599-604.
- [7] Al-Haddad M, Wallace MB, Woodward TA et al. The safety of fine-needle aspiration guided by endoscopic ultrasound: a prospective study. *Endoscopy*. 2008;40(3):204-208.
- [8] Kongkam P, Ang TL, Vu CK et al. Asian Consortium of EUS. Current status on the diagnosis and evaluation of pancreatic tumor in Asia with particular emphasis on the role of endoscopic ultrasound. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(6):924-930.
- [9] Eisendrath P, Ibrahim M. How good is fine needle aspiration? What results should you expect? *Endosc Ultrasound*. 2014;3(1): 3-11.
- [10] Iglesias-Garcia J, Dominguez-Munoz JE, Abdulkader I et al. Influence of on-site cytopathology evaluation on the diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) of solid pancreatic masses. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106(9):1705-1710.

- [11] Hijoka S, Hara K, Mizuno N et al. Diagnostic performance and factors influencing the accuracy of EUS-FNA of pancreatic neuroendocrine neoplasms. *J Gastroenterol*. 2016;51(9):923–930.
- [12] Fusaroli P, Spada A, Mancino MG, et al. Contrast harmonic endoscopic ultrasound improves accuracy in diagnosis of solid pancreatic masses. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(7):629–634.e1–2.
- [13] Fusaroli P, Napoleon B, Gincul R et al. The clinical impact of ultrasound contrast agents in EUS: a systematic review according to the levels of evidence. *Gastrointest Endosc*. 2016;84(4):587–596.e10.
- [14] Kitano M, Kudo M, Yamao K et al. Characterization of small solid tumors in the pancreas: the value of contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(2):303–310.
- [15] Napoleon B, Alvarez-Sanchez MV, Gincoul R et al. Contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasound in solid lesions of the pancreas: results of a pilot study. *Endoscopy*. 2010;42(7):564–570.
- [16] Kamata K, Kitano M, Omoto S et al. New endoscopic ultrasonography techniques for pancreaticobiliary diseases. *Ultrasonography*. 2016;35(3):169–179.
- [17] Frič P, Škrha J, Šedo A et al. Early detection of pancreatic cancer: impact of high-resolution imaging methods and biomarkers. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28(12):e33–e43.
- [18] Leem G, Chung MJ, Park JY et al. Clinical value of contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography in the differential diagnosis of pancreatic and gallbladder masses. *Clin Endosc*. 2018;51(1):80–88.
- [19] Kitano M, Sakamoto H, Komaki T, Kudo M. New techniques and future perspective of EUS for the differential diagnosis of pancreatic malignancies: contrast harmonic imaging. *Dig Endosc*. 2011; 23(Suppl 1):46–50.
- [20] Dietrich CF, Ignee A, Braden B et al. Improved differentiation of pancreatic tumors using contrast-enhanced endoscopic ultrasound. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(5):590–597.e1.
- [21] D'Onofrio M, Malagò R, Vecchiato F, et al. Contrast-enhanced ultrasonography of small solid pseudopapillary tumors of the pancreas: enhancement pattern and pathologic correlation of 2 cases. *J Ultrasound Med*. 2005;24(6):849–854.
- [22] Csomor J, Bunganič B, Dvořáková D et al. Extramedullary plasmacytoma of the pancreas complicated with left-sided portal hypertension. A case report and literature review. *J Gastrointest Cancer*. 2018. DOI:10.1007/s12029-018-0146-8
- [23] Miljković M, Senadhi V. Use of endoscopic ultrasound in diagnosing plasmacytoma of the pancreas. *JOP*. 2012;13(1):26–29.

Vyšetření mutace KRAS v EUS-FNA preparátech pacientů s tumorem pankreatu

¹Bohuš Bunganič, ²Tereza Hájková, ³Lucie Benešová, ²Barbora Bejšánová, ¹Martin Laclav, ¹Martina Hružová, ³Eva Traboulsi, ¹Přemysl Frič, ¹Štěpán Suchánek, ²Marek Minárik, ¹Miroslav Zavoral

¹Interní klinika 1. LF UK a ÚVN – Vojenské fakultní nemocnice Praha

²Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES)

³Oddělení patologie ÚVN – Vojenské fakultní nemocnice Praha

Čas. Lék. čes. 2016; 155: 48–51

SOUHRN

Diferenční diagnostika pankreatických solidních tumorů pomocí EUS-FNA je asi v 10–15 % případů náročná. Slibnou metodou, která v těchto případech pomáhá rozlišit chronickou pankreatitidu a karcinom, je vyšetření bodové mutace proto-onkogenu KRAS. Doposud však není zavedená do klinické praxe. Cílem zkoumání bylo stanovení senzitivity testu KRAS s použitím různých typů vzorků pacientů s tumory pankreatu a testování vlivu přítomnosti mutace KRAS na prognózu přežití těchto pacientů. 147 pacientů podstoupilo EUS-FNA vyšetření pankreatického tumoru doplněné o odběr vzorku krve s následnou separací plazmy pro detekci cirkulující tumorové DNA. Část bioptického vzorku byla ponechána nativní ve stabilizačním roztoku a část byla zpracována do cytologického nátěru. Vzorky (nativní aspiráty, cytologické nátěry, plazma) byly vyšetřeny na přítomnost mutace genu KRAS metodou heteroduplexní analýzy pomocí denaturační kapilární elektroforézy.

V souboru 147 pacientů s ložiskovým procesem pankreatu byl diagnostikován 118x karcinom, 26x chronická pankreatitida, 3x neuroendokrinní tumor. Celkem bylo vyšetřeno 147 nativních aspirátů, 118 cytologických nátěrů a 94 vzorků plazmy. Ve skupině

pacientů s karcinomem pankreatu bylo nejvyšší senzitivity vyšetření mutace KRAS dosaženo při použití cytologických preparátů, kdy byla mutace detekována v 90 % (106/118) vzorků. Při použití nativních buněčných aspirátů byla mutace detekována v 78 % (92/118) a vyšetření plazmy bylo pozitivní ve 27 % (24/90) případů. U čtyř pacientů s chronickou pankreatitidou byla detekována mutace KRAS, ačkoliv u žádného z nich nebyl karcinom potvrzen cytologicky. U dvou z těchto pacientů byl v dalším průběhu potvrzen karcinom, jeden pacient zemřel předčasně na komplikace alkoholového deliria a poslední byl indikován k radikálnímu chirurgickému zákroku.

Vyšetření mutace KRAS lze provádět u všech pacientů podstupujících EUS-FNA, přičemž nejvhodnějším typem vzorků pro toto vyšetření jsou cytologické preparáty. Vyšetření KRAS je vhodné aplikovat ve skupině pacientů s nejasnou diferenční diagnostikou, zvláště pak u nemocných s chronickou pankreatitidou, kde metoda umožňuje identifikovat časný karcinom pankreatu v nepřehledném terénu zánětlivých změn.

KLÍČOVÁ SLOVA

karcinom pankreatu, chronická pankreatitida, mutace KRAS, EUS-FNA

SUMMARY

Bunganič B., Hájková T., Benešová L., Bejšánová B., Laclav M., Hružová M., Traboulsi E., Frič P., Suchánek Š., Minárik M., Zavoral M. KRAS mutation assay on EUS-FNA specimens from patients with pancreatic mass

Differential diagnosis of solid pancreatic masses using EUS-FNA is in 10–15 % of cases still challenging. Promising method, which helps to distinguish between chronic pancreatitis and cancer, is point mutations of the proto-oncogene KRAS test. This method is not established in routine clinical practice yet. Objectives were the determination of the sensitivity of the KRAS assay using various kinds of samples of patients with pancreatic mass and testing the effect of the presence of KRAS mutations on the prognosis of survival. 147 patients underwent EUS-FNA examination of pancreatic mass, accompanied by blood sampling with subsequent separation of plasma for the detection of circulating tumor DNA. Part of biopsy sample was left native in a stabilizing solution and part as cytological smear. Samples (native aspirates, cytological smears, plasma) were examined for the presence of KRAS mutation by heteroduplex analysis, denaturing capillary electrophoresis.

Among 147 patients with pancreatic masses, 118 were diagnosed as a cancer, 26 chronic

pancreatitis, 3 neuroendocrine tumor. In total 147 native aspirates, 118 cytological smears and 94 plasma samples were examined. The highest sensitivity of KRAS mutation was reached in the group of pancreatic cancer patients using cytology, in which 90 % of KRAS mutation was detected (106/118 of the samples). When using the native cellular aspirates, mutation was detected in 78 % (92/118 samples), and examination of plasma was positive in 27 % (24/90 samples). In four patients with chronic pancreatitis KRAS mutations was detected, although none has been cytologically confirmed as a cancer. Two of these four patients were confirmed in the course of the disease as a cancer, one patient died because of alcoholic delirium and the last one was indicated for surgery recently.

Examination of KRAS mutations can be performed in all patients undergoing EUS-FNA, with the cytology being the most reliable type of sample for genetic tests. KRAS examination would be reasonable to introduce into routine clinical practice in a group of patients with unclear differential diagnosis of chronic pancreatitis, especially in those with suspicion of cancer in inflammatory terrain.

KEYWORDS

pancreatic cancer, chronic pancreatitis, KRAS mutation, EUS-FNA

ÚVOD

Tumory pankreatu představují diagnostické dilema asi v 10-15% případů (1-4). Zejména rozlišení benigní a maligní etiologie je pro další léčbu pacientů zcela zásadní. Pacienti s časně diagnostikovaným karcinomem pankreatu mají největší šanci na vyléčení (tab. 1.) (5, 6). Přibližně v 90% případů, je diagnóza stanovena v pozdním stádiu, a tedy s minimální šancí na přežití (7). Hlavním důvodem pozdní diagnózy je absence časných příznaků tohoto onemocnění (8).

V časně fázi procesu karcinogeneze, ještě před morfologickými změnami pankreatického duktálního epitelu, bylo zjištěno několik genetických alterací včetně mutace proto-onkogenu KRAS (9), která je nalézána až v 93% karcinomů pankreatu (10), zatímco v tkáni chronické pankreatitidy přítomna nebývá (11). Stanovení mutace KRAS tedy může tedy v diagnostickém procesu pankreatických lézí pomoci odlišit chronickou pankreatitidu a karcinom. I přes značný pokrok v genetickém testování však nadále není vyšetření KRAS mutace zavedeno do běžné klinické praxe. Obzvlášť testování KRAS ze vzorků získaných endosonograficky tenkojehlovou aspirací (EUS-FNA) je výjimečné, což je dané pravděpodobně obavou z nedostatečné velikosti EUS-FNA vzorků pro genetické analýzy. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli v rámci této studie otestovat využitelnost dvou typů biptických vzorků, nativních aspirátů a cytologických preparátů, pro rutinní stanovení KRAS mutace. Nově se nabízí také možnost vyšetřování molekulárních markerů z cirkulující tumorové DNA (ctDNA) (8, 12), proto jsme možnost rutinního vyšetřování KRAS mutace testovali také ve vzorcích plazmy. Senzitivitu KRAS testu jsme stanovili ve všech třech typech použitých vzorků a zaměřili jsme se také na prověření často diskutované prognostické role KRAS mutace.

MATERIÁL A METODY

PACIENTI

Do studie bylo zahrnuto celkem 147 pacientů s tumorem pankreatu, kteří podstoupili vyšetření EUS s FNA a následný odběr krve. V souboru bylo 118 pacientů s karcinomem pankreatu, 26 pacientů s chronickou pankreatitidou a 3 pacienti s neuroendokrinním tumorem. Skupinu pacientů s karcinomem tvořilo 64 mužů ve věku průměrně 69 ± 9 let (rozmezí 44–92 let) a 54 žen ve věku průměrně 66 ± 9 let (rozmezí 44–87 let) s PDAC ve stadiu II (n = 3), III (n = 53) a IV (n = 58), u čtyř pacientů nebylo stadium onemocnění určeno. Studie byla provedena v souladu se zásadami uvedenými v Helsinské deklaraci a schválena Etickou komisí Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice v Praze. Všichni jedinci zařazení do studie podepsali informovaný souhlas s vyšetřením.

Tab. 1 Přežití pacientů s karcinomem pankreatu podle stadia TNM

Klinické stadium	TNM stadium	Sleté přežití (%)
Časný neinvazivní karcinom pankreatu	Tis/1a	85,7/68,7
Časný invazivní karcinom pankreatu	Ib/II	23,8
Pokročilý invazivní karcinom pankreatu	III a IV	2,3

METODY

Endosonografické vyšetření prováděli dva endoskopisté. K vyšetření byl použit lineární elektronický echoendoskop GF-UCT 180 Olympus a ultrazvukový přístroj Aloka Prosound Alpha 10. KEUS-FNA byly použity jehly Pro-Core 19 G a 22 G (Cook Medical), Expect 19 G a 22 G (Boston Scientific) a standardní jehly Olympus 22 G. Při konvenčním EUS byla u každé léze popsána lokalizace, velikost, homogenita, echogenita a okraje. Jako karcinom bylo označeno ložisko hypoechoogenní a nehomogenní a/nebo s nepravidelnými okraji (13). Pro diagnózu chronické pankreatitidy byla použita Rosemontská kritéria (14).

Část biptického vzorku byla uchována nativní ve stabilizačním roztoku při -20 °C, část byla zpracována do cytologického nátěru. Suché cytologické nátěry byly doručeny na patologii, kde byly vzorky fixovány a barveny roztokem Giemsa Romanovski a cytologem se specializací v pankreatobilární diagnostice následně provedl jejich zhodnocení. Na cytologických preparátech byla cytopatologem vyznačena oblast s majoritním výskytem nádorových buněk (minimálně 80 %) a vzorky byly poté odeslány na genetickou analýzu.

IZOLACE DNA A DETEKCE MUTACE KRAS

V případě aspirátů byl materiál ve stabilizačním roztoku rozmrazen, centrifugován pro vytvoření pelety a peleta byla využita pro izolaci DNA. Z cytologických preparátů byl mikrodisekovaný materiál z vyznačené oblasti nádorových buněk a přenesen do mikrozkušavky. DNA pak byla z obou typů materiálu izolována kitem Recover All Total Nucleic Acid isolation (Ambion) podle pokynů výrobce, pouze 1. krok izolace (deparafinizace) byl vynechán. Ze vzorku krve byla nejprve dvojnásobně centrifugací separována plazma a bezprostředně zmrazena na -20 °C. Ve zmraženém stavu byla dopravena do genetické laboratoře, kde byla z plazmy izolována ctDNA kitem NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Dueren, Německo).

Detekce somatických mutací genu KRAS byla ve všech třech typech vzorků provedena metodou PCR s následnou heteroduplexní analýzou pomocí kapilární gelové elektroforézy při teplotním gradientu na přístroji ABI Prism 3100 (Applied Biosciences), stejně jako v předchozích studiích (15, 16). Výsledky heteroduplexní analýzy byly vizualizovány pomocí softwaru Gene Marker v2, 4, 2.

TEST PROGNOSTICKÉ ROLE MUTACE KRAS

K této analýze byly využity pouze cytologické preparáty, ve kterých bylo dosaženo nejvyšší senzitivity. Pacienti byli rozděleni do skupiny s mutací KRAS a bez této mutace. Byla stanovena korelace přítomnosti mutace KRAS s prognózou (celkovým přežitím) pomocí Kaplanovy-Meierovy metody a křivky přežití obou skupin pacientů byly porovnány pomocí log-rank testu. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

ENDOSONOGRRAFIE

Endosonografie je považována za metodu s nejvyšší senzitivitou pro stanovení diagnózy fokální pankreatické léze i pro staging pankreatického karcinomu (13). Všichni pacienti podstoupili EUS vyšetření. Byla vypočtena senzitivita, specifická, pozitivní prediktivní hodnota a negativní

PŮVODNÍ PRÁCE

prediktivní hodnota pro EUS, které dosahovali 82,9%, 45,5%, 82,9% a 45,5%.

TENKOJEHOVÁ ASPIRACE (FNA)

Tenkojehlová aspirace je bezpečná metoda zavedená pro vyšetření všech pacientů s podezřením na karcinom při EUS vyšetření. V této studii dosahovala celková senzitivita FNA, bez přítomnosti patologa při EUS vyšetření, pro karcinom pankreatu 88 %, specifická 100 %, PPV 100 %, NPV 20 %. Jako nekonkluzivních bylo patologem označeno 13 % vzorků.

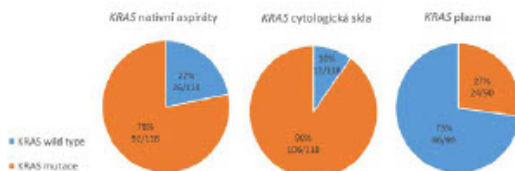
GENETICKÁ ANALÝZA

Celkem bylo na přítomnost mutace KRAS testováno 147 nativních aspirátů všech pacientů podstupujících EUS-FNA, 118 cytologických preparátů a 94 vzorků plazmy pacientů s karcinomem pankreatu. Úspěšnost stanovení mutace KRAS je shrnuta v tab. 2. U pacientů s NET a CHP byly k testu KRAS použity pouze nativní buněčné aspiráty se záchytem 0/3 (0 %), respektive 4/26 (15 %).

Tab. 2 Úspěšnost stanovení mutace KRAS

Typ vzorku	Úspěšnost stanovení KRAS
Nativní aspiráty	147/147 (100%)
Cytologická skla	118/118 (100%)
Plazma	90/94 (96%)

Pro skupinu pacientů s karcinomem pankreatu byly k dispozici všechny 3 typy vzorků, přičemž nejvyšší senzitivita detekce (záchytu) mutace KRAS bylo dosaženo při použití cytologických preparátů (90 %). V nativních aspirátech byla mutace detekována pouze v 78 % případů, výsledky vyšetření v těchto vzorcích tedy byly ve 12 % případů falešně negativní. Nejnižšího záchytu bylo dosaženo při detekci z plazmy, kde bývá DNA pocházející z nádoru (ctDNA) obecně přítomna ve



Obr. 1 Záchyt mutace genu KRAS ve třech typech vzorků

velmi nízkých koncentracích. Výsledný záchyt mutace KRAS v ctDNA činil pouze 27 % (obr. 1).

U 4 z 28 pacientů s CHP byla detekována mutace KRAS. U žádného nebyl karcinom iniciálně cytologicky diagnostikován. V průběhu klinického sledování byl potvrzen karcinom pankreatu u 2 pacientů, 1 pacient předčasně zemřel pro komplikace alkoholového deliria, 1 pacient byl aktuálně indikován k resekcímu výkonu, který odmítl. Srovnání přežití pacientů s mutovaným KRAS oproti nemutovanému (wt) nepřineslo statisticky významný rozdíl v prognóze (obr. 2).

DISKUSE

V diagnostice se genetické testování mutace KRAS a dalších testů včetně jejich kombinace uplatňuje již řadu let. Specifická

samotného testu KRAS je natolik vysoká, že jeho pozitivita s vysokou přesností signalizuje malignitu (15, 17). Mutace KRAS byla opakovaně detekována u 74 % karcinomů pankreatu (18), 77 % (17), 70 % (16), 77–84 % (19) a 92 % (20). V našem souboru bylo nejvyšší senzitivity EUS-FNA detekce mutace KRAS dosaženo při použití cytologických preparátů (90 %); byla dokonce vyšší, než je doposud uvedeno ve většině recentních publikací. Kromě toho, že byly nádorové buňky na cytologických vzorcích před genetickou analýzou označeny cytopatologem, se na vysoké senzitivě podílí jistě i metodika zpracování popsaná již v dřívějších pracích publikovaných našim pracovištěm (15, 16).

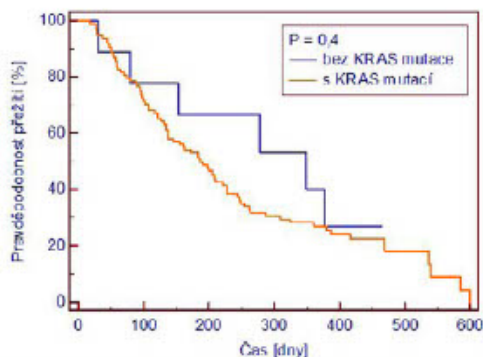
Samotný fakt, že v terénu chronické pankreatitidy byl v naší studii detekován KRAS bez náležité cytopatologické verifikace, je velmi zajímavý. V doposud publikovaných pracích byl zaznamenán pouze jeden případ pozitivity mutace KRAS v terénu chronického zánětu pankreatu. Boumet et al. (2014) doporučují zapojit do vyšetřovacího procesu nejasné pankreatické masy testování mutace KRAS. V případě klinické či radiologické prezentace pseudotumorózní formy chronické pankreatitidy (nebo nejistého závěru cytopatologa) může identifikace KRAS bez mutace vyloučit maligní transformaci (21). V praxi může indikace resekcímu výkonu pouze na podkladě mutace KRAS činit jisté potíže, proto je doporučováno před definitivním rozhodnutím o chirurgické léčbě opakovat EUS s FNA (21).

Přehled studií vyšetření mutace KRAS u vzorků získaných pomocí EUS-FNA v rámci diferenciální diagnostiky karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy uvádí tab. 3.

Tab. 3 Přehled vyšetření mutace KRAS u vzorků získaných EUS-FNA v rámci diferenciální diagnostiky karcinomu pankreatu a chronické pankreatitidy

Studie/rok	Počet pacientů	Karcinom pankreatu % (počet pac.)	Chronická pankreatitida % (počet pac.)
Tada et al.17 (2002)	34	77 (20/26)	0 (0/8)
Pellise et al.23 (2003)	57	73 (24/33)	0 (0/5)
Zheng et al.24 (2003)	66	83 (45/54)	0 (0/5)
Takahashi et al.18 (2005)	77	74 (46/62)	0 (0/15)
Khalid et al.20 (2006)	21	73 (1/15)	0 (0/2)
Maluf-Filho et al.25 (2007)	74	63 (34/57)	9 (1/11)
Boumet et al.26 (2009)	178	67(86/129)	0(0/27)
Celkový počet pacientů v publikovaných studiích	507	71(266/376)	1(1/73)
Naše studie	118	90(106/118)	14(4/28)

Prognostický význam KRAS byl hodnocen v několika recentních studiích, avšak výsledky jsou značně rozporuplné. Mutace KRAS je prokazatelně asociovaná s horším přežíváním ve srovnání s nemutovaným KRAS (wtKRAS), nicméně se



Obr. 2 Přežití pacientů v závislosti na přítomnosti mutace KRAS

jedná o statisticky hraničně významné asociace. Práce, které hodnotily prognostický význam mutace KRAS z EUS-FNA, neidentifikovaly studované molekulární markery jako prognostické ukazatele. Naproti tomu jsou známé závěry studií genetické analýzy resekátů karcinomu pankreatu, které naznačují, že obzvlášť některé typy mutací KRAS, např. G12D, jsou asociovány s horším přežíváním (22). Pravděpodobně proto jsou v současnosti většinou geneticky vyšetřovány zejména tkáňové tumory z resekátů, přestože jsou k dispozici jen u omezeného množství pacientů. V našem zkoumání korelací přežití pacientů s mutovaným KRAS a wtKRAS nebyl zjištěn významný rozdíl v prognóze. Do hodnocení ovšem nebyly zahrnuty výsledky mutací jednotlivých typů KRAS, které vyžadují podrobnější analýzu.

ZÁVĚR

Vyšetřování mutace KRAS z EUS-FNA preparátů je dostatečně senzitivní. Specifita testu KRAS je natolik vysoká, že jeho pozitivita s vysokou přesností signalizuje malignitu, naproti tomu negativní výsledek svědčí spíše pro benigní etiologii. Přínos je zaznamenán především u pacientů s chronickou pankreatitidou, kde nebyla na základě ostatních klinických faktorů indikována resekce. V případě průkazu přítomnosti KRAS by měla být resekce znovu zvážena vzhledem k vysokému riziku skrytého karcinomu pankreatu.

Pro využití KRAS jakožto prediktivního markeru nejsou dostatečné klinické důkazy.

Tato práce byla podpořena granty Ministerstva zdravotnictví ČR, projekty NT 13638 a NT 14 254-3, a Grantové agentury Ministerstva obrany ČR – projekt MO 1012.

Literatura

- Müller MF, Meyenberger C, Bertschinger P et al. Pancreatic tumors: evaluation with endoscopic US, CT, and MR imaging. *Radiology* 1994; 190(3): 745–751.
- Rosewicz S, Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. *Lancet* 1997 Feb 15; 349(9050): 485–489.
- Varadarajulu S, Tamhane A, Eloubeidi MA. Yield of EUS-guided FNA of pancreatic masses in the presence or the absence of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2005 Nov; 62(5): 728–736.
- Pietryga JA, Morgan DE. Imaging preoperatively for pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2015 Aug; 6(4): 343–357.
- Hanada K, Okazaki A, Hirano N et al. Diagnostic strategies for early pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 2015 Feb; 50(2): 147–154.

- Hanada K, Okazaki A, Hirano N et al. Effective screening for early diagnosis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015; 29(6): 929–939.
- Chari ST, Kelly K, Hollingsworth MA et al. Early detection of sporadic pancreatic cancer: summative review. *Pancreas* 2015 Jul; 44(5): 693–712.
- Kenner BJ, Chari ST, Cleeter DF, Go VL. Early detection of sporadic pancreatic cancer: strategic map for innovation—a white paper. *Pancreas* 2015 Jul; 44(5): 686–692.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000 Aug; 6(8): 2969–2972.
- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 2012 Nov 15; 491(7424): 399–405.
- Ginestà MM, Mora J, Mayor R et al. Genetic and epigenetic markers in the evaluation of pancreatic masses. *J Clin Pathol* 2013 Mar; 66(3): 192–197.
- Majumder S, Chari ST, Ahlquist DA. Molecular detection of pancreatic neoplasia: current status and future promise. *World J Gastroenterol* 2015 Oct 28; 21(40): 11387–11395.
- Kitano M, Kudo M, Yamao K et al. Characterization of small solid tumors in the pancreas: the value of contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography. *Am J Gastroenterol* 2012 Feb; 107(2): 303–310.
- Catalano MF, Sahai A, Levy M et al. EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification. *Gastrointest Endosc* 2009 Jun; 69(7): 1251–1261.
- Šálek C, Benešová L, Zavoral M et al. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2007 Jul 21; 13(27): 3714–3720.
- Šálek C, Minaříková P, Benešová L et al. Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2009 May; 29(5): 1803–1810.
- Tada M, Komatsu Y, Kawabe T et al. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002 Sep; 97(9): 2263–2270.
- Takahashi K, Yamao K, Okubo K et al. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005 Jan; 61(1): 76–79.
- Ginestà MM, Mora J, Mayor R et al. Genetic and epigenetic markers in the evaluation of pancreatic masses. *J Clin Pathol* 2013 Mar; 66(3): 192–197.
- Khalid A, Dewitt J, Othori NP et al. EUS-FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol* 2011; 11(5): 482–486.
- Bournet B, Gayral M, Torrisani J et al. Role of endoscopic ultrasound in the molecular diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014 Aug 21; 20(31): 10758–10768.
- Rachakonda PS, Bauer AS, Xie H et al. Somatic mutations in exocrine pancreatic tumors: association with patient survival. *PLoS One* 2013; 8(4): e60870.
- Pellisé M, Castells A, Ginès A et al. Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 May 15; 17(10): 1299–1307.
- Zheng M, Liu LX, Zhu AL et al. K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses. *World J Gastroenterol* 2003 Jan; 9(1): 188–191.
- Maluf-Filho F, Kumar A, Gerhardt R et al. K-ras mutation analysis of fine needle aspirate under EUS guidance facilitates risk stratification of patients with pancreatic mass. *J Clin Gastroenterol* 2007 Nov-Dec; 41(10): 906–910.
- Bournet B, Souque A, Senesse P et al. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2009 Jun; 41(6): 552–557.


ADRESA PRO KORESPONDENCI:

MUDr. Bohuš Bunganic

Interní klinika 1. lékařské fakulty UK a Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice U Vojenské nemocnice 1200, 160 00 Praha 6
e-mail: bohus.bunganic@uvn.cz



Comparison of Native Aspirates and Cytological Smears Obtained by EUS-Guided Biopsies for Effective DNA/RNA Marker Testing in Pancreatic Cancer

Lucie Benesova¹ · Tereza Halkova¹ · Bohus Bunganic² · Barbora Belsanova¹ · Miroslav Zavoral² · Eva Traboulsi³ · Marek Minarik^{1,2} 

Received: 5 January 2018 / Accepted: 10 October 2018
© Arányi Lajos Foundation 2018

Abstract

We compare two types of pancreatic carcinoma samples obtained by EUS-guided fine needle biopsy (EUS-FNB) in terms of the success rates and clinical validity of analysis of two most commonly investigated DNA/RNA pancreatic cancer markers, *KRAS* mutations and miR-21 expression. 118 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma underwent EUS-FNB. The collected sample was divided, one part was stored in a stabilizing solution as native aspirate (EUS-FNA) and second part was processed into the cytological smear (EUS-FNC). DNA/RNA extraction was followed by analysis of *KRAS* mutations and miR-21 expression. For both sample types, the yields of DNA/RNA extraction and success rates of *KRAS* mutation and miRNA expression were evaluated. Finally, the resulting *KRAS* mutation frequency and miR-21 prognostic role were compared to literature data from tissue resections. The overall amount of isolated DNA/RNA from EUS-FNC was lower compared to the EUS-FNA, average yield 10 ng vs 147 ng for DNA and average yield 164 vs. 642 ng for RNA, but the success rates for *KRAS* and miR-21 analysis was 100% for both sample types. The *KRAS*-mutant detection frequency in EUS-FNC was 12% higher than in EUS-FNA (90 vs 78%). The prognostic role of miR-21 was confirmed in EUS-FNC ($p = 0.02$), but did not reach statistical significance in EUS-FNA ($p = 0.06$). Although both types of EUS-FNB samples are suitable for DNA/RNA extraction and subsequent DNA mutation and miRNA expression analysis, reliable results with clinical validity were only obtained for EUS-FNC.

Keywords EUS-FNA · Pancreatic cancer · *KRAS* · miR-21

Introduction

Pancreatic cancer with its most common subtype, the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), is one of the most feared cancers because of its dismal survival prognosis of just several

months in most cases. Due to the absence of clinical symptoms in its early phase, PDAC is typically diagnosed in advanced inoperable stages, which are characterized by a very rapid progression. Currently, there is a lack of reliable biochemical markers useable in diagnosis and/or management of the disease. The only tumor marker used in clinical practice, the CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9), has a limited use in the diagnosis of PDAC with its relatively low sensitivity and specificity (79–81% and 82–90%, respectively) [1].

In the field of molecular markers based on DNA or RNA, a proto-oncogene *KRAS* has been widely investigated in PDAC. Mutation-activated *KRAS* is a well-known driver of initiation and progression of PDAC. Determination of the presence of point mutations in the *KRAS* can mainly be used in a differential diagnosis of focal lesions (chronic pancreatitis vs. carcinoma), as *KRAS* mutation occur in up to 93% of pancreatic cancers [2], while they are virtually absent in the tissue of chronic pancreatitis [3, 4]. *KRAS* mutation status could potentially have a predictive role in a targeted biological therapy,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12253-018-0490-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marek Minarik
mminarik@email.com

¹ Centre for Applied Genomics of Solid Tumors (CEGES), Genomac Research Institute, 161 00 Prague, CZ, Czech Republic

² Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine of Charles University and Military University Hospital, 169 02 Prague, CZ, Czech Republic

³ Pathology department, Military University Hospital, 169 02 Prague, CZ, Czech Republic

but no inhibitors of KRAS signaling pathway have yet been demonstrated to have any effects in PDAC treatment [5]. Therefore, attention is now put on key effectors downstream of KRAS signaling, particularly phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, through which it would be possible to target the KRAS indirectly [5, 6]. Currently, more than 40 PI3K and more than 20 MAPK inhibitors are included in clinical trials, so it is likely that in the future will the mutation status of the *KRAS* gene have a predictive role [6]. Most recently, we found that a certain type of *KRAS* mutations is an important prognostic marker [7]. It is therefore clear that KRAS is in PDAC key marker with great future potential.

Micro RNAs (miRNAs) present another promising class of biomarkers. An aberrant expression of miRNAs that induce silencing of key signaling pathway genes has been described in a variety of cancers, including PDAC. Increased or decreased levels of these miRNA can then cause incorrect cell signaling, and thus contribute to malignant transformation. In a recent review [8], we have listed miRNAs that are involved in carcinogenesis of pancreatic tissue. Expression of the most prominent, miR-21, is significantly increased in PDAC compared to non-malignant tissue [9–15] and in addition, its high levels correlate with shorter overall survival [9, 11, 13–16]. Hence, miR-21 represents not only a promising diagnostic but also prognostic marker for clinical practice.

Analysis of above mentioned molecular markers, *KRAS* and miRNA, are currently mainly performed on the resected tissue of pancreatic tumors. This, however, is relevant only for a small subgroup of PDAC patients (ca. 15%) as the advanced disease typically prevents undergoing of surgical treatment. The endoscopic ultrasound-guided fine-needle biopsy (EUS-FNB) remains the main source of tumor tissue applicable to all patients as other alternative sample processing approaches (such as cell-blocks) inherently suffer from DNA degradation and chemical modification due to the formalin fixation. At the same time with other sample types tumor DNA yield is reduced due to the high content of wildtype DNA coming from lymphocytes. Hence EUS-FNB with subsequent cytological evaluation is currently a standard diagnostic procedure for PDAC [17].

However, use of EUS-FNB samples for molecular analysis is still rare. This is probably due to the low content of representative material with sufficient quality compared to the resection samples. Development of reliable analysis methodology of the molecular markers from EUS-FNB samples is therefore crucial for their introduction to the clinical use.

EUS-FNB samples of pancreatic tissue are processed into smears for cytological diagnosis. In the past, we and others have demonstrated feasibility of the cytological smears (EUS-FNC) for *KRAS* mutation detection [3, 18, 19]. However most pathologists performing *KRAS* testing from EUS-FNB samples prefer native cellular aspirate (EUS-FNA) as the source

material [20–23]. Although EUS-FNA allows the extraction of a sufficient amount of high quality DNA/RNA, the sample is not evaluated by a cytologist and accurate representation of the tumor cells is uncertain. Confirmation of the presence of tumor cells is then done indirectly by parallel evaluation of EUS-FNC prepared from a different part of the collected aspirate. It seems, therefore, that a better approach is to perform *KRAS* analysis of cellular material directly from EUS-FNC only on selected tumor cells to prevent contamination by leukocytes, stroma and other non-malignant cells.

The use of EUS-FNB samples for analysis of miRNA expression is also rare. Existing EUS-FNB studies of miRNA mainly utilized the EUS-FNA [24–26] as a source material. Compared to mutations, determining miRNA levels requires more precise information of the amount of tumor cells within the sample (cellularity), as the contaminating elements may exhibit significantly different miRNA expression resulting in false results. Therefore, analysis of EUS-FNC is a better approach for determination of miRNA levels than of EUS-FNA. Surprisingly, miRNA analysis from EUS-FNC in PDAC has not yet been described unlike other cancers [27].

Building on our previous studies of somatic mutations in PDAC cytological smears [3, 18], the aim of this study was to investigate the feasibility of miRNA analysis and to compare the utility of two common EUS-FNB sample types - EUS-FNC and EUS-FNA commonly acquired in clinical practice. Both specimen types were evaluated in terms of the DNA/RNA extraction yields and subsequently, detecting *KRAS* mutations and miR21 expression, by the outcome and clinical validity of the molecular genetic testing.

Materials and Methods

Patients

The study design was reviewed and certified by the Scientific and Ethics boards of the Military University Hospital. All patients admitted into the study have signed an informed consent. The study prospectively recruited a total of 120 patients who were diagnosed with PDAC based on the EUS examination, supplemented by EUS-FNC evaluation. Two patients were subsequently excluded because of tumor duplicity. The characteristics of the final group of 118 patients are listed in Table 1.

EUS-FNB Sampling

EUS was performed using a linear echo endoscope GF 180 UCT (Olympus), and the tumor was collected by a standard 22G FNA needle. The resulting sample types evaluated in this work are shown in Fig. 1.

Table 1 Patient characteristics

Total patients		118 (100%)
Gender	Male	64 (54%)
	Female	54 (46%)
Location of PDAC	Head	81 (69%)
	Body	28 (24%)
	Tail	9 (8%)
Disease stage	II	3 (3%)
	III	54 (46%)
	IV	58 (49%)
	unknown	3 (3%)

In all cases, part of the obtained material (Fig. 1a) was smeared onto a slide and submitted to cytological evaluation for final confirmation of PDAC diagnosis. In order to preserve DNA there was no fixation, cytology slides were air dried and then May-Grünwald-Giemsa staining was used upon examination, areas of tumor cells (at least 80%) were marked by the cytologist for subsequent genetic analysis as shown in Fig. 1b. The remaining fresh aspirate was placed into a stabilizing solution (RNAlater, Ambion ThermoFisher Scientific, Grand Island, New York, USA) at room temperature and the next day put at -20°C until processing for genetic testing. A total of 118 EUS-FNA and 118 EUS-FNC were processed.

Extraction of Nucleic Acids from Native Aspirates and Cytological Specimens

Material from the cytological slides in the marked areas of tumor cells was dissected and transferred into a tube. The remaining parts from the original native aspirates (Fig. 1a) placed in stabilization solution were first slowly thawed, then centrifuged to create a pellet and, finally, the supernatant stabilizer solution was removed. From both sample types, the total RNA and DNA was isolated using the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion

ThermoFisher), which is primarily designed for the extraction of nucleic acids from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) blocks. Nucleic acids were isolated according to the manufacturer's instructions; only the initial step (deparaffinization) was omitted. The concentration of nucleic acid was measured with a fluorimeter (Qubit 2.0, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) using a RNA HS Assay Kit with a detection limit of 20 ng/ml and a dsDNA HS Assay kit with a detection limit of 0.5 ng/ml (both from Invitrogen).

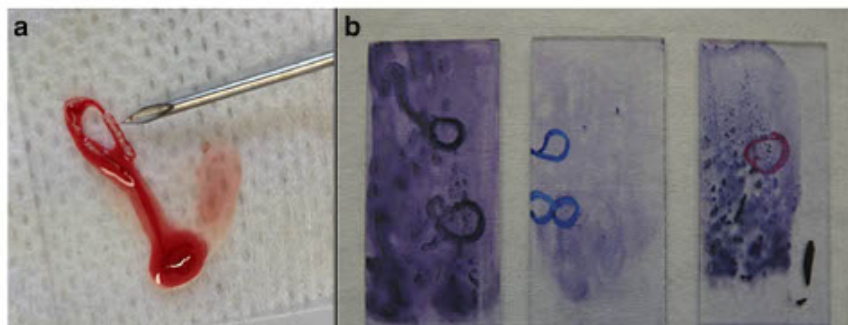
Evaluation of KRAS Mutations

Detection of somatic *KRAS* mutations covering hotspot in exon 2 (codons 12 and 13) was performed by PCR followed by denaturing capillary electrophoresis (DCE) on an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosciences, Foster City, California, USA). The technique is based on a principle of differential denaturation of wild-type and mutant alleles, similar to the high-resolution melting technique. It has previously been applied for *KRAS* testing in PDAC and all experimental conditions have been detailed [3, 18]. The analytical sensitivity of the technique has been experimentally evaluated having a limit of detection at 1% minor allele fraction (MAF). The fragment analysis data evaluation was done using Gene Marker v2.4.2. (Softgenetics LLC, State College, Pennsylvania, USA). Detection limit of the method corresponds to a fluorescence intensity of 700 RFU for the wild-type homoduplex peak (Supplementary materials, Fig. S1). The software enables determination of the fluorescence intensity of the resolved fragment peaks and the fraction of *KRAS* mutated cells in the sample could be calculated from the ratio of peak intensities (see Supplementary materials for more information).

Evaluation of miR-21 Expression

5 μl of total RNA was used for reverse transcription from miRNA to cDNA by the qScript micro RNA cDNA Synthesis kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg,

Fig. 1 Sample types acquired by endoscopic ultrasound-guided fine-needle biopsy procedure (EUS-FNB). A native fine-needle aspirate (FNA) (a), a fine-needle cytology specimen (b)



Maryland, USA) according to the manufacturer's instructions. At first, miRNA was polyadenylated by poly(A) polymerase, then the adenylated miRNA was transcribed to cDNA by reverse transcriptase and oligo dT primer with adaptor sequence. The adaptor sequence allowed for hybridization of a universal primer during the subsequent Real-Time (qRT) PCR.

Amplification and quantification of miR-21 expression by qRT-PCR was performed on a Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) real-time cyler using the PerfeCta micro RNA Assay kit (Quanta Biosciences), PerfeCta Sybr green SuperMix (Quanta Biosciences), a universal primer and a miRNA-specific primer (Quanta Biosciences). Amplification of each sample was done on 2 parallels using the following cycling conditions: initial denaturation at 95 °C /15 min followed by 40 cycles consisting of 94 °C/15 s, 60 °C/30 s and 70 °C/30 s and a final extension at 72 °C/10 min. Specificity of the PCR products was confirmed by a melting curve analysis of PCR products.

qRT-PCR data was analyzed by MxPro software (Agilent Technologies) with automated baseline setting and 0.4 threshold value. Calculation of relative miR-21 expression was done using an average of Ct values from both parallels. Relative expression of miR-21 was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [28], using RNU6B as a reference gene ($\Delta\Delta Ct = Ct_{miR-21} - Ct_{RNU6B}$). Only results with $Ct \leq 35$ were considered valid.

Statistical Analyses

Fisher's exact test was applied to compare percentages of *KRAS* mutant cells in EUS-FNA and EUS-FNC. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The prognostic value of miR-21 was tested by means of overall survival analysis using Kaplan-Meier method. At first, a median of relative miR-21 expression from all 118 PDAC samples was determined. Then, any value greater than the median was considered as "high expression", while values lower than the median were assigned as "low expression". Overall survival was calculated from the time of diagnosis. In order to evaluate a homogeneous group, patients with unconfirmed survival status ($n = 7$), those who died due to causes unrelated to the PDAC diagnosis ($n = 7$) and those who underwent surgical treatment ($n = 13$) were excluded from survival analysis. In the resulting group of 91 patients, the overall survival for high and low values of miR-21 expression were evaluated by Kaplan-Meier analysis using the Medcalc statistical software (Medcalc, Oostende, Belgium). Survival curves were compared using a log-rank test at 5% statistical significance ($P < 0.05$).

Results

DNA/RNA Yields and Success Rates for *KRAS* and miR-21 Analysis

Due to the smaller amounts of input material in EUS-FNC, the DNA/RNA extraction yields were approximately an order of magnitude below the yields from EUS-FNA. For DNA, the average yield was 10 ng per specimen (ranging from 1.5 to 58.5 ng) with 19% (22/118) below the fluorimeter detection limit. For RNA, 81% (21/26) of specimens were below the detection limit with the rest containing on average 164 ng of RNA (ranging from 92 to 294 ng).

In EUS-FNA, the yields reflected input amounts of collected pancreatic tissue that was processed as a whole and therefore exhibited considerable variability. For DNA, the average yield was 147 ng (ranging from 6.5 to 1930 ng) with 5% (6/118) of samples below the fluorimeter detection threshold. For RNA, the average was 642 ng (ranging from 138 to 45,000 ng) with 15% (18/118) of samples below the detection limit.

Despite the generally low DNA/RNA yields from both types of EUS-FNB collected specimens, there was a 100% success rate for the detection of *KRAS* mutations and 100% success rate for the analysis of miR-21 expression. At *KRAS* assay, none of the samples produced fluorescence intensity of the wild-type homoduplex below 1200 RFU. For miR-21 expression analysis, the Ct values were in the range of 20.37–33.47 for EUS-FNC and in the range of 17.9–29.43 for EUS-FNA.

KRAS Mutation Detection Rates and the Mutant Cell Fraction

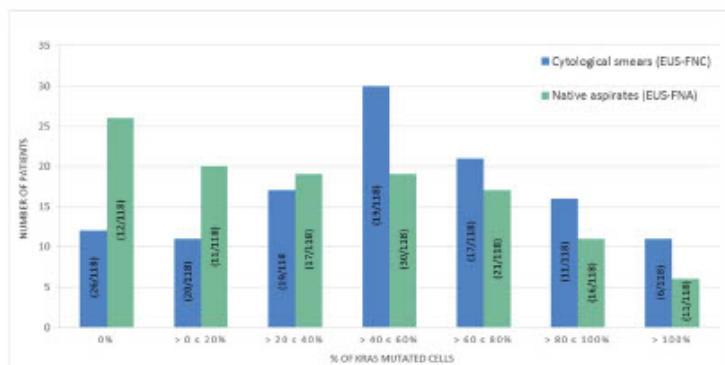
The rate of *KRAS*-mutant positives in EUS-FNC was 90% (106/118), while only 78% (92/118) in EUS-FNA. *KRAS* mutant detection results from both specimen types are compared in Table 2.

Next, the *KRAS*-mutant cell fraction in samples was evaluated (see [Supplementary materials](#) for details). The results are illustrated in Fig. 2. As expected, EUS-FNC, where the DNA was extracted only from an area of predominantly tumor

Table 2 Comparison of *KRAS* status determined from both types of EUS-FNB samples

<i>KRAS</i> status determined from native aspirate / cytological smear	% (n/ total)
mutant / mutant	78% (92/118)
wild type / wild type	10% (12/118)
mutant / wild type	0% (0/118)
wild type / mutant	12% (14/118)

Fig. 2 *KRAS*-mutant cell fraction in EUS-FNC vs EUS-FNA samples



cells marked by an experienced cytologist, contained more *KRAS* mutant cells than in EUS-FNA. The average fraction of *KRAS*-mutant cells in EUS-FNC was 56% compared to 31% in EUS-FNA. Two thirds of EUS-FNC (78/118) contained more than 40% of *KRAS* mutant cells, the same percentage of *KRAS* mutant cells was present only in less than half (53/118) of EUS-FNA ($p = 0.0016$, Fisher's exact test).

miR-21 Expression Analysis and Confirmation of its Prognostic Role

The validity of results obtained from miR-21 expression experiments was assessed by confirming its negative prognostic role as reported by multiple studies done on resected PDAC tissue. The results of Kaplan-Meier survival analysis are shown in Fig. 3a and b. In EUS-FNC a total of 48 patients displayed tumors with low levels of miR-21 expression with a median of overall survival of 200 days, while 43 patients had tumors with high miR-21 expression and a median of overall survival of 128 days. The Kaplan-Meier analysis showed a statistically significant difference confirming the negative prognostic value of miR-21 expression ($P = 0.02$), Fig. 3a. In EUS-FNA, there were 43 patients with tumors showing low miR-21 expression with a median of survival of 208 days and 48 patients with tumors showing high miR-21 expression with a median of survival of 117 days. Despite the difference of almost 100 days between the groups, this result is not statistically significant ($P = 0.06$), see Fig. 3b.

Discussion

Molecular analysis performed from pancreatic tissue collected by EUS-FNB is not routinely used, particularly due to the minute amount of material obtained. The approach, if adopted, would open possibility for molecular testing of virtually all PDAC patients, especially those in inoperable status. Compared to resected tissue, analysis of molecular markers from biopsy specimens is considerably more challenging. The

representative material in the sample is reduced due to contribution from blood and a desmoplastic character of the PDAC (a small fraction of malignant cells in an excess of tumor stroma) composing up to 90% of the sample volume [29]. As a result, most research studies evaluating molecular markers in PDAC use resected tissue with very limited relevance for clinical practice.

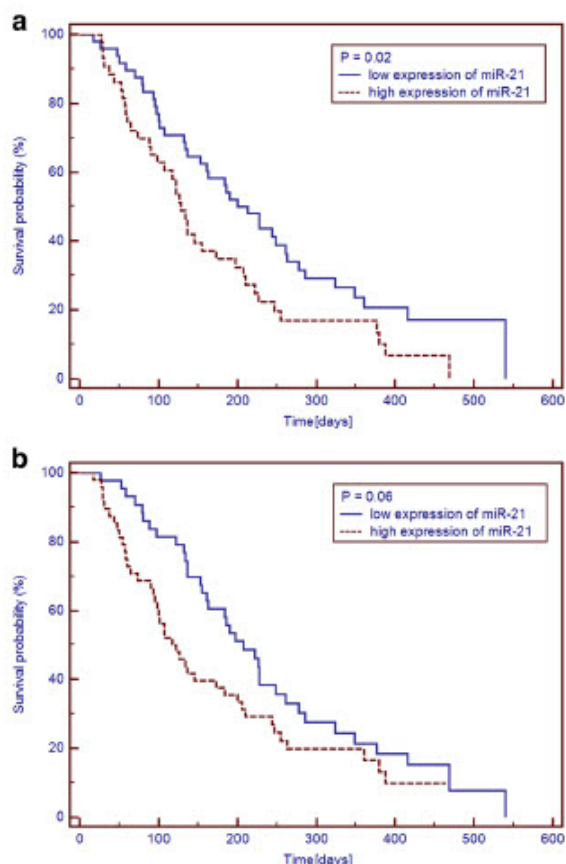


Fig. 3 Overall survival of patients according to miR-21 expression. Comparison of EUS-FNC (a) and EUS-FNA (b) samples

Both, collection of cells by dissection from EUS-FNC and the direct processing of EUS-FNA, have potential limitations. In the case of EUS-FNC, the fixation process and limited cell amount in sample could decreased quality and quantity of extracted DNA/RNA, while in case of EUS-FNA the indeterminate fraction and representation of tumor cells may lead to a false interpretation of results.

Yet, our results indicate that despite the low amounts of DNA/RNA extracted from EUS-FNC, the ultimate success and reliability was comparable to the EUS-FNA for both DNA and miRNA tests (100% in both cases). Similarly to other cancers preparation of cytological sample has no noticeable impact on the outcome of DNA or miRNA analyses [30]. This is most likely due to very short DNA/miRNAs segments studied (about 100 bp in the case of DNA and 20 bp in case of miRNA), that do not undergo degradation during sample fixation.

Our overall rates of mutant *KRAS* in EUS-FNC samples in PDAC patients was similar to result of Biankin et al. obtained for homogeneous resected tumor mass [2]. In contrast rate of only 78% was obtained for mutant *KRAS* in EUS-FNA samples from the same patients. The 12% of presumably falsely negative EUS-FNA samples were most likely a result of absence of cancer cells in the sample. In addition, the average fraction of tumor cells (tumor cellularity), derived from the *KRAS* mutated DNA fraction within the sample, was close to double in EUS-FNC than EUS-FNA (56 vs 31%). Hence, the knowledge of the tumor cellularity is key for correct data interpretation.

Apparently, EUS-FNC samples seem also more suitable for miRNA analysis. This conclusion can be drawn from the results of the miR-21 expression, where its negative prognostic role known from previous studies [9, 11, 13–16] was confirmed only for EUS-FNC samples ($p = 0.02$). In the EUS-FNA samples the presence of non-tumorous mass obviously influenced the final expression value.

In summary, EUS-FNC samples are a perspective source for molecular markers analysis. Although exhibits much lower yields of nucleic acids, clinical validity of the data obtained is significantly higher.

Acknowledgments This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. 16-31028A and by institutional support grant MO 1012. All authors declare no conflict of interest.

References

- Ballehaninna UK, Chamberlain RS (2012) The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: an evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol* 3:105–119
- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL et al (2012) Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491:399–405
- Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minarik M (2007) Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 13:3714–3720
- Ginesta MM, Mora J, Mayor R, Farre A, Peinado MA, Busquets J et al (2013) Genetic and epigenetic markers in the evaluation of pancreatic masses. *J Clin Pathol* 66:192–197
- Thompson H (2013) US National Cancer Institute's new Ras project targets an old foe. *Nat Med* 19:949–950
- Eser S, Schmieke A, Schneider G, Saur D (2014) Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 111:817–822
- Minarik M, Halkova T, Belsanova B, Bunganic B, Zavoral M, Benesova L (2016) Detection of specific KRAS mutation type, Gly12Asp (GGT > GAT), in EUS-guided fine needle aspiration cytology (EUS-FNAC) identifies pancreatic cancer patients with poor prognosis. AACR 107th Annual Meeting on Bioinformatics and Systems Biology. *Cancer Res* 76(Suppl 14):4943
- Halkova T, Cuperkova R, Minarik M, Benesova L (2015) MicroRNAs in pancreatic cancer: involvement in carcinogenesis and potential use for diagnosis and prognosis. *Gastroenterol Res Pract* 2015:892903
- Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M (2008) MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 12:2171–2176
- du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M et al (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 56:603–612
- Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TRJ, McKay CJ, Oien KA (2012) MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 18:534–545
- Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M (2012) MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res* 18:981–992
- Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, Lyberopoulou A, Lykoudis PM, Polymeneas G, Voros D (2013) Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas* 42:67–71
- Vychytilova-Faltejskova P, Kiss I, Khasova S, Hlavsa J, Prochazka V, Kala Z, Mazanec J, Hausnerova J, Kren L, Hermanova M, Lenz J, Karasek P, Vyzula R, Slaby O (2015) MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Diagn Pathol* 10:38
- Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, Gall TM, Giovannetti E, Funel N et al (2015) MicroRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 51:1389–1404
- Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim SW, Chiaro MD, Peters GJ, Giaccone G (2010) Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS One* 5:e10630
- Nelsen EM, Buehler D, Soni AV, Gopal DV (2015) Endoscopic ultrasound in the evaluation of pancreatic neoplasms-solid and cystic: a review. *World J Gastrointest Endosc* 7:318–327
- Salek C, Minarikova P, Benesova L, Nosek V, Strnad R, Zavoral M, Minarik M (2009) Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 29:1803–1810
- Khalid A, Dewitt J, Ohoi NP, Chen JH, Fasanella KE, Sanders M, McGrath KM, Nikiforova M (2011) EUS-FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol* 11:482–486

20. Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, Shiratori Y, Omata M (2002) Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 97:2263–2270
21. Pellise M, Castells A, Gines A, Sole M, Mora J, Castellvi-Bel S et al (2003) Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Aliment Pharmacol Ther* 17:1299–1307
22. Wang X, Gao J, Ren Y, Gu J, Du Y, Chen J et al (2011) Detection of KRAS gene mutations in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for improving pancreatic cancer diagnosis. *Am J Gastroenterol* 106:2104–2111
23. Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S (2005) Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 61:76–79
24. Szafianska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttes J, Munding JB, Barth RJ, Gutmann EJ, Suriawinata AA, Marc Pipas J, Tannapfel A, Korc M, Hahn SA, Labourier E, Tsongalis GJ (2008) Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem* 54:1716–1724
25. Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, Buscail L, Cordelier P (2009) Let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 20:831–844
26. Brand RE, Adai AT, Centeno BA, Lee LS, Rateb G, Vignesh S, Menard C, Wiechowska-Kozłowska A, Boldys H, Hartleb M, Sanders MK, Munding JB, Tannapfel A, Hahn SA, Stefańczyk L, Tsongalis GJ, Whitcomb DC, Conwell DL, Morisset JA, Gardner TB, Gordon SR, Suriawinata AA, Lloyd MB, Wylie D, Labourier E, Andruss BF, Szafianska-Schwarzbach AE (2014) A microRNA-based test improves endoscopic ultrasound-guided cytologic diagnosis of pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12:1717–1723
27. Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupo MA, Manganelli ML, Andruss B, Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S (2015) Testing for miRNA, mRNA, and DNA on fine-needle aspiration improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 100:2743–2750
28. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25:402–408
29. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, Lolkema MP, Buchholz M, Olive KP, Gress TM, Tuveson DA (2011) Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60:861–868
30. Saito KC, Fuziwara CS, Kimura ET (2013) Nucleic acid recovery from thyroid fine-needle cytology slides. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 57:490–491

Molekulárně spektroskopická analýza krevní plazmy – cesta k diagnostice karcinomu pankreatu?

Molecular spectroscopy of blood plasma – towards the diagnostics of pancreatic cancer?

B. Bunganič¹, L. Šťovičková², M. Tatarovič², L. Kocourková², Š. Suchánek¹, P. Frič¹, V. Setnička², M. Zavoral¹

¹ Interní klinika 1. LFUK a ÚVN – VFN v Praze

² Ústav analytické chemie, VŠCHT v Praze

Souhrn: Karcinom pankreatu je nádorové onemocnění s nepříznivou prognózou. Odhaduje se, že se do konce desetiletí stane jednou z hlavních příčin úmrtí na nádorová onemocnění vůbec. Pouze časná diagnostika může tento nepříznivý trend změnit. K selekci rizikové skupiny pacientů je potřeba efektivního biomarkeru. Cílem pilotní studie je nalezení nových specifických spektrálních markerů karcinomu pankreatu použitím nepolarizovaných metod molekulové spektroskopie (Ramanova spektroskopie) v kombinaci s chiroptickými metodami citlivými ke strukturálním změnám chirálních molekul (elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita). **Metody:** U 10 pacientů s karcinomem pankreatu a 23 zdravých kontrol byl proveden odběr krve s následnou separací a konzervací získaného materiálu. Kombinací metod chiroptické a vibrační spektroskopie byly vyšetřeny vzorky pacientů i kontrol. **Výsledky:** V pilotní studii s omezeným počtem vzorků bylo použitím statistického modelu dosaženo po křížové validaci 85–90% senzitivity, tedy lepší ve srovnání s doposud jediným klinicky dostupným biomarkerem CA 19-9. **Závěr:** Získané výsledky jsou vhodné k dalšímu testování na větším souboru pacientů. Spektroskopické vyšetření rizikových pacientů by mohlo být součástí screeningového procesu. **Klíčová slova:** nádory slinivky břišní – krevní plazma – biologické markery – spektroskopie – cirkulární dichroismus – Ramanova optická aktivita – chiralita

Summary: Pancreatic cancer is a malignancy with a poor prognosis and is estimated to become one of the leading causes of death from cancer by the end of the decade. Only early diagnosis may alter this adverse trend. To select a group of patients at risk of pancreatic cancer, an effective biomarker is required. The main objective of the pilot study is to identify a new specific spectral biomarker of pancreatic cancer using unpolarized methods of molecular spectroscopy (Raman spectroscopy) in combination with chiroptical methods that are inherently sensitive to structural changes of chiral molecules (electronic circular dichroism and Raman optical activity). **Methods:** Blood samples were collected from 10 patients with pancreatic cancer and 23 healthy controls. Subsequently, blood plasma was separated and preserved. The obtained samples were analysed using a combination of chiroptical and vibrational spectroscopies. **Results:** In a pilot study with a limited number of samples, the sensitivity of the established statistical model reached 85–90% after cross-validation. The results are better in comparison with so far the only clinically available biomarker CA-19-9. **Conclusion:** The obtained results are suitable for further testing in a larger group of patients. The spectroscopic examination of high-risk patients may form part of a screening process.

Key words: pancreatic cancer – blood plasma – biomarkers – spectroscopy – circular dichroism – Raman optical activity – chirality

Úvod

Incidence a mortalita karcinomu pankreatu (KP) v ČR i ve světě narůstá. Podle odhadů se do roku 2020 stane KP druhou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění [1]. Z důvodu, že až 80 % pacientů s KP je v čase

diagnózy ve stadiu generalizace, blíží se mortalita KP ke 100 % a je téměř shodná s incidencí [2]. Bez možnosti chirurgické léčby, jediné efektivní terapie KP, je prognóza nepříznivá [3]. Pacienti s časným neinvazivním KP dosahují po operaci významně lep-

šího přežití ve srovnání z pozdním stadiem (85,7 % pro stadium 0; 68,7 % pro stadium Ia; 23,8 % v případě stadia Ib a 2,3 % pro pozdní stadia) (tab. 1) [1,4].

Moderní diagnostické postupy – zobrazovací metody a biomarkery – jsou neefektivní, neboť bývají apli-

Tab. 1. Pětileté přežití u karcinomu pankreatu podle klinických stadií.

Tab. 1. Five-year survival rate for pancreatic cancer according to clinical stages.

Klinické stadium	UICC TNM stadium	Pětileté přežití (%)
časný neinvazivní KP	0/la	85,7/68,7
časný invazivní KP	Ib, II	23,8
pokročilý invazivní KP	III a IV	2,3

KP – karcinom pankreatu

kovány pozdě, teprve až po objevení klasických symptomů KP – ikteru, cholangitidy, kachexie či bolestí břicha a zad [5].

Na druhou stranu jsou známy i časně symptomy KP, které však zatím nenacházejí klinické využití. U většiny pacientů s KP se přitom objevují 2–3 roky před diagnózou [6–9]. I přes dostatečně dlouhé diagnostické okno je detekce časného KP nedostatečná a odráží se v malém počtu zachycených časných klinických stadií. V roce 2012 bylo v ČR evidováno pouze 4,7 % pacientů ve stadiu I a 11,3 % ve stadiu II [4]. Diagnostika KP tedy nadále spolesňuje pouze na sérové biomarkery s nízkou efektivitou a zobrazovací metody. Protože žádný z biomarkerů nedosahuje dostatečné senzitivity a specifity, nemůže být použit ve screeningovém programu ani u pacientů s vysokým rizikem KP. Např. karbohydrát antigen 19-9 (CA 19-9) ze skupiny glykoproteinových biomarkerů KP (MUC – mucin core proteins) je dle doporučení European Society for Medical Oncology z roku 2015 vhodný pouze k odhadu prognózy a sledování odpovědi na léčbu a ne k časně diagnostice KP [10]. Hledání biomarkerů ze skupiny MUC, miRNA (inhibitor messengerové ribonukleové kyseliny) a cirkulujících nádorových buněk je předmětem celé řady současných preklinických i klinických studií [11–14]. Souběžně nacházejí značné uplatnění genomické a proteomické diagnostické metody [15–18]. Nedávné proteomické studie se zaměřily na hledání sérového biomarkeru časného stadia KP. Od zdravé populace je možné

nemocné s časným karcinomem odlišit např. na základě sledování rozdílu signálů a změn 3D struktury plazmatických biomolekul [19,20]. Analýza krevní plazmy jako celku (všech obsažených biomolekul, ne pouze jednoho biomarkeru) je metoda s velkým potenciálem pro diagnózu KP na molekulární úrovni. Cílem naší pilotní studie je nalezení nových specifických spektrálních markerů KP použitím nepolarizovaných metod molekulové spektroskopie (Ramanova spektroskopie) v kombinaci s chiroptickými metodami citlivými ke strukturálním změnám chirálních molekul (elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita) [17]. Kombinací těchto metod lze pozorovat stereochemické a konformační změny nejen plazmatických, ale i jiných cirkulujících biomolekul a jejich metabolitů [20].

Materiál a metody

Pacienti

Do této pilotní studie bylo zařazeno 10 pacientů s KP a 23 kontrolních jedinců, jejichž výběr byl proveden na Interní klinice 1. LF UK a ÚVN – VFN v Praze. Průměrný věk pacientů s KP a kontrol byl 66 ± 7 let, resp. 61 ± 8 let. Pacienti s KP byli vyšetřeni dle doporučených postupů, vč. cytologické verifikace karcinomu [21]. V rámci stagingu bylo doplněno CT břicha s intravenózní a perorální kontrastní látkou s použitím třífázového pankreatického protokolu [22]. Hodnocení bylo prováděno zkušeným cytopatologem a radiologem. Ve všech případech se jednalo o pokročilá stadia III a IV dle TNM klasifikace. V rámci odběru krve bylo pro-

vedeno základní biochemické vyšetření, vč. stanovení hladiny sérového albuminu, celkové bílkoviny, glykemie a hladiny CA 19-9. Kontrolní skupinu tvořili zdraví dárči, s vyrovnanou distribucí obou pohlaví. Všem kontrolním jedincům byla rovněž provedena základní klinická vyšetření vč. podrobné anamnézy a laboratorní analýzy krve. Na základě výsledků těchto vyšetření nebylo shledáno podezření na KP ani diabetes. Studie byla provedena v souladu se zásadami uvedenými v Helsinské deklaraci a schválena Etickou komisí ÚVN – VFN v Praze. Všichni jedinci zařazení do studie podepsali informovaný souhlas.

Krevní plazma

Po endosonografickém vyšetření byla všem pacientům odebrána žilní krev do sterilních, antikoagulantem ošetřených odběrových zkumavek (BD Vacutainer Systems, Velká Británie). Po odběru byla provedena centrifugace vzorků při 1 500 g po dobu 10 min; následně byly získané frakce krevní plazmy zamrazeny, transportovány v termoboxu při teplotě suchého ledu (-78°C) na Ústav analytické chemie, VŠCHT v Praze, kde byly nadále skladovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C . Před každou analýzou byly vzorky plazmy volně rozmrazeny při pokojové teplotě a pro odstranění reziduálních částic filtrovány přes PVDF membránový filtr s porozitou $0,45\ \mu\text{m}$ (Grace, USA) při 13 000 g po dobu 10 min.

Ramanova optická aktivita a Ramanova spektroskopie

Ramanova spektra a spektra Ramanovy optické aktivity byla zaznamenávána simultánně na spektrometru ChiralRAMAN-2X™ (BioTools, Inc., USA), který je vybaven systémem Opus 2W/mpc6000 (Laser Quantum, Velká Británie) s excitační vlnovou délkou 532 nm. Zfiltrované vzorky krevní plazmy ($100\ \mu\text{l}$) byly měřeny v kyvetě o rozměrech $4 \times 4 \times 10\ \text{mm}$ ošetřené antireflexní vrstvou (BioTools,

Inc., USA). Teplota analyzovaného vzorku (15 °C) byla kontrolována pomocí Peltierova článku vlastní výroby. Pro získání kvalitních spekter s rozlišením ~ 7 cm⁻¹ ve spektrálním rozsahu 2 500–90 cm⁻¹ jsme vyvinuli metodiku měření [19] sestávající z přidavku zhašedla fluorescence, vysvěcování vzorku laserem pro urychlení zhašení fluorescence a záznamu spekter. Pro eliminaci zbytkové distorze pozadí bylo využito Fourierova filtru.

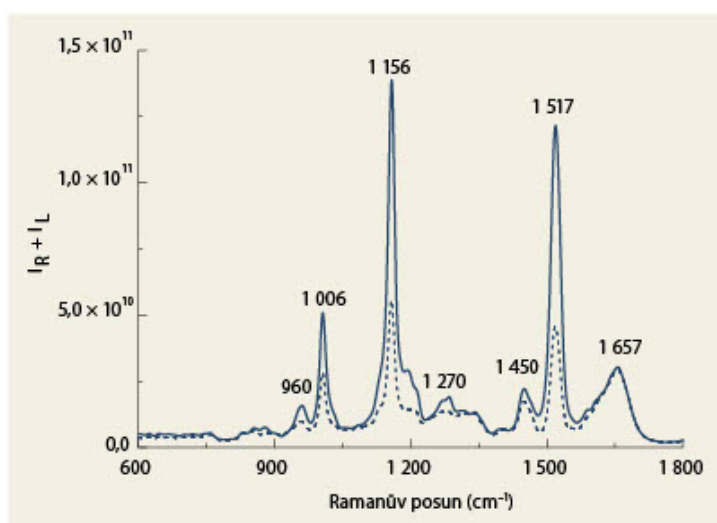
Elektronový cirkulární dichroismus

Analýzy elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) byly provedeny na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko), který umožňuje kontrolu teploty vzorků. Pro měření při kratších vlnových délkách byly zfiltrované vzorky naředěny v poměru 1 : 3 v/v sterilním fosfátovým pufrům o pH = 7,4. Zředěné vzorky (20 µl) byly analyzovány v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 0,01 mm (Hellma, Německo) v oblasti 185–260 nm. Pro každý vzorek bylo zaznamenáno šest spekter s rozlišením 0,1 nm; spektra byla následně zprůměrována v modulu Spectra Analysis programu Spectra Manager, verze 2.6.0.1 (Jasco, Japonsko).

Před spektrálním měřením a po něm byly všechny použité kyvety vyčištěny roztokem Starna CellClean (Starna Scientific Ltd., Velká Británie), opakovaně propláchnuty demineralizovanou vodou a metanolem a následně vysušeny.

Statistické zpracování

Pro odlišení pacientů s KP a kontrolní skupiny byla získaná spektrální data vyhodnocena s použitím lineární diskriminační analýzy v programu XLSTAT (Addinsoft, Francie). Pro vybrané oblasti spekter, ve kterých jsou obsaženy informace o struktuře plazmatických biomolekul a jejich možné změny, byl vytvořen statistický model. Zároveň byla stanovena senzitivita a specificita použitého klasifikačního modelu. K ověření jeho platnosti a vypovídací



Obr. 1. Průměrná Ramanova spektra krevní plazmy pacientů s karcinomem pankreatu (čárkovaná čára) a kontrolních jedinců (plná čára).

Fig. 1. The average Raman spectra of blood plasma from patients with pancreatic cancer (dashed line) and control subjects (solid line).

schopnosti byla rovněž provedena křížová validace typu leave-one-out a výpočet hodnot pro křivku ROC (receiver operating characteristics).

Výsledky

Ramanova spektroskopie

V průměrných Ramanových spektrech pacientů s KP a kontrolních jedinců (obr. 1) jsou patrné tři intenzivní pásy náležící především vibracím karotenoidů (1 006, 1 156 a 1 517 cm⁻¹), které jsou přítomny v plazmě v nízkých koncentracích. Vysoká intenzita těchto pásů v Ramanově spektru je zapříčiněna rezonančním zesílením po excitaci ve viditelné oblasti [23,24]. U skupiny kontrolních jedinců byla pozorována několikanásobně vyšší intenzita těchto pásů v porovnání s pacienty, což naznačuje možnou roli karotenoidů v procesu kancerogeneze. Ve spektrech je zároveň možné pozorovat změnu intenzity pásů typických pro proteiny s vysokým obsahem α -helikální struktury, a to především u 1 270 cm⁻¹ v oblasti rozšířeného amidu III, který odpovídá vibracím peptidové vazby [20,25]. V krvi rovněž přítomné sacharidy a lipidy jsou

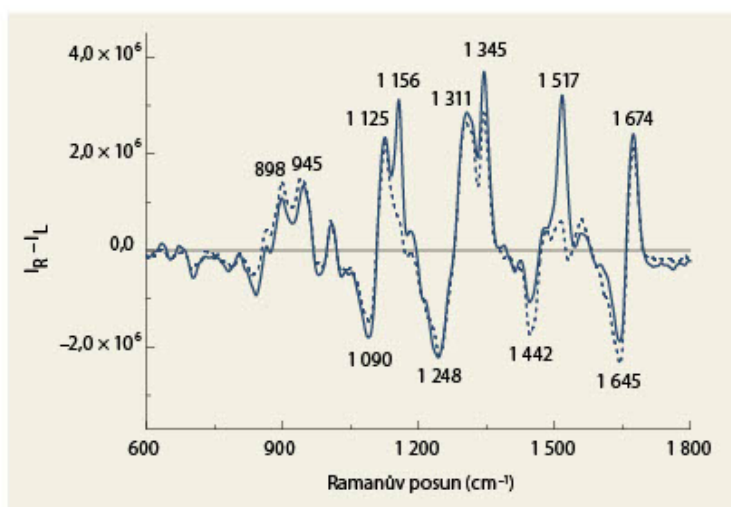
zastoupeny pásy 960 a 1 450 cm⁻¹ [20], jejichž intenzita byla nižší v případě pacientů s KP.

Ramanova optická aktivita

Ve spektrech Ramanovy optické aktivity (obr. 2) byla zaznamenána skupina pásů proteinů v oblastech amidu I (1 645, 1 674 cm⁻¹) a amidu III (1 248, 1 311, 1 345 cm⁻¹). Spektrální průběh v těchto oblastech je opět typický pro proteiny s vysokým obsahem α -helikálních struktur [15,16,20]. Výrazné pozitivní pásy 1 156 a 1 517 cm⁻¹ vyskytující se ve spektrech kontrolních jedinců mohou být přiřazeny karotenoidům, přičemž některé z nich se překrývají s pásy aromatických aminokyselin [20].

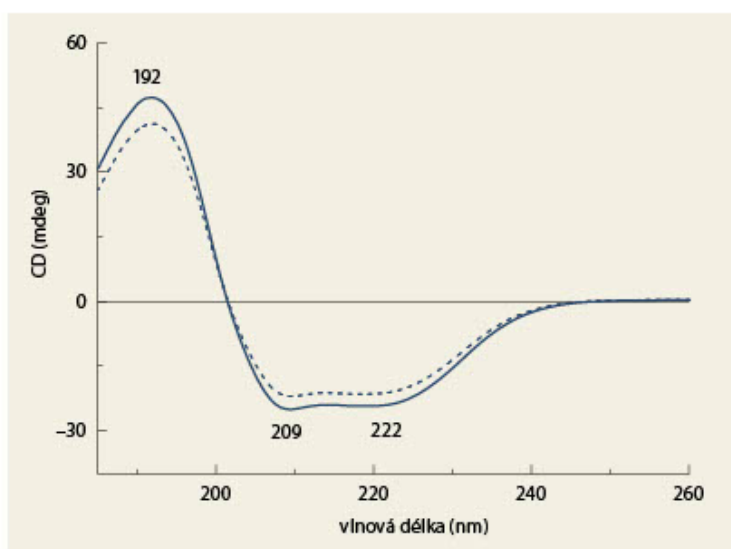
Elektronový cirkulární dichroismus

Ve spektrech ECD (obr. 3) dominují tři pásy charakteristické pro sekundární strukturu proteinů [17,23]. Pozitivní pás 192 nm a dva částečně se překrývající negativní pásy 209 a 222 nm jsou výsledkem elektronových přechodů v rámci peptidové vazby. Intenzita a tvar těchto pásů se mění v závislosti na konformaci peptidového



Obr. 2. Průměrná spektra ROA krevní plazmy pacientů s karcinomem pankreatu (čárkovaná čára) a kontrolních jedinců (plná čára).

Fig. 2. The average ROA spectra of blood plasma from patients with pancreatic cancer (dashed line) and control subjects (solid line).



Obr. 3. Průměrná spektra ECD krevní plazmy pacientů s karcinomem pankreatu (čárkovaná čára) a kontrolních jedinců (plná čára).

Fig. 3. The average ECD spectra of blood plasma from patients with pancreatic cancer (dashed line) and control subjects (solid line).

řetězce [20,26]. Průběh spekter odpovídá proteinům s vysokým obsahem α -helikální struktury [17,27], které jsou v krvi zastoupeny převážně lidským sérovým albuminem. Je patrné, že v případě pacientů s KP mají všechny tři

uvedené pásy nižší intenzitu než ve spektrech kontrolních jedinců.

Lineární diskriminační analýza

Jelikož byly některé změny ve spektrech pacientů s KP a kontrolních je-

dinců obtížně pozorovatelné, byla získaná spektrální data vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami. Cílem bylo odlišit pacienty od kontrolních jedinců na základě rozpoznání charakteristických spektrálních vzorů, určit senzitivitu a specifitu využitých spektroskopických metod a zároveň prokázat spolehlivost klasifikačního modelu vytvořeného pro kombinaci všech tří použitých metod.

Byla pozorována úplná separace skupiny pacientů s KP a kontrolních jedinců (obr. 4), přičemž celková správnost přiřazení jednotlivých vzorků do příslušných skupin činila 100 %. Specifita a senzitivita vytvořeného modelu dosahovaly vysokých hodnot i po provedení křížové validace, a to 90 %, resp. 87 % (tab. 2). Zároveň byly z křížové validace vypočteny hodnoty pro křivku ROC, kde plocha pod křivkou dosahovala hodnoty 0,907 (obr. 5).

Diskuze

V naší pilotní studii byl pomocí kombinace pokročilých spektroskopických metod vytvořen klasifikační model, který dosahuje hodnot senzitivity a specifity ~ 90 %.

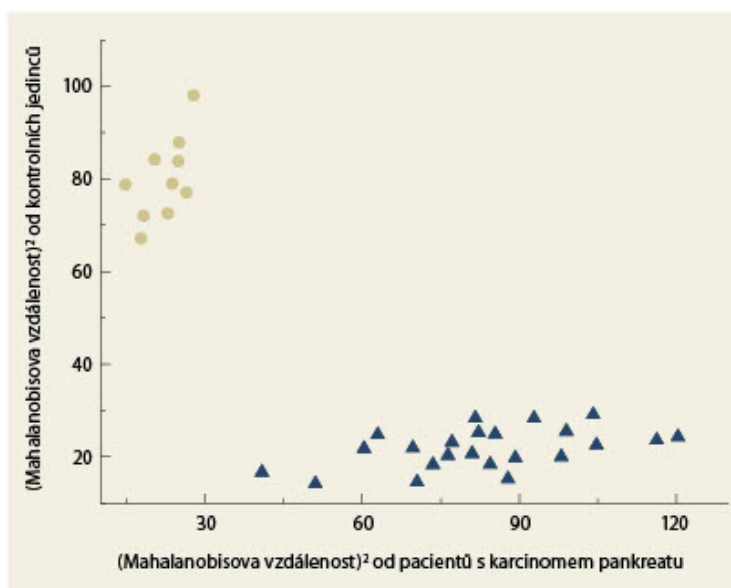
U symptomatických pacientů s KP je senzitivita CA 19-9 79–81 % a specifita 82–90 % [28]. Výzkumem časného KP bez typických symptomů bylo potvrzeno, že CA 19-9 není vhodný detekční nástroj časného KP, zejména pro jeho nízkou pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) 0,5–0,9 % [29,30]. V rozsáhlém retrospektivním hodnocení 37 studií s 1 882 případy KP a kontrolní skupiny byla specifita CA 19-9 na úrovni 82,8 % [9]. Bohužel se v praxi také často setkáváme s falešně negativní hodnotou CA 19-9. Jedním z důvodů časté chybovosti je, že protilátka je vázána na oligosacharid – krevní antigen Lewis A. U 5–10 % pacientů s krevní skupinou A a antigenem Lewis A⁻/B⁻ je hladina CA 19-9 u KP nižší než 1,0 U/ml [31]. Příčinou falešné negativy CA 19-9 mohou být i jiné patolo-

gické stavy, např. jaterní cirhóza, cholangitida, chronická pankreatitida a další gastrointestinální tumory [32]. Ve fázi pilotního projektu byl sledovaný soubor pacientů malý a zároveň naměřené hodnoty CA 19-9 vykazovaly značný rozptyl (28,5–14 250 kU/l) bez korelace se stadiem onemocnění. Kromě toho platí, že CA 19-9 není doporučen jako diagnostický biomarker [10]. Při předběžném hodnocení se však zdá, že naproti tomu spektrální biomarkery sledované v našem pilotním projektu nejsou zatíženy chybami, a to bez ohledu na hladinu bilirubinu, CRP či krevní skupinu, a je tedy možné je k diagnostice použít.

V současnosti bylo publikováno několik studií zabývajících se detekcí prekursorů a premaligního stadia KP. Ze skupiny glykoproteinových mucinů dosáhl vysoké senzitivity a specifity MUC5AC u prekursorových Pan-IN-1 lézí na myších modelech [12]. MUC je v séru pacientů s KP jen v omezeném množství a snaha o jejich detekci pomocí klasické immunoassay nepostačuje. Proto jsou testovány další techniky vhodné pro úpravy a měření vzorků (např. povrchem zesílená Ramanova spektroskopie), které jsou 100–1 000× citlivější než konvenční metody [11,33]. Mezi další aberantně exprimované muciny patří CA 50, CA 19-5, CA 125/MUC16, CA 242, CAM 17.1, MUC4, MUC5AC, DUPAN 2, PAM4 a SPAN-1. Pro sporné výsledky však zatím nejsou v klinické praxi využívány [13,14].

Další práce zabývající se časnou detekcí KP studovaly efektivitu miRNA. Rodinu miRNA tvoří asi 2 000 molekul, jejichž hlavní funkce spočívá v inhibici translace messengerové RNA (mRNA) a degradaci transkriptu. Byla prokázána exprese různých forem miRNA v plazmě jedinců s KP [18]. Kombinace některých miRNA s CA 19-9 dosahuje vyšší senzitivity než pro CA 19-9 samotné [34].

Zajímavé je zjištění, že již v časných fázích nádorové onkogeneze jsou v cirkulaci přítomné pankreatické buňky. Diseminace pankreatických buněk



Obr. 4. Grafické znázornění výsledku LDA pro kombinaci chiroptických metod (ECD, ROA) a konvenční Ramanovy spektroskopie v analýze krevní plazmy pacientů s karcinomem pankreatu (●) a kontrolních jedinců (▲).

Fig. 4. Graph representation of the LDA result for the combination of chiroptical methods (ECD, ROA) and conventional Raman spectroscopy in the analysis of blood plasma from patients with pancreatic cancer (●) and control subjects (▲).

Tab. 2. Konfuzní matice výsledků křížové validace modelu LDA pro diskriminaci vzorků krevní plazmy pacientů s karcinomem pankreatu a kontrolních jedinců.

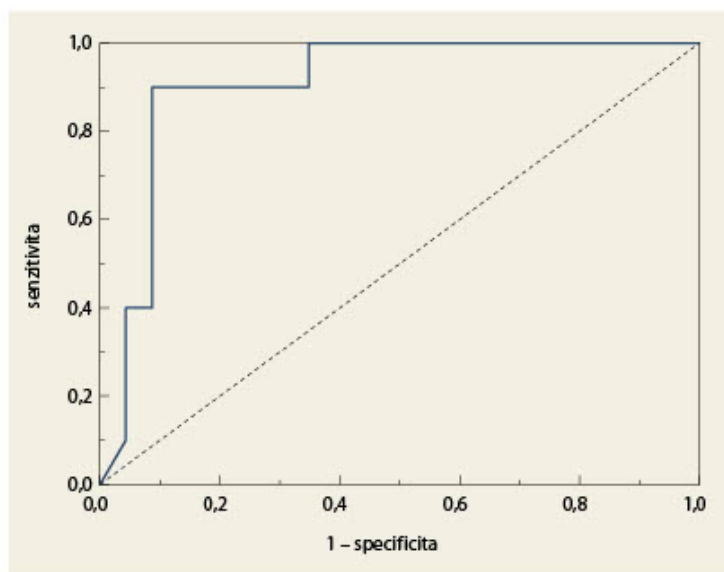
Tab. 2. Confusion matrix of the LDA cross-validation results for the discrimination between blood plasma samples of patients with pancreatic cancer and control subjects.

z/do	KP	Kontrolní skupina	Celkem	Správně (%)
Karcinom pankreatu (KP)	9	1	10	90
Kontrolní skupina	3	20	23	87
Celkem	12	21	33	88

v prostředí časného KP je označována jako cirkulující pankreatické buňky (CPCs). Cirkulující přednádorové buňky se objevují u PanIN-1 a PanIN-2 a dokonce i u BRCA mutace. Rhim et al [35] ověřili sledované změny klinicky a prokázali CPCs asi u 30 % pacientů s intraduktální papilární mucinózní neoplazií (IPMN) zatím bez morfologických změn typických pro KP. Detekce CPCs v séru je také jedním z potenciálních biomarkerů časného stadia KP [36].

V našem pilotním projektu byly potvrzeny předpokládané rozdíly v sig-

nálech charakterizujících odlišnosti 3D struktury plazmatických bílkovin a dalších plazmatických biomolekul. Hlavní rozdíly byly zjištěny nejen v sekundární struktuře proteinů krevní plazmy, ale i dalších molekul jako lipidů, sacharidů, aromatických aminokyselin a karotenoidů. Zejména poslední zmiňovaná molekula byla v různých intenzitách zachycena v Ramanových spektrech i pomocí ROA. V plazmě pacientů s KP byla pozorována nízká intenzita karotenoidů. Účast karotenoidů v procesu onkogeneze zřejmě souvisí se změ-



Obr. 5. Křivka ROC po křížové validaci LDA modelu pro diskriminaci vzorků krevní plazmy pacientů s KP a kontrolních jedinců; AUC = 0,907.

Fig. 5. ROC curve after cross-validation of the LDA model for the discrimination of blood plasma samples in patients with pancreatic cancer and control subjects; AUC = 0.907.

nou mikroprostředí a navozením dez-moplastické reakce aktivací stellate cells [37]. Tyto buňky jsou schopné se transformovat z klidového stadia do stadia aktivního, kdy se podílejí na fibroprodukcii. Retinoidy na modelech KP u transgenických myši indukovaly vznik klidového stadia stellate cells, a tím navodily inhibici růstu KP [38]. Karotenoidy jsou těsně propojeny s nádorovou progresí KP a jak se ve fázi pilotního projektu zdá, jsou dobře definovatelné pomocí citlivých spektroskopických metod. Zjištění rozdílu v intenzitách spektrálních pásů karotenoidů mezi pacienty s KP a kontrolami má v tuto chvíli informativní charakter. Tento nále z a jeho případnou korelaci s KP bude třeba řádně prozkoumat.

Hlavním limitem většiny studií zabývajících se biomarkery KP je samotné testování využívaných metod a postupů na detekci časného karcinomu u pokročilých stadií nádorů. I v této studii byl spektroskopický biomarker testován pouze u pozdních stadií KP,

protože časná stadia se v diagnostické praxi vyskytují extrémně vzácně a do této pilotní studie nebylo možno takové pacienty zahrnout. Přislíbem do budoucna by jistě mohl být navazující projekt testování pacientů s IPMN, které jsou pokládány za prekurzory KP.

Závěr

Časná diagnostika KP s cílem detekce operabilního stadia vyžaduje identifikaci efektivního biomarkeru. Je testováno několik kandidátů ze skupiny biomarkerů časného KP, ale zatím nejsou dostupné pro běžnou klinickou praxi. CA 19-9 je sice klinicky dostupný, ale jako marker časného karcinomu není vyhovující. V této studii byla testována specifita a senzitivita nového spektrálního biomarkeru charakterizovaného vybranými změnami všech biomolekul krevní plazmy. Pro obě sledované charakteristiky bylo dosaženo hodnot ~ 90 %, což je více než doposud publikované výsledky pro CA 19-9. Jedním z dalších úkolů je spektrosko-

pické vyšetření rizikových pacientů s recentně diagnostikovanou poruchou glukózové tolerance, s premaligním stadiem karcinomu a familiárními rizikovými syndromy.

Literatura

1. Trends in SEER incidence and U.S. mortality using the Joinpoint Regression Program, 1975–2011 with up to five Joinpoints, 1992–2011 with up to three Joinpoints, both sexes by race/ethnicity. [online]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/results_merged/sect_22_pancreas.pdf#search=pancreatic.
2. Katz MH, Hwang R, Fleming JB et al. Tumor-node-metastasis staging of pancreatic adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin* 2008; 58(2): 111–125. doi: 10.3322/CA.2007.0012.
3. Gobbi PG, Bergonzi M, Comelli M et al. The prognostic role of time to diagnosis and presenting symptoms in patients with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol* 2013; 37(2): 186–190. doi: 10.1016/j.canep.2012.12.002.
4. Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. [online]. Dostupné z: www.svod.cz.
5. Gangi S, Fletcher JG, Nathan MA et al. Time interval between abnormalities seen on CT and the clinical diagnosis of pancreatic cancer: retrospective review of CT scans obtained before diagnosis. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182(4): 897–903.
6. Bunganič B, Frič P, Zavoral M. Pancreatic adenocarcinoma – early symptoms and screening. *Cas Lek Cesk* 2014; 153(6): 267–270.
7. Sah RP, Nagpal SJ, Mukhopadhyay D et al. New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(7): 423–433. doi: 10.1038/nrgastro.2013.49.
8. Aggarwal G, Kamada P, Chari ST. Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers. *Pancreas* 2013; 42(2): 198–201. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182592c96.
9. Poruk KE, Firpo MA, Adler DG et al. Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? *Ann Surg* 2013; 257(1): 17–26. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182592c96.
10. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C. Cancer of the pancreas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015. 26 (Suppl 5): v56–v68. doi: 10.1093/annonc/mdv295.
11. Wang G, Lipert RJ, Jain M et al. Detection of the potential pancreatic cancer marker MUC4 in serum using surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chem* 2011; 83(7): 2554–2561. doi: 10.1021/ac102829b.
12. Kaur S, Kumar S, Momi N et al. Mucins in pancreatic cancer and its mic-

- roenvironment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(10): 607–620. doi: 10.1038/nrgastro.2013.120.
13. Horn A, Chakraborty S, Dey P et al. Immunocytochemistry for MUC4 and MUC16 is a useful adjunct in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma on fine-needle aspiration cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137(4): 546–551. doi: 10.5858/arpa.2011-0229-OA.
14. Carrara S, Cangi MG, Arcidiacono PG et al. Mucin expression pattern in pancreatic diseases: findings from EUS-guided fine-needle aspiration biopsies. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(7): 1359–1363. doi: 10.1038/ajg.2011.22.
15. Zhu F, Isaacs NW, Hecht L et al. Raman optical activity: a tool for protein structure analysis. *Structure* 2005; 13(10): 1409–1419.
16. Barron LD, Zhu F, Hecht L et al. Raman optical activity: an incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure. *J Mol Struct* 2007; 834–836(1): 7–16.
17. Berova N, Nakanishi K, Polavarapu PL et al. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc 2012.
18. Schultz NA, Dehendorf C, Jensen BV et al. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA* 2014; 311(4): 392–404. doi: 10.1001/jama.2013.284664.
19. Tatarovič M, Synytsya A, Štovičková L et al. The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(5): 1335–1342. doi: 10.1007/s00216-014-8358-7.
20. Synytsya A, Judexová M, Hrubý T et al. Analysis of human blood plasma and hen egg white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(16): 5441–5453. doi: 10.1007/s00216-013-6946-6.
21. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E et al. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012; 23 (Suppl 7): vii33–vii40.
22. Tempero MA, Arnoletti JP, Behrman S et al. Pancreatic adenocarcinoma. *Journal Natl Compr Canc Netw* 2010; 8(9): 972–1017.
23. Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J et al. Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim Acta, Part A* 2003; 59(10): 2207–2212.
24. Parker SF, Tavender SM, Dixon NM et al. Raman spectrum of beta-carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): implications for the characterization of conjugated polyenes. *Appl Spectrosc* 1999; 53(1): 86–91.
25. Kinalwa MN, Blanch EW, Doig AJ. Accurate determination of protein secondary structure content from Raman and Raman optical activity spectra. *Anal Chem* 2010; 82(15): 6347–6349. doi: 10.1021/ac101334h.
26. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 2008; 89(5): 392–400.
27. Hirst JD, Colella K, Gilbert AT. Electronic circular dichroism of proteins from first-principles calculations. *J Phys Chem B* 2003; 107: 11813–11819.
28. Molina V, Visa L, Conill C et al. CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2012; 33(3): 799–807. doi: 10.1007/s13277-011-0297-8.
29. Kim JE, Lee KT, Lee JK et al. 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.
30. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: an evidence-based appraisal. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3(2): 105–119. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021.
31. Itzkowitz SH, Kim YS. New carbohydrate tumor markers. *Gastroenterology* 1986; 90(2): 491–494.
32. Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R et al. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol* 2010; 21(3): 441–447. doi: 10.1093/annonc/mdp332.
33. Baine M. Pancreatic cancer biomarkers. In: *Encyclopedia of Cancer*. Heidelberg: Springer 2009: 790–805.
34. Gao L, He SB, Li DC. Effects of miR-16 plus CA 19-9 detections on pancreatic cancer diagnostic performance. *Clin Lab* 2014; 60(1): 73–77.
35. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012; 148(1–2): 349–361. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.025.
36. Rhim AD, Thege FI, Santana SM et al. Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 647–651. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.007.
37. Apte MV, Wilson JS, Lugea A et al. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology* 2013; 144(6): 1210–1219.
38. He XY, Yuan YZ. Advances in pancreatic cancer research: moving towards early detection. *World J Gastroenterol* 2014; 20(32): 11241–11248. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11241.

Tato studie byla realizována v rámci projektů Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR (NT 13638, NT 14254-3 a NT 13259-3), Grantové agentury Ministerstva obrany ČR (MO 1012) a Grantové agentury ČR (P208/11/0105). Práce byla dále podpořena Operačními programy Praha – Konkurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/22197 a CZ.2.16/3.1.00/21537), Národním programem udržitelosti (NPU MŠMT – LO1215; 34807/2013) a Účelovou podporou na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT 20/2015).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasláné do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Doručeno/Submitted: 5. 11. 2015
Přijato/Accepted: 30. 11. 2015

MUDr. Bohuš Bunganič
Interní klinika 1. LF UK a ÚVN – VFN
U Vojenské nemocnice 1200
169 02 Praha 6
bohush.bunganic@uvn.cz

Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer

Lucie Habartová¹  | Bohuš Bunganič²  | Michal Tatarkovič¹ | Miroslav Zavoral²  |
Jana Vondroušová³ | Kamila Syslová³  | Vladimír Setnička¹ 

¹Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Prague 6, Czech Republic

²Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Military University Hospital, Charles University, Prague 6, Czech Republic

³Department of Organic Technology, University of Chemistry and Technology Prague, Prague 6, Czech Republic

Correspondence

Lucie Habartová, Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Email: lucie.habartova@vscht.cz

Funding information

Ministry of Defence and Armed Forces of the Czech Republic, Grant/Award Number: MO1012; National Program of Sustainability, Grant/Award Number: LO1601-43760/2015; Operational Program Prague-Competitiveness, Grant/Award Number: CZ.2.16/3.1.00/24503 and CZ.2.16/3.1.00/21537; Specific University Research MSM, Grant/Award Number: 20-SVV/2017; Ministry of Health of the Czech Republic, Grant/Award Number: 16-31028A

Abstract

To enable the early diagnosis of pancreatic cancer, the search for and definition of reliable biomarkers remain a subject of great interest, with the specificity and sensitivity of the currently used biomarkers being below the required values. We tested a novel diagnostic approach for pancreatic cancer based on the specific molecular signature of blood plasma components. To acquire more detailed structural information, structure-sensitive chiroptical methods (electronic circular dichroism and Raman optical activity) were supplemented by conventional Raman and infrared spectroscopies. The obtained spectra were subsequently processed by linear discriminant analysis yielding high values of specificity and sensitivity. In addition, to monitor not only large biomolecules as potential biomarkers but also those of low molecular weight, we conducted an analysis of blood plasma samples by using metabolomics. The achieved results suggest a panel of promising biomarkers for a reliable detection of pancreatic cancer.

KEYWORDS

blood plasma, chiroptical spectroscopy, metabolomics, pancreatic cancer, Raman spectroscopy, spectral biomarker

1 | INTRODUCTION

In terms of mortality, pancreatic cancer (PC) is one of the five most lethal cancers, with a globally reported increasing incidence.^{1,2} Local symptoms (pain, jaundice, cholangitis, and cachexia) appear late and are thus not

[This article is part of the Special Issue: Proceedings 16th International Conference on Chiroptical Spectroscopy, Rennes France 2017. See the first articles for this special issue previously published in Volume 30:4. More special articles will be found in this issue as well as in those to come.]

conductive to a reliable early-stage diagnosis.^{3,4} Although modern imaging methods enable a more accurate diagnosis and new treatment options have improved the overall survival rate in recent decades, the prognosis is extremely unfavorable, with the 5-year survival rate still only 3 to 5%.^{5,6} Thus, the search for early symptoms and specific biomarkers of PC remains a subject of intense research.⁷⁻¹⁰ Without an effective biomarker, it is not possible to propose a screening program for PC with the aim of the positive diagnosis before local, late symptoms occur.

There are thought to be at least 3 groups of patients who could benefit from a screening program for early PC. The first consists of subjects identified by hereditary factors.¹¹ The second, nonhereditary group involves those at danger because of certain specific risk factors (smoking, alcohol consumption, obesity, and chronic pancreatitis).¹² The third group of patients comprises those with new-onset pancreatogenic type 3 diabetes. This group is particularly interesting because these patients can exhibit early PC symptoms, such as changes in glucose homeostasis and weight loss, 2 to 3 years before any local symptoms occur, which represents a large diagnostic window.¹³⁻¹⁵

However, until a reliable biomarker is successfully identified, it is not possible to propose, for any patient group, an effective screening program for early-stage PC that would facilitate the diagnosis before local, late symptoms appear. Although the tumor markers carbohydrate antigen 19-9 (Ca 19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA) have been employed, they are nonspecific for PC. Moreover, the elevated level of Ca 19-9 can be observed only in the late stages of PC.¹⁶ Nevertheless, regardless of the stage of PC, this tumor marker is not expressed in the blood of patients, who lack the Lewis antigen.¹⁷ Currently, most biomarker research is based on proteomics/metabolomics¹⁸ and is primarily focused on single peptides and proteins, such as islet amyloid polypeptide (IAPP),^{19,20} adrenomedullin,⁸ S-100 A8 protein,²¹ or connexin 26.²² Other researchers have compared the ratios of different hormones and peptides, for example, adiponectin/leptin,⁹ proinsulin/C-peptide,²³ IAPP/insulin,²⁰ and glucagon/insulin.²⁴ Despite this extensive effort, the most promising candidate biomarkers exhibit sensitivity and/or specificity that is unsatisfactory for clinical use.

Recently, attention has been focused on PC at the genetic level, with the inspection of micro-RNAs^{7,25} showing a promising diagnostic potential, as well as suggesting that a reliable biomarker panel might emerge from biofluids if innovative approaches are applied.²⁶⁻²⁹ Because biomolecules in human biofluids are already routinely used to determine the biomarkers of several diseases,³⁰ blood plasma seems to be a useful probe also for the screening of PC. Blood plasma is easy to obtain, with minimal invasiveness and simple sample preparation. Combining these features with relatively cheap, fast and reagent-free spectroscopic methods may enable the identification of disease-specific molecular signatures based on spectral pattern recognition.^{31,32} Changes in spectral patterns are usually caused by variations in molecular structure. In the case of plasmatic biomolecules, these structural alterations are triggered by several pathological processes that occur during the pathogenesis of a disease.³³ Unfortunately, few of the currently used diagnostic tools are able to provide information about the structure

of plasmatic biomolecules. Similarly, the use of conventional spectroscopic methods, such as Raman or infrared spectroscopy, has many limitations. The high number of fluorescing entities and low concentrations of molecules of interest represent major drawbacks in the spectroscopic analysis of biofluids.^{31,32}

Nevertheless, many bodily biomolecules and potential biomarkers are chiral. Thus, their structure and behavior is suited to being monitored by chiroptical spectroscopy, which is inherently sensitive to the 3D arrangement of chiral molecules and, thus, better able to identify any subtle conformational changes.^{34,35} In our previous studies,^{27,29} we developed a methodology for the smooth spectroscopic analysis of human blood plasma that combines both conventional and chiroptical forms of spectroscopy.²⁹ We have also successfully applied our methodology to the identification of differences between the blood plasma of healthy subjects and that of patients suffering from type 1 diabetes³⁶ and colon cancer.²⁸

In this study, we combine the structure-sensitive methods of chiroptical and vibrational spectroscopy, specifically Raman optical activity (ROA) and electronic circular dichroism (ECD) with Raman and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopies, to compare the spectral patterns of plasma peptides/proteins and other biomolecules of patients suffering from PC with those of subjects in a control group. We believe that this approach allows us to identify alterations that may be synonymous with PC. In addition to cover a wider range of inspected molecules and to possibly correlate the observed spectral differences with biochemical changes that may occur within blood plasma during PC, we also perform a metabolomic analysis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subjects

For this pilot study, 34 PC patients and 23 healthy control subjects were recruited from the Department of Gastrointestinal Endoscopy at the Internal Clinic of the Military University Hospital and the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic. The average age of PC patients and controls was 66 ± 9 and 61 ± 8 years, respectively. The patients with PC were included in the study after the examination according to established diagnostic standards using endoscopic ultrasound, computed tomography, and/or magnetic resonance imaging. Their biopsy samples were evaluated, and the final diagnosis was established by a histopathologist. All patients with PC met the clinical criteria³⁷ for stages III and IV, with the average survival rate of ~200 days. A group of healthy controls was selected based on repeated clinical follow-up in the outpatient clinic, where

mainly preventive examinations were indicated. The healthy subjects were included in the study after a thorough evaluation of their medical record history, clinical examination, and the outcome of imaging methods (abdominal sonography and thoracic examination of the chest). Blood samples were collected from both studied groups and subjected to a routine biochemical test along with the assessment of human serum albumin, total protein, fasting plasma glucose, and glycated hemoglobin. Cancer biomarker levels (Ca 19-9 and CEA) were measured for the patient group (Table 1).

The study was carried out according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Military University Hospital Prague. A signed informed consent was secured from all subjects.

2.2 | Blood plasma

Venous blood (9 mL) from the studied subjects was collected using sterile, anticoagulant-treated blood collection tubes (BD Vacutainer Systems, UK) at the Department of Gastrointestinal Endoscopy at the Internal Clinic of the Military University Hospital and the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague. The plasma fractions were obtained by centrifugation at 1500×g for 10 minutes and frozen immediately (−80°C). Prior to each analysis at the Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, the plasma samples were thawed at room temperature and filtered through a polyvinylidene difluoride membrane filter with 0.45-μm sized pores (Grace, USA) at 13000×g for 10 minutes to remove any residual particulates.

2.3 | Raman optical activity and Raman spectroscopy

The ROA and Raman spectra were acquired simultaneously using the ChiralRAMAN-2X™ spectrometer (BioTools Inc., USA) equipped with an Opus 2W/mpc6000 system (Laser Quantum, UK) with a 532-nm excitation. The filtered plasma samples (100 μL) were measured in a 4 × 4 × 10 mm optical cell with an antireflective coating (BioTools Inc., USA), which was placed in

a home-made Peltier cell holder to control sample temperature (15°C). To obtain reliable spectra with a resolution of ~7 cm^{−1} in the 2500 to 90 cm^{−1} spectral region, we have developed a measurement procedure²⁹ consisting of the addition of a fluorescence quencher (10 mg NaI per 100 μL of plasma), 12-hour laser irradiation of the sample (280 mW of real laser power on the sample) to expedite fluorescence quenching, and spectra acquisition (250 mW, 24 h). The illumination period for the measurements was set according to the optimal working range of the CCD detector (1–2.5 s depending on individual samples).²⁹ The laser power on the sample was monitored by using a 1916-R optical power meter with an 818-P sensor (Newport Corporation, USA). To correct the raw ROA/Raman spectra for residual baseline distortion, we used fast Fourier transform filter²⁹ and a modified procedure described in the literature.³⁸

2.4 | Electronic circular dichroism

The ECD analyses were performed on the J-815 spectrometer (Jasco, Japan) with Peltier-controlled sample temperature (23°C). To facilitate measurements at lower wavelengths, the filtered samples were diluted (1:3 vol/vol) with a sterile phosphate buffer (pH = 7.4). The diluted samples (20 μL) were placed into a 0.01-mm Suprasil quartz cell (Hellma, Germany) and measured in the 185- to 280-nm spectral region. Six scans with a data pitch of 0.1 nm were accumulated for each sample and averaged in the Spectra Analysis module of the Spectra Manager program, ver. 2.6.0.1 (Jasco, Japan).

2.5 | Infrared spectroscopy

The FTIR spectra were acquired on the Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo Scientific, USA) with a ZnSe crystal as ATR accessory. The filtered samples (10 μL) were analyzed without any additional pretreatment. Five hundred and twelve scans were collected to create each individual spectrum with a resolution of 4 cm^{−1} in the mid-IR region (4000–400 cm^{−1}). Water and water vapor spectra measured under identical conditions were subtracted from all sample spectra. Linear baseline correction was performed in the OMNIC 32 program, ver. 8.2 (Thermo Scientific, USA).

TABLE 1 Selected biochemical parameters assessed from blood of patients with pancreatic cancer and healthy controls

	HSA [g L ^{−1}]	Total Protein [g L ^{−1}]	HbA _{1c} [mmol mol ^{−1}]	FPG [mmol L ^{−1}]	Ca 19-9 [kU L ^{−1}]	CEA [μg L ^{−1}]
Patient	21.6–45.7	42.1–77.0	28.0–97.0	4.6–24.6	0.8–64,310.0	0.6–118.0
Control	36.6–48.9	60.8–74.9	33.0–38.0	4.9–5.9	N/A	N/A

Ca indicates carbohydrate antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; FPG, fasting plasma glucose; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; HSA, human serum albumin.

All optical cells were cleaned prior to and after the spectral measurements with a Starna CellClean solution (Starna Scientific Ltd., UK), repeatedly rinsed with demineralized water and methanol, and dried.

2.6 | Statistical data evaluation

To discriminate between the PC patients and healthy controls, the obtained spectral data sets were evaluated by linear discriminant analysis (LDA) in the XLSTAT software (Addinsoft, France). A statistical model was created for selected spectral regions that include significant information about the structure of plasmatic proteins and other biomolecules. Sensitivity and specificity of the mathematical model were determined. To verify the reliability thereof, leave-one-out cross-validation^{39,40} was performed and receiver operator characteristics⁴¹ was calculated.

2.7 | Metabolomic analysis

The blood plasma samples of 5 randomly selected PC patients and 5 healthy controls were subjected to metabolomics. Two sets of analyses were performed: (i) the detection and quantification of clinically recognized markers of oxidative stress related to cancerous diseases⁴²⁻⁴⁴ and (ii) the identification of other metabolites (multimarker screening) that may be newly considered clinically significant for PC.

For both sets of experiments, the samples were prepared using the following pretreatment procedure: An extraction solution (200 μL of acetonitrile) was added to the plasma (100 μL). After homogenization and sonication (10 min, room temperature), the resulting solution was centrifuged at 6500 $\times g$ and 4°C. While the supernatant was analyzed without further processing in the case of multimarker screening, the sample for the detection of oxidative stress markers was stripped out with nitrogen to dryness and dissolved in 450 μL of borate buffer (pH = 8.9). Subsequently, 50 μL of a derivatization reagent (3-aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate in acetonitrile at a concentration of 1 mg mL⁻¹) was added to the sample, and the mixture was incubated for 10 minutes at room temperature.

For the detection of oxidative stress markers, we used a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry system consisting of an Accela 1250 pump, Open Accela autosampler, and a TSQ Vantage mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). The analytes were separated on a Gemini C18-NX column (150 \times 2 mm \times 5 μm ; Phenomenex, USA) with a mobile phase containing a 10-mM aqueous solution of ammonium acetate (solvent A) and acetonitrile (solvent B) in a

gradient elution. The high-performance liquid chromatography (HPLC) elution program was as follows: 70% A (10 min) followed by 30% A (linear decrease over 15 min, held for 5 min) and 70% A (linear increase over 2 min, held for 8 min). The flow rate on the column was 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. The column and sample temperatures were maintained at 25 and 4°C, respectively. The injection volume was 10 μL . For the quantification of substances of interest, the mass spectrometer was used in a negative electrospray ionization mode (ESI⁻) and the triple quadrupole was set to a highly selective single reaction monitoring mode. The optimal conditions for the analysis comprised a spray voltage of -3000 V, ion transfer tube and HESI vaporizer temperatures of 350°C, a sheath gas (nitrogen) pressure of 35 psi, and nitrogen as auxiliary gas. The data were acquired and processed using the Xcalibur 2.2.0 software (Thermo Scientific, USA). The detected markers were quantified using commercially available standards thereof, ie, 8-iso-prostaglandin F_{2 α} (8-isoprostane); leukotriene B₄; Cysteinyl Leukotriene HPLC Mixture I containing leukotrienes C₄, D₄, and E₄; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-hydroxyguanosine; and 3-nitrotyrosine purchased from Cayman Chemical, USA and 3-chlorotyrosine and ortho-tyrosine (o-Tyr) from Sigma-Aldrich, Germany.

The multimarker screening was performed using a liquid chromatography electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry system consisting of an Accela 600 pump, Accela autosampler, and an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). The analytes were separated on a Gemini C18-NX column (150 \times 2 mm \times 5 μm ; Phenomenex, USA) with a mobile phase containing a 10-mM aqueous solution of ammonium acetate (solvent A) and acetonitrile (solvent B) in a gradient elution. The HPLC elution was programmed as 90% A (5 min) followed by 10% A (linear decrease over 15 min, held for 10 min) and 90% A (linear increase over 5 min, held for 10 min). The flow rate on the column was 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. The column temperature was maintained at 25°C and the sample temperature at 4°C. The injection volume was 10 μL . The mass spectrometer was operated in negative (ESI⁻) or positive (ESI⁺) ionization modes and in a full scan mode (100–2000 Da) with high resolution (>50000). The experimental conditions were as follows: a spray voltage of 2500 V/3000 V, ion transfer tube and HESI vaporizer temperatures of 350°C, a sheath gas (nitrogen) pressure of 35 psi, and nitrogen as auxiliary gas. The data were acquired with the Xcalibur 2.2.0 software (Thermo Scientific, USA). Using a control method to compare the trend, the obtained chromatograms were evaluated by the SIEVE 2.1 software (Thermo Scientific, USA) set to the following parameters: a framing of 0 to 30 minutes, an *m/z* of 80 to 1000 Da, a frame time width

of 0.5 to 1.5 minutes, an m/z width of 10 ppm, a threshold of 10 to 100 k counts, and a frame maximum of 5 to 50 k counts. To identify molecules (metabolites) in the selected frames, Human Metabolome Database⁴⁵ was used.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Raman optical activity

The ROA spectra of blood plasma (Figure 1) showed several bands in the amide I ($1630\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$; C=O stretch of the peptide bond) and extended amide III ($1230\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$; in-phase combination of in-plane N–H and C_{α} –H bends with a small contribution of C_{α} –N stretch of the peptide bond) regions.^{46–48} The extended amide III region is of particular importance in ROA due to its very high sensitivity to molecule geometry provided by the coupling between N–H and C_{α} –H vibrations.⁴⁸ The negative-positive amide I couplet at $(-)$ 1645 and $(+)$ 1674 cm^{-1} is characteristic of proteins with prevailing α -helical conformation. With the progression of the disease, we observed an intensity increase within the negative 1645- cm^{-1} band. On the other hand, extended amide III bands at 1311 and 1345 cm^{-1} exhibited lower intensities, as well as a change of relative intensities. These variations might be connected with the destruction of pancreatic cells during different stages of PC. Intensity and/or pattern changes of other spectral bands were also observed, for example, within positive bands at 898 and 945 cm^{-1} that confirm the prevailing α -helical conformation of plasmatic proteins,⁴⁸ a negative 1248 cm^{-1} band reflecting more β -components,⁴⁹ or a negative band at 1442 cm^{-1} indicating aliphatic side chains. The variations of these bands may demonstrate the disruption of serum albumin folding mechanism and/or

structure. The prominent positive bands at 1156 and 1517 cm^{-1} can be assigned to plasma carotenoids, which overlap with the bands of aromatic amino-acid residues.⁴⁷ In the case of PC patients, the significant intensity decrease within these bands suggests enormous utilization of carotenoids to resist oxidative stress within the tumor-affected tissue. The presence of oxidative stress during PC was proved by metabolomics (see Section 3.6), in which significantly elevated levels of oxidative stress markers were detected, ie, 8-isoprostan and o-Tyr.

3.2 | Electronic circular dichroism

The average ECD spectra (Figure 2) are dominated by a single positive band (192 nm) and 2 partially overlapping negative bands (209, 222 nm), the slightly decreased intensities of which were observed in the case of the PC patients. These bands represent electronic transitions of the peptide bond in proteins,³⁴ and their intensities and band shapes vary depending on the peptide backbone geometry.^{50,51} The overall spectral pattern of the ECD spectra is typical for proteins with a predominant α -helical conformation^{34,47} probably due to a high content of albumin, as an α -helical protein, in blood plasma ($\sim 60\%$ of total protein).³⁰ Thus, lower band intensities may correspond with partial albumin misfolding or the decrease in albumin level during the development of PC (Table 1).

3.3 | Raman spectroscopy

The average Raman spectra (Figure 3) show 3 pronounced bands corresponding primarily to the C–C and C=C vibrations of carotenoids (1006, 1156, and 1517 cm^{-1}).^{47,52–54} Although carotenoids are only present

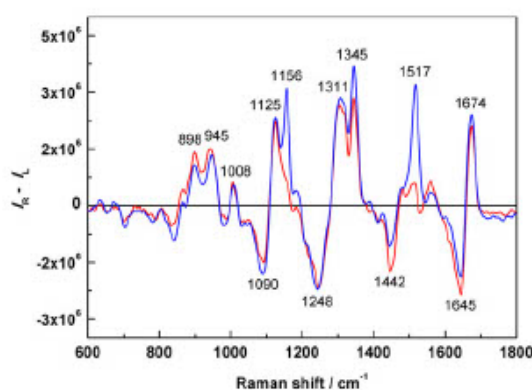


FIGURE 1 Average Raman optical activity spectra of blood plasma of patients with pancreatic cancer (red; $n = 34$) and healthy controls (blue; $n = 23$)

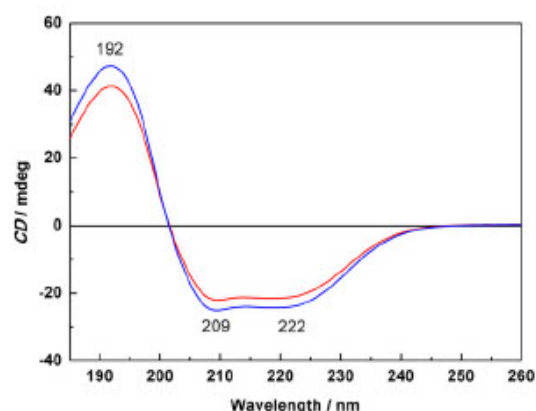


FIGURE 2 Average electronic circular dichroism spectra of blood plasma of patients with pancreatic cancer (red; $n = 34$) and healthy controls (blue; $n = 23$)

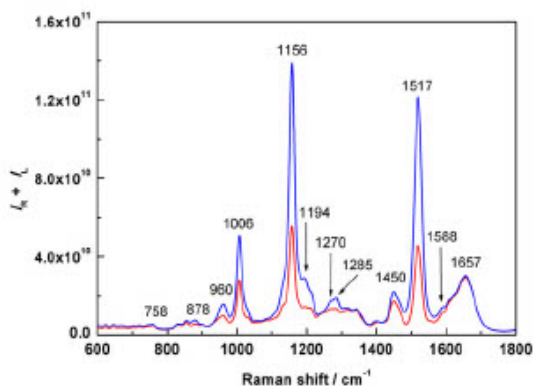


FIGURE 3 Average Raman spectra of blood plasma of patients with pancreatic cancer (red; $n = 34$) and healthy controls (blue; $n = 23$)

in blood plasma at low concentrations,⁵⁵ a resonance enhancement of their band intensities occurs with excitation in the visible spectral range (532 nm).^{29,52} We observed significant changes within the carotenoid bands, lower Raman intensities of which were typical for the PC patients. Moreover, in some stage IV samples, very low intensity or even no carotenoid bands were observed. These findings suggest that carotenoids may play a role in the development and progress of PC. Exhibiting strong antioxidant properties, carotenoids are apparently used to diminish the destructive impact of oxidative stress building up in the close proximity to the growing tumor. Other spectral differences between the PC patients and healthy controls were detected in the extended amide III region (1230–1350 cm^{-1}), arising from the combination of N–H and C_α –H bending vibrations of the peptide bond.^{47–49} The bands at 1270 and 1285 cm^{-1} significantly decreased in intensity within the patient spectra, which indicates a major change in protein secondary structure and may point to partial protein misfolding and the loss of their correct biological function in the case of PC. Variations were also observed in the relative intensities of the 878/855 cm^{-1} and 758/747 cm^{-1} bands that are connected with the vibrations of protein side chains and also C–C and C–N groups of the peptide backbone. As expected, neither intensity nor shape variations were observed at the 1657 cm^{-1} band in the amide I region representing the C=O stretch of the peptide bond. Further spectral bands can be assigned to vibrations of glycoprotein moieties (960 cm^{-1}),⁴⁷ side chain CH_3 and CH_2 groups overlapping with phospholipids (1450 cm^{-1}), tryptophan and phenylalanine residues (1588, 1196, and 1006 cm^{-1} overlapping with carotenoids).⁴⁷ Changes within most of these bands most likely reflect the differences between the metabolic status of the PC patients and that of the healthy controls.

3.4 | Infrared spectroscopy

Figure 4 shows the average FTIR spectra dominated by 2 intense bands with their maxima at ~ 1649 and 1547 cm^{-1} . The intensity and shape of the 1649 cm^{-1} band localized in the amide I region are significantly influenced by the type and content of protein secondary structure.⁵⁶ The second band at 1547 cm^{-1} arises from out-of-phase N–H in-plane bending and C_α –N stretching of the peptide bond, the so-called amide II.^{56,57} Slightly lower intensities of both bands in the spectra of PC patients may again indicate variations in the secondary structure of plasmatic proteins. However, differences in the spectral pattern were observed primarily within the amide I region. With the progression of PC, the band at 1649 cm^{-1} with a shoulder at 1639 cm^{-1} broadened, generating a single band with a maximum at 1645 cm^{-1} . Such band shifting/broadening is evidence of a possible variation in the secondary structure and, thus, of the increasing level of unordered or β -sheet segments in PC patient plasma. Similar observations were made in the case of other spectroscopies, which suggests structural alterations of plasmatic proteins connected with the pathological processes during PC.

The spectra of patients and controls overlap in other studied regions, eg, 1448 cm^{-1} (CH_3 and CH_2 bend of phospholipids and protein side chains) and 1260 to 1390 cm^{-1} (phospholipids overlapping with cholesterol and COO^- stretch of proteins).⁵⁸

3.5 | Linear discriminant analysis

To detect all differences included in the spectra, some of which could not be easily observed by the naked eye, the obtained data sets were processed by means of

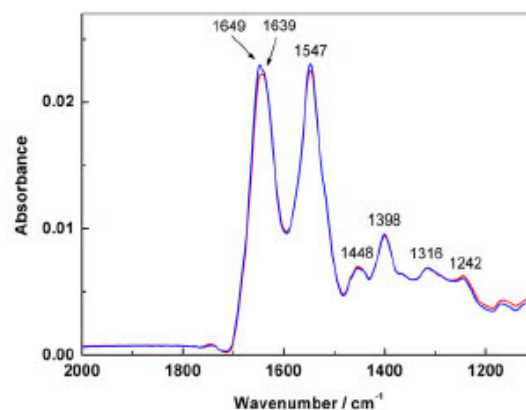


FIGURE 4 Average Fourier transform infrared spectra of blood plasma from patients with pancreatic cancer (red; $n = 34$) and healthy controls (blue; $n = 23$)

statistical evaluation. Linear discriminant analysis was performed using spectral bands (Table 2) that reflect primarily protein secondary structure. The band selection was based on the evaluation of correlation and covariance matrices. The main aims of LDA were to differentiate the PC patients from healthy controls by spectral pattern recognition, to assess the sensitivity and specificity of the spectroscopic methods used, and to establish the reliability of our statistical model.

Because the highly structure-sensitive chiroptical spectroscopy provides additional information to the conventional vibrational spectroscopy, we created a statistical model that combines spectral data of all techniques used (ROA, ECD, Raman, and FTIR). Prior to the combination, statistical evaluation was carried out also for individual spectroscopies (Figure S1 and Table S1) but provided unsatisfactory results. The studied groups overlapped significantly, causing inaccurate sample discrimination. Although the highest sensitivity (~91%) was reached for Raman spectroscopy, specificities for all individual methods were rather low (~48–74%), which is insufficient for clinical applications. In the combined model, the differences in the FTIR spectra represented rather a drawback. We even found that the FTIR data acted merely as an extra load in the statistical model, which caused a slightly lower classification accuracy if compared to a model excluding FTIR (Table S2). Therefore, the final combined statistical model comprised only spectral data acquired in ROA, ECD, and Raman.

Sample discrimination according to the clinical diagnosis is shown in Figure 5. To emphasize the differences between individual samples and groups of samples, the

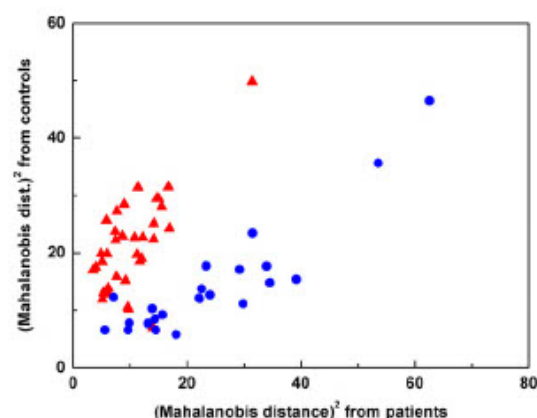


FIGURE 5 Graphical representation of results of linear discriminant analysis for the combination of Raman optical activity, electronic circular dichroism, and Raman spectroscopies showing the differentiation between patients with pancreatic cancer (\blacktriangle ; red, $n = 34$) and healthy controls (\bullet ; blue, $n = 23$)

LDA results are plotted in squared Mahalanobis distances.⁵⁹ The combined statistical model leads to significant classification improvement in comparison with individual techniques, and we observed good separation of the PC patients from the control group, with the overall accuracy exceeding 90%. The achieved results were verified by leave-one-out cross-validation (Table 3), using which 2 healthy controls were misclassified, yielding a specificity of 91%. Three patients from the total of 34 were not classified correctly (91% sensitivity), and thus, the overall accuracy after cross-validation reached 91%. In fact, the receiver operator characteristics curve

TABLE 2 Positions and assignment of spectral bands selected for LDA

Method	Band Position		Assignment	
ROA	898	cm ⁻¹	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CN})$	Peptide backbone in proteins
	1248	cm ⁻¹	$\delta(\text{N-H}), \delta(\text{C-H})$	Amide III in proteins: unhydrated β -sheet
	1311	cm ⁻¹	$\delta(\text{CH})$	Proteins: hydrated α -helix
	1345	cm ⁻¹	$\tau(\text{CH}_2), \delta(\text{CH})$	Proteins: unhydrated α -helix
	1442	cm ⁻¹	CH_2/CH_3	Protein side chains (overlap with phospholipids)
	1645	cm ⁻¹	$\nu(\text{C=O})$	Amide I in proteins
ECD	192	nm	$\pi-\pi^*$	Peptide bond in proteins
	209	nm	$n-\pi^*$	Peptide bond in proteins
	222	nm	$n-\pi^*$	Peptide bond in proteins
Raman	758	cm ⁻¹	$\delta(\text{CH})_{\text{ring}}$	Peptide backbone in proteins/Trp
	878	cm ⁻¹	Skeletal $\text{C}_\alpha-\text{C}, \text{C}-\text{N}$	Peptide backbone in proteins/Trp, Arg side chains
	1194	cm ⁻¹	$\delta(\text{CH})$	Trp, Phe
	1270	cm ⁻¹	$\delta(\text{N-H}), \delta(\text{C-H})$	Amide III in proteins
	1285	cm ⁻¹	$\delta(\text{N-H}), \delta(\text{C-H})$	Amide III in proteins
	1588	cm ⁻¹	$\nu(\text{CC})$	Tyr, Trp, Phe
FTIR	1547	cm ⁻¹	$\nu(\text{C}_\alpha-\text{N}), \delta(\text{N-H})$	Amide II in proteins
	1649	cm ⁻¹	$\nu(\text{C=O})$	Amide I in proteins

ECD indicates electronic circular dichroism; FTIR, Fourier transform infrared; LDA, linear discriminant analysis; ROA, Raman optical activity.

TABLE 3 Confusion matrix from linear discriminant analysis cross-validation for patients with pancreatic cancer and healthy controls

From/to	Patient	Control	Total	Correct
Patient	31	3	34	91.2%
Control	2	21	23	91.3%
Total	33	24	57	91.2%

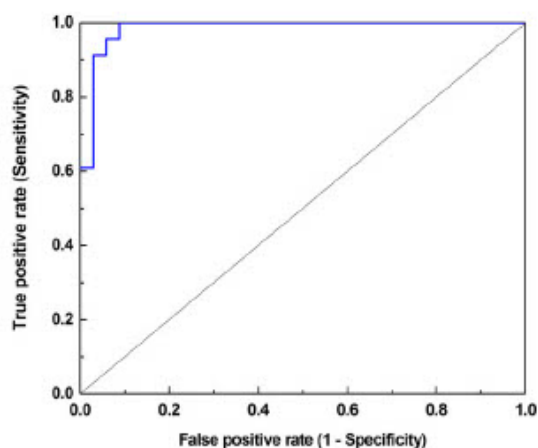


FIGURE 6 Receiver operator characteristics curve (blue) for linear discriminant analysis model after leave-one-out cross-validation differentiating patients with pancreatic cancer and healthy controls; area under the curve = 0.985

(Figure 6) with an area under the curve of 0.985 confirmed a high reliability of the proposed statistical model.

3.6 | Metabolomic analysis

In the first step of metabolomics, we evaluated the levels of clinically recognized markers,⁴² which have not yet

been utilized in PC diagnostics (Table 4). The significantly increased levels of tyrosine derivatives in PC patients, ie, ortho-, chloro-, and nitro-tyrosine, demonstrated the presence of oxidative and/or nitrosative stress,⁴² which is most likely caused by plasmatic protein damage due to the formation of highly reactive species during tumor growth. Oxidative stress along with the disruption of phospholipid membranes were also reflected by a higher level of 8-isoprostane^{60,61} in PC patients. In addition, we observed a possible damage to genetic information, which was indicated by a slight increase of 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxydeoxyguanosine^{61,62} in PC patients. Although the differences within the leukotriene C/D/E₄ cascade were negligible, the activation of the patient immune system⁴³ was expressed by the considerably increased level of leukotriene B₄, the primary inflammation marker.⁴⁴

The second aim of the metabolomic analysis was to identify compounds, the presence or absence of which may be regarded as a unique and typical sign of PC. The detected metabolites were not quantified, yet we compared the intensities of their corresponding *m/z* signals (Figure 7). The vast majority of the identified metabolites are involved in cell signaling, energy management, and maintaining the integrity and/or stability of cell membranes,⁴⁵ all of which are often impaired due to pathological states.

As lysophosphatidylcholine(20:5) is known for its anticancer abilities,⁶³ the enormous *m/z* signal decrease thereof in the PC patients indicated uncontrolled cell proliferation, and tumor growth.⁶⁴ Furthermore, this decrease may also reflect a major disruption of lipid metabolism affecting primarily the lecithin-cholesterol acyltransferase enzyme system in the liver. The almost 20-fold increased intensity of chenodeoxycholic acid in patients confirmed a change in their metabolic status, especially severe disturbances in sterol transport/

TABLE 4 Mean values of clinically recognized metabolomic markers assessed from blood plasma of patients with pancreatic cancer (*n* = 5) and healthy controls (*n* = 5)

Marker	Clinical Significance	Patient	Control
		[pg mL ⁻¹]	[pg mL ⁻¹]
Ortho-tyrosine	Oxidative damage to amino acids	120 ± 9	95 ± 8
3-Chlorotyrosine	Myeloperoxidase-induced damage to proteins	87 ± 8	62 ± 6
3-Nitrotyrosine	Nitrosative stress (NO• radical-induced protein damage)	89 ± 9	49 ± 5
8-Iso-prostaglandin F _{2α}	Oxidative stress, damage to phospholipid membranes	54 ± 5	34 ± 4
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	Damage to genetic information in DNA	54 ± 5	49 ± 5
8-Hydroxyguanosine	Damage to genetic information in RNA	59 ± 5	48 ± 4
Leukotriene C/D/E ₄ cascade	Allergic reaction	41 ± 4	45 ± 4
Leukotriene B ₄	Inflammation	52 ± 6	34 ± 2

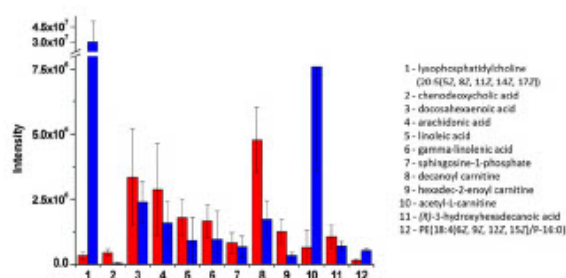


FIGURE 7 Average intensities of the m/z signal of metabolites identified in the blood plasma of patients with pancreatic cancer (red) and healthy controls (blue). The error bars indicate standard deviation

metabolism and in the modulation of lipid secretion, as well as the presence of icterus (jaundice). Given the potent toxic properties of this bile acid,⁴⁵ the observed signal intensities may also suggest a significant contribution to membrane disintegration in the case of PC.

The disruption of cell membrane function leading to inflammation and immune activation was reflected by docosahexaenoic acid and metabolites thereof (arachidonic, linoleic, and gamma-linolenic acids). Their elevated intensities were detected in the blood plasma of PC patients. Docosahexaenoic acid itself takes part in the reduction of insulin resistance,⁴⁵ one of the main factors contributing to diabetes mellitus, which is closely connected with PC. The arachidonic, linoleic, and gamma-linolenic acids act as components of prostaglandin metabolism, therefore having proinflammatory and immunoactive properties. The production of prostaglandin and leukotriene metabolites *via* cytochrome P450 pathway is altered in diabetes and may be reflected for the most part by changes in arachidonic acid levels.⁴⁵ The inflammatory response in PC patients was also confirmed by the presence of sphingosine-1-phosphate, which regulates the production of eicosanoids and the induction of cyclooxygenase-2. Moreover, sphingosine-1-phosphate is involved in the calcium signaling pathway, which is responsible for cell survival, growth and proliferation.⁴⁵

The approximately 3-fold higher intensity of the m/z signal was observed for decanoyl carnitine and hexadec-2-enoyl carnitine within the patient group. As the fatty acid metabolism may be disrupted during PC, these carnitines are unable to fulfill their biological function therein and thus remain in blood plasma. However, acetyl-L-carnitine, another modulator of fatty acid metabolism, showed more than 10-fold lower intensity in the case of PC than in the control group. In fact, a dramatic depletion of acetyl-L-carnitine was shown in diabetic individuals,⁶⁵ which is in correlation with the basic idea of impaired glucose tolerance in most PC patients.¹³

4 | CONCLUSION

Using a unique combination of chiroptical and vibrational spectroscopies for the analysis of blood plasma, we have successfully identified the spectral regions that are most likely affected by the pathological processes of PC. According to our observations, the most significant spectral differences between the blood plasma of PC patients and healthy controls occur in spectral regions primarily reflecting the changes in protein secondary structure. In addition, we found obvious spectral signs of the disruption of lipid metabolism that are presumably related to diabetes accompanying and/or preceding PC. Moreover, the very low intensities of carotenoid bands in the Raman spectra of PC patients might be related to progression of the disease and thus considered a spectral biomarker of PC. Statistical data analysis showed good discrimination between the studied groups and confirmed the quality and reliability of the proposed model (specificity and sensitivity exceeding 90%). The metabolomics analyses confirmed significant changes on the cellular/molecular level leading especially to oxidative stress and the disruption of lipid metabolism and energetic management during PC. Apart from the detection of clinically recognized oxidative stress markers (8-isoprostane and tyrosine derivatives), whose connection to cancer was proven in several cases of lung or breast carcinomas, we also identified molecules (lysophosphatidylcholine, decanoyl carnitine etc) that have not yet been linked to PC. The achieved results suggest that the uncommon combination of spectroscopy and metabolomics has strong potential to establish a biomarker panel that would facilitate the diagnosis of PC.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was realized within grant no. 16-31028A provided by the Ministry of Health of the Czech Republic and partially supported by Specific University Research MSMT (no. 20-SVV/2017 - A1_FCHI_2017_003 and A2_FCHI_2017_001). The authors also thank for the partial support by Operational Program Prague-Competitiveness (CZ.2.16/3.1.00/21537 and CZ.2.16/3.1.00/24503) and the National Program of Sustainability (NPU MSMT LO1601-43760/2015). Further financial support by the Ministry of Defence and Armed Forces of the Czech Republic (no. MO1012) is also gratefully acknowledged.

ORCID

Lucie Habartová <http://orcid.org/0000-0003-0973-0635>
 Bohuš Bunganič <http://orcid.org/0000-0002-2870-7003>
 Miroslav Zavoral <http://orcid.org/0000-0001-7883-7431>
 Kamila Syslová <http://orcid.org/0000-0001-7791-2874>
 Vladimír Setnička <http://orcid.org/0000-0002-9615-7955>

REFERENCES

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA-Cancer J Clin.* 2017;67:7-30.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014;74:2913-2921.
- Fric P, Zavoral M. Early diagnosis of pancreatic adenocarcinoma: role of stroma, surface proteases, and glucose homeostatic agents. *Pancreas.* 2013;41:663-670.
- Pannala R, Leibson CL, Rabe KG, et al. Temporal association of changes in fasting blood glucose and body mass index with diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:2318-2325.
- Kenner BJ, Chari ST, Maitra A, et al. Early detection of pancreatic cancer—a defined future using lessons from other cancers. *Pancreas.* 2016;45:1073-1079.
- Egawa S, Toma H, Ohigashi H, et al. Japan Pancreatic Cancer Registry: 30th year anniversary: Japan pancreas society. *Pancreas.* 2012;41:985-992.
- Allegra A, Alonci A, Campo S, et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol.* 2012;41:1897-1912.
- Aggarwal G, Ramachandran V, Javeed N, et al. Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice. *Gastroenterology.* 2012;143:1510-1517.e1.
- Krechler T, Zeman M, Vecka M, et al. Leptin and adiponectin in pancreatic cancer: connection with diabetes mellitus. *Neoplasma.* 2011;58:58-64.
- Frič P, Šedo A, Škrha J, et al. Early detection of sporadic pancreatic cancer: time for change. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017;29:885-891.
- Zhou B, Xu J-W, Cheng Y-G, et al. Early detection of pancreatic cancer: where are we now and where are we going? *Int J Cancer.* 2017;141:231-241.
- Hanada K, Okazaki A, Hirano N, et al. Diagnostic strategies for early pancreatic cancer. *J Gastroenterol.* 2015;50:147-154.
- Andersen DK, Korc M, Petersen GM, et al. Diabetes, pancreatogenic diabetes, and pancreatic cancer. *Diabetes.* 2017;66:1103-1110.
- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology.* 2008;134:95-101.
- Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* 2009;10:88-95.
- Poruk KE, Firpo MA, Adler DG, Mulvihill SJ. Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? *Ann Surg.* 2013;257:17-26.
- Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (Ca 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33:266-270.
- Sun C, Rosendahl AH, Ansari D, Andersson R. Proteome-based biomarkers in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17:4845-4852.
- Chari ST, Klee GG, Miller LJ, Raimondo M, DiMagna EP. Islet amyloid peptide is not a satisfactory marker for detecting pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2001;121:640-645.
- Mäkimmattila S, Hietaniemi K, Kiviluoto T, Timonen T, Yki-Järvinen H. In vivo glucose-stimulated amylin secretion is increased in nondiabetic patients with pancreatic cancer. *Metabolism.* 2001;50:1036-1042.
- Basso D, Greco E, Fogar P, et al. Pancreatic cancer-derived S100A8 N-terminal peptide: a diabetes cure? *Clin Chim Acta.* 2006;372:120-128.
- Pfeffer F, Koczan D, Adam U, et al. Expression of connexin26 in islets of Langerhans is associated with impaired glucose tolerance in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004;29:284-290.
- Nakamori S, Ishikawa O, Ohigashi H, et al. Increased blood proinsulin and decreased C-peptide levels in patients with pancreatic cancer. *Hepato-Gastroenterology.* 1999;46:16-24.
- Kolb A, Rieder S, Born D, et al. Glucagon/insulin ratio as a potential biomarker for pancreatic cancer in patients with new-onset diabetes mellitus. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:1527-1533.
- Joshi GK, Deitz-McElyea S, Johnson M, Mali S, Korc M, Sardar R. Highly specific plasmonic biosensors for ultrasensitive microRNA detection in plasma from pancreatic cancer patients. *Nano Lett.* 2014;14:6955-6963.
- Radon TP, Massat NJ, Jones R, et al. Identification of a three-biomarker panel in urine for early detection of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21:3512-3521.
- Tatarkovič M, Fišar Z, Raboch J, Jiráček R, Setnička V. Can chiroptical spectroscopy be used for the analysis of blood plasma? *Chirality.* 2012;24:951-955.
- Tatarkovič M, Miškovičová M, Štovičková L, Synytsya A, Petruželka L, Setnička V. The potential of chiroptical and vibrational spectroscopy of blood plasma for the discrimination between colon cancer patients and the control group. *Analyst.* 2015;140:2287-2293.
- Tatarkovič M, Synytsya A, Štovičková L, et al. The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:1335-1342.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper's Illustrated Biochemistry.* New York: McGraw-Hill; 2003.
- Lasch P, Kneipp J (Eds). *Biomedical Vibrational Spectroscopy.* New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2008.
- Mitchell AL, Gajjar KB, Theophilou G, Martin FL, Martin-Hirsch PL. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *J Biophotonics.* 2014;7:153-165.
- Schipper HM, Kwok CS, Rosendahl SM, et al. Spectroscopy of human plasma for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Biomark Med.* 2008;2:229-238.
- Berova N, Nakanishi K, Polavarapu PL, Woody RW (Eds). *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy: Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products,*

- and *Biomolecules*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.; 2012.
35. Nafie LA. *Vibrational Optical Activity*. Chichester: John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
36. Štovičková L, Tatarkovič M, Logerová H, Vavřinec J, Setnička V. Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. *Analyst*. 2015;140:2266-2272.
37. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Eds). *TNM Classification of Malignant Tumours*. Eighth ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2016.
38. Člupěk M, Matějka P, Volka K. Noise reduction in Raman spectra: finite impulse response versus Savitzky-Golay smoothing. *J Raman Spectrosc*. 2007;38:1174-1179.
39. Sammut C, Webb GI (Eds). *Encyclopedia of Machine Learning*. New York: Springer; 2010.
40. Dunne RA. Linear discriminant analysis. In: Dunne RA, ed. *A Statistical Approach to Neural Networks for Pattern Recognition*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2006:19-34.
41. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recogn Lett*. 2006;27:861-874.
42. Syslová K, Běhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longevity*. 2014;2014:1-14.
43. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature Clin Pract Cardiovasc Med*. 2002;420:860-867.
44. Kim YR, Park MK, Kang GJ, et al. Leukotriene B₄ induces EMT and vimentin expression in Panc-1 pancreatic cancer cells: involvement of BLT2 via ERK2 activation. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids*. 2016;115:67-76.
45. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, et al. HMDB 3.0—the Human Metabolome Database in 2013. *Nucl Acids Res*. 2013;41:D801-D807.
46. Zhu F, Isaacs NW, Hecht L, Barron LD. Raman optical activity: a tool for protein structure analysis. *Structure*. 2005;13:1409-1419.
47. Synytsya A, Judexová M, Hrubý T, et al. Analysis of human blood plasma and hen egg-white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Anal Bional Chem*. 2013;405:5441-5453.
48. Barron LD, Zhu F, Hecht L, Tranter GE, Isaacs NW. Raman optical activity: an incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure. *J Mol Struct*. 2007;834-836:7-16.
49. Kinalwa MN, Blanch EW, Doig AJ. Accurate determination of protein secondary structure content from Raman and Raman optical activity spectra. *Anal Chem*. 2010;82:6347-6349.
50. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*. 2008;89:392-400.
51. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*. 2005;1751:119-139.
52. Feldt L, Pacáková V, Štulík K, Volka K. Reliability of carotenoid analyses: a review. *Curr Anal Chem*. 2005;1:93-102.
53. Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J, Edwards HGM, de Oliveira LFC. Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim Acta, Part A*. 2003;59:2207-2212.
54. Parker SF, Tavender SM, Dixon NM, Herman HK, Williams KPJ, Maddams WF. Raman spectrum of beta-carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): implications for the characterization of conjugated polyenes. *Appl Spectrosc*. 1999;53:86-91.
55. Parker RS. Carotenoids in human blood and tissues. *J Nutr*. 1989;119:101-104.
56. Daidone I, Aschi M, Zanetti-Polzi L, Di Nola A, Amadei A. On the origin of IR spectral changes upon protein folding. *Chem Phys Lett*. 2010;488:213-218.
57. Carmona P, Molina M, Calero M, et al. Infrared spectroscopic analysis of mononuclear leukocytes in peripheral blood from Alzheimer's disease patients. *Anal Bional Chem*. 2012;402:2015-2021.
58. Piva JAAC, Silva JLR, Raniero L, Martin AA, Bohr HG, Jalkanen KJ. Overview of the use of theory to understand infrared and Raman spectra and images of biomolecules: colorectal cancer as an example. *Theor Chem Acc*. 2011;130:1261-1273.
59. De Maesschalck R, Jouan-Rimbaud D, Massart DL. The Mahalanobis distance. *Chemom Intel Lab Syst*. 2000;50:1-18.
60. Loeffler DA, Klaver AC, Coffey MP, Aasly JO, LeWitt PA. Increased oxidative stress markers in cerebrospinal fluid from healthy subjects with Parkinson's disease-associated LRRK2 gene mutations. *Front Aging Neurosci*. 2017;3:89-96.
61. Liou SH, Wu WT, Liao HY, et al. Global DNA methylation and oxidative stress biomarkers in workers exposed to metal oxide nanoparticles. *J Hazard Mater*. 2017;5:329-335.
62. Dabrowska N, Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26:155-166.
63. Ross T, Jakubzig B, Grundmann M, et al. The molecular mechanism by which saturated lysophosphatidylcholine attenuates the metastatic capacity of melanoma cells. *FEBS Open Bio*. 2016;6:1297-1309.
64. Akita H, Ritchie SA, Takemasa I, et al. Serum metabolite profiling for the detection of pancreatic cancer: results of a large independent validation study. *Pancreas*. 2016;45:1418-1423.
65. Thorne Research Inc. Monograph on acetyl carnitine. *Alt Med Rev*. 1999;4:439.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Habartová L, Bunganič B, Tatarkovič M, et al. Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer. *Chirality*. 2018;30:581-591. <https://doi.org/10.1002/chir.22834>