

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

POSTGRADUÁLNÍ DOKTORSKÉ STUDIUM BIOMEDICÍNY

OBOROVÁ RADA: BIOLOGIE A PATOLOGIE BUŇKY



**Detekce genových variací ve vybraných onkogenech a tumor supresorových
genech jako markerů časných stadií karcinomu slinivky břišní**

autoreferát disertační práce

Cyril Šálek

Praha 2009

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

POSTGRADUÁLNÍ DOKTORSKÉ STUDIUM BIOMEDICÍNY

OBOROVÁ RADA: BIOLOGIE A PATOLOGIE BUŇKY

**Detekce genových variací ve vybraných onkogenech a tumor supresorových
genech jako markerů časných stadií karcinomu slinivky břišní**

autoreferát disertační práce

Cyril Šálek

Praha 2009

Disertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního studia biomedicíny na Interní klinice 1. LF UK a ÚVN Praha a v laboratoři molekulární genetiky a onkologie Genomac International s.r.o. v Praze.

Uchazeč: MUDr. Mgr. Cyril Šálek
Adresa: Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
Telefon: 221 977 365
Fax: 221 977 249
e-mail: cyril.salek@uhkt.cz

Oborová rada: Biologie a patologie buňky
Předseda oborové rady: prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.
Školitel: prof. MUDr. Miroslav Zavoral, Ph.D.
Školitel – konzultant: RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíle práce	4
3. Materiál a metodika	5
4. Výsledky a diskuse	7
5. Závěry	10
6. Summary	14
7. Literatura	16
8. Přehled publikační a odborné aktivity	18

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CDK = cyklin-dependentní kináza

DPC4 = deleted in pancreatic carcinoma (též SMAD4)

EUS = endoskopická ultrasonografie

EUS-FNA = aspirace tenkou jehlou provedená pod endosonografickou kontrolou

FNA = aspirace tenkou jehlou (fine needle aspiration)

KRAS = Kirsten rat sarcoma 2 viral onkogen

LOH = ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity)

PanIN = pankreatická intraepiteliální neoplasie

STR = mikrosatelitní markery (short tandem repeats)

TGF- β = transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)

1. ÚVOD

Přes významný pokrok v diagnostických technologiích a terapeutických metodách zůstává prognóza pacientů s karcinomem pankreatu za poslední půl století téměř nezměněna.⁽¹⁾ Jeho incidence se prakticky rovná mortalitě, což je především důsledkem pozdní diagnózy onemocnění. V roce 2000 bylo v Evropě diagnostikováno 60 139 nových případů, 64 801 pacientů na tuto diagnózu zemřelo.⁽²⁾ V České republice bylo v roce 2005 diagnostikováno 1777 nových případů, incidence v mužské populaci činila 18,1/100.000, v ženské 16,7/100.000; zemřelo 1808 pacientů, mortalita v mužské populaci dosáhla 18,7/100.000, v ženské 16,7/100.000.⁽³⁾ Medián přežití pacientů s generalizovaným onemocněním činí 3–5 měsíců; k radikálnímu resekcímu výkonu je indikováno 10–15 % nemocných, medián přežití v této skupině dosahuje 11–15 měsíců.⁽⁴⁾ Jelikož karcinom pankreatu je považován za genetické onemocnění, jsou naděje na včasnou diagnózu i racionální volbu terapeutických modalit vkládány do genetického testování a výzkumu.⁽⁵⁾

Časnou a nejčastěji popisovanou genetickou změnou v karcinomu pankreatu jsou aktivující mutace onkogenu KRAS. Byly popsány ve více než 80 % pokročilých karcinomů.⁽⁶⁾ V onkogenezi karcinomu pankreatu se v časové posloupnosti za mutacemi KRAS objevují inaktivující variace v řadě tumor supresorových genů: *p16* (také znám jako CDKN2 nebo INK4A), lokalizovaném na chromosomu 9p; DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma, popisovaný také jako SMAD4), přítomném na chromosomu 18q. Jsou inaktivovány v 90 % (*p16*) a 55 % (DPC4) karcinomech pankreatu, a představují tak potenciální molekulární markery malignity slinivky břišní.^(7,8) Mutace v tumor supresorovém genu *p53* jsou popisovány v 50 % případů⁽⁹⁾. Zvýšená exprese onkogenu HER-2/neu je důsledkem zvýšené transkripce, nikoliv genové amplifikace.⁽¹⁰⁾ Proto je mutační analýza metodou nevhodnou k posuzování funkčního stavu tohoto genu. Všechny výše uvedené genové variace byly detekovány již v premaligních lézích slinivky břišní (pankreatická intraepiteliální neoplasie, PanIN).

Výše popsané genové změny zásadním způsobem ovlivňují kontrolu buněčného cyklu. Jejich mutace umožňují defektní buněčné populaci nekontrolované se množit. Onkogen KRAS kóduje GTP-vazebný protein zodpovědný za signalizaci v MAP-kinázové kaskádě buněčné signalizace.⁽¹¹⁾ Tumor supresorový gen *p53* kóduje proteinový produkt, jenž reguluje transkripci dalších regulačních proteinů, jako například proteinu p21, klíčového inhibitoru komplexu cyklinu D s cyklin-dependentní kinázou 2 (CDK2).⁽¹²⁾ Produkt dalšího tumor supresorového genu, *p16*, váže komplexy cyklinu D s CDK4 nebo CDK6, čímž reguluje

progresi buněčného cyklu v kontrolním bodě buněčného cyklu na přechodu mezi postmitotickou a syntetickou fází (G1).⁽¹³⁾ Tumor supresorový gen DPC4 je členem rodiny Smad proteinů, jejichž interakce podmiňují buněčný přenos signálu v kaskádě transformující růstový faktor beta (transforming growth factor – TGF-β).⁽¹⁴⁾

Moderní diagnostické přístupy spočívají v evaluaci morfologických změn parenchymu slinivky břišní a v současném histologickém, popřípadě cytologickém vyšetření materiálu získaného aspirací tenkou jehlou (fine needle aspiration – FNA). Tyto metody jsou do jisté míry subjektivní a značně závislé na zkušenostech vyšetřujícího subjektu. Byla publikována řada prací, které potvrdily zvýšenou validitu protokolů, které v diagnostice maligních ložiskových lézí pankreatu kombinují morfologické a genetické metody.⁽¹⁵⁾

KRAS je nejčastěji studovaným genem v karcinomu pankreatu. Jeho prevalence se udává 90-95 %. Senzitivita genetických testů značně závisí na metodologii a materiálu, ze kterého je DNA izolována. Dosahuje 61-89 % v pankreatické šťávě,^(16,17) 72 až 83 % v kartáčové cytologii z Wirsungova vývodu,^(18,19) 35 % v plazmě,⁽²⁰⁾ 33 % ve žluči,⁽²¹⁾ 25 % v aspirátu z duodena.⁽²²⁾ Testy na přítomnost mutací ve stolici dosáhly vyšší senzitivity než testy ze žluče, jsou však značně nespecifické.⁽²³⁾ Uspokojivá specificita byla dosažena pouze v materiálu z kartáčové cytologie a pankreatické šťávy (77-100 %).

Pro vysokou záchytnost KRAS mutací v pankreatické šťávě byly v tomto materiálu studovány také variace v jiných genech. Senzitivita a specificita genetických testů v pankreatické šťávě je 61-89 % a 33-96 % pro KRAS, 11-43 % a 70-100 % pro *p16*, 14-47 % a 88-100 % pro *p53*, 36-70 % a 39-100 % pro DPC4.⁽²⁴⁾

Dosud bylo publikováno jen malé množství prací studujících frekvenci genových variací v materiálu EUS-asistované FNA. Zatím nejrozsáhlejší je japonská studie publikovaná v roce 2005, která sledovala pouze přítomnost mutací KRAS a na skupině 62 pacientů dosáhla 74% senzitivity a 100% specificity.⁽²⁵⁾

2. CÍLE PRÁCE

• četnost, senzitivita a specificita genových variací

Cílem práce je popis frekvence mutací v onkogenu KRAS, tumor supresorovém genu *p53* a alelických ztrát na chromosomech 9p (lokus genu *p16*) a 18q (lokus genu DPC4) v DNA získané z materiálu EUS-navigované aspirace tenkou jehlou (EUS-FNA) tkáně karcinomu pankreatu. Získané četnosti mutací budou porovnány se zjištěným výskytem příslušných

genových variací ve vzorcích pacientů s chronickou pankreatitidou za účelem odhadu specifity výskytu jednotlivých mutací v karcinomu pankreatu. Současně budou srovnány s publikovanými frekvencemi výskytu jednotlivých mutací v pankreatické šťávě.

- **optimalizace molekulárněgenetických metod pro zpřesnění diagnostiky karcinomu pankreatu**

Bude optimalizována a do klinické praxe zavedena metodika detekce relevantních genových variací přímo v pankreatické tkáni, získané aspirací tenkou jehlou pod endosonografickou kontrolou (EUS-FNA). Data budou vyhodnocena se záměrem vytipovat dostatečně senzitivní a specifický test pro diferenciaci maligní léze, využitelný zejména v případech, kdy endoskopická ultrasonografie (EUS) a cytologie samy nejsou schopny rozlišit mezi benigní a maligní diagnózou.

- **zhodnocení prognostického významu sledovaných mutací**

Vedlejším cílem práce je zhodnocení dat získaných molekulárněgenetickou analýzou vzorků tenkojehlových aspirátů karcinomu pankreatu a korelovat spektrum jednotlivých mutací se statistikami přežití. Záměrem je vytipovat molekulárně genetický test, který by mohl být klinicky využitelný jako prognostický marker.

3. MATERIÁL A METODIKA

Do studie bylo zařazeno 106 konsekutivních pacientů s ložiskovým procesem pankreatu, kteří od ledna 2003 do dubna 2006 podstoupili endosonograficky navigovanou tenkojehlovou biopsii. Definitivní diagnóza byla stanovena na základě histologického hodnocení chirurgického resekátu nebo dlouhodobého ambulantního sledování u neoperovaných pacientů. Po vyřazení pěti pacientů z důvodu zjištění jiné diagnózy nebo maligní duplicity čítal statistický soubor 101 osob (63 mužů a 38 žen, střední věk 60 ± 12 let, rozpětí 32 - 84 let), z nichž u 81 byl diagnostikován karcinom pankreatu a u 20 chronická pankreatitida. V 18 případech byly hodnoceny jak vzorky získané při EUS-asistované FNA, tak peroperační biopsie. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii a s genetickou analýzou jejich biologického materiálu.

EUS vyšetření bylo prováděno jedním zkušeným endosonografistou za použití radiálních a lineárních sond (Olympus GF-UM 20 a GF-UCT 140). Kvalita tenkojehlového

aspirátu byla po obarvení rychlou hematoxylinovou-eosinovou řadou okamžitě ověřena on-site cytologem. Definitivní evaluaci cytologických nátěrů provedl zkušený patolog po obarvení zbylých nátěrů metodou dle Giemsy. Tytéž nátěry byly následně podstoupeny ke genetické analýze.

DNA byla izolována z cytologických nátěrů po laserové mikrodisekci nádorově, popřípadě zánětlivě změněných duktálních epitelů (laserový mikrodisektor P.A.L.M., Carl Zeiss). Z každého nátěru bylo získáno 100–200 buněk. Mutační analýza byla zaměřena na kodony 12 a 13 v exonu 1 onkogenu KRAS a exony 5–8 genu *p53*. Příslušné úseky extrahované DNA byly amplifikovány metodou polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) za použití fluorescenčně značených primerů. Přítomnost mutací byla detekována citlivou metodou separace heteroduplexů s využitím kapilární elektroforézy v cyklujícím teplotním gradientu.⁽²⁶⁾

Metodika izolace DNA z cytologických nátěrů a detekce bodových mutací v onkogenu KRAS pomocí kapilární elektroforézy v cyklujícím teplotním gradientu byla optimalizována v rámci pilotní studie na prvních 35 pacientech. Tyto zkušenosti byly publikovány separátně: Šálek C., Zavoral M., Benešová-Mináriková L. et al. *Detection of K-ras mutations in pancreatic cancer samples collected by fine needle aspiration biopsy: an intermediate report on the first results and experience*. Folia Gastroenterol Hepatol 2004; 2: 150-155.

Alelické delece byly monitorovány metodou detekce ztráty heterozygosity (loss of heterozygosity, LOH) sady 3 mikrosatelitních markerů (STR) na krátkém raménku 9. chromosomu v místě lokace genu *p16* (D9S157, D9S171, D9S1748) a sady 2 STR na dlouhém raménku 18. chromosomu v místě lokace genu *DPC4* (D18S363, D18S474). Pro vyhodnocení byl porovnáván signál amplifikátů DNA nádorové tkáně se signálem získaným z DNA leukocytů téhož pacienta.

Statistická analýza byla provedena metodou dvou- a vícerozměrných kontingenčních tabulek za použití softwaru BMDP PC90 a MedCalc. K výpočtu hodnot senzitivity a specificity byly zvoleny 95% intervaly spolehlivosti relativních četností. Statistiky přežití byly počítány pomocí Kaplanova-Meierova odhadu funkce přežití a Mantelova-Coxova testu pro hodnocení shody křivek přežití. Molekulárněgenetická data byla porovnána se statistikami přežití pomocí χ^2 testu ve dvourozměrných kontingenčních tabulkách a Yatesovy korekce.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Endosonografické vyšetření umožnilo jednoznačně hodnotit 89 % ložiskových lézí pankreatu. Bylo dosaženo 79% senzitivity a 77% specificity, 5 % případů bylo falešně negativních, 4 % falešně pozitivní. Ve zbylých 11 % případů nebyl endoskopista schopen na základě endosonografického obrazu diferencovat mezi maligním a benigním charakterem ložiska.

Hodnocení cytologických nátěrů získaných EUS-FNA bylo podkladem pro stanovení cytopatologické diagnózy v 74 % případů. V této skupině dosáhlo 75% senzitivity a 85% specificity. Pozitivní i negativní prediktivní hodnota dosáhly 100 %. Žádný ze vzorků pocházejících z maligní léze tedy nebyl označen jako benigní a vice versa. Zbylých 26 % vzorků patolog hodnotil jako nekonkluzivní; nebyl tedy schopen rozlišit mezi karcinomem pankreatu a chronickou pankreatitidou.

Histologické vyšetření chirurgického resekátu bylo provedeno u 18 pacientů. Bylo dosaženo 95% senzitivity a 100% specificity. Jeden resekát (3 %) pocházející z maligní léze byl hodnocen falešně negativně.

Aktivující mutace v onkogenu KRAS byly nalezeny v 57 karcinomech a v FNA žádné chronické pankreatitidy (tab. 1). Senzitivita testu dosáhla 70 %, specificita 100 %. Dvacet čtyři (30 %) případů bylo falešně negativních. Mutace v tumor supresorovém genu *p53* byly detekovány jen v 19 z celkových 81 případů karcinomu pankreatu. Senzitivita byla jen 24 %, specificita 90 %.

Delece krátkého raménka 9. chromosomu v místě lokalizace genu *p16* byly detekovány metodou ztrát heterozygoty (LOH). Bylo dosaženo senzitivity 85 % a specificity 64 % (tab. 2). Pro detekci inaktivace tumor supresorového genu *DPC4* byla zvolena metoda LOH se zaměřením na genový lokus 18q. Senzitivita metody dosáhla 78 %, specificita 57 % (tab. 3). Jeden pacient byl homozygotní pro všechny ze tří vybraných markerů pro sledování fenoménu LOH v oblasti 18q, tudíž nebyl touto metodou vyšetřitelný.

Výsledky potvrdily ústřední postavení EUS v diagnostice, diferenciální diagnostice a eventuálně stagingu ložiskových lézí pankreatu.⁽²⁷⁾ Pozitivní a negativní prediktivní hodnota cytologického vyšetření FNA vzorků dosáhla 100 %. Tento fakt odráží vysokou efektivitu vyšetřovacího protokolu, kdy je EUS-FNA prováděna ve specializovaném centru s evaluací tenkojehlového aspirátu on-site a definitivním hodnocením patologem zkušeným v pankreatické cytodiagnostice. Získané výsledky screeningu mutací v onkogenu KRAS detekovaných v materiálu FNA jsou srovnatelné s dříve publikovanými výsledky

v pankreatické šťávě.^(28,29) Studie potvrdila 100% specifitu detekce mutací KRAS pro karcinom pankreatu.⁽²⁵⁾

Sledování alelických ztrát na chromosomech 9p a 18q přineslo velmi slibné výsledky. Aplikace této metody na materiál FNA nebyla dosud v odborné literatuře publikována. Citlivost metody zásadně profitovala z izolace DNA z buněk získaných laserovou mikrodisekcí cytologických nátěrů.

Z dosavadního stavu znalostí genetických procesů v karcinomu pankreatu je zřejmé, že k diagnostickým účelům není samostatně dostačující žádný ze známých genů a že je třeba typizovat vhodnou kombinaci genových testů, která by měla uspokojivou senzitivitu i specifitu.⁽³⁰⁾ Ve studii byly nejlepší výsledky získány pro kombinaci KRAS a LOH 9p, kde senzitivita dosáhla 92 % a specifita 64 %. Těsně následovala kombinace KRAS a LOH 18q se senzitivitou 92 % a specifitou 57 %. Kombinace LOH v obou sledovaných chromosomových lokusech dosáhla senzitivity 92 % a specifity 43 %. Senzitivita této kombinace je srovnatelná s kombinací KRAS a jakéhokoliv ze dvou LOH lokusů, specifita je však výrazně nižší (tab. 4).

Trojkombová mutační analýza onkogenu KRAS s monitorací alelických ztrát v lokusech 9p a 18q vykazuje senzitivitu 96 % a specifitu 43 %. Rozšířením kombinačního testu KRAS + LOH 9p o monitoraci LOH 18q dojde k navýšení senzitivity z 92 % na 96 %, tento zisk je však významně kompromitován významným poklesem specifity z 64 % na 43 % (tab. 4).

U 18 pacientů byly hodnoceny genetické změny v materiálu FNA i peroperační biopsii. Míra detekce mutací KRAS v obou typech vzorků nevykazovala statisticky významný rozdíl ($p < 0,001$). Vyšší senzitivita pro testy LOH v materiálu FNA dosáhla hranice statistické významnosti ($p < 0,001$ pro 9p, $p < 0,10$ pro 18q). Tato skutečnost může být podmíněna faktem, že peroperační biopsické vzorky byly podstoupeny ke genetické analýze bez předchozího mikroskopického vyhodnocení, a skutečností, že DNA byla extrahována z celého tkáňového materiálu poskytnutého chirurgem bez výběru nádorových buněk, například metodou laserové mikrodisekce.

V podskupině 53 pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu (klinické stádium III a IV dle WHO) byly statistiky přežití korelovány se spektrem zjištěných mutací. Soubor se skládal z 28 mužů a 25 žen, rozpětí věku bylo 40–85 let. Medián přežití ve skupině s mutací onkogenu KRAS byl $7,0 \pm 2,4$ měsíců (95% CI 2,3–11,7), ve skupině bez mutace KRAS dosahoval $10,0 \pm 0,6$ měsíců (95% CI 8,7–11,3). Medián přežití ve skupině s mutací v genu *p53* byl $10,0 \pm 2,2$ měsíců (95% CI 5,6–14,4), ve skupině s nemutovaným genem *p53* dosahoval

6,0±2,5 měsíců (95% CI 1,1–10,9). Medián přežití ve skupině s potvrzenou ztrátou heterozygoty na chromosomu 9p byl 9,0±5,1 měsíců (95% CI 0–18,9), ve skupině bez zjištěné LOH 9p činil 10,0±5,0 měsíců (95% CI 0,2–19,8). Medián přežití ve skupině s potvrzenou LOH na chromosomu 18q byl 10,0±4,2 měsíců (95% CI 1,8–18,2), ve skupině bez zjištěné LOH 18q dosahoval 3,0±1,3 měsíců (95% CI 0,5–5,5). Po úpravě dat pomocí Coxova proporčního modelu rizik nebyl žádný z vyšetřovaných molekulárních markerů identifikován jako nezávislý prognostický marker pro přežití pacientů s karcinomem pankreatu.

Tabulka 1. Test na přítomnost mutací v genu KRAS

	chronická pankreatitida, n(%)	karcinom pankreatu, n(%)	celkem, n(%)
negativní	20 (100)	24 (29,6)	44 (43,6)
pozitivní	0 (0)	57 (70,4)	57 (56,4)
celkem	20 (100)	81 (100)	101 (100)

senzitivita: 70 % 95% CI (60 % – 80 %) $p < 0,001$
specifická: 100 %

Tabulka 2. Test na přítomnost LOH na chromosomu 9p (lokace genu *p16*)

	chronická pankreatitida, n(%)	karcinom pankreatu, n(%)	celkem, n(%)
negativní	9 (64,3)	8 (15,4)	17 (25,8)
pozitivní	5 (35,7)	44 (84,6)	49 (74,2)
celkem	14 (100)	52 (100)	66 (100)

senzitivita: 85 % 95% CI (75 % – 95 %) $p < 0,001$
specifická: 64 % 95% CI (53 % – 75 %)

Tabulka 3. Test na přítomnost LOH na chromosomu 18q (lokace genu *DPC4*)

	chronická pankreatitida, n(%)	karcinom pankreatu, n(%)	celkem, n(%)
negativní	8 (57,1)	11 (22,4)	19 (30,2)
pozitivní	6 (42,9)	38 (77,6)	44 (69,8)
celkem	14 (100)	49 (100)	63 (100)

senzitivita: 78 % 95% CI (67 % – 89 %) $p < 0,05$
specifická: 57 % 95% CI (45 % – 69 %)

Tabulka 4. Kombinace testů

kombinace testů			95% konfid. interval	<i>p</i>
KRAS + LOH 9p	senzitivita	92 %	85 % – 99 %	<0,001
	specifická	64 %	53 % – 75 %	
KRAS + LOH 18q	senzitivita	92 %	85 % – 99 %	<0,001
	specifická	57 %	45 % – 69 %	
LOH 9p + LOH 18q	senzitivita	92 %	85 % – 99 %	<0,01
	specifická	43 %	31 % – 55 %	
KRAS + <i>p53</i>	senzitivita	74 %	65 % – 83 %	<0,001
	specifická	90 %	85 % – 95 %	
KRAS + LOH 9p + LOH 18q	senzitivita	96 %	92 % – 100 %	<0,001
	specifická	43 %	31 % – 55 %	
<i>p53</i> + LOH 9p + LOH 18q	senzitivita	92 %	85 % – 99 %	<0,001
	specifická	43 %	31 % – 55 %	

5. ZÁVĚRY

Hlavní závěry:

Výsledky screeningu mutací v onkogenu KRAS detekovaných v materiálu FNA jsou srovnatelné s dříve publikovanými frekvencemi záchytu mutací v pankreatické šťávě. Senzitivita testu dosáhla 70 %, studie potvrdila 100 % specifickost mutací KRAS pro karcinom pankreatu v diferenciální diagnostice od zánětlivých lézí.

Sledování alelických ztrát na chromosomech 9p a 18q přineslo velmi slibné výsledky, problematická je však nedostatečná specifická testů.

Z dosavadního stavu znalostí frekvence známých mutací v karcinomu pankreatu je zřejmé, že k diagnostickým účelům není samostatně dostačující žádný ze známých genů. Z kombinančních testů v naší studii vyšlo nejlépe spojení testu na přítomnost mutací v onkogenu KRAS spolu s testem LOH v lokusu 9p (senzitivita 92 %, specifická 64 %).

Po zhodnocení výsledků této studie byl navržen diagnostický algoritmus, který kombinuje cytologické hodnocení FNA nátěru s molekulárněgenetickými testy tak, aby byla minimalizována možnost falešně negativního nálezu při zachované senzitivitě. V prvním kroku navrhuje hodnotit FNA nátěry získané EUS navigovanou punkcí ložiska (100% pozitivní i negativní prediktivní hodnota), k hodnocení molekulárněgenetických testů pak

navrhujeme podstoupit jen nekonkluzivní nátěry, z nichž izolujeme DNA a hodnotíme v druhém kroku přítomnost aktivujících mutací onkogenu KRAS (100% specificita). KRAS negativní vzorky pak testujeme na přítomnost alelických ztrát v lokusech 9p a 18q. Po aplikaci tohoto algoritmu na soubor sledovaných 101 pacientů byla malignita správně určena u všech pacientů s potvrzeným karcinomem pankreatu, žádný pacient nebyl falešně negativní, jeden byl falešně pozitivní (pro pozitivitu testů na ztráty heterozygozity).

Žádný ze sledovaných molekulárněgenetických testů (mutace KRAS, mutace *p53*, LOH 9p a LOH 18q) není nezávislým prognostickým faktorem pro délku přežití pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu.

Vedlejší zjištění:

Cytologické vyšetření aspirátu pankreatu získaného technikou tenkojehlové punkce pod endosonografickou kontrolou dosáhlo uspokojivé senzitivity a specificity (75 % a 85 %), pozitivní a negativní prediktivní hodnoty byly 100 %. Shledal-li patolog buněčný nátěr jako konklusivní, nehodnotil žádný vzorek z maligní léze jako benigní a naopak. Podmínkou je předběžné hodnocení aspirátu cytologem ihned po odběru materiálu na endoskopickém oddělení a zkušenost patologa, který se pravidelně věnuje pankreatické cytodiagnostice.

Izolace DNA přímo z cytologických nátěrů zvýšila záchytnost genetických odchylek (mutací KRAS a zejména alelických delecí v lokusech 9p a 18q). Osvědčil se tak postup navržený po skončení pilotní studie, kdy všechny nátěry byly barveny metodou dle Giemsky, vyšetřeny patologem a následně podstoupeny do molekulárněgenetické laboratoře. DNA byla izolována přímo ze suspektních buněk separovaných metodou laserové mikrodisekce.

— — —

Diskepance mezi objemem nových poznatků o biologické podstatě karcinomu pankreatu a rychlým klinickým průběhem s neblahou prognózou se prohlubuje celých 15 let od okamžiku, kdy D. S. Klimstra v *American Journal of Pathology* prohlásil adenokarcinom slinivky břišní za geneticky podmíněné onemocnění. Identifikace prekurzorových lézí, jejich morfologická definice a zjištění, že jednotlivá PanIN stádia jsou doprovázena sekvenční akumulací genových variací, vedly k předpokladu, že genetické metody umožní diagnostikovat karcinom pankreatu v časných stádiích choroby, kdy bude možné radikálně

terapeuticky zasáhnout, a tím zlepšit nepříznivé statistiky přežití. Biologický průběh onemocnění však dosud neumožňuje časný karcinom pankreatu klinicky definovat. Ani molekulárněgenetické metody nepřinesly zásadní průlom v chápání pojmu časného karcinomu pankreatu. Studium PanIN lézí je z tohoto hlediska nedostatečné, neboť se zpravidla vyskytují i na periferiích invazivního karcinomu pankreatu a jejich identifikace v tkáni rizikových pacientů (například s chronickou pankreatitidou) je možná jen po resekčním výkonu.

V poslední době se těžiště výzkumného zájmu přesunulo ke sledování expresních profilů tisíců genů v tumorózní tkáni a k následné identifikaci vhodných biomarkerů na bázi cirkulující mRNA a proteinů. Významné jsou i pokroky v oblasti epigenetiky zahrnující především sledování specifické metylace promotorů či potlačení genové exprese na principu RNA interference. Receně publikovaný popis kmenové buňky karcinomu pankreatu dále rozšiřuje prostor k pochopení patofyziologických mechanismů vývoje tohoto fatálního onemocnění. Klinický výzkum se zaměřuje na možnosti biologické léčby. První výsledky z této nové éry studia karcinomu slinivky břišní již pronikly do klinické praxe.

6. SUMMARY

Background: EUS-guided fine needle aspiration cytology (FNA) is standard diagnostic procedure for evaluation of suspicious pancreatic mass. Somatic mutations in DNA extracted from pancreatic FNAs have long been studied as potential molecular markers of malignancy. In this work, some of the most characteristic genetic changes occurring in pancreatic neoplasia from patients undergoing FNA biopsy are examined to reveal their usefulness in routine clinical diagnostic testing.

Aims: To establish an optimum combination of molecular markers resulting in best overall diagnostic sensitivity and specificity. As a secondary aim, molecular data are compared with survival statistics of the patients and their correlation with patients' prognosis is questioned.

Methods: EUS-guided FNA was performed on 101 consecutive patients (63 males, 38 females, 60 ± 12 years; 81 with subsequently diagnosed pancreatic cancer, 20 with chronic pancreatitis) with focal pancreatic mass. Samples were evaluated by rapid H&E staining followed by more detailed assessment using Giemsa staining method. DNA was extracted from Giemsa stained cells selected by laser microdissection and the presence of KRAS and *p53* somatic mutations was tested by CGCE and SSCP techniques. In addition, allelic losses of tumor suppressor genes *p16* (INK4, CDKN2A) and DPC4 (MADH4, SMAD4) were detected by monitoring the loss of heterozygosity (LOH) at 9p and 18q, respectively.

Molecular data of a subset of 53 consecutive patients (28 males, 25 females, 63 ± 10.5 years) with advanced pancreatic cancer (stage III and IV according to WHO classification) who underwent EUS-guided FNA were compared with survival statistics using Kaplan-Meier method.

Results: Sensitivity and specificity of EUS-guided FNA were 75% and 85%, positive and negative predictive value reached 100%. The remaining 26% samples were assigned as inconclusive. Testing of molecular markers revealed sensitivity and specificity of 70% and 100% for KRAS mutations ($p < 0.001$), 24% and 90% for *p53* mutations (NS), 85% and 64% for allelic losses at 9p ($p < 0.001$) and 78% and 57% for allelic losses at 18q ($p < 0.05$). When tests for different molecular markers were combined, the best results were obtained with KRAS + LOH at 9p (92% and 64%, $p < 0.001$), KRAS + LOH at 18q (92% and 57%, $p < 0.001$), and KRAS + LOH 9q + LOH 18q (96% and 43%, $p < 0.001$). When the molecular

markers were used as complements to FNA cytology to evaluate inconclusive samples only, the overall sensitivity of cancer detection was 100% in all patients enrolled in the study.

The median survival in KRAS positive group was 7.0 ± 2.4 months (95% CI 2.3–11.7), in KRAS negatives was 10.0 ± 0.6 months (95% CI 8.7–11.3). The median survival in *p53* positive group was 10.0 ± 2.2 months (95% CI 5.6–14.4), in *p53* negatives was 6.0 ± 2.5 months (95% CI 1.1–10.9). The median survival in LOH 9p positive group was 9.0 ± 5.1 months (95% CI 0–18.9), in LOH 9p negatives was 10.0 ± 5.0 months (95% CI 0.2–19.8). The median survival in LOH 18q positive group was 10.0 ± 4.2 months (95% CI 1.8–18.2), in LOH 18q negatives was 3.0 ± 1.3 months (95% CI 0.5–5.5). After the adjustment for age using Cox proportional hazards model, none of the evaluated molecular markers has shown to be independent prognostic marker for survival of patients with pancreatic cancer.

Conclusions: EUS-guided FNA cytology combined with screening of KRAS mutations and allelic losses of tumor suppressors *p16* and *DPC4* represents a very sensitive approach in screening for pancreatic malignancy. Molecular markers may find be useful particularly in cases where FNA cytology has been inconclusive. None of the studied molecular markers was identified as an independent factor determining survival prognosis.

7. LITERATURA

- 1 Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L. SEER Cancer Statistics Review, 1973–1998. National Cancer Institute : Bethesda, 2001.
- 2 Parkin DM, Bray R, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 (Suppl 8): 4-66.
- 3 Novotvary 2005 ČR. Zdravotnická statistika. ÚZIS, Praha, 2008.
- 4 Alderson D, Johnson CD, Neoptolemos JP, Ainley CC, Bennett MK, Campbell F, Charnley RM. Guidelines for the management of patients with pancreatic cancer, periampullary and ampullary carcinomas. *Gut* 2005; 54 (Suppl. 5): 1-16.
- 5 Real FX, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P. Pancreatic cancer development and progression: Remodeling the model. *Gastroenterology* 2008; 135: 724-728.
- 6 Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 97–101.
- 7 Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 3126–3130.
- 8 Hua Z, Zhang YC, Hu XM, Jia ZG. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2764–2767.
- 9 Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2140-2143.
- 10 Hermanová M, Lukáš Z, Nenutil R, Brázdil J, Kroupová I, Křen L, Pazourková M, Růžička M, Dítě P. Amplification and overexpression of HER-2/neu in invasive ductal carcinomas of the pancreas and pancreatic intraepithelial neoplasms and the relationship to the expression of p21(WAF1/CIP1). *Neoplasma* 2004;51:77-83
- 11 Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424–430.
- 12 Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008; 27: 6507–6521.
- 13 Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 731–737.
- 14 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19: 1745–54.
- 15 Zheng M, Liu LX, Zhu AL, Qi SY, Jiang HC, Xiao ZY. K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 188–191.
- 16 Costentin L, Pages P, Bouisson M, Berthelemy P, Buscail L, Escourrou J, Pradayrol L, Vaysse N. Frequent deletions of tumor suppressor genes in pure pancreatic juice from patients with tumoral or nontumoral pancreatic diseases. *Pancreatology* 2002; 2: 17-25.
- 17 Uehara H, Nakaizumi A, Tatsuta M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Iishi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Okada S, Kakizoe T. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2513-2518.
- 18 Zhou GX, Huang JF, Li ZS, Xu GM, Liu F, Zhang H. Detection of K-ras point mutations and telomerase activity during endoscopic retrograde cholangiopancreatography in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1337-1340.

- 19 van Laethem JL, Vertongen P, Deviere J, van Rampelbergh J, Rickaert F, Cremer M, Robberecht P. Detection of c-Ki-ras gene codon 12 mutations from pancreatic duct brushings in the diagnosis of pancreatic tumours. *Gut* 1995; 36: 781-787.
- 20 Uemura T, Hibi K, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Okochi O, Nagasaka T, Nakao A. Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *J Gastroenterol* 2004; 39: 56-60.
- 21 Trumper L, Menges M, Daus H, Kohler D, Reinhard JO, Sackmann M, Moser C, Sek A, Jacobs G, Zeitz M, Pfreundschuh M. Low sensitivity of the ki-ras polymerase chain reaction for diagnosing pancreatic cancer from pancreatic juice and bile: a multicenter prospective trial. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4331-4337.
- 22 Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ, Yeo CJ, Hruban RH, Slebos RJ. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 96-103.
- 23 Caldas C, Halin SA, da Costa LT, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTSI) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8: 27-32.
- 24 Greenhalf W, Vitone L, Neoptolemos JP. Novel molecular diagnostic strategies: Molecular diagnosis of pancreatic cancer in pancreatic juice. In: Gress TM, Neoptolemos JP, Lemoine NR, Real FX (Eds.) *Exocrine pancreas cancer*. Solvay Pharmaceuticals 2005: 404-425.
- 25 Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 76-79.
- 26 Minárik M, Mináriková L, Hrabíková M, Mináriková P, Hrabal P, Zavoral M. Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. *Electrophoresis* 2004; 25: 1016-1021.
- 27 Helmstaedter L, Riemann JF. Pancreatic cancer – EUS and early diagnosis. *Langenbecks Arch Surg* 2007; 393: 923-927.
- 28 Lu X, Xu T, Qian J, Wen X, Wu D. Detecting K-ras and p53 gene mutation from stool and pancreatic juice for diagnosis of early pancreatic cancer. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 1632-1636.
- 29 Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, Ohtsubo K, Motoo Y, Sawabu N. Detection of p53 gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from patients with pancreatic carcinomas. *Pancreas* 2004; 28: 13-19.
- 30 Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 211-226.

8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ A ODBORNÉ AKTIVITY

Publikované originální práce k tématu disertace:

- Šálek C., Zavoral M., Benešová-Mináriková L., Jelínková M., Nosek V., Minárik M. *Detection of K-ras mutations in pancreatic cancer samples collected by fine needle aspiration biopsy: an intermediate report on the first results and experience.* Folia Gastroenterol Hepatol, 2004; 2(4): 150–155.
- Šálek C., Benešová L., Zavoral M., Nosek V., Kašperová L., Ryska M., Strnad R., Traboulsi E., Minárik M. *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; 13(27): 3714–3720.
- Šálek C., Mináriková P., Benešová L., Nosek V., Strnad R., Zavoral M., Minárik M. *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; accepted for publication.

Další publikace:

- Zavoral M., Šálek C., Ryska M., Novotný J. *Karcinom pankreatu – rizikové faktory, diagnostika a léčba.* In: Programy kvality a standardy léčebných postupů. Verlag Dashöfer, Praha 2004, 15 stran.
- Šálek C. *Nové poznatky k epidemiologii nádorů pankreatu.* Bulletin HPB chirurgie, 2004; 12(3): 86–90.
- Zavoral M., Šálek C. *Karcinom slinivky břišní.* Gastroenterológia pre prax, 2004; 3(1): 28–32.
- Nosek V., Zavoral M., Stehlík J., Šálek C. *Intervenční endoskopická ultrasonografie pankreatu.* Endoskopie, 2004; 10(3): 42–45.
- Zavoral M., Šálek C. *Racionální diagnostika karcinomu pankreatu.* Postgraduální medicína, 2005; 7(1): 18–22.
- Šálek C. *Rizikové faktory.* In: Zavoral M. et al. *Karcinom pankreatu.* Galén, Praha 2005, 21–37.
- Šálek C., Zavoral M., Nosek V., Benešová L., Kašperová L., Traboulsi E., Minárik M. *Přínos genetického testování EUS-navigovaných bioptických vzorků v diferenciální diagnostice ložiskových lézí pankreatu.* Bulletin HPB chirurgie, 2006; 14(3): 100–101.
- Šálek C., Zavoral M., Nosek V., Benešová L., Kašperová L., Ryska M., Strnad R., Traboulsi E., Minárik M. *Detekce somatických mutací onkogenu K-ras a alelických ztrát na chromosomech 9p a 18q zvyšuje diagnostickou výtěžnost EUS-navigované tenkojehlové biopsie u pacientů s ložiskovým postižením pankreatu.* Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2007; 61(1): 11–16.
- Zavoral M., Závada F., Šálek C., Frič P. *Czech Society of Gastroenterology: Colorectal cancer screening in the Czech Republic.* Endoscopy, 2006; 38(5): 550–551.
- Šálek C. *Klasifikace a etiopatogeneze cystických tumorů pankreatu.* Bulletin HPB chirurgie, 2007; 15(1): 32–34.
- Ryska M., Strnad R., Bělina F., Zavoral M., Šálek C., Hrabal P., Buřič I., Lásziková E., Kvičerová H., Jurenka B., Holcátová I. *Radikální resekcce u nemocných s karcinomem hlavy pankreatu. Retrospektivní analýza přežívání u souboru 307 nemocných.* Rozhledy v chirurgii, 2007; 86(8): 432–439.

- Folber F., Šálek C., Doubek M., Maaloufová J., Valová T., Trka J., Gökbüget N., Cetkovský, P., Hoelzer D., Mayer J. *Léčba dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií dle protokolu GMALL 07/2003 v České republice a její výsledky – první zkušenosti dvou center*. Transfuze a hematologie dnes, 2009, přijato k publikaci.

Odborná sdělení vztahující se k tématu disertace:

- Šálek C.: Nové poznatky k epidemiologii nádorů pankreatu. III. brněnský pankreatologický den, Brno 23. 4. 2004.
- Šálek C., Minárik M.: Genetika karcinomu pankreatu – kde jsme a kam směřujeme. Aktuální gastroenterologie XVI, Praha 7. 4. 2005.
- Šálek C., Zavoral M., Benešová L., Minárik M., Nosek V.: Genetika karcinomu pankreatu – předběžné výsledky FNAB. IV. brněnský pankreatologický den, Brno 15. 4. 2005.
- Šálek C., Benešová L., Jelínková M. et al.: Frequency of K-ras Mutations in Fine Needle Aspiration (FNA) Samples of Pancreatic Adenocarcinoma. 37th Meeting of the European Pancreatic Club, Graz 6. 7. - 8. 7. 2005.
- Šálek C. The Role of Genetics in Diagnosing Pancreatic Cancer. 15th Meeting of International Association of Surgeons and Gastroenterologists, Prague 8. 9. - 10. 9. 2005.
- Šálek C., Minárik M., Zavoral M. Genetic Changes in Early Pancreatic Cancer. 40th Annual Meeting of the Society for Clinical Investigation, Prague 15. 3. - 18. 3. 2006.
- Šálek C., Zavoral M., Benešová L. et al.: Genové variace v časném karcinomu pankreatu – výsledky prospektivní studie 120 pacientů. IV. brněnský pankreatologický den, Brno 8. 9. 2006.
- Šálek C., Zavoral M., Nosek V. et al.: Diagnostická hodnota EUS, cytologického a genetického vyšetření u pacientů s karcinomem pankreatu. 9. vzdělávací a diskusní gastroenterologické dny, Karlovy Vary 16. 11. - 18. 11. 2006.
- Šálek C., Fantová L., Benešová L. et al.: Zpřesnění diagnostiky karcinomu pankreatu na základě detekce bodových mutací genů K-ras, p16 a p53 a alelických delecí 9p a 18q. XXXI. brněnské onkologické dny, Brno 23. 4. - 25. 4. 2007.

Další odborná sdělení:

- Šálek C. Klasifikace a etiopatogeneze cystických tumorů pankreatu. XVI. jarní zasedání České společnosti HPB chirurgie, Lohotky 13. 4. 2007.
- Šálek C., Doubek M., Maalouf J. et al.: Léčba dospělých pacientů s ALL protokolem GMALL 07/2003 v ČR. Průběžné zhodnocení výsledků léčby 30 pacientů. XV. česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd, Špindlerův Mlýn 5. 9. - 9. 9. 2008.

Absolvované kurzy:

- Pokroky v molekulární biologii a genetice, 3. 11. - 14. 11. 2003 (doc. Jonák)
- Základy DNA diagnostiky, 19. 1. - 23. 1. 2004 (prof. Brdička)
- Statistika v biomedicinském výzkumu, 2. 2. - 6. 2. 2004 (prof. Zvárová)
- Pokroky v biologii buňky, 8. 2. - 29. 3. 2005 (prof. Raška)

